



**HAL**  
open science

# Mécanismes de la perte osseuse et musculaire avec l'âge et étude du potentiel de l'huile d'olive, de la vitamine D et du DHA pour une stratégie nutritionnelle de prévention

Camille Tagliaferri

## ► To cite this version:

Camille Tagliaferri. Mécanismes de la perte osseuse et musculaire avec l'âge et étude du potentiel de l'huile d'olive, de la vitamine D et du DHA pour une stratégie nutritionnelle de prévention. Alimentation et Nutrition. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT: . tel-02796593

**HAL Id: tel-02796593**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02796593>**

Submitted on 5 Jun 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

*ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Nutrition

soutenue le 14 novembre 2014

**TAGLIAFERRI Camille**

---

Mécanismes de la perte osseuse et musculaire avec l'âge et étude  
du potentiel de l'huile d'olive, de la vitamine D et du DHA pour  
une stratégie nutritionnelle de prévention.

---

Président:

**M. Yves Boirie**, PU-PH, UNH, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand

Rapporteurs:

**M. Jérôme Guicheux**, Directeur de Recherche, INSERM, UMR 791, Université de Nantes, Nantes

**M. Jean-Michel Lecerf**, Chef du service nutrition et professeur associé de l'Institut Pasteur de Lille, Lille

**M. Etienne Lefai**, Chargé de Recherche, INSERM U1060/Université de Lyon 1/INRA U1235, Lyon

Membre:

**Mme Sylvie Breton**, Directeur Recherche et Innovation, Société Lesieur, Asnières-sur-Seine

Co-directeurs de thèse:

**Mme Véronique Coxam**, Directrice de Recherche, UNH, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

**M. Stéphane Walrand**, Directeur de Recherche, UNH, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand



# Remerciements

Tout d'abord, je remercie mes directeurs de thèse Véronique Coxam et Stéphane Walrand pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de mon jury d'avoir accepté de lire et de juger ce manuscrit, j'en suis très honorée et vous exprime ici toute ma reconnaissance. Un grand merci au professeur Yves Boirie, président du jury, ainsi qu'à mes rapporteurs, le docteur Jérôme Guicheux, le docteur Etienne Lefai et le professeur Jean-Michel Lecerf.

Je voudrais remercier Lesieur pour son appui financier ainsi que son appui humain en les personnes de Alain Huertas, Amélie Dhaussy, Sylvie Breton et Dominique Serra.

Je remercie toute l'équipe Alimentation Squelette et Métabolismes dans laquelle j'ai effectuée mes 2 premières années de thèse : Yohann Wittrant, pour les réunions du lundi matin qui m'ont permis de bien avancer dans les travaux de thèse, Marie-Jeanne Davicco, pour sa capacité incroyable à trouver des références, Patrice Lebecque, pour les moments passés dans le bunker et les séjours à Saint-Etienne, Marion Brandolini, pour son appui sur l'étude clinique, Laurent Léotoing, pour ses réponses qui donnaient toujours lieu à de nouvelles questions, Audrey Daneault, d'avoir partagé le même bureau et de nombreux bons moments, Fabien Wauquier, pour son optimisme inégalable, Aurélie Wauquier, pour sa bonne humeur, Mélanie Spilmont, pour le congrès mémorable de Lausanne, ainsi que Claire Philippe, Cédric Darie et Fanny Furlan.

Je souhaite remercier tout particulièrement l'équipe NutriM qui m'a accompagnée tout au long de ma thèse et particulièrement au cours de la dernière année : Jérôme Salles, pour sa disponibilité et ses idées qui ont grandement amélioré la valorisation des résultats, Christelle Guillet pour ses conseils, Olivier Le Bacquer pour ses connaissances sur la voie mTOR et sa bonne humeur, Christophe Giraudet pour son travail, particulièrement lorsque je ne pouvais pas utiliser de produits toxiques, Véronique Patrac, pour les nombreuses extractions d'ARN et PCR, Alexandre Berry, pour les pauses parfois studieuses, Katia Bouton, Marie-Laure Collin, Audrey Chanet, Carla Domingues Costa Faria, Kristell Combe et Yves Boirie. Vous êtes une équipe soudée, efficace, pédagogue dans laquelle j'ai pu trouver du soutien et surtout une passion contagieuse pour la science. Encore un merci particulier à Stéphane Walrand pour sa disponibilité, son efficacité, ses connaissances et ses idées qui permettent de toujours voir les choses du bon côté.

Je tiens à remercier toute l'équipe Unité d'Exploration en Nutrition du Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne : Noël Cano, Nathalie Meunier, Adeline Blot, Françoise Laporte, Amandine Prulière, Dominique Provenchère, Hélène Parrot, Noëlle Lyon-Belgy, Aurélie Caille,



Christophe Montaurier, Véronique Pidou, Guy Manlhiot et Line Wittrant de m'avoir formée à la mise en place et au suivi d'une étude clinique, pour leur patience dans la prise de rendez-vous et leur disponibilité pour rencontrer les volontaires.

Je remercie aussi tous les autres acteurs du projet ANR POLivD3 dont les travaux ont permis de compléter mes travaux de thèse : Marie-Jo Amiot, Jean-François Landrier, Emmanuelle Reboul, Aurélie Goncalves et Stéphane Georgé.

Mes remerciements vont vers l'équipe Installation Expérimentale de Nutrition : Christophe Del'homme, Philippe Lhoste, Philippe Denis, Arlette Cissoire, Mehdi Djelloul-Mazouz, Elie Fournon, Julien Hermet, Anne Terrisse-Lotier, Alexandre Teynie et Benoit Cohade pour leur bienveillance et leur aide dans la réalisation des trois expérimentations animales menées au cours de ma thèse. Je tiens à mettre à l'honneur les 192 rats et les 180 souris ayant permis la réalisation des expérimentations.

Je tiens aussi à remercier Catherine Besson, Denis Roux, Laurence Artige, Isabelle Savary-Auzeloux, Frédéric Capel, Corinne Malpuech-Brugère, Luc Demaison, Jean-Louis Sébédio, Dominique Dardevet, Cécile Boby, Anne De La Foye, Christiane Deval, Dragan Milenkovic, Claudine Manach, Christine Morand, Anne Dutour, Liliane Guidoux, Omar Bouzar, Irène Faria, Corinne Pouyet, Jean-François Martin, Florence Bourges, Jean-François Cougoul, Laurent Beaudonnat, Martine Nunes, Michèle Borel et Hervé Ferluc du centre INRA de Clermont/Theix.

Je remercie également Norbert Laroche, du Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux et Contraintes Mécaniques de m'avoir formée à l'utilisation du microCT à Saint-Etienne.

Merci tout particulièrement à Laurent-Emmanuel Monfoulet pour ton soutien et tes précieux conseils. Tu es quelqu'un d'extraordinaire, passionné avec un esprit scientifique hors du commun.

Je remercie Sylvie Mercier du fond du cœur. Tu as souvent trouvé des solutions insolites pour que le bateau ne coule pas. Tu as une capacité de travail et des compétences incroyables.

Merci à tous mes collègues de bureau du Laboratoire de Nutrition Humaine: la célèbrement connue pour sa discrétion : la « team M » composée de Audrey Chanet, Marlène Magalhaes, Carla Domingues Costa Faria, Alexandre Pinel, Laurie Cubizolles d'avoir répondu à mes questions posées à la volée pendant ma rédaction et pour votre contribution exceptionnelle à mes pauses et aux craquages du vendredi (voire du mardi matin).

Je remercie également les autres (anciens) thésards : Dilek Coban, Anne Duconseille, Sylvain Claude, Aurélie Masgrau, Carole Mast, Roza Leulmi, Marine Gueugneau, Wafa B'chir et tous les Adassiens foteux et volleyeurs qui m'ont permis de me défouler !



Merci à mes amis Sophie, Mathilde, Stéphanie, Cindie, Rachel, Fabrice, Julien, Camille, Rémi, Aurélie, Kévin, Eloïse, Mathieu, Karine, Aurore, Geoffroy, Wilfried, JR, Guillaume, Delphine, Jean-Philippe, Isabelle, Nohlan qui ont toujours su quand il fallait parler thèse ou pas.

Et enfin un grand merci à mes grands-parents, mes parents, mes frères, mes belles-sœurs, ma (très) belle famille, ma toute petite cracotte et Benoit l'amour de ma vie.

**A tous mes grands-pères,**

**Auguste, Antonio, Roger, Albert et Gilbert,**

**Je vous aime du plus profond de mon cœur.**





# Résumé

Les sociétés économiquement développées sont confrontées à la problématique du vieillissement de leur population associée à la recrudescence des pathologies dégénératives. Parmi les manifestations du vieillissement, l'atteinte de l'appareil locomoteur (ostéoporose et sarcopénie) est considérée comme un problème majeur de santé publique. De ce fait, le développement de mesures préventives permettant de préserver la santé des séniors constitue un véritable enjeu de santé publique. La recherche scientifique fournit de nombreuses preuves concernant l'importance de l'alimentation dans la diminution ou l'exacerbation de certaines maladies. Ces observations confirment le vieux concept soutenant que l'adoption d'une alimentation équilibrée permet le maintien d'un état de santé satisfaisant, en particulier avec l'avancée en âge. A ce jour, le potentiel de l'huile d'olive, en tant que telle ou comme vecteur de nutriments lipophiles d'intérêt pour la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose et de la sarcopénie, n'a jamais été testé.

La prévalence de l'ostéoporose étant très supérieure chez la femme ménopausée qui souffre également d'une perte musculaire accélérée, cette population a été ciblée dans la présente étude.

Dans une première étape, des résultats originaux ont été obtenus concernant l'effet de l'ovariectomie sur le métabolisme musculaire. Ainsi, notre travail montre qu'après ablation des ovaires, la synthèse protéique musculaire est réduite, en association avec une diminution d'un marqueur de la protéolyse de ce tissu. Pris dans son ensemble, ces résultats démontrent un ralentissement du renouvellement protéique musculaire suite à l'ovariectomie. En termes de mécanismes mis en jeu, une augmentation de l'infiltration lipidique tissulaire a été observée. En parallèle du ralentissement du renouvellement musculaire après ovariectomie, une augmentation du renouvellement osseux, classiquement décrit dans la littérature, a été mise en évidence.

Dans un second temps, l'effet de l'huile d'olive et plus particulièrement des polyphénols présents dans cet aliment en association avec la vitamine D et l'acide docosahexaénoïque et leur éventuelle synergie a été évalué à l'aide d'un modèle d'ostéoporose post-ménopausique. Des souris ovariectomisées ont été soumises à une des 4 huiles suivantes : huile de maïs, huile d'olive raffinée, huile d'olive extra vierge ou huile de poisson. Pour chaque huile, un groupe supplémentaire de souris ovariectomisées a reçu de l'huile enrichie en vitamine D. Cette étude a permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'association de l'huile d'olive extra vierge et de la vitamine D sur la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la souris. En effet, l'accélération du renouvellement osseux consécutive à la carence estrogénique est freinée par cette association de nutriments, qui diminuent également l'expression des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Les résultats obtenus sont en cours de validation chez l'Homme grâce à une investigation clinique réalisée chez des femmes ménopausées. Celle-ci a été mise en place au cours de ces travaux de thèse.



# Abstract

Economically developed societies face the problem of an aging population combined with the increase in degenerative diseases. Among the signs of aging, musculoskeletal pathologies (osteoporosis and sarcopenia) are considered major public health problems. Therefore, the development of preventive measures to preserve seniors' health is a real public health issue. Scientific research provides ample evidence of the importance of diet in diseases reduction or exacerbation. These observations confirm the old concept arguing that the adoption of a balanced diet helps to maintain a healthy life, especially with advancing age. To date, the potential of the olive oil, as such or as a vector of lipophilic nutrients, for the prevention of osteoporosis and sarcopenia, has never been tested.

As the prevalence of osteoporosis is much higher in postmenopausal women who also suffer from an accelerated muscle mass loss, this population was targeted in this study.

In a first step, original results were obtained regarding the effect of ovariectomy on muscle metabolism. Thus, our work showed that after removal of the ovaries, muscle protein synthesis was reduced in association with a decrease in the expression of a proteolysis marker of this tissue. Taken together, these results suggest a slowing down of muscle protein turnover after ovariectomy. In terms of mechanisms, an increase in lipid tissue infiltration was observed. The slowdown in muscle protein renewal after ovariectomy was associated with an increased bone turnover, classically described in the literature.

In a second step, the effect of olive oil and more particularly its polyphenols in combination with vitamin D and docosahexaenoic acid and their possible synergy was assessed using a postmenopausal osteoporosis model. Ovariectomized mice were subjected to one of the following oils: corn oil, refined olive oil, extra virgin olive oil or fish oil. Four additional groups of ovariectomized mice received the oil fortified with vitamin D. This study demonstrated a protective effect of the combination of virgin olive oil and vitamin D on bone loss induced by ovariectomy in mice. Indeed, the acceleration of the bone turnover induced by the estrogen deficiency was inhibited by this combination of nutrients, which also decreased the expression of oxidative stress and inflammation markers. These results are currently being validated in a clinical investigation conducted in postmenopausal women, which has been established during this thesis work.



# Liste des publications et communications

## Publications

1- Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats

**Tagliaferri, C.**, Salles, J., Landrier, J.F., Giraudet, C., Patrac, V., Lebecque, P., Davicco, M.J., Chanet, A., Pouyet, C., Dhaussy, A., Huertas, A., Boirie, Y., Wittrant, Y. Coxam, V., Walrand, S.

*European Journal of Nutrition, Novembre 2014*

2- Olive oil and vitamin D synergistically prevent bone loss in mice

**Tagliaferri, C.**, Davicco, M.J., Lebecque, P., Georgé, S., Amiot, M.J., Mercier, S., Dhaussy, A., Huertas, A., Walrand, S., Wittrant, Y. Coxam, V.

*PLOS ONE, Décembre 2014*

3- Muscle and bone, two interconnected tissues

**Tagliaferri, C.**, Wittrant, Y., Davicco, M.J., Walrand, S., Coxam, V.

*Soumis au journal Ageing Research Reviews*



## **Communications orales**

**Tagliaferri C.**

*Etude de l'impact de la consommation d'huile d'olive riche en polyphénols, vitamine D et DHA sur la fonction locomotrice*

Journées des doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), INRA, Clermont-Ferrand/Theix, France, 6 septembre 2012

## **Communications affichées**

1- **Tagliaferri, C.**, Wittrant, Y., Walrand, S. et Coxam, V.

*Etude de l'impact de la consommation d'huile d'olive riche en polyphénols et vitamine D sur le tissu osseux*

Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand, France, 12 et 13 Juin 2014

**Obtention du deuxième prix poster**

2- ANR POLivD3

*Etude de l'impact de la consommation d'huile d'olive riche en polyphénols, vitamine D et DHA sur la fonction locomotrice*

Colloque Bilan du Programme National de Recherche en Alimentation (PNRA) pour les éditions 2006 et 2007, Paris, France, 25 au 27 octobre 2011





# Liste des figures

- Figure 1 : Structure de l'os long (Marieb 1999).
- Figure 2 : Structure de la diaphyse d'un os long.
- Figure 3 : Voie de signalisation de la différenciation ostéoclastique : le système OPG/RANK/RANKL.
- Figure 4 : Voie de signalisation de la différenciation ostéoblastique : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.
- Figure 5 : Le réseau lacuno-canaliculaire (Bonewald 2011).
- Figure 6 : Anatomie du muscle strié squelettique (Dominique 2009).
- Figure 7 : La cellule satellite musculaire.
- Figure 8 : Structure du sarcomère, unité de base de la fibre musculaire (Greising, Gransee et al. 2012).
- Figure 9 : Disposition anatomique des muscles de la jambe.
- Figure 10 : Organisation des unités motrices (Campbell and Reece 2004).
- Figure 11 : Structure de la mitochondrie.
- Figure 12 : La chaîne respiratoire mitochondriale.
- Figure 13 : La  $\beta$ -oxydation.
- Figure 14 : Le cycle de Krebs.
- Figure 15 : Mécanisme de la contraction musculaire.
- Figure 16 : Raccourcissement du sarcomère lors de la contraction musculaire.
- Figure 17 : Analyses de fémurs de rats sain à gauche et ovariectomisé à droite obtenues par micro-tomographie numérique.
- Figure 18 : Microarchitecture d'un os trabéculaire normal à gauche et d'un os ostéoporotique à droite.
- Figure 19 : Ostéodensitométrie lombaire (L1 à L4) d'une volontaire saine à gauche et d'une volontaire ostéoporotique à droite.
- Figure 20 : Densitométries à mi-cuisse chez un sujet jeune et un sujet âgé.
- Figure 21 : Algorithme suggéré par l' EWGSOP pour la recherche de cas de sarcopénie chez les personnes âgées (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010).
- Figure 22 : Estimation du nombre de femmes et d'hommes atteints d'ostéoporose en France (d'après Svedbom, Hernlund et al. 2013).
- Figure 23 : Facteurs de risque de l'ostéoporose.
- Figure 24 : Cycle du remodelage osseux (d'après Marie and Halbout 2008).
- Figure 25 : Evolution de la masse osseuse au cours de la vie (Eastell 2013).
- Figure 26 : Les modèles d'induction de l'ostéoporose chez le rat (Lelovas, Xanthos et al. 2008).
- Figure 27 : La protéolyse par action du complexe ubiquitine-protéasome.
- Figure 28 : Modèle d'inhibition des facteurs FOXO par IGF-1 et Akt.
- Figure 29 : La voie Akt/mTOR activant la synthèse protéique.
- Figure 30 : La biogenèse mitochondriale.
- Figure 31 : Facteurs de risque de la sarcopénie.
- Figure 32 : Augmentation de la protéolyse en réponse à NF- $\kappa$ B.
- Figure 33 : Structure des polyphénols de l'huile d'olive.
- Figure 34 : Structure de l'oleuropéine et de ses métabolites (Hagiwara, Goto et al. 2011).
- Figure 35 : Métabolisme de la vitamine D (Holick 2007).
- Figure 36 : Valeurs de référence (nmol/L) définissant la carence, l'insuffisance, les taux recommandés et la toxicité de la vitamine D retrouvées dans la littérature.
- Figure 37 : Valeurs de références pour le statut en vitamine D établies par le GRIO.
- Figure 38 : Nomenclature des acides gras polyinsaturés oméga 3.
- Figure 39 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés oméga 3.
- Figure 40 : Objectifs de la thèse.
- Figure 41 : Plan de l'expérimentation animale sur la rate ovariectomisée.
- Figure 42 : Organisation des prélèvements chez le rat.
- Figure 43 : Composition en polyphénols des huiles d'olive.
- Figure 44 : Evolution du poids des animaux.
- Figure 45 : Composition corporelle en fin d'expérimentation.
- Figure 46 : Contrôle de consommation.
- Figure 47 : Poids et photographies des utérus.



Figure 48 : Poids des tissus adipeux.  
Figure 49 : Densité minérale osseuse et paramètres sériques osseux mesurés chez la rate.  
Figure 50 : Poids des *tibialis* et poids des *tibialis* rapportés au poids corporel.  
Figure 51 : Taux de synthèse protéique (FSR).  
Figure 52 : Plan de l'expérimentation animale sur la souris ovariectomisée.  
Figure 53 : Différence de poids entre les jours J25 et J-3  
Figure 54 : Composition corporelle des souris entre les jours J25 et J-3.  
Figure 55 : Poids de l'utérus.  
Figure 56 : Poids du foie.  
Figure 57 : Poids de la rate.  
Figure 58 : Poids des muscles et poids des muscles rapportés au poids corporel.  
Figure 59 : Densité minérale osseuse de l'os trabéculaire du fémur de souris.  
Figure 60 : Concentrations sériques des marqueurs du turnover osseux.  
Figure 61 : Déroulement des recrutements sur le site de Clermont-Ferrand.  
Figure 62 : Activité ALP des hFOB1.19 cultivées en présence de plasma humain.  
Figure 63 : Observation au microscope des puits de culture des hFOB1.19 cultivées en présence de plasma humain après coloration à l'Alizarin Red.  
Figure 64 : Impact de l'association de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D sur la densité minérale osseuse de la souris et sur la synthèse protéique musculaire de la rate, après ovariectomie.

Certaines figures ont été réalisées avec l'aide de Servier Medical Art.



# Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition polyphénolique de l'huile d'olive extra vierge, vierge et raffinée (Phenol Explorer 3.0).

Tableau 2 : Effet de l'huile d'olive et de ses constituants sur le tissu osseux. Etudes clinique, animales et cellulaires.

Tableau 3 : Effet de l'huile d'olive et de ses constituants sur le tissu musculaire. Etudes animales et cellulaires.

Tableau 4 : Caractéristiques des différents lots de rates.

Tableau 5 : Etudes animales sur l'effet de l'acide docosahéxaénoïque sur le tissu osseux.

Tableau 6 : Composition de l'huile du régime témoin et de l'huile du régime huile d'olive A.

Tableau 7 : Caractéristiques des différents lots de souris.

Tableau 8 : Consommation moyenne des souris à J11 et J23 et rapport entre le poids corporel et la moyenne des consommations.

Tableau 9 : Comparaison des modèles animaux étudiés.



# Abréviations

1,25(OH)<sub>2</sub>D : 1,25-dihydroxyvitamine D  
4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E - binding protein 1  
25(OH)D : 25-hydroxyvitamine D  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AFSSAPS : agence française de sécurité sanitaire des produits de santé  
AGPI : acides gras polyinsaturés  
Akt : protéine kinase B  
ALA : acide  $\alpha$ -linoléinique  
ALAT : alanine amino transférase  
ALP : alcaline phosphatase  
AMPK : AMP-activated protein kinase  
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé  
ANC : apports nutritionnels conseillés  
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail  
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé  
AJR : apports journaliers recommandés  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ASAT : aspartate amino transférase  
ASM : masse musculaire appendiculaire  
ATCC : American Type Culture Collection  
ATP : adénosine triphosphate  
BCAR1 : breast cancer anti-estrogen resistance protein-1  
BMC : teneur minérale osseuse (bone mineral content)  
BMD : densité minérale osseuse (bone mineral density)  
BMP : bone morphogenetic protein  
BMU : unités multicellulaires de base (basic multicellular unit)  
BV/TV, % : pourcentage de volume osseux par rapport au volume total du tissu  
C2C : cleavage of type-II collagen  
CCL2 : chemokine (C-C motif) ligand 2  
c-fms : colony stimulating factor 1 receptor  
c-JNK : c-Jun N-terminal kinase  
Colla1 : collagène de type I  
Cox-2 : cyclooxygénase-2  
CPII : Procollagen Type II C-Propeptide  
CPP : comité de protection des personnes  
CRNH : Centre de Recherche en Nutrition Humaine  
CRP : C-reactive protein  
CTCPA : Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles  
CTR: calcitonin receptor  
Ctsk : cathepsin K





CTX1 : C-telopeptide of type 1 collagen  
DBP : vitamin D binding proteins  
DHA : acide docosahexaénoïque  
DHEA : dehydroépiandrostérone  
DKK1 : Dickkopf-1  
DMEM-F12 (1:1) : Dulbecco's minimum Eagle medium F-12 nutriment mixture Ham  
DXA : absorption biphotonique à rayons X (dual energy X-ray absorptiometry)  
EDL : *extensor digitorum longus*  
eIF4E : eukaryotic initiation factor 4E  
EPA : acide eicosapentaénoïque  
EPIC : European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition  
ERK : extracellular signal-regulated kinases  
EWGSOP : European Working Group on Sarcopenia in Older People  
FGF: fibroblast growth factor  
FNIH : foundation for the national institutes of health  
FOXO : forkhead box O  
FSR : taux de synthèse protéique  
gamma GT : gamma glutamyl-transférases  
GRIO : Groupe de Recherche et d'Information sur les Ostéoporoses  
GSK3 $\beta$  : glycogen synthase kinase 3 $\beta$   
HOMA : homeostasis model assessment of insulin resistance  
IGF-1 : insulin like growth factor 1  
Ihh : Indian Hedgehog  
IL-1 : interleukine-1  
IMC : indice de masse corporelle  
Itg- $\beta$ 3 : integrin  $\beta$ 3  
LDL : low-density lipoprotein  
LPS : lipopolysaccharide  
LRP5 : LDL receptor-related protein 5  
LtB4 : leukotriene B4  
MAFbx : muscle atrophy Fbox protein  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MCP1 : monocyte chemotactic protein 1  
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor  
MEC : matrice extracellulaire  
MEF2 : myocyte enhancer factor-2  
MHC : chaînes lourdes de myosine  
MMP : métalloprotéases matricielles  
MRF4: myogenic regulatory factor 4  
mTOR : mammalian target of rapamycin  
MuRF1 : muscle RING finger-containing protein-1  
myf5: myogenic factor 5  
MyoD : myogenic differentiation factor  
NFATc1 : nuclear factor of activated T-cells c1  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappaB  
NO : oxyde nitrique  
Nos-2 : nitric oxide synthase 2  
NRF1 : facteur respiratoire nucléaire 1  
OCN : ostéocalcine  
OGN : osteoglycin



OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OPG : ostéoprotégérine  
OPN : ostéopontine  
PINP : N-terminal propeptide of type I procollagen  
p38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase  
PBMC : cellules mononucléées sanguines périphériques  
PGC1 $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha  
PGE2 : prostaglandine-E2  
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase  
p-NPP : p-nitrophenylphosphate  
PTH : parathormone  
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa B  
RANKL : receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand  
REDCap : research electronic data capture  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
RSMI : indice relatif de masse musculaire  
Runx2 ou Cfb1 : runt-related transcription factor 2 (ou core-binding factor subunit alpha-1)

1)  
RXR : retinoid X receptors  
S6K : ribosomal protein S6 kinase  
SERM : modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes  
SIBLING : small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein  
Sost : sclérostine  
SPPB : short physical performance battery  
sTNFR1 : soluble tumour necrosis factor receptor-1  
tFAM : mitochondrial transcription factor A  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
THS : traitement hormonal substitutif  
TRAF6 : TNF receptor associated factor 6  
TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase  
TSC1/2 : tuberous sclerosis 1 and 2  
UCP : uncoupling protein  
VD3 : vitamine D3  
VDR : récepteur à la vitamine D  
VIH : virus d'immunodéficience humaine  
vitD : vitamine D  
 $\omega$ 3 : oméga 3  
 $\omega$ 6 : oméga 6



# Sommaire

<b>AVANT PROPOS</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>1- Le système locomoteur</b>	<b>3</b>
1-1- Le tissu osseux	3
1-1-1- Les fonctions du système osseux	3
1-1-2- Structure de l'os long	4
1-1-2-1- La diaphyse, épiphyse et métaphyse	4
1-1-2-2- Le périoste et l'endoste	4
1-1-2-3- L'os cortical et l'os trabéculaire	5
1-1-2-4- La matrice extracellulaire	6
1-1-3- Les cellules osseuses	6
1-1-3-1- Les ostéoclastes	7
1-1-3-2- Les cellules ostéoblastiques	8
Les ostéoblastes	8
Les ostéocytes	9
Les cellules bordantes	10
1-2- Le muscle strié squelettique	11
1-2-1- Fonctions du muscle strié squelettique	11
1-2-2- Structure du muscle strié squelettique	11
1-2-3- Les cellules musculaires	11
1-2-3-1- Les cellules satellites	11
1-2-3-2- La fibre squelettique	12
Les chaînes lourdes de myosine	12
La mitochondrie	13
1-2-3-3- La contraction musculaire	14
<b>2- Vieillessement de l'appareil locomoteur</b>	<b>16</b>
2-1- L'ostéoporose et la sarcopénie, deux atteintes majeures du système locomoteur	16
2-1-1- Définitions	16
2-1-1-1- L'ostéopénie et l'ostéoporose	16
2-1-1-2- La sarcopénie	17
2-1-2- Epidémiologie de l'ostéoporose et de la sarcopénie	19



2-1-2-1-	Les données épidémiologiques de l'ostéoporose	19
2-1-2-2-	Les données épidémiologiques de la sarcopénie	20
2-1-3-	Les chutes et les fractures	20
2-2-	Mécanismes de l'ostéoporose	23
2-2-1-	Le remodelage osseux	23
2-2-1-1-	Mécanismes du remodelage osseux	23
2-2-1-2-	Régulations	25
Le couplage ostéoblaste/ostéoclaste		25
Le rôle de l'ostéocyte		26
L'homéostasie du calcium		27
Contrôles hormonaux		28
2-2-2-	Dérégulations du remodelage osseux au cours du vieillissement	29
2-2-2-1-	La carence estrogénique	31
2-2-2-2-	Le vieillissement	32
2-2-2-3-	Autres facteurs	33
2-2-3-	Traitements	34
2-2-4-	Modélisation de l'ostéoporose : l'ovariectomie	36
2-3-	Les mécanismes de la sarcopénie	37
2-3-1-	Le renouvellement protéique du tissu musculaire	37
2-3-1-1-	Mécanismes de la protéolyse	37
2-3-1-2-	Mécanismes de la synthèse protéique	38
2-3-2-	La biogenèse mitochondriale	40
2-3-3-	Les mécanismes de la sarcopénie	40
2-3-3-1-	L'altération de la balance synthèse/dégradation protéique	41
2-3-3-2-	La dégénérescence mitochondriale	43
2-3-4-	Rôle des hormones	45
2-3-4-1-	L'insuline	45
2-3-4-2-	IGF-1	46
2-3-4-3-	Les estrogènes	47
2-3-5-	Stratégies de prévention et de traitement de la sarcopénie	48
2-3-5-1-	L'exercice physique	48
2-3-5-2-	Les traitements médicaux	49
2-4-	Un modèle de dérégulation commun: Inflammation et stress oxydant	50
2-4-1-	L'inflammation	50
2-4-1-1-	Inflammation et perte osseuse	50
2-4-1-2-	Inflammation et sarcopénie	51
2-4-1-3-	Inflammation, ostéoporose et sarcopénie	52
2-4-2-	Le stress oxydant	53





2-4-2-1-	Stress oxydant et ostéoporose	53
2-4-2-2-	Stress oxydant et sarcopénie	54
2-4-2-3-	Stress oxydant, ostéoporose et sarcopénie	55
2-5-	Les relations os-muscle	56
2-6-	Conclusion	58
<b>3-</b>	<b>Les stratégies nutritionnelles</b>	<b>59</b>
3-1-	Le régime méditerranéen	59
3-2-	L'huile d'olive et ses polyphénols	61
3-2-1-	Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur le tissu osseux	62
3-2-2-	Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur le tissu musculaire	64
3-2-3-	L'huile d'olive, inflammation et stress oxydant	65
3-2-4-	Conclusion	67
3-3-	La vitamine D	69
3-3-1-	Disponibilité de la vitamine D	69
3-3-2-	Synthèse de la vitamine D	69
3-3-3-	Les rôles de la vitamine D	70
3-3-4-	Statut en vitamine D	71
3-3-4-1-	Les recommandations nutritionnelles	71
3-3-4-2-	Toxicité	72
3-3-4-3-	La prévention des chutes et des fractures	73
La prévention des chutes		73
Eviter la conséquence des chutes : la fracture		73
3-3-5-	Mécanismes d'action de la vitamine D sur l'os	74
3-3-6-	La vitamine D et le muscle	75
3-3-7-	Vitamine D et inflammation	75
3-3-8-	Conclusion	76
3-4-	L'acide docosahéxaénoïque	77
3-4-1-	Sources et biodisponibilité	77
3-4-2-	L'acide docosahéxaénoïque et l'os	77
3-4-3-	L'acide docosahéxaénoïque et le muscle	79
3-4-4-	L'acide docosahéxaénoïque, inflammation et stress oxydant	81
3-4-5-	Conclusion	82
3-5-	Conclusion	82
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>83</b>
	<b>PUBLICATION N°1</b>	<b>85</b>
1-	<b>Présentation de la publication</b>	<b>85</b>



1-1-	Objectif de l'étude	85
1-2-	Matériel et méthodes	85
1-3-	Résultats	86
1-4-	Conclusion	86
<b>2-</b>	<b>Article</b>	<b>87</b>
<b>3-</b>	<b>Résultats complémentaires à la publication n°1</b>	<b>98</b>
3-1-	Matériel et méthodes	98
3-1-1-	Animaux et régimes expérimentaux	98
3-1-2-	Echantillons récoltés	98
3-1-3-	Analyses	99
3-1-3-1-	Densité minérale osseuse	99
3-1-3-2-	Synthèse protéique musculaire	99
3-2-	Résultats	100
3-2-1-	Sélection des huiles d'olive	100
3-2-2-	Evolution pondérale et composition corporelle	100
3-2-3-	Contrôle de consommation	101
3-2-4-	Poids des organes	101
3-2-4-1-	Poids de l'utérus	101
3-2-4-2-	Poids des tissus adipeux sous cutané et péri-rénal	101
3-2-5-	Les paramètres osseux	101
3-2-5-1-	La densité minérale osseuse	101
3-2-5-2-	Paramètres sériques	102
3-2-6-	Les paramètres musculaires	102
3-2-6-1-	Poids des muscles	102
3-2-6-2-	Synthèse protéique musculaire	102
3-3-	Discussion	103
3-4-	Conclusion et perspectives	106
	<b>PUBLICATION N°2</b>	<b>108</b>
<b>1-</b>	<b>Présentation de la publication</b>	<b>109</b>
1-1-	Introduction	109
1-2-	Matériel et méthodes	109
1-3-	Résultats	109
1-4-	Conclusion	109
<b>2-</b>	<b>Article</b>	<b>110</b>



<b>3- Résultats pré-cliniques complémentaires</b>	<b>129</b>
3-1- Matériel et méthodes	129
3-2- Résultats	130
3-2-1- Evolution du poids des animaux et de la composition corporelle	130
3-2-2- Composition corporelle	130
3-2-3- Consommation des régimes	130
3-2-4- Poids des organes	130
3-2-4-1- Poids de l'utérus	130
3-2-4-2- Poids du foie	131
3-2-4-3- Poids de la rate	131
3-2-4-4- Poids des muscles	131
3-2-5- Les paramètres osseux	131
3-2-5-1- Densité minérale osseuse	131
3-2-5-2- Dosages sériques	132
3-3- Discussion	132
3-4- Conclusions et perspectives	133

## **ETUDE CLINIQUE 135**

<b>1- Objectif et autorisations</b>	<b>135</b>
<b>2- Protocole expérimental</b>	<b>135</b>
2-1- Protocole	135
2-1-1- Les aliments tests	135
2-1-1-1- Les dosettes d'huile d'olive	135
2-1-1-2- Les comprimés de calcium	136
2-1-2- Le cahier d'observation	136
2-2- Recrutement des volontaires	136
2-2-1- Les critères d'inclusion et d'exclusion	136
2-2-1-1- Critères d'inclusion	136
2-2-1-2- Critères d'exclusion	137
2-2-2- Organisation du recrutement	138
2-2-3- Les visites d'inclusion V0 et V0'	138
2-2-4- Les visites au cours de l'étude	139
2-3- Paramètres d'étude	140
2-3-1- La densité minérale osseuse et la composition corporelle	140
2-3-2- Le test de force	140
2-3-3- Le test short physical performance battery	140
2-3-4- Les paramètres sanguins	140



3-	Le déroulement du recrutement	141
	<b>MISE AU POINT DE LA CULTURE <i>EX VIVO</i> DE HFOB1.19</b>	<b>142</b>
1-	Culture <i>ex vivo</i> , activité de l'alcaline phosphatase et minéralisation	142
2-	Conclusions	143
	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>144</b>
	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>156</b>
	<b>REFERENCES</b>	<b>158</b>
	<b>ANNEXE</b>	<b>184</b>





# Avant propos

Les sociétés économiquement développées sont confrontées à la problématique du vieillissement de leur population associé à la recrudescence des pathologies dégénératives. Parmi les manifestations de la sénescence, l'atteinte de l'appareil locomoteur (ostéoporose et sarcopénie) est considérée comme un problème majeur de santé publique. Il a effectivement été estimé que l'ostéoporose (maladie du squelette caractérisée par une fragilité osseuse) atteint 70% des femmes de plus de 80 ans en France. De même, la sarcopénie (réduction progressive de la masse et de la force musculaire et/ou de la performance physique) affecte plus de 23% des femmes françaises entre 60 et 78 ans, prévalence qui est augmentée chez les femmes ostéoporotiques. Ces pathologies handicapantes diminuent la capacité de mouvement, conduisent à la perte d'autonomie des personnes âgées (chutes, fractures) et à une augmentation de la mortalité.

Devant les nombreux effets secondaires des traitements anti-ostéoporotiques, l'absence de traitements médicamenteux de la sarcopénie et l'inexistence de moyens prophylactiques, les professionnels de santé recommandent le développement de nouvelles stratégies de prise en charge de ces pathologies. La recherche scientifique fournit de nombreuses preuves sur l'importance de l'alimentation dans la diminution ou l'exacerbation de maladies, qui soutient l'hypothèse qu'une bonne alimentation permet le maintien d'une bonne santé, notamment au cours du vieillissement (Sacco, Horcajada et al. 2013).

L'installation d'un statut inflammatoire de bas grade et une augmentation du stress oxydant sont des processus communs au vieillissement et à l'établissement et l'exacerbation de l'ostéoporose et de la sarcopénie. A ce titre, les nutriments dotés de propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires constituent une possibilité innovante de stratégie de prévention nutritionnelle de ces processus dégénératifs. Il s'agit notamment de certains acides gras et des polyphénols. L'huile d'olive est un vecteur particulièrement intéressant, compte tenu de sa composition et sa richesse en polyphénols et de la qualité de ses acides gras. De plus, sa forte consommation a été régulièrement évoquée pour expliquer, au moins partiellement, le bénéfice santé du régime méditerranéen. Les données épidémiologiques sont d'ailleurs corroborées par une étude clinique et surtout par l'expérimentation animale qui ont permis de démontrer le potentiel protecteur de l'huile d'olive, et de certains de ses



polyphénols (oleuropéine, hydroxytyrosol, tyrosol) sur différents tissus, dont le squelette et le muscle. Un autre nutriment lipophile suscite actuellement un regain d'intérêt pour son action systémique potentielle, incluant un effet anti-inflammatoire. Il s'agit de la vitamine D, pour laquelle les données récentes de la littérature démontrent des vertus biologiques qui iraient bien au-delà d'une simple implication dans l'absorption intestinale du calcium et le métabolisme phosphocalcique. De la même façon, il existe aujourd'hui un fort intérêt pour les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga 3 ( $\omega$ 3) et plus particulièrement pour l'acide docosahexaénoïque (DHA), un AGPI  $\omega$ 3 à longue chaîne, qui possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes.

Les stratégies nutritionnelles actuelles sont exclusivement basées sur une supplémentation calcique et vitaminique D pour l'ostéoporose (Quesada-Gomez, Diaz-Curiel et al. 2013) et centrées sur les apports protéiques pour la sarcopénie (Walrand, Guillet et al. 2011)). L'association de l'huile d'olive avec la vitamine D et le DHA ouvre des perspectives intéressantes, sous réserve que leur effet soit scientifiquement démontré, et les mécanismes de leur action explicités.

La première partie de mon manuscrit consistera en une revue bibliographique organisée en trois chapitres. Le premier rappellera quelques notions sur la physiologie du tissu osseux et du muscle strié squelettique. Le second sera focalisé sur l'ostéoporose et la sarcopénie, leur définition et quelques données épidémiologiques suivi par la description des mécanismes impliqués dans ces deux pathologies. Enfin le dernier chapitre de l'introduction sera consacré aux effets de l'huile d'olive, de la vitamine D et du DHA sur les tissus osseux et musculaires. La seconde partie de mon manuscrit présentera les objectifs et stratégies adoptées dans mon travail de thèse dont les résultats seront exposés sous forme de deux articles et de résultats complémentaires. La discussion générale sera consacrée à l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion par rapport aux connaissances actuelles. Enfin, les perspectives qui découlent de mon travail viendront clore ce manuscrit.



# Etude Bibliographique

## 1- Le système locomoteur

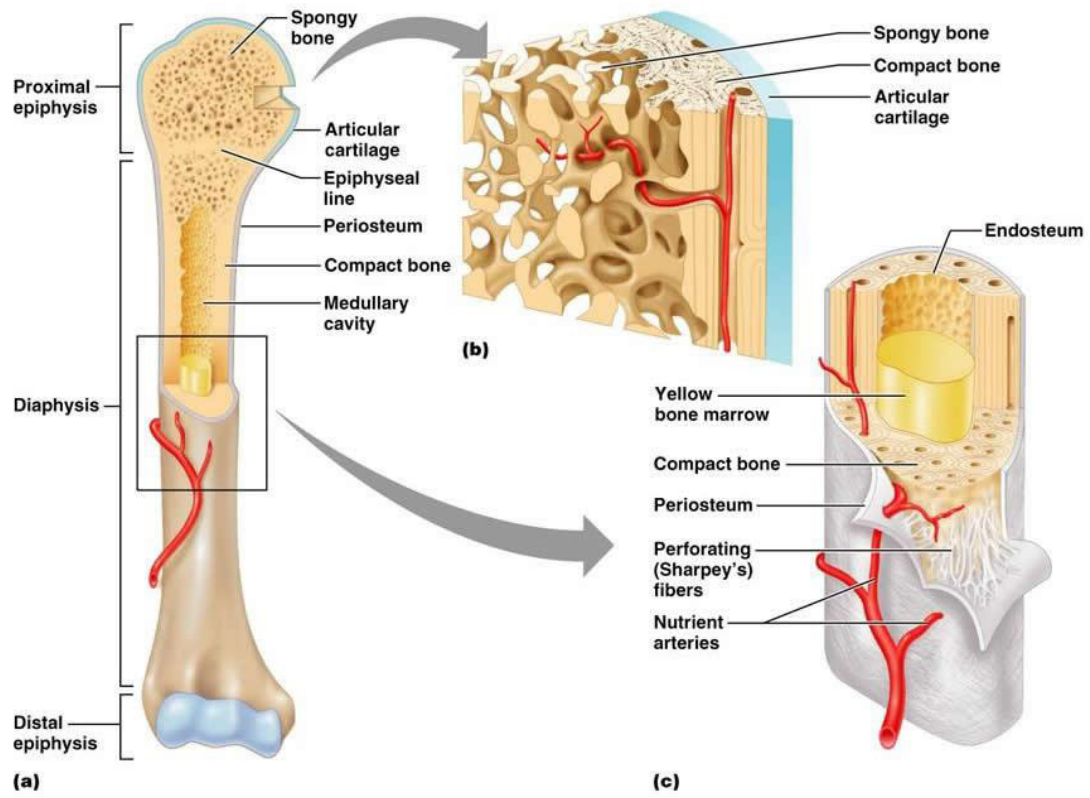
La locomotion est définie comme le déplacement actif d'un endroit à un autre (Campbell and Reece 2004). Elle nécessite l'action combinée des muscles agissant comme moteurs, mais aussi freins et ressorts (Dickinson, Farley et al. 2000) et d'un tissu rigide soutenant le corps, les os (Marieb 1999; Campbell and Reece 2004). Ces tissus aux fonctions physiologiques, à la structure et aux propriétés très différentes sont complémentaires pour la locomotion et répondent de façon conjointe lors de sollicitations telles que la croissance ou le vieillissement. Chaque tissu sera présenté séparément pour pouvoir aborder, dans une deuxième partie, les atteintes liées au vieillissement : l'ostéoporose et la sarcopénie. De plus, au-delà de l'association fonctionnelle entre l'os et le muscle, un vrai dialogue tissulaire et cellulaire existe entre ces tissus. Celui-ci a fait l'objet d'une revue résumée dans cette étude bibliographique (paragraphe 2-5) et figurant en Annexe de ce manuscrit.

### 1-1- Le tissu osseux

Le squelette humain est constitué de plus de 200 os, qui peuvent être classés d'un point de vue macroscopique : les os longs (le fémur, le tibia, la clavicule et les phalanges), les os courts (les carpes et tarses), les os plats (le crâne, la mandibule et le sternum) et les os irréguliers (les vertèbres et le coccyx) (Clarke 2008). Chaque os est composé de tissu conjonctif caractérisé par la présence d'une matrice minéralisée dans laquelle sont enchâssés des ostéocytes (Campbell and Reece 2004). Le tissu osseux est une structure dynamique, qui se renouvelle constamment et c'est l'équilibre entre les phases organiques et minérales qui lui confère des propriétés de rigidité mais aussi d'élasticité (Toppets, Pastoret et al. 2004).

#### 1-1-1- Les fonctions du système osseux

Le système osseux remplit différentes fonctions. Il permet de soutenir les tissus mous et de protéger les organes internes vitaux. Ainsi, le cerveau est contenu dans la boîte crânienne, la cage thoracique renferme les poumons et le cœur et les os longs protègent la moelle osseuse rouge, siège de l'hématopoïèse, et la moelle osseuse jaune qui est un tissu



**Figure 1 : Structure de l'os long (Marieb 1999).**

(a) schéma d'un humérus, (b) structure de l'épiphyse caractérisée par la présence d'os trabéculaire, (c) structure de la diaphyse

adipeux. Il assure la locomotion conjointement avec les muscles striés squelettiques auxquels il sert de point d'attache. De plus, les sels minéraux constitutifs de l'os (principalement le calcium et le phosphore) peuvent être mobilisés ou stockés pour maintenir leur homéostasie. Ainsi, le tissu osseux, avec l'intestin et les reins, assure le contrôle du métabolisme phosphocalcique (Tortora and Grabowski 1994; Toppets, Pastoret et al. 2004).

### **1-1-2- Structure de l'os long**

L'humérus est généralement utilisé comme modèle pour décrire la structure de l'os long (Figure 1). Un os long se caractérise par une partie centrale, la diaphyse, qui se poursuit en cônes appelés les métaphyses et se terminent en deux extrémités élargies, les épiphyses (Tortora and Grabowski 1994; Toppets, Pastoret et al. 2004). Le périoste est une fine couche de tissu conjonctif qui recouvre l'os au niveau de la diaphyse, les épiphyses étant recouvertes de cartilage. L'endoste est la couche interne de l'os, séparant l'os de la moelle osseuse. Ces deux couches contiennent des cellules osseuses : des ostéoblastes et des ostéoclastes, ainsi que des vaisseaux sanguins (Clarke 2008).

#### *1-1-2-1- La diaphyse, épiphyse et métaphyse*

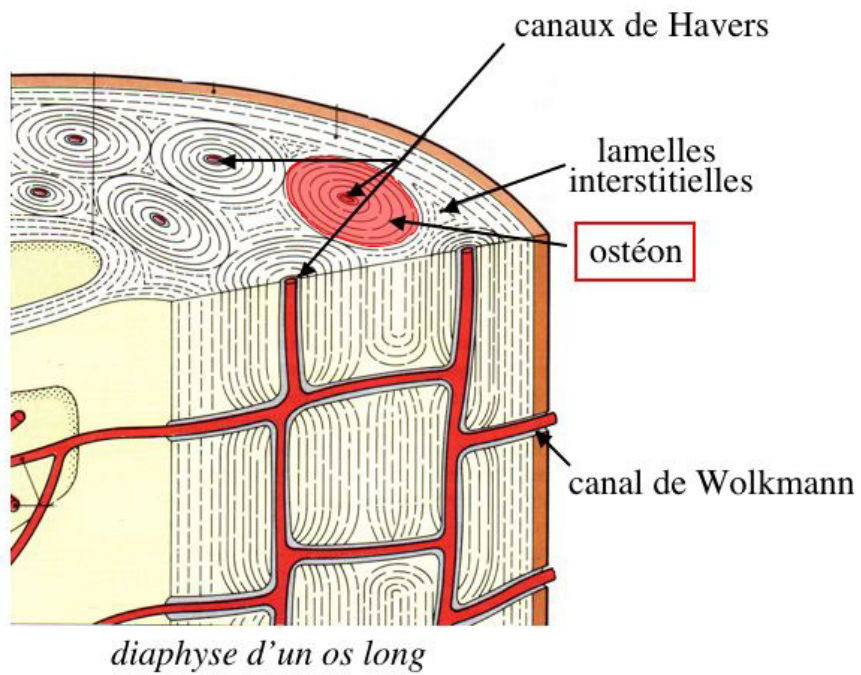
La diaphyse constitue l'axe longitudinal de l'os (Figure 1). Il s'agit d'un cylindre d'os cortical, qui entoure une lacune : le canal médullaire. Chez l'adulte, ce canal ou cavité est rempli de moelle osseuse jaune parcourue de vaisseaux sanguins (Marieb 1999). Les épiphyses contiennent un réseau d'os trabéculaire, qui renferme la moelle osseuse rouge. L'os trabéculaire est recouvert d'une fine couche d'os cortical, lui-même recouvert de cartilage articulaire. Ce dernier assure le glissement des pièces osseuses lors des mouvements de l'articulation et amortit les chocs lors de la locomotion (Marieb 1999). La métaphyse est la zone de jonction entre la diaphyse et les épiphyses. Elle renferme le cartilage de conjugaison, qui se minéralise en totalité à la fin de la croissance (Tortora and Grabowski 1994; Toppets, Pastoret et al. 2004).

#### *1-1-2-2- Le périoste et l'endoste*

Le périoste est l'enveloppe qui recouvre l'extérieur de l'os, à l'exception des articulations, recouvertes de cartilage articulaire (Figure 1). Ce tissu, très vascularisé, est constitué d'une membrane externe fibreuse, le périoste fibreux, et d'une couche ostéogénique interne, le périoste cellulaire. Le périoste fibreux est un tissu conjonctif dense et irrégulier,



## tissu osseux compact Haversien



**Figure 2 : Structure de la diaphyse d'un os long.**  
(<http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux>)

constitué d'un réseau de fibres de collagène. Il contient les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les nerfs qui traversent l'os. Le périoste cellulaire renferme des cellules mésenchymateuses, des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoblastes, des ostéoclastes ainsi que des vaisseaux sanguins et des fibres élastiques. Il est attaché à la surface externe de l'os cortical par d'épaisses fibres de collagène : les fibres de Sharpey, qui s'étendent jusqu'à l'intérieur de la matrice osseuse. Le périoste sert de point d'attache aux ligaments et aux tendons. En effet, les fibres de collagène des ligaments et des tendons s'entremêlent à celles du périoste et les traversent pour s'insérer sur le tissu osseux sous-jacent. Enfin, le périoste joue un rôle dans la nutrition, la croissance et la réparation de l'os (Tortora and Grabowski 1994; Toppets, Pastoret et al. 2004; Clarke 2008).

L'endoste est une membrane de tissu conjonctif qui recouvre les surfaces internes des os. On distingue l'endoste cortical tapissant l'os cortical attenant à la cavité médullaire, l'endoste trabéculaire recouvrant les travées osseuses épi-métaphysaires et l'endoste ostéonien dans les canaux de Havers qui traversent l'os cortical (Figure 2). Cette membrane contient des vaisseaux sanguins, des ostéoblastes, des ostéoclastes et des cellules souches mésenchymateuses. L'endoste ostéonien relie le périoste et l'endoste cortical via les canaux de Volkman (Marieb 1999; Toppets, Pastoret et al. 2004; Clarke 2008).

### *1-1-2-3- L'os cortical et l'os trabéculaire*

Selon leur degré de porosité, on peut distinguer l'os cortical dense (5 à 30%) et l'os trabéculaire spongieux (30 à 90%) (Toppets, Pastoret et al. 2004). L'os cortical, représentant 80% du squelette (Bonnick 1998), est retrouvé au niveau de la diaphyse des os longs et forme la couche externe de tous les os (Tortora and Grabowski 1994; Souberbielle 2000). C'est un tissu épais, dense et très résistant, dont la densité minérale osseuse (BMD) est plus importante que celle de l'os trabéculaire (Brandi 2009).

L'os trabéculaire, qui peut être divisé en spongieuse primaire et spongieuse secondaire (Hochberg, Silman et al. 2011) est principalement retrouvé au niveau des métaphyses et des épiphyses des os longs. La spongieuse primaire est située directement sous la plaque de croissance suivie de la spongieuse secondaire. L'os trabéculaire est constitué de nombreuses travées communicantes remplies de moelle osseuse et traversées par des vaisseaux sanguins. Les travées sont disposées selon les forces de pression et de traction qui s'exercent sur l'os (Marieb 1999). L'architecture ainsi formée conditionne la résistance et la flexibilité de l'os (Seeman 2009). De plus, le réseau trabéculaire permet d'augmenter la surface d'échange, ce



qui fait de lui un lieu privilégié pour le remodelage osseux et lui confère son rôle majeur dans l'homéostasie du calcium.

#### *1-1-2-4- La matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire (MEC) osseuse est composée de 50 à 70% d'une phase minérale, de 20 à 40 % d'une phase organique dont 2 à 5% de cellules, de 5% à 10% d'eau et de moins de 3% de lipides (Sommerfeldt and Rubin 2001; Clarke 2008).

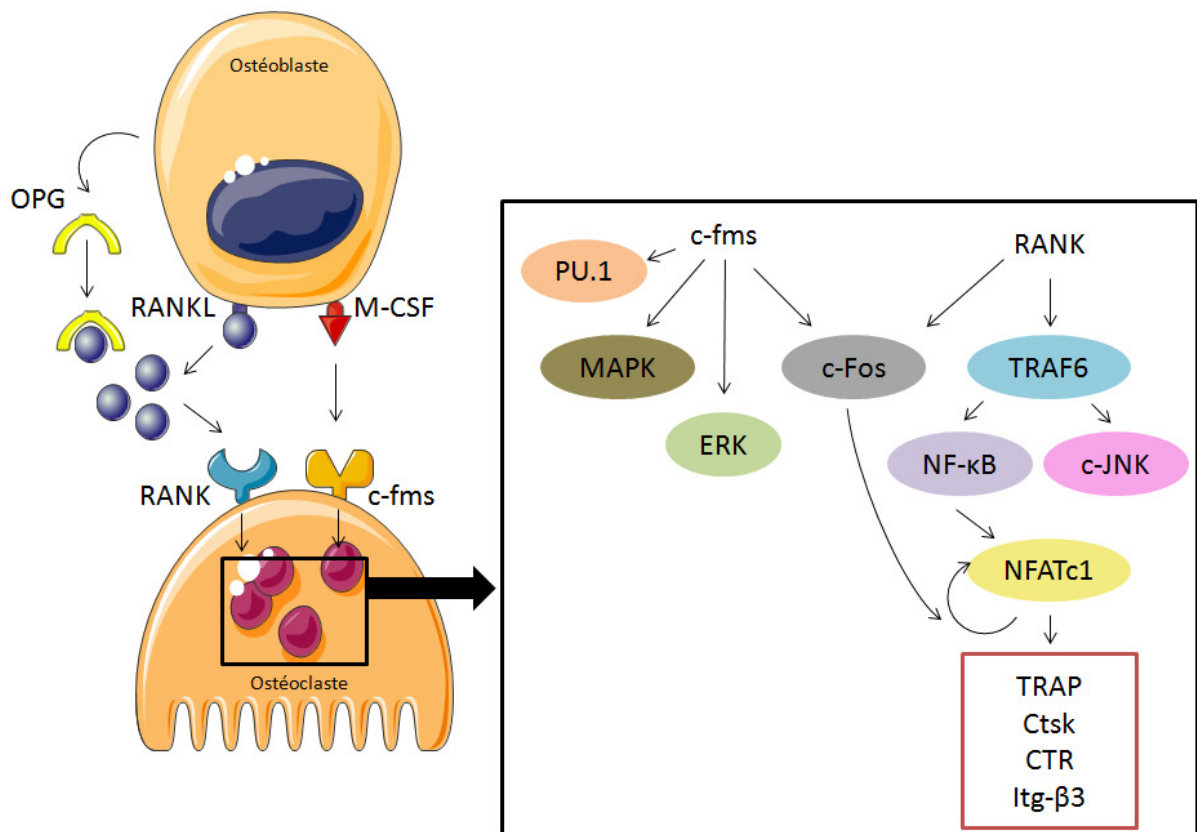
La partie organique est constituée à 90% par des fibres de collagène de type I (Colla1). Ces fibres sont organisées de façon parallèle au sein d'une même couche. Plusieurs couches ayant des orientations différentes se superposent (Souberbielle 2000). Les fibres de collagènes s'organisent de façon concentrique pour former des ensembles circulaires nommés ostéons ou système de Havers avec, en leur milieu les canaux de Havers au sein desquels circulent des capillaires sanguins et des fibres nerveuses (Figure 2). L'os trabéculaire et l'os cortical sont tous deux composés d'ostéons (Clarke 2008). Les canaux de Volkmann, contenant des vaisseaux sanguins, sont perpendiculaires aux canaux de Havers.

Les 10% restants sont constitués de protéines dites non collagéniques parmi lesquelles se trouvent notamment l'ostéocalcine (OCN) qui intervient dans la minéralisation et qui constitue un marqueur de la formation osseuse, l'ostéopontine (OPN) reliant l'hydroxyapatite aux cellules osseuses, l'ostéonectine qui participe au processus de minéralisation par son affinité pour le Colla1 et le calcium, la sialoprotéine osseuse et la thrombospondine qui permettent l'attache des cellules osseuses à la MEC via un récepteur membranaire de la famille des intégrines et des protéoglycane (Souberbielle 2000).

La phase minérale est constituée d'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) dont la formule est  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et qui est formée par les ostéoblastes (Clarke 2008; Raggatt and Partridge 2010). Cette minéralisation détermine la dureté de l'os. Ainsi, l'os joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique et le calcium peut être mobilisé pour d'autres processus biologiques de l'organisme.

#### **1-1-3- Les cellules osseuses**

Les cellules correspondent à 2 à 5% de la matrice organique (Sommerfeldt and Rubin 2001). Il existe deux types principaux de cellules osseuses : les ostéoclastes et les cellules ostéoblastiques.



**Figure 3 : Voie de signalisation de la différenciation ostéoclastique : le système OPG/RANK/RANKL.**

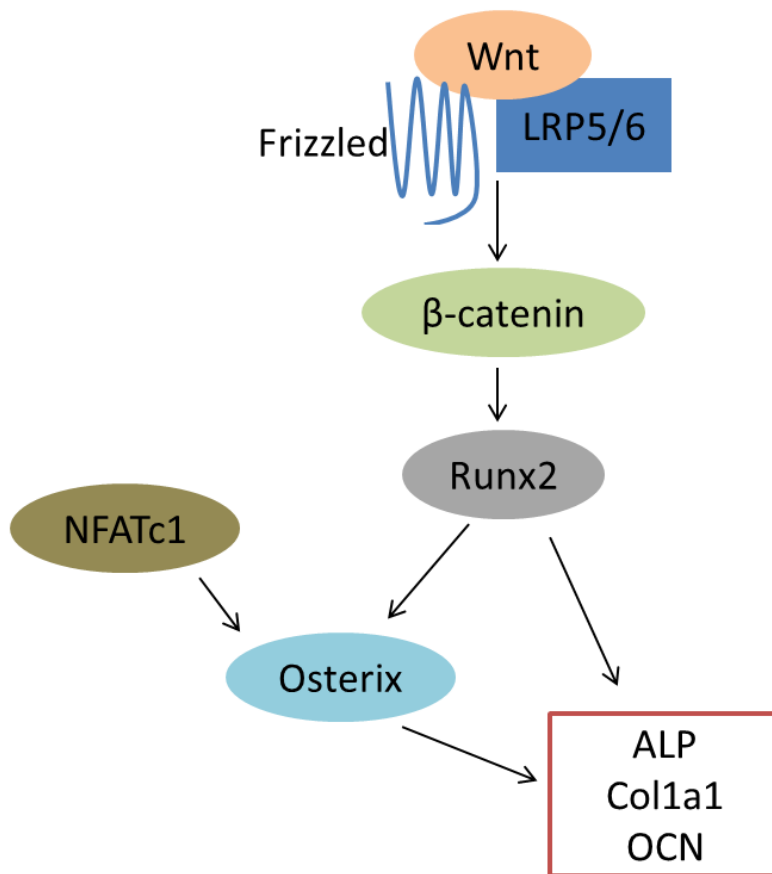
Le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) se fixe à son récepteur et colony stimulating factor 1 receptor (c-fms) pour activer les voies des mitogen-activated protein (MAP) kinases et des extracellular signal-regulated kinases (ERK) ainsi que les facteurs c-Fos et PU.1.

Le receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) se fixe à son récepteur RANK s'il n'est pas bloqué par l'ostéoprotégérine pour activer le facteur c-Fos et le TNF receptor associated factor 6 (TRAF6). Ce dernier active alors les facteurs c-Jun N-terminal kinase (c-JNK) et nuclear factor-kappaB (NF-κB) qui induit le nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1). Le facteur c-Fos permet l'autoamplification de NFATc1.

Les ostéoclastes ainsi différenciés sécrètent la tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), la cathepsin K (Ctsk), le calcitonin receptor (CTR) et l'intégrin β3 (Itg-β3)

### *1-1-3-1- Les ostéoclastes*

Les ostéoclastes ou cellules ostéorésorbantes sont responsables de la résorption de l'os au niveau des lacunes de Howship (Sommerfeldt and Rubin 2001). Tout comme les macrophages, ils dérivent des cellules souches hématopoïétiques (Udagawa, Takahashi et al. 1990; Suda, Takahashi et al. 1992) et sont localisés au niveau de l'endoste au sein des systèmes de Havers et en dessous du périoste avec une densité cellulaire de 2 à 3 cellules par  $\mu\text{m}^3$  (Roodman 1996). Il s'agit de cellules migrantes, multinuclées et polarisées, formées par la fusion de progéniteurs de la famille des monocytes et des macrophages (Teitelbaum 2000). Les ostéoclastes ont une durée de vie de 2 semaines environ (Manolagas 2000; Manolagas and Parfitt 2010). La présence de lysosomes, de vacuoles, de mitochondries en forte concentration et d'une membrane apicale capable de former un joint étanche avec la matrice calcifiée rend ces cellules hautement spécialisées (Walker 1972; Lakkakorpi, Tuukkanen et al. 1989; Pfaff and Jurdic 2001; Sommerfeldt and Rubin 2001). Toutes ces caractéristiques permettent aux ostéoclastes de sécréter des enzymes et des ions  $\text{H}^+$  dans une zone définie de l'os et ainsi de dissoudre des cristaux d'hydroxyapatite et de dégrader de la matrice organique de façon ciblée (Vaananen, Zhao et al. 2000). Deux molécules sont nécessaires et suffisantes à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes : le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) et le receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand (RANKL). Ces facteurs sont sécrétés majoritairement par les cellules stromales de la moelle osseuse ou par les ostéoblastes qui en découlent (Udagawa, Takahashi et al. 1990; Teitelbaum 2000). Le M-CSF accroît la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques (Wagner and Karsenty 2001). Il se lie à son récepteur colony stimulating factor 1 receptor (c-fms) au niveau des pré-ostéoclastes et active les voies des mitogen-activated protein kinases (MAPK) et des extracellular signal-regulated kinases (ERK) ainsi que les facteurs c-Fos et PU.1 pendant la phase précoce de la différenciation (Figure 3) (Ross 2006; Boyce, Yao et al. 2009; Kular, Tickner et al. 2012). En parallèle, la fixation de RANKL à son récepteur RANK, situé à la surface des précurseurs ostéoclastiques, amorce un mécanisme en 3 étapes : le déclenchement (jusqu'à l'activation du nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1)), l'amplification (de NFATc1) et le ciblage (des gènes par NFATc1) (Kuroda and Matsuo 2012). Tout d'abord, le tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) est activé et régule à son tour le nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) nécessaire à l'induction du nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1) (Takayanagi, Kim et al. 2002; Asagiri and Takayanagi 2007). Le facteur c-Fos, aussi induit par la liaison de RANK à RANKL, est alors nécessaire à l'autoamplification de NFATc1 (Huang, Chang et al. 2006; Asagiri and



**Figure 4 : Voie de signalisation de la différenciation ostéoblastique : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.**

La fixation d'un ligand Wnt au complexe composé du récepteur frizzled et des low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) et LRP6 conduit à la translocation de la  $\beta$ -caténine vers le noyau où elle active le facteur de transcription Runx2. Ce dernier active le facteur ostérix qui est aussi sous le contrôle de NFATc1. Runx 2 et ostérix déclenchent la transcription de l'alkaline phosphatase (ALP), du collagène de type I (Col1a1) et de l'ostéocalcine (OCN), exprimés par des ostéoblastes différenciés.

Takayanagi 2007). De plus, suite à l'activation par RANKL, TRAF6 active aussi la c-Jun N-terminal kinase (c-JNK), membre de la famille des MAPK, qui est impliqué dans la signalisation de l'ostéoclastogénèse (Kim, Lee et al. 1999). Les ostéoclastes ainsi différenciés secrètent la tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) dont l'activité est utilisée en tant que marqueur ostéoclastique mais aussi la cathepsin K (Ctsk), le calcitonin receptor (CTR) et l'intégrin  $\beta 3$  (Itg- $\beta 3$ ) (Kular, Tickner et al. 2012).

### *1-1-3-2- Les cellules ostéoblastiques*

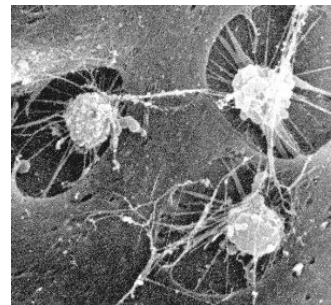
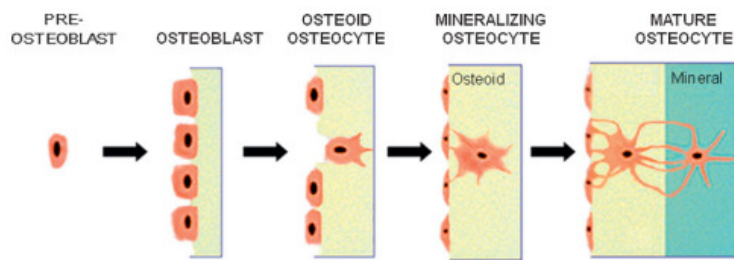
La lignée ostéoblastique comprend les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes ainsi que les cellules bordantes (Long 2012).

#### **Les ostéoblastes**

Les ostéoblastes, ainsi que les chondrocytes, les adipocytes et les myocytes dérivent d'un précurseur commun, la cellule souche mésenchymateuse (Pittenger, Mackay et al. 1999; Bianco, Riminucci et al. 2001). L'expression du facteur Sox-9 induit la différenciation en chondrocytes, celle du myogenic differentiation factor (MyoD), la voie myoblastique, l'expression du proliférateur activated receptor  $\gamma 2$  (PPAR $\gamma 2$ ) induit la différenciation adipocytaire alors que celle du Runt-related transcription factor 2 (Runx2 ou Cbfa1) est nécessaire pour la différenciation vers le lignage ostéoblastique. Les ostéoblastes forment une couche de cellules cuboïdes localisées à la surface de l'os au niveau des sites de formation osseuse (Sommerfeldt and Rubin 2001). Leur durée de vie est de 3 mois environ (Manolagas 2000; Manolagas and Parfitt 2010) et leur rôle principal est la synthèse de la matrice extracellulaire (Clarke 2008). L'alcaline phosphatase (ALP) et l'OCN, généralement utilisées comme marqueurs de la formation osseuse, participent à la minéralisation de la matrice extracellulaire par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite (Orimo 2010; Kular, Tickner et al. 2012). Les ostéoblastes secrètent aussi des cytokines (M-CSF, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukine-1 (IL-1), IL-6 et IL-11) et des facteurs de croissance pouvant être piégés au sein de la MEC osseuse et qui jouent un rôle fondamental dans la régulation du remodelage osseux et de la minéralisation.

D'un point de vue moléculaire, le facteur Runx2 ainsi qu'ostérix dont l'expression est dépendante de Runx2 sont indispensables à la formation osseuse (Figure 4) (Long 2012). Ostérix complète l'action de Runx2 sur les précurseurs ostéochondroblastiques en déterminant l'orientation ostéoblastique pure (Nakashima, Zhou et al. 2002). Runx2, qui





**Figure 5 : Le réseau lacuno-canaliculaire (Bonewald 2011).**

active l'expression de l'OCN par les ostéoblastes différenciés, est sous l'influence de nombreuses bone morphogenetic proteins (BMPs) et du transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Ducy, Zhang et al. 1997; Ducy, Schinke et al. 2000). NFATc1 régule l'expression d'ostéix, qui active en retour l'expression des gènes codant pour des protéines de la MEC comme le Col1a1, la sialoprotéine osseuse, l'ostéonectine et l'OCN (Nakashima, Zhou et al. 2002; Koga, Matsui et al. 2005; Zhang 2012). Ces facteurs de transcription (Runx2 et ostéix) sont sous le contrôle principal de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin, dont la voie canonique a été la plus étudiée (Long 2012). Les ligands Wnt se lient à un récepteur composé du récepteur frizzled et de la low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5 (LRP5) et LRP6. La fixation d'un ligand au complexe conduit à la translocation de la  $\beta$ -catenin vers le noyau où elle active la transcription des gènes cibles dont l'ALP, le Col1a1 et l'OCN (Westendorf, Kahler et al. 2004; Kubota, Michigami et al. 2009). Les voies de signalisation Hedgehog, Notch, des BMPs et du fibroblast growth factor (FGF) sont aussi impliquées dans la différenciation ostéoblastique (Kular, Tickner et al. 2012; Long 2012). Le rôle du facteur insulin like growth factor 1 (IGF-1) a été examiné récemment par Tahimic (Tahimic, Wang et al. 2013) qui montrait qu'IGF-1 stimule la survie, la différenciation et la maturation des ostéoblastes ainsi que la biosynthèse matricielle.

Lors de la minéralisation, 60 à 80% des ostéoblastes meurent par apoptose, le reste évolue en ostéocyte ou en cellule bordante.

### **Les ostéocytes**

Les ostéocytes, représentant 90 à 95% des cellules du tissu osseux mature, sont des ostéoblastes emmurés dans la MEC qu'ils synthétisaient. Leur durée de vie, qui peut atteindre 50 ans, est la plus longue parmi les cellules osseuses (Manolagas and Parfitt 2010). Ils sont interconnectés par le biais de prolongements cytoplasmiques, contenus dans des canalicules et reliés entre eux par des jonctions communicantes Gap (Figure 5) (Cowin 2007; Bonewald 2011). Les cellules bordantes, les ostéoblastes et des cellules de la moelle osseuse sont aussi reliées à ce système lacuno-caniculaire (Long 2012). Ce réseau dense de canalicules permet notamment la circulation des nutriments, des minéraux, des hormones et des molécules sécrétées (Souberbielle 2000). De plus, le réseau lacuno-caniculaire est considéré comme étant le site de la transduction et de la transmission du signal aux ostéoblastes et aux ostéoclastes, notamment en terme de modifications de la charge mécanique (Cowin 2007; Klein-Nulend, Bacabac et al. 2012; Klein-Nulend, Bakker et al. 2012). En effet, les ostéocytes seraient les cellules les plus mécanosensibles de l'os (Klein-Nulend, van der Plas et al. 1995).



Ainsi, ils modifieraient leur microenvironnement pour s'adapter aux signaux de charge mécanique et les transmettre au sein du réseau (Wu, Schaffler et al. 2013). La charge mécanique activerait majoritairement la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin (Dallas, Prideaux et al. 2013). *In vitro*, les contraintes de cisaillement induisaient la translocation nucléaire de  $\beta$ -catenin (Kamel, Picconi et al. 2010). De plus, la présence des 2 allèles du gène codant pour la  $\beta$ -catenin était nécessaires à la réponse anabolique à la charge mécanique (Javaheri, Stern et al. 2013) et les souris LRP5<sup>-/-</sup> présentaient une réponse biaisée à la stimulation mécanique (Sawakami, Robling et al. 2006).

### **Les cellules bordantes**

Certains ostéoblastes se différencient en cellules bordantes qui recouvrent le tissu osseux qui n'est pas en renouvellement. Ces cellules ont une durée de vie de 1 à 10 ans (Manolagas and Parfitt 2010). Leur présence semblerait bloquer l'arrivée des ostéoclastes et ainsi protéger le tissu osseux d'une résorption aléatoire (Kular, Tickner et al. 2012).

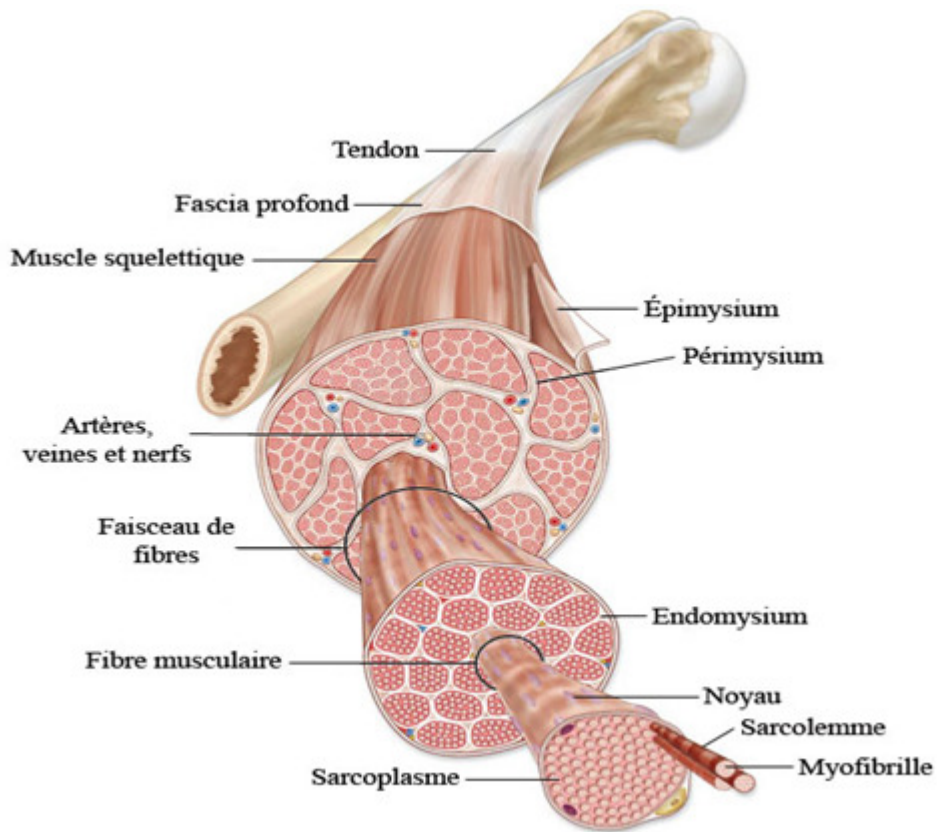


Figure 6 : Anatomie du muscle strié squelettique (Dominique 2009).

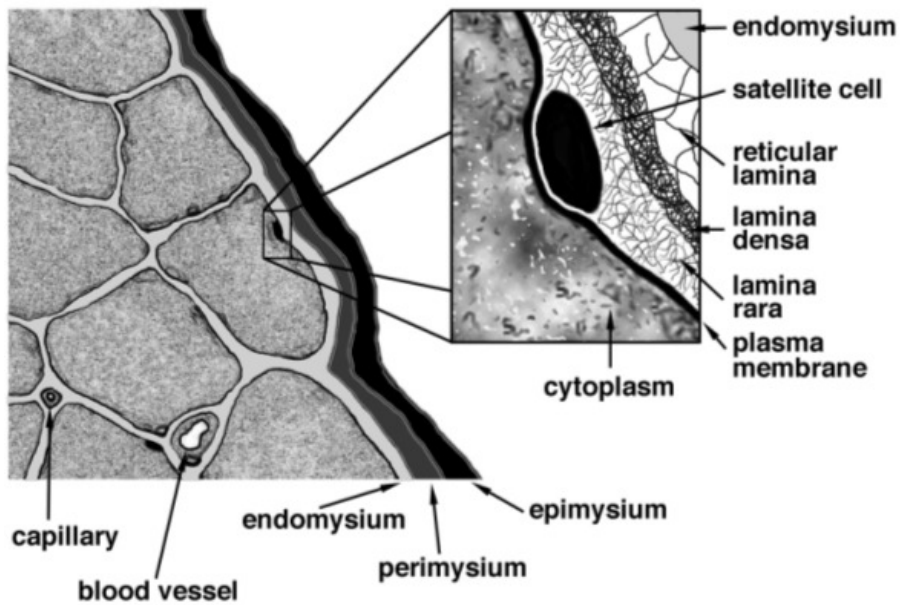


Figure 7 : La cellule satellite musculaire.  
 (<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21775/ch01.html>)

## 1-2- Le muscle strié squelettique

Les muscles squelettiques recouvrent généralement le squelette osseux et s'y attachent (Marieb 1999). Ils représentent au moins 40% de la masse corporelle chez l'Homme (Marieb 1999; Sanchez, Csibi et al. 2013).

### 1-2-1- **Fonctions du muscle strié squelettique**

La fonction principale du muscle strié squelettique est la motricité (Vandenburgh, Chromiak et al. 1999). Il permet aussi de maintenir la posture, de stabiliser les articulations et 70 à 80% de l'énergie produite en son sein se dissipent sous forme de chaleur (Marieb 1999). Le muscle strié squelettique joue aussi un rôle dans la balance énergétique. De plus, les acides aminés du muscle sont mobilisables pour d'autres processus physiologiques en situation pathologique ou en absence de substrat protéique suffisant. Le muscle squelettique est un tissu excitable, contractile, extensible et élastique, caractéristiques qui lui permettent de remplir ses fonctions (Marieb 1999).

### 1-2-2- **Structure du muscle strié squelettique**

Le muscle est un tissu vascularisé et innervé qui se compose de cellules ou fibres musculaires et de cellules satellites et qui est structuré par du tissu conjonctif (Marieb 1999). Ainsi, chaque fibre est enveloppée par l'endomysium, elles se regroupent en faisceaux délimités par le pérимыsium. Un ensemble de faisceaux forme le muscle qui est circonscrit par l'épimysium (Figure 6) (Dominique 2009). Ces différentes gaines permettent de préserver l'intégrité du muscle et de transmettre la force produite à l'os. En effet, en se contractant, les fibres tirent sur les différentes gaines qui sont reliées aux tendons, eux-mêmes étant fixés aux os.

### 1-2-3- **Les cellules musculaires**

#### 1-2-3-1- *Les cellules satellites*

Les cellules satellites musculaires sont des cellules souches, généralement quiescentes mais capables de proliférer et de se différencier en cellules musculaires (Figure 7). La proportion de cellules satellites dans le muscle est de 1 à 4% (Zammit 2008). Chez le sujet adulte, les cellules satellites sont fréquemment recrutées pour le maintien, l'hypertrophie et la réparation des fibres (Zammit 2008; Blaauw and Reggiani 2014; Ceafalan, Popescu et al. 2014). Sous l'influence de l'expression des facteurs MyoD, myogenic factor 5 (myf5),

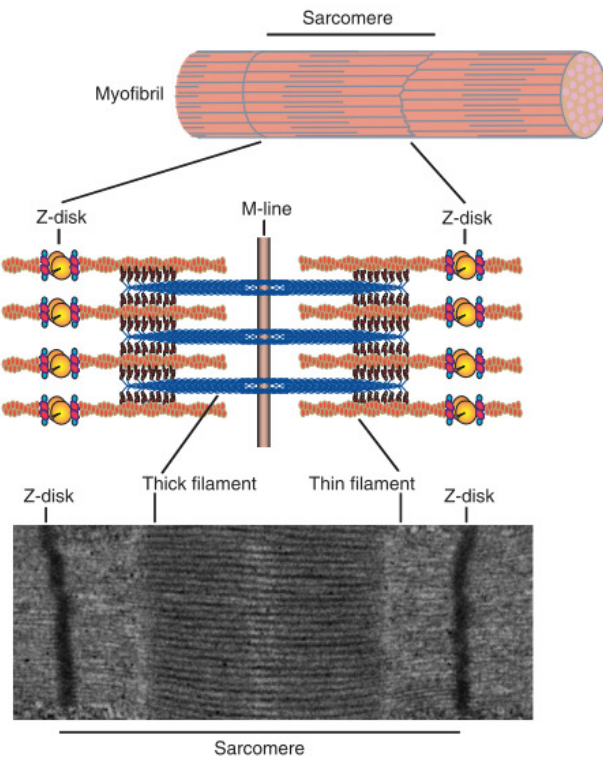


Figure 8 : Structure du sarcomère, unité de base de la fibre musculaire (Greising, Gransee et al. 2012).

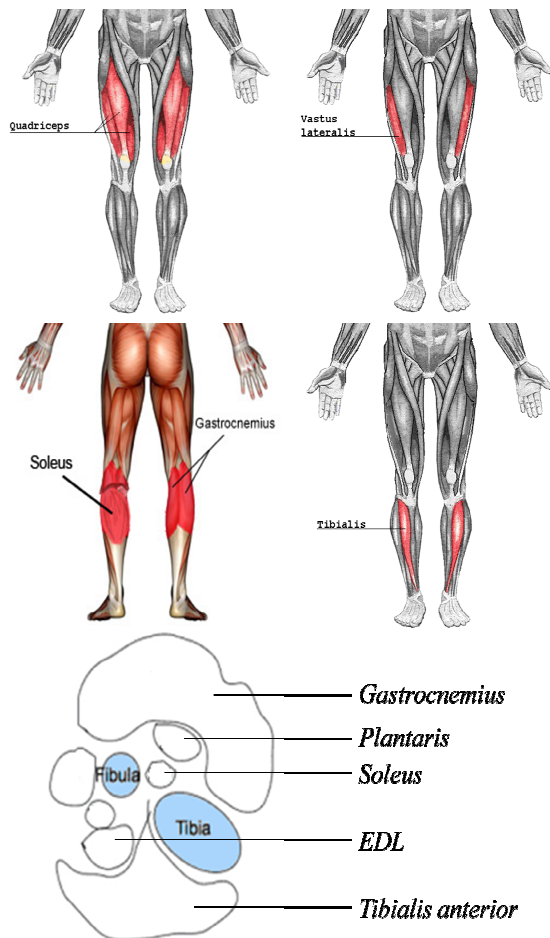


Figure 9 : Disposition anatomique des muscles de la jambe.

myogenic regulatory factor 4 (MRF4) et myogénine, les cellules satellites se différencient en myoblastes, qui fusionnent alors avec une fibre musculaire préexistante ou entre eux pour former une nouvelle fibre (Bentzinger, Wang et al. 2012; Yin, Price et al. 2013).

### *1-2-3-2- La fibre squelettique*

Les fibres musculaires sont des cellules multinuclées issues de la fusion de myoblastes et allongées dans le sens de la longueur du muscle (Figure 6) (Marieb 1999). Elles sont caractérisées par la présence d'un cytosquelette spécialisé agencé en myofibrilles, d'un nombre important de mitochondries, d'un réticulum sarcoplasmique, de tubules transverses et d'une quantité importante de glycogène.

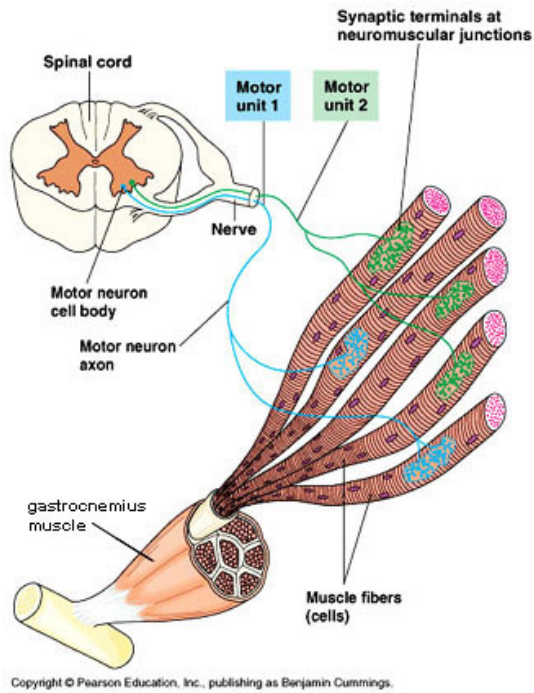
Les myofibrilles qui sont les éléments contractiles de la fibre musculaire, constituent environ 80% du volume de la cellule (Figure 6) (Marieb 1999). Les sarcomères, unités de base des myofibrilles, sont alignés en série dans le sens de la longueur pour faciliter la génération d'énergie (Greising, Gransee et al. 2012), ce qui donne l'aspect strié du muscle (Figure 8) (Campbell and Reece 2004). Ils sont ancrés à la membrane plasmique grâce à des filaments de desmine, qui permettent aux fibres de conserver leur architecture et de se contracter en bloc (Lodish, Baltimore et al. 1997). Chaque sarcomère est strictement organisé par l'alternance des filaments épais, constitués de myosine et des filaments fins comportant principalement des molécules d'actine, de tropomyosine et de troponine (Greising, Gransee et al. 2012).

#### **Les chaînes lourdes de myosine**

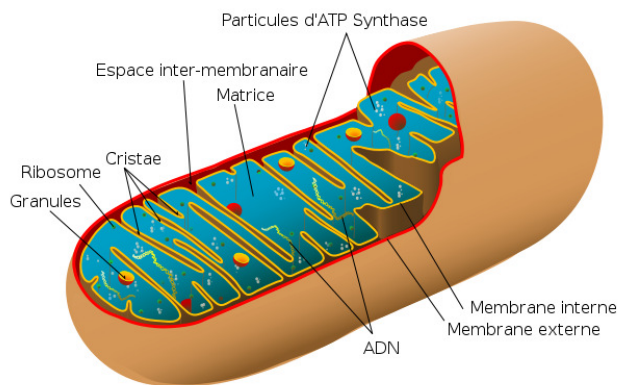
La myosine, constituant principal des filaments épais, est une protéine constituée de 2 chaînes lourdes (MHC) et de 2 couples de chaînes légères (Greising, Gransee et al. 2012). Il existe différentes isoformes de MHC. En général, chaque fibre musculaire n'en contient qu'un seul type, ce qui permet de classifier les différents types de fibres musculaires selon l'isoforme de MHC qu'elles contiennent (Hamalainen and Pette 1995). Ainsi, il existe des fibres de type I, IIa, IIx et IIb possédant respectivement des MHC I, MHC IIa, MHC IIx et MHC IIb. Chez l'Homme, seules les fibres de type I, IIa et IIx sont présentes (Bottinelli and Reggiani 2000), alors que les 4 isoformes sont retrouvés chez le rat et la souris. Ces isoformes confèrent des propriétés contractiles différentes aux fibres.

Les fibres de type I, à contraction lente, ont un faible diamètre et sont très vascularisées. Elles possèdent une forte densité mitochondriale, peu de réserve en glycogène, d'importantes réserves de triglycérides et sont riches en myoglobine. Elles sont caractérisées





**Figure 10 : Organisation des unités motrices (Campbell and Reece 2004).**



**Figure 11 : Structure de la mitochondrie.**  
 (<http://biology.about.com/od/cellanatomy/ss/mitochondria.htm>)

par un métabolisme énergétique de type oxydatif et une faible activité myosine-ATPase. Elles sont recrutées lors d'exercices d'endurance et pour le maintien de la posture, de part leur faible fatigabilité.

Les fibres II ou à contraction rapide ont un diamètre plus important, sont peu vascularisées, pauvres en mitochondries et possèdent d'importantes réserves de glycogène plutôt que de triglycérides. Elles permettent d'effectuer des mouvements puissants ou intenses de courte durée et sont ainsi très fatigables. On distingue les fibres IIa à métabolisme oxydolytique et les fibres de type IIx et IIb, à métabolisme glycolytique.

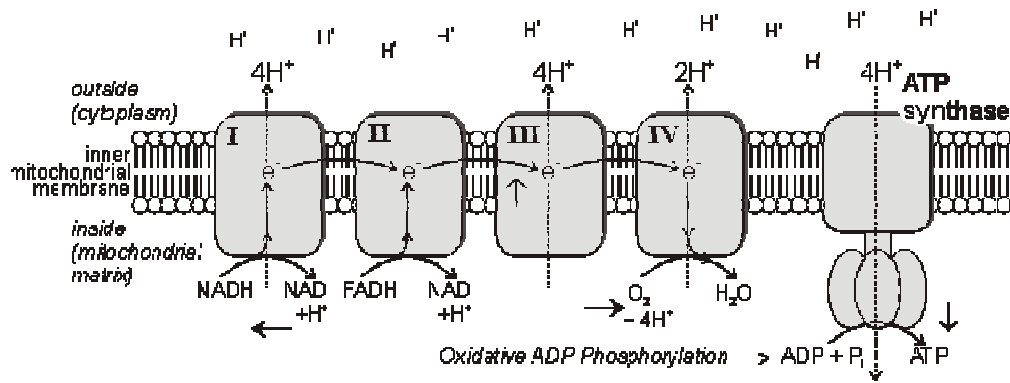
Même si une fibre ne contient qu'un seul type de MHC, un muscle contient différents types de fibres (Kim and Choi 2013). La proportion des types de fibres varie selon les espèces, le site anatomique et les individus (principalement selon le patrimoine génétique et l'activité physique) (Schiaffino and Reggiani 2011). Par exemple chez l'Homme, dans une grande cohorte de personnes sédentaires ou actives, des 2 sexes, la proportion de fibres de type I dans le muscle *vastus lateralis* de la cuisse (Figure 9) variait de 15 à 85% (Simoneau and Bouchard 1989). Toutefois, le muscle *soleus* comporte en grande majorité des fibres de type I et est ainsi un muscle oxydatif (Figure 9) (Schiaffino and Reggiani 2011). Le *tibialis anterior*, le *plantaris* et l'*extensor digitorum longus* (EDL) sont des muscles majoritairement glycolytiques alors que le *gastrocnemius* et le quadriceps (dont fait partie le *vastus lateralis*) sont des muscles mixtes, le *gastrocnemius* contenant plutôt des fibres rapides (Figure 9).

Chaque fibre est innervée par un seul neurone ou motoneurone, lui-même relié à plusieurs fibres musculaires d'un seul type formant ainsi une unité motrice (Figure 10). Les fibres d'une même unité motrice sont dispersées dans le muscle pour garantir un recrutement et une contraction harmonieux. La synapse entre le motoneurone et la fibre musculaire innervée est appelée jonction neuromusculaire.

### **La mitochondrie**

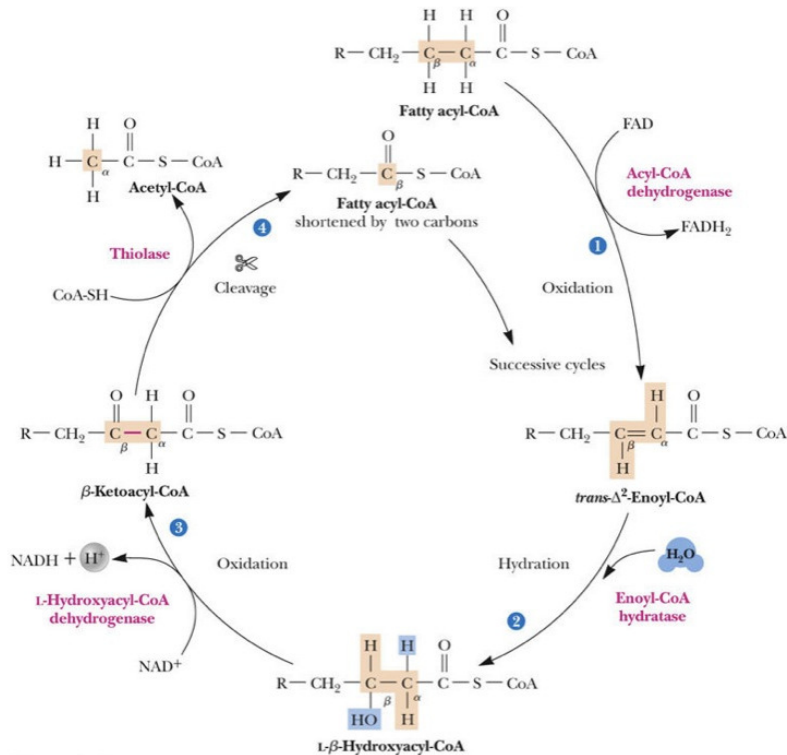
En plus du cytosquelette spécialisé composé notamment des MHC, le muscle a besoin d'énergie pour se contracter. La mitochondrie est le siège de la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).

La mitochondrie possède deux membranes mitochondriales, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace inter-membranaire et la matrice (Figure 11). La mitochondrie possède son propre



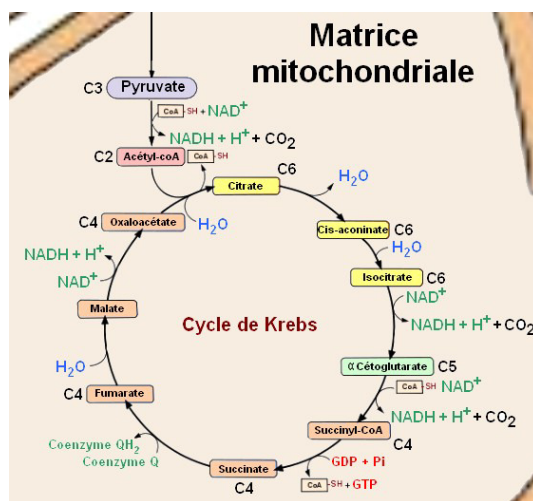
**Figure 12 : La chaîne respiratoire mitochondriale.**

(<http://www.biologymad.com/master.html?http://www.biologymad.com/PhotosynResp/PhotosynResp.htm>)



**Figure 13 : La  $\beta$ -oxydation.**

(<http://pixgood.com/beta-oxidation-of-palmitic-acid.html>)



**Figure 14 : Le cycle de Krebs.**

([http://eric.lacouture.free.fr/lycee/termS\\_spe/cours\\_term\\_spe\\_ch2.html](http://eric.lacouture.free.fr/lycee/termS_spe/cours_term_spe_ch2.html))

ADN : l'ADN mitochondrial, qui code pour certaines protéines mitochondriales, les autres étant codées par le génome nucléaire.

Pour produire de l'ATP, elle convertit les produits des métabolismes glucidique, lipidique et protéique en  $\text{CO}_2$  et en eau à l'aide des 5 complexes protéiques qui composent la chaîne respiratoire : le complexe I ou NADH déshydrogénase, le complexe II ou succinate déshydrogénase, le complexe III ou le cytochrome bc1, le complexe IV ou cytochrome c oxydase et le complexe V ou ATP synthase et de 2 petites molécules : le cytochrome c et l'ubiquinone (Figure 12) (Johannsen and Ravussin 2009). Fonctionnellement, des molécules d'acétylcoenzyme A principalement, convergent vers le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie. Ces molécules sont obtenues par oxydation du pyruvate issu de la glycolyse, par  $\beta$ -oxydation des lipides ou par protéolyse des protéines (Lunt and Vander Heiden 2011; Koopman, Ly et al. 2014). La  $\beta$ -oxydation des lipides a lieu dans la mitochondrie, après conversion des acides gras en acylcoenzyme A dans le cytosol et transfert dans la mitochondrie via une translocase. Il s'agit d'une succession de réactions, chaque cycle permettant la formation d'un acétylcoenzyme A, d'une molécule de NADH,  $\text{H}^+$  et d'une molécule de FADH<sub>2</sub> (Figure 13). L'oxydation d'une molécule d'acétylcoenzyme A par les 8 réactions successives du cycle de Krebs permet la production d'une molécule d'ATP, de 3 molécules de NADH,  $\text{H}^+$  et d'une molécule de FADH<sub>2</sub> (Figure 14). Ces cofacteurs réduits tendent à donner facilement leurs électrons. Le transfert de ces électrons le long de la chaîne respiratoire s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons. Ces derniers retournent dans la matrice en passant à travers les ATP synthases, qui convertissent l'énergie ainsi libérée pour catalyser la formation d'ATP. Le mécanisme de couplage entre l'oxydation des nutriments et la formation d'ATP est appelé phosphorylation oxydative. La majorité de l'ATP est générée par la glycolyse couplée à la phosphorylation oxydative, chaque processus dépendant de la disponibilité en substrat et en oxygène et de la demande énergétique de la cellule (Koopman, Ly et al. 2014).

### *1-2-3-3- La contraction musculaire*

Après libération du neurotransmetteur acétylcholine par un motoneurone au niveau de la jonction neuromusculaire, celui-ci diffuse et va se fixer sur ses récepteurs situés sur le sarcolemme. L'activation des récepteurs cholinergiques nicotiques induit l'ouverture d'un canal intermembranaire qui permet la diffusion de  $\text{Na}^+$  à l'intérieur et de  $\text{K}^+$  à l'extérieur de la cellule. Ces flux sont à l'origine d'un potentiel d'action qui se propage au niveau du

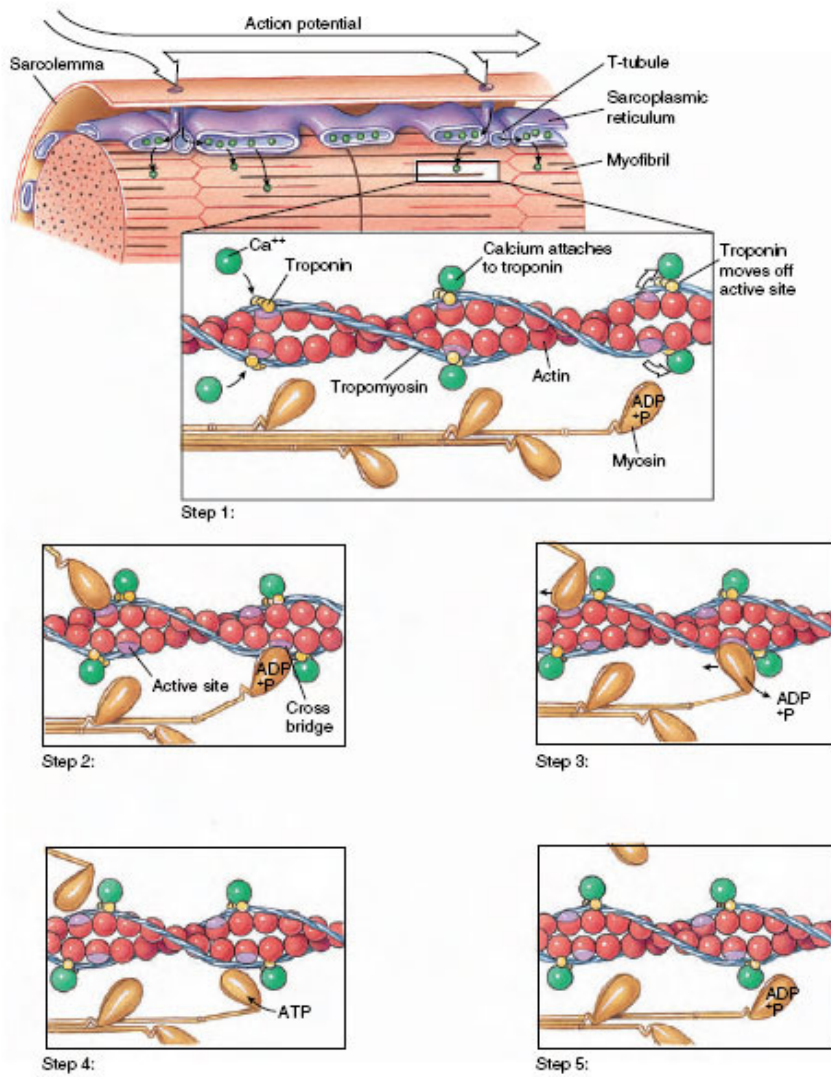


Figure 15 : Mécanisme de la contraction musculaire.

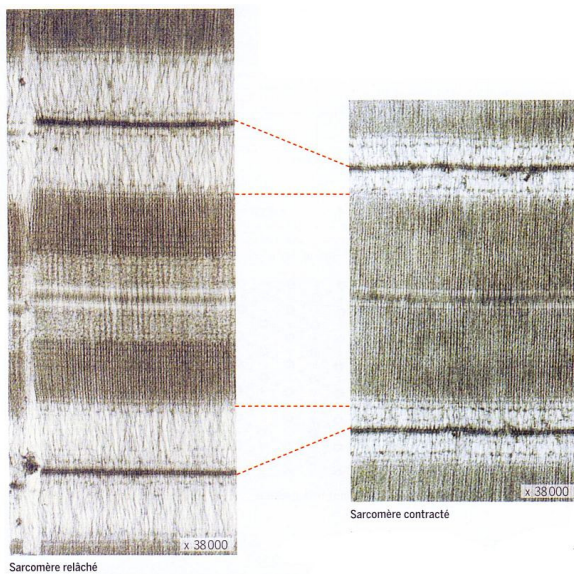
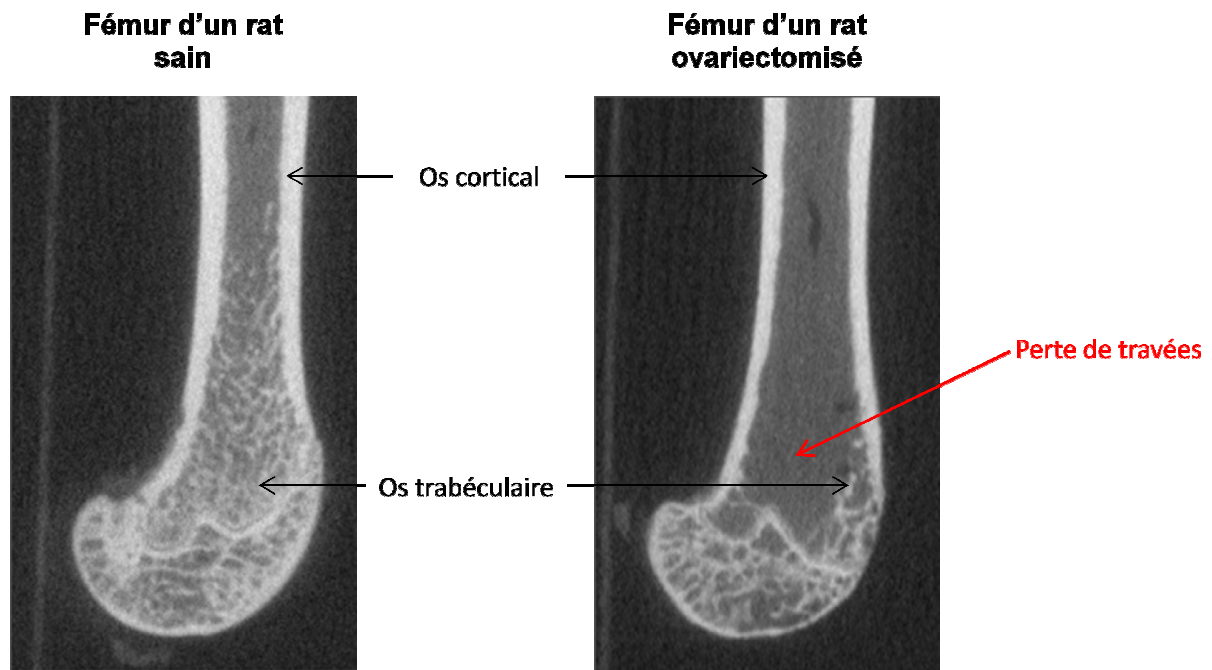


Figure 16 : Raccourcissement du sarcomère lors de la contraction musculaire.

sarcolemme. Lorsque la dépolarisation atteint la zone de contact entre les tubules transverses et le réticulum sarcoplasmique, les ions calcium retenus dans ce dernier sont libérés. Ils peuvent alors se fixer à la troponine qui change de conformation et entraîne la tropomyosine, ce qui libère le site de liaison de la myosine à l'actine (Figure 15). La liaison des 2 molécules induit la libération de la molécule d'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique liés à la myosine, modifiant ainsi sa conformation. La tête de la myosine, toujours fixée à l'actine, bascule. Ainsi, la zone de superposition entre les filaments épais et les filaments fins augmente et le sarcomère se raccourcit, contractant le muscle (Figure 16) (Greising, Gransee et al. 2012). La fixation d'une molécule d'ATP libère la myosine qui hydrolyse alors l'ATP en ADP. Cette réaction est exothermique et l'énergie libérée est convertie par la myosine en force mécanique (Greising, Gransee et al. 2012; Koopman, Ly et al. 2014). Le cycle d'accrochage, basculement, décrochage, hydrolyse d'ATP se poursuit tant que du calcium est présent. La libération de calcium n'est que transitoire grâce à l'action rapide de pompes à calcium-ATPase situées au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique (Greising, Gransee et al. 2012). Ainsi, au repos, la concentration intracytoplasmique de calcium est faible et le site de liaison de la myosine à l'actine est masqué par la tropomyosine et la troponine.

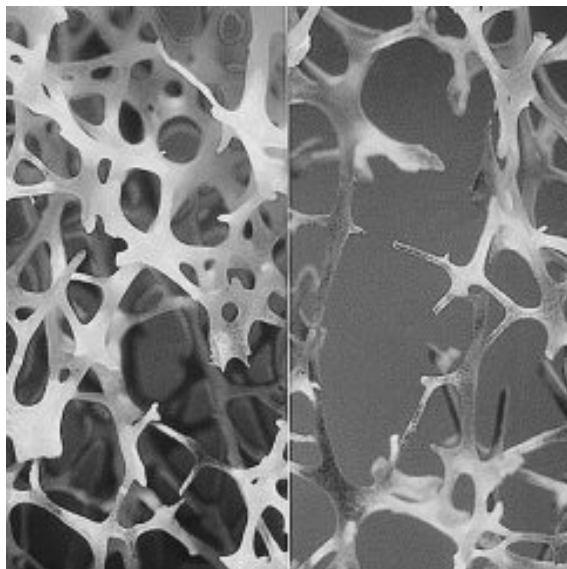
Les fibres à contraction lente possèdent moins de réticulum sarcoplasmique que celles à contraction rapide (Campbell and Reece 2004). De cette façon, le calcium libéré reste plus longtemps dans le cytosol, ce qui permet une contraction prolongée. De plus, ces fibres ont un approvisionnement en énergie plus régulier grâce à une meilleure irrigation et un nombre plus important de mitochondries (Campbell and Reece 2004).



**Figure 17 : Analyses de fémurs de rats sain à gauche et ovariectomisé à droite obtenues par micro-tomographie numérique.**

Les niveaux de gris reflètent la densité minérale osseuse : plus le pixel est blanc, plus la densité osseuse est forte. L'os sain est caractérisé par la présence de nombreuses travées, dont le nombre est fortement diminué chez l'individu ostéoporotique.

(Données de l'étude animale sur le modèle de la rate ovariectomisée)



**Figure 18 : Microarchitecture d'un os trabéculaire normal à gauche et d'un os ostéoporotique à droite.**

(<http://www.iofbonehealth.org/what-is-osteoporosis>)

## 2- Vieillessement de l'appareil locomoteur

Différentes pathologies de l'appareil locomoteur surviennent au cours du vieillissement, notamment l'ostéoporose, la sarcopénie et l'arthrose. L'importance des interrelations entre les tissus osseux et musculaires, ainsi que le développement parallèle de l'ostéoporose et de la sarcopénie nous a conduits à nous intéresser particulièrement à ces deux tissus.

L'ostéoporose puis la sarcopénie seront définies avant d'exposer les données épidémiologiques et notamment les chiffres concernant la prévalence des chutes et des fractures ainsi que le coût sociétal induit. Ensuite, les mécanismes du renouvellement osseux et musculaire, ainsi que leur dérégulation avec l'âge et le rôle prépondérant du stress oxydant et de l'inflammation, seront discutés. La dernière partie sera consacrée au résumé de la revue de la littérature rédigée au cours de ces travaux de thèse sur les relations physiologiques, cellulaires et moléculaires entre les deux tissus d'intérêt.

### 2-1- L'ostéoporose et la sarcopénie, deux atteintes majeures du système locomoteur

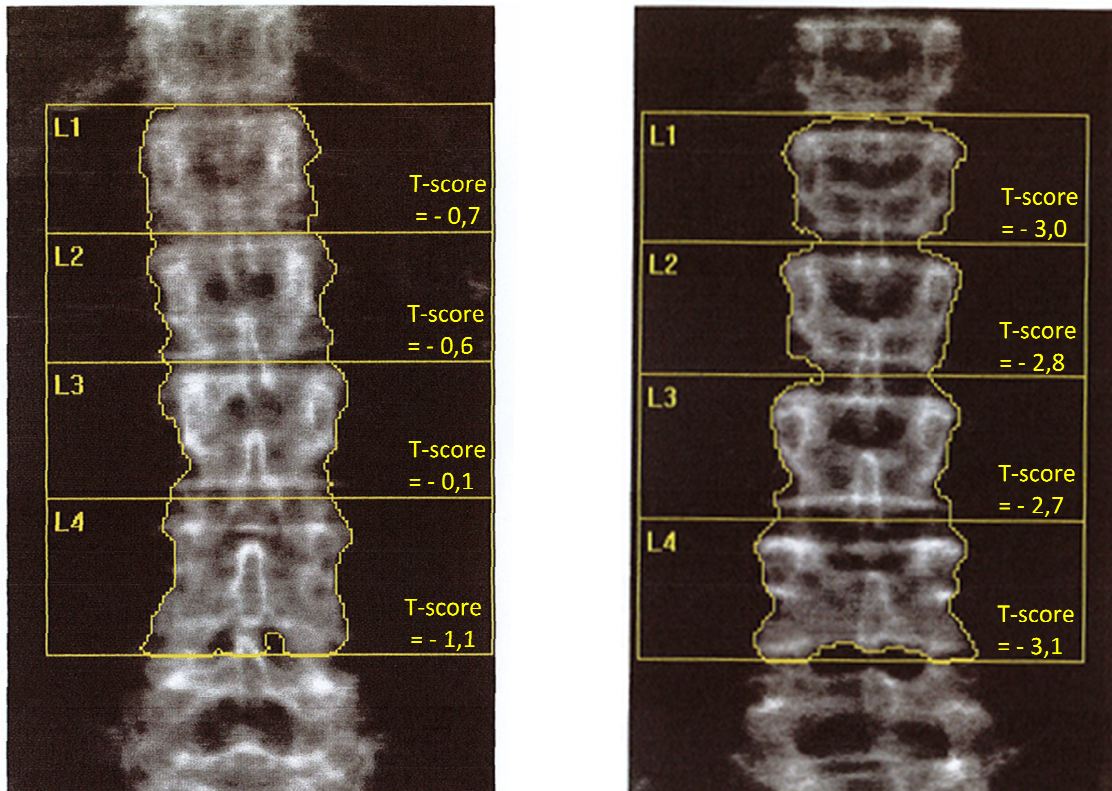
L'ostéoporose et la sarcopénie sont des pathologies répandues chez les personnes âgées, qui réduisent considérablement la qualité de vie en limitant la capacité à effectuer des tâches du quotidien, accélérant alors leur entrée en dépendance. De plus, elles sont à l'origine de chutes et de fractures qui augmentent la morbidité.

#### 2-1-1- Définitions

##### 2-1-1-1- *L'ostéopénie et l'ostéoporose*

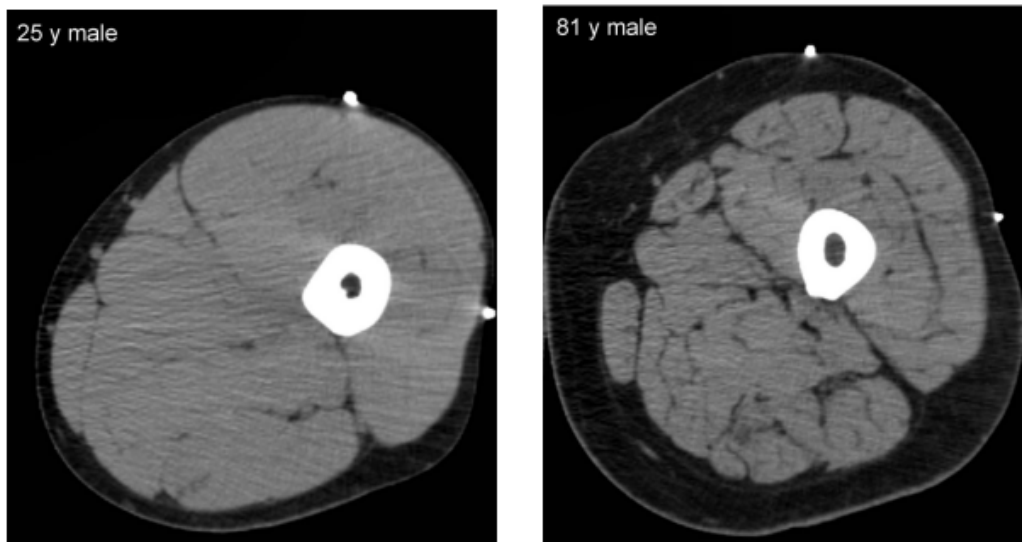
L'ostéoporose signifie littéralement « os poreux » (Figure 17 et Figure 18) et est définie comme : « une maladie squelettique systémique caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration microarchitecturale du tissu osseux, avec une augmentation conséquente de la fragilité osseuse et une sensibilité aux fractures » (Conférence report 1993; Klibanski, Adams-Campbell et al. 2001; Kanis, McCloskey et al. 2008; Bijlsma, Meskers et al. 2012). Il existe différentes formes d'ostéoporose dont l'ostéoporose post-ménopausique et l'ostéoporose sénile, réunies sous le terme ostéoporoses primaires. L'ostéoporose induite par d'autres pathologies comme l'hypogonadisme ou le diabète, l'ostéoporose liée à une immobilisation, à des déficiences nutritionnelles (en calcium et/ou vitamine D) ou à un traitement médicamenteux (utilisation de glucocorticoïdes par exemple) sont appelées





**Figure 19 : Ostéodensitométrie lombaire (L1 à L4) d'une volontaire saine à gauche et d'une volontaire ostéoporotique à droite.**

Les niveaux de gris reflètent la densité minérale osseuse : plus le pixel est blanc, plus la densité osseuse est forte. (Données de l'étude clinique POLivD3).



**Figure 20 : Densitométries à mi-cuisse chez un sujet jeune et un sujet âgé.**

Chez le sujet âgé il y a une réduction de l'aire musculaire, une augmentation de la graisse sous-cutanée et une augmentation de l'infiltration lipidique et de tissu conjonctif dans le muscle (Koopman, 2009).

ostéoporoses secondaires (Post, Cremers et al. 2010). Les ostéoporoses post-ménopausique et sénile sont les formes d'ostéoporose ciblées par l'étude présentée dans cette thèse. L'ostéoporose de type I ou post-ménopausique intervient suite à l'apparition d'une réduction de l'imprégnation en estrogènes liée à la ménopause chez les femmes. L'ostéoporose de type II ou ostéoporose sénile touche les personnes âgées (à partir de 75 ans environ) et atteint aussi bien les femmes que les hommes. Chez la femme âgée, les deux ostéoporoses peuvent cohabiter.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le T-score est utilisé pour diagnostiquer l'ostéoporose. Il s'agit de la comparaison de la densité osseuse (mesurée préférentiellement par absorption biphotonique à rayons X (DXA)) d'une personne à un temps t par rapport à la densité osseuse théorique de l'adulte jeune caucasien (30 ans) de même sexe, au même site osseux. Ainsi, l'ostéoporose est définie comme une densité osseuse qui se trouve à 2,5 écart-types ou plus, en dessous de la valeur de référence : T-score inférieur ou égal à -2,5. Un T-score compris entre -1,1 à -2,4 signale une ostéopénie et est normal s'il se trouve dans la fourchette 0 à -1,0 (Figure 19).

En général l'ostéoporose peut rester longtemps asymptomatique et a comme principale conséquence la fracture osseuse, qui augmente considérablement la morbidité et la mortalité des personnes âgées (Chen, Zhou et al. 2013; Eastell 2013).

#### *2-1-1-2- La sarcopénie*

Le terme sarcopénie était proposé par Rosenberg en 1989 (1989). Dans un premier temps, la définition était uniquement basée sur la perte de la masse musculaire (Baumgartner, Koehler et al. 1998), et a été ensuite associée à la perte de la force musculaire (Morley, Baumgartner et al. 2001) et/ou à la diminution de la performance physique (Figure 20). En effet, l'European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP, the Sarcopenia Working Group) recommande d'utiliser le double critère, réunissant une faible masse musculaire associée à une réduction de la fonction musculaire (force ou performance physique) pour diagnostiquer les sujets sarcopéniques (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010). La force musculaire est générée par un muscle en contraction et la performance est la capacité à effectuer un mouvement.

L'EWGSOP a identifié différents stades dans le développement de la sarcopénie pour une meilleure prise en charge des patients (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010). Ainsi, la pré-sarcopénie est caractérisée par une diminution de la masse musculaire, la sarcopénie par une



diminution de la masse musculaire et de la force ou de la performance musculaire et la sarcopénie sévère associe les 3 critères.

Contrairement à l'ostéoporose, il n'existe pas de consensus sur le ou les paramètres de mesure de la sarcopénie. En effet, des valeurs de référence ne sont à ce jour pas disponibles (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010). En fonction du coût, de la disponibilité, de la simplicité d'utilisation, de la précision et de la répétabilité des différentes mesures disponibles les groupes EWGSOP et le Foundation for the National Institutes of Health (FNIH) ont sélectionnés des méthodes de mesure, qui s'avèrent consensuelles (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010; Dam, Peters et al. 2014). La DXA a été préférée pour la mesure de la masse musculaire. Ainsi, la somme de la masse maigre ou masse musculaire des 4 membres est effectuée (masse musculaire appendiculaire (ASM)), puis rapportée à l'indice de masse corporel (IMC) (Dam, Peters et al. 2014) ou à la taille au carré (indice relatif de masse musculaire (RSMI)) (Baumgartner, Koehler et al. 1998; Newman, Kupelian et al. 2003; Delmonico, Harris et al. 2007). Le dynamomètre a été préconisé pour mesurer la force de préhension (Fried, Tangen et al. 2001; Lauretani, Russo et al. 2003; Dam, Peters et al. 2014), qui est corrélée à la force des jambes (Lauretani, Russo et al. 2003). Le test « short physical performance battery » (SPPB) (Guralnik, Ferrucci et al. 2000; Delmonico, Harris et al. 2007; Cesari, Kritchevsky et al. 2009) ou uniquement la vitesse de marche sur une distance de 4 ou 6 mètres (Fried, Tangen et al. 2001; Lauretani, Russo et al. 2003; Dam, Peters et al. 2014) ont été choisis pour estimer la performance physique. Le SPPB évalue l'équilibre (capacité à se tenir debout avec les pieds joints, en semi-tandem et en tandem), la marche sur une distance de 4 mètres et la capacité à se lever d'une chaise et à se rasseoir à 5 reprises (Guralnik, Simonsick et al. 1994).

D'autres indices ont aussi été utilisés dans les travaux sur la sarcopénie. Ainsi, la perte de masse musculaire a été évaluée en utilisant le rapport entre la masse musculaire absolue (et non l'ASM) déterminée par impédancemétrie (et non par DXA) et la taille au carré (Janssen, Baumgartner et al. 2004; Tichet, Vol et al. 2008). D'autres équipes ont rapporté la masse musculaire absolue mesurée par impédancemétrie au poids corporel, ce rapport étant multiplié par 100 (Janssen, Heymsfield et al. 2002; Tichet, Vol et al. 2008). Newman et coll. ont utilisé le RSMI et un second indice : l'ASM ajustée pour la taille et la masse grasse (Newman, Kupelian et al. 2003). Dans une autre étude, les auteurs se sont servis de la section transversale du quadriceps mesurée à mi-cuisse et rapportée au poids corporel (Ochi, Tabara et al. 2010). La mesure de la force des muscles extenseurs du genou par dynamométrie a été utilisée pour déterminer la force musculaire (Goodpaster, Park et al. 2006). En ce qui

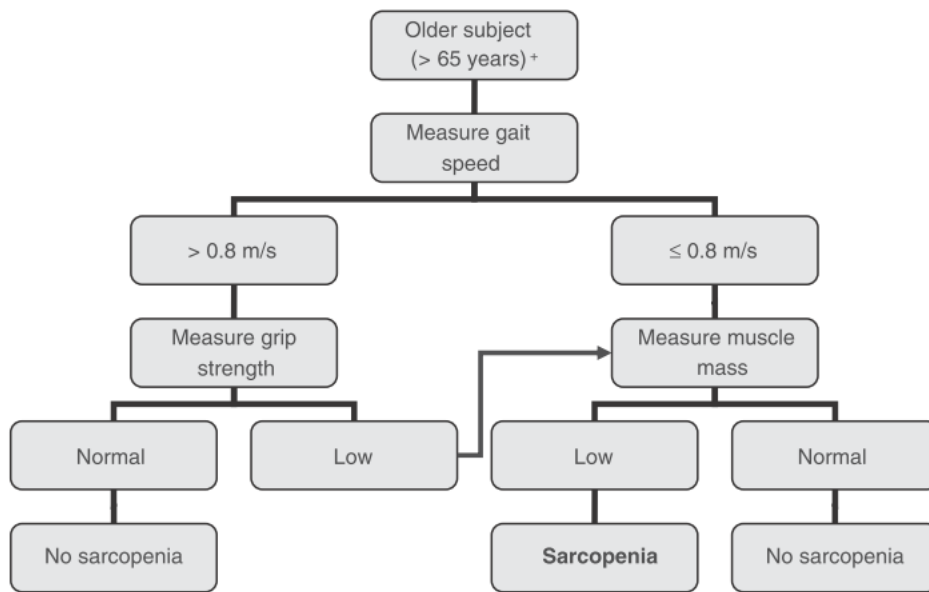


Figure 21 : Algorithme suggéré par l' EWGSOP pour la recherche de cas de sarcopénie chez les personnes âgées (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010).

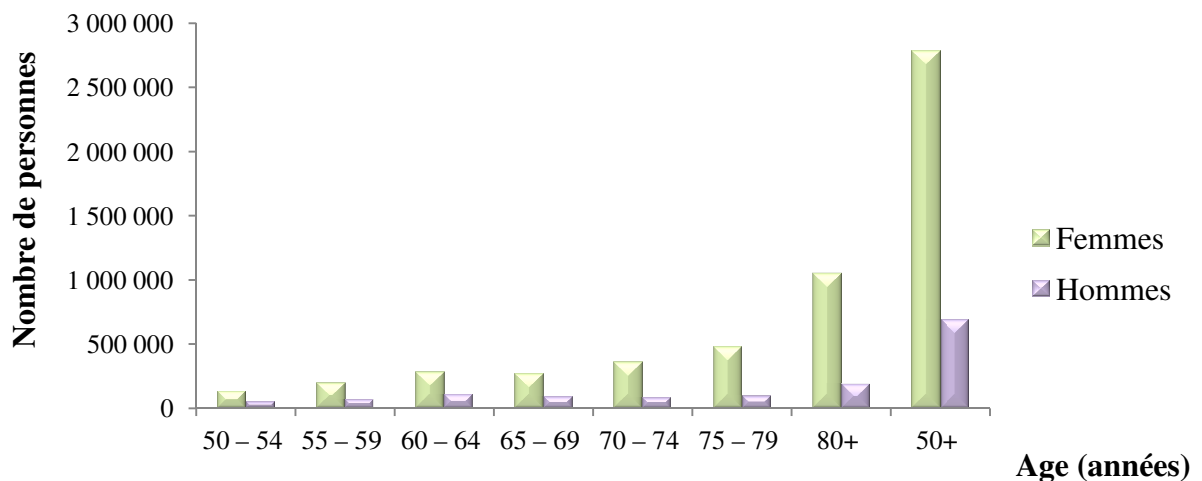


Figure 22 : Estimation du nombre de femmes et d'hommes atteints d'ostéoporose en France (d'après Svedbom, Hernlund et al. 2013).  
Mesure effectuée au niveau du col du fémur (T-score  $\leq -2,5$ ).

concerne la performance physique, en plus de la vitesse de marche sur une distance de 4 mètres, Lauretani et coll. (Lauretani, Russo et al. 2003) ont aussi évalué la capacité à marcher pendant un kilomètre sans difficulté (Lauretani, Russo et al. 2003).

L'EWGSOP a suggéré un algorithme pour identifier la sarcopénie (Figure 21), dont le premier critère était une vitesse de marche inférieure ou égale à 0,8 m/s (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010). Ce même seuil a été proposé par le FNIH. De plus, pour ce dernier, une faible masse musculaire correspondait à un rapport ASM/IMC inférieur à 0,789 pour les hommes et inférieur à 0,512 pour les femmes et une force musculaire était considérée comme faible quand la valeur mesurée était respectivement inférieure à 26 kg et 16 kg (Studenski, Peters et al. 2014). En ce qui concerne ces 2 derniers critères, l'EWGSOP a récapitulé les données de la littérature disponibles, sans toutefois faire un choix (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010).

Une étude de comparaison des différents paramètres de mesures de la sarcopénie a été menée par le FNIH, et montrait que l'association positive entre les différents critères utilisés était faible, variant de 7 à 32% alors que l'association négative était de plus de 95% (Dam, Peters et al. 2014). Ainsi, il serait plus facile d'exclure la sarcopénie que de la diagnostiquer.

### **2-1-2- Epidémiologie de l'ostéoporose et de la sarcopénie**

En 2010 en France, 22 645 000 personnes avaient plus de 50 ans. Cette population est estimée à 27 134 000 en 2025, ce qui correspondrait à une augmentation de 20% (Svedbom, Hernlund et al. 2013). Selon l'OMS, la population mondiale des plus de 60 ans devrait tripler entre les années 2000 et 2050, passant de 605 millions à 2 milliards de personnes (soit de 11 à 22% de la population).

Par ailleurs, l'allongement de la durée de vie associé à la diminution de l'activité physique, et à une réduction de l'espérance de vie en bonne santé laisse supposer à une forte augmentation du nombre de personnes atteintes d'ostéoporose et de sarcopénie dans les années à venir.

#### *2-1-2-1- Les données épidémiologiques de l'ostéoporose*

Selon la Société Française de Rhumatologie, 39% des femmes de 65 ans sont atteintes d'ostéoporose, ce chiffre augmente à 70% pour des femmes de 80 ans. La figure 22 met



clairement en évidence l'augmentation de la prévalence de l'ostéoporose avec le vieillissement, et ce majoritairement chez les femmes (Svedbom, Hernlund et al. 2013).

#### *2-1-2-2- Les données épidémiologiques de la sarcopénie*

Selon les estimations, plus de 50 millions de personnes sont affectées par la sarcopénie dans le monde aujourd'hui et ce chiffre sera probablement multiplié par 4 en 2050 (Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010).

Les premières données épidémiologiques étaient basées uniquement sur la perte de masse musculaire. Dans l'étude New Mexico Elder Health Survey, le critère ASM rapporté à la taille au carré inférieure à deux écarts types de la moyenne d'un groupe de sujets a été utilisé (soit 7,26 kg/m<sup>2</sup> pour les hommes et 5,45 kg/m<sup>2</sup> pour les femmes) (Baumgartner, Koehler et al. 1998). Différentes populations ont été distinguées : les femmes et les hommes, hispaniques ou non. Ainsi, 13,5 à 24,1% des sujets de moins de 70 ans, 18,3 à 36,4% des sujets de 70 à 80 ans et de 43,2 à 60,0% des sujets de plus de 80 ans étaient identifiés comme sarcopéniques (Baumgartner, Koehler et al. 1998). En France, 23,6% des femmes et 12,5% des hommes âgés de 60 à 78 ans étaient diagnostiqués comme sarcopéniques, en utilisant le rapport de la masse musculaire mesurée par impédancemétrie sur le poids corporel (Tichet, Vol et al. 2008). En utilisant les critères de l'EWGSOP, le FNIH a déterminé une prévalence de la sarcopénie de 5,3% pour les hommes et 13,3% pour les femmes de plus de 65 ans, et une prévalence de la sarcopénie sévère de 0,7% pour les hommes et de 2,9% chez les femmes (Dam, Peters et al. 2014).

Il a été mis en évidence que la prévalence de la sarcopénie (définie par un RSMI < 5,45 kg/m<sup>2</sup>) était augmentée de 8,9% chez des femmes ostéopéniques et de 33,9% chez des femmes ostéoporotiques par rapport à celles ayant une BMD normale, un résultat très intéressant bien que non significatif (Walsh, Hunter et al. 2006).

#### **2-1-3- Les chutes et les fractures**

Au cours du vieillissement, les mouvements sont ralentis, la stabilité et l'équilibre sont affectés, ce qui contribue au risque de chutes et de fractures (Yu, Hedstrom et al. 2007; Ryall, Schertzer et al. 2008). La sarcopénie multiplie par 3 le risque de chute (Landi, Liperoti et al. 2012), qui, associée à la fragilité osseuse, est à l'origine de fractures (Manolagas and Parfitt 2010). Les chutes et les fractures engendrent une perte d'indépendance ainsi que d'importantes dépenses de santé.





En France en 2005, 24 % des personnes de 65 à 75 ans déclaraient être tombées au cours des 12 derniers mois (Danet 2011). Toujours en France en 2004, 450 000 chutes ont nécessité un recours aux urgences hospitalières. Selon l’OMS, chaque année dans le monde 37,3 millions de chutes requièrent un suivi médical du fait de leur sévérité relative (Aide-mémoire N°344 Octobre 2012). Ce chiffre correspondrait à environ 20% des chutes totales (Francis 2001). Parmi la totalité des chutes, 10% seraient à l’origine de fractures (Francis 2001; Harada 2013). En plus des fractures dues aux chutes, l’ostéoporose engendre des fractures spontanées ou dues à de faibles impacts (Lelovas, Xanthos et al. 2008). Ainsi, parmi les 70% des femmes de plus de 80 ans qui sont atteintes d’ostéoporose, 60% présentent au moins une fracture. Les vertèbres, le col du fémur et le poignet, qui sont soumis aux contraintes mécaniques les plus fortes, sont très susceptibles de fracturer chez les personnes ostéoporotiques (Rachner, Khosla et al. 2011). Ainsi en France en 2010, 73 600 fractures de la hanche, 55 600 fractures vertébrales et 56 100 fractures du poignet ont été dénombrées (Svedbom, Hernlund et al. 2013). Le coût associé a été estimé à 4,85 milliards d’euros dont 72,6% concernaient les femmes. Le coût de la première année après une fracture représentait 65,5% de ces dépenses, 27,4% ont été utilisés pour couvrir le coût de l’invalidité à long terme et seulement 7,1% ont été investis dans la prévention des fractures (Hernlund, Svedbom et al. 2013; Svedbom, Hernlund et al. 2013).

Le risque de chute a été estimé à 27% pour les personnes de plus de 65 ans, et il est augmenté chez celles ayant déjà subi une chute préalable (Ganz, Bao et al. 2007). Les meilleurs prédicteurs d’une chute seraient une démarche ou un équilibre anormal (Ganz, Bao et al. 2007). Dans une étude clinique, chez les sujets de plus de 65 ans, le risque d’avoir une fracture dans le reste de leur vie était de 18% pour les hommes et de 52% pour les femmes (Court-Brown, Clement et al. 2014), un risque qui était augmenté par une fracture antérieure (Klotzbuecher, Ross et al. 2000). Le risque fracturaire est en augmentation dans les pays développés à cause de l’accroissement de la durée de vie et à la sédentarisation (Eastell 2013). En effet, le nombre de fractures en France devrait augmenter de 30% en 2025 pour atteindre un total de 491 500 (Svedbom, Hernlund et al. 2013). Au niveau mondial, le nombre de fractures dues à l’ostéoporose devrait être multiplié par 3 entre les années 1990 et 2050, passant de 1,7 millions à 6,3 millions selon l’OMS (WHO 2002).

La forte incidence des chutes et des fractures est à l’origine d’une perte importante de la qualité de vie ainsi que d’un très fort coût sociétal. Les chiffres mettent en évidence la très



faible part de budget investi dans la prévention. Ainsi, le développement de stratégies nutritionnelles de prévention à faible coût pour la société, pourrait permettre de réduire les dépenses budgétaires publiques engendrées par l'ostéoporose et la sarcopénie.

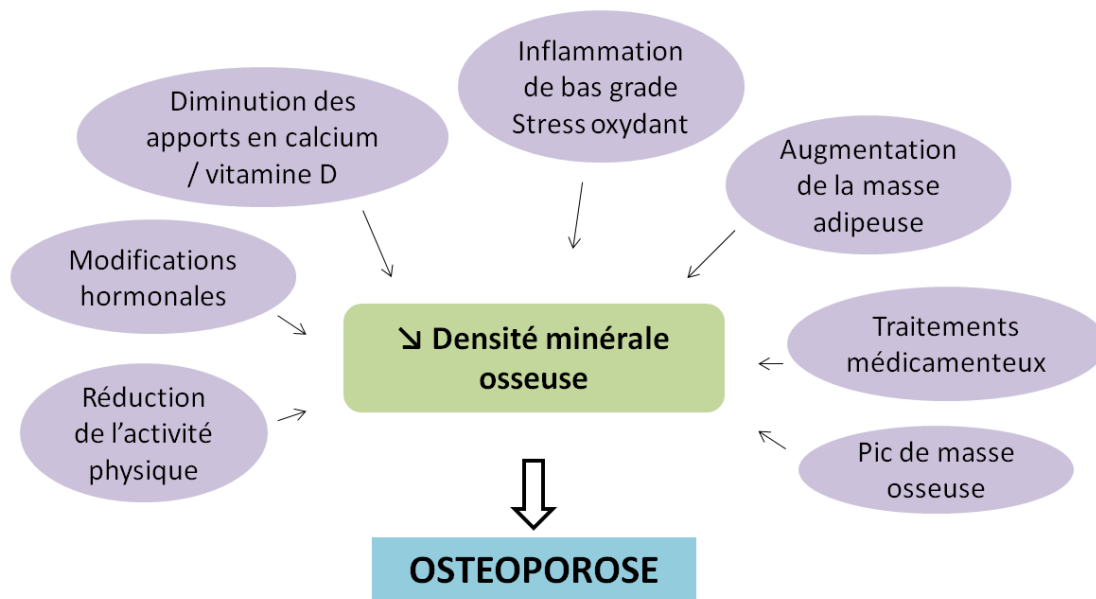


Figure 23 : Facteurs de risque de l'ostéoporose.

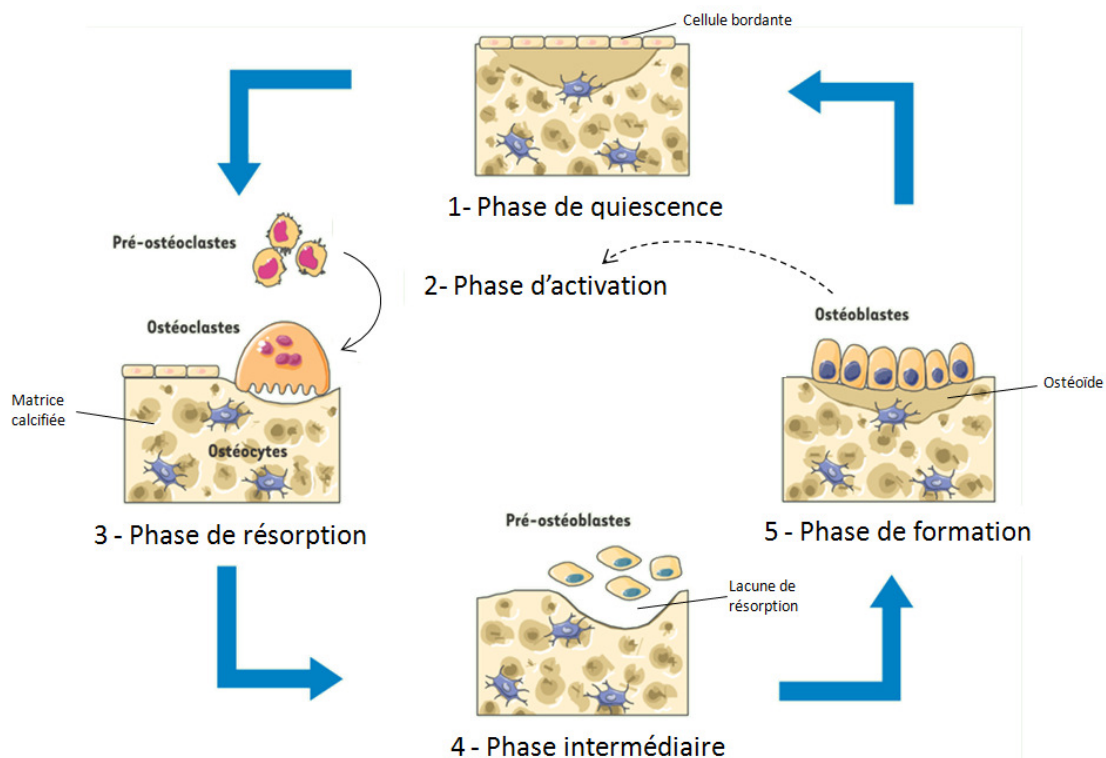


Figure 24 : Cycle du remodelage osseux (d'après Marie and Halbout 2008).

## 2-2- Mécanismes de l'ostéoporose

Pour maintenir les qualités de rigidité et d'élasticité de l'os et pour répondre aux besoins de l'organisme, notamment en ce qui concerne le calcium, celui-ci doit régulièrement être renouvelé. Ainsi, les ostéoclastes et les ostéoblastes travaillent en tandem pour remodeler le tissu osseux. Cependant, au cours du vieillissement, les mécanismes impliqués sont dérégulés, conduisant, parmi de nombreux autres facteurs (Figure 23), à l'ostéoporose. Les mécanismes de ce remodelage et les régulations associées, ainsi que la dérégulation au cours du vieillissement seront développés ci-dessous, en se limitant aux acteurs étudiés au cours de ces travaux de thèse. De plus, quelques notions sur les traitements pharmaceutiques disponibles et la modélisation de l'ostéoporose chez l'animal seront abordées.

### 2-2-1- Le remodelage osseux

#### 2-2-1-1- Mécanismes du remodelage osseux

Au cours de la croissance, le modelage osseux permet d'atteindre le pic de masse osseuse. Chez l'adulte, on ne parle plus de modelage mais de remodelage osseux. Il permet de maintenir la solidité des os en renouvelant le tissu, en remplaçant l'os endommagé mais aussi en s'adaptant aux modifications de charge mécanique (Seeman 2009; Eriksen 2010). Environ 9% de l'os est renouvelé chaque année (environ 4% de l'os cortical et 28% de l'os trabéculaire) (Manolagas 2000). C'est le dialogue entre les deux types cellulaires et la forte régulation de la synchronisation des mécanismes qui sont les garants de l'intégrité de l'os (Del Fattore, Teti et al. 2012).

Le remodelage osseux se déroule au sein des unités multicellulaires de base (basic multicellular unit (BMU)) qui comportent des ostéoclastes, des ostéoblastes, des ostéocytes, des cellules bordantes et des capillaires (Kular, Tickner et al. 2012). Les ostéoclastes sont situés à l'avant de la BMU et sont suivis par les ostéoblastes, les deux types cellulaires formant ainsi un tandem (Manolagas and Parfitt 2010). Le processus peut être découpé en 5 phases (Figure 24) (Souberbielle 2000; Marie and Halbout 2008). Au cours de la phase de quiescence, les cellules bordantes recouvrent la surface osseuse et bloquent ainsi les cellules résorbantes. Sous l'impact différents stimuli tels que la parathormone (PTH), la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) ou la prostaglandine-E2 (PGE2), les cellules bordantes se rétractent pour laisser place aux ostéoclastes tout juste activés, ce qui se traduit par une polarisation des cellules (Liu, Li et al. 2005; Boyce, Rosenberg et al. 2012). Celles-ci se fixent alors à la matrice extracellulaire de manière à former des jonctions étanches (Vaananen and



Horton 1995; Jurdic, Saltel et al. 2006). En parallèle, les cellules bordantes migrent pour former une voûte au-dessus de la zone de remodelage, appelée « canopée » (Hauge, Qvesel et al. 2001). Les ostéoclastes secrètent alors des enzymes lytiques à l'origine de la création d'une lacune de résorption appelée lacune de Howship (Sommerfeldt and Rubin 2001). La présence de pompes à protons permet d'acidifier le compartiment et d'activer les enzymes telles que la TRAP (Blair, Teitelbaum et al. 1989). Cette acidification entraîne la dissolution de la matrice inorganique qui précède la dégradation de la matrice organique (Blair, Kahn et al. 1986). En effet, une fois libérées les protéines sont dégradées par des enzymes telles que la collagénase lysosomale Ctsk (Gowen, Lazner et al. 1999; Li and Chen 1999). Les ostéoclastes produisent également des métalloprotéases matricielles (MMP). Ces MMP jouent un rôle dans la migration des ostéoclastes et l'initiation de la résorption osseuse (Delaisse, Andersen et al. 2003). Les protéines matricielles digérées dont les fragments de Col1a1 sont transportées de la lacune de résorption vers le milieu extracellulaire, par voie endo-exocytosique, d'où ils rejoignent la circulation sanguine (Vaananen 2005). Ainsi, les fragments de dégradation du collagène tels que le C-telopeptide of type 1 collagen (CTX1) sont des marqueurs de la résorption osseuse dosables dans le sérum (Boyce, Rosenberg et al. 2012). Les fibres laissées par les ostéoclastes sont prises en charge et digérées par les cellules bordantes, qui de ce fait nettoient la lacune de Howship avant de déposer une nouvelle couche de collagène (Everts, Delaisse et al. 2002). La phase de résorption dure environ 2 semaines (Riggs, Khosla et al. 2002). Le mécanisme d'arrêt de la résorption osseuse n'est pas connu. Cependant, le calcium extracellulaire, les estrogènes ou la phagocytose d'ostéocytes par les ostéoclastes pourraient faire partie des signaux impliqués (Hughes, Dai et al. 1996; Lorget, Kamel et al. 2000; Seeman 2009). La phase de formation osseuse est précédée d'une phase intermédiaire au cours de laquelle les ostéoclastes partent en apoptose (Kular, Tickner et al. 2012). Les ostéoblastes élaborent alors la trame organique (tissu ostéoïde) (Eriksen 2010; Raggatt and Partridge 2010), majoritairement constituée de Col1a1 (Clarke 2008). Cette dernière se minéralise suite au dépôt de cristaux d'hydroxyapatite par les ostéoblastes. Ce processus est contrôlé par la sécrétion ostéoblastique d'ALP et de protéines telles que l'OCN (Orimo 2010; Raggatt and Partridge 2010) et les small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein (SIBLING), dont fait partie l'OPN et qui jouent un rôle dans la nucléation et la croissance de l'hydroxyapatite (Staines, MacRae et al. 2012). Pour maintenir le capital osseux, la quantité de matrice formée doit être identique à celle résorbée (Seeman 2009). La majorité des ostéoblastes meure, les autres deviennent des cellules bordantes ou se retrouvent bloqués dans la matrice osseuse formant ainsi des ostéocytes (Han, Cowin et al. 2004; Seeman 2009).





Le volume moyen d'os remplacé par une BMU est de 0,025 mm<sup>3</sup> (Manolagas 2000). En permanence, plusieurs millions de cycles de remodelage sont en cours, dont chacun a une durée moyenne de 6 à 9 mois. Cependant, le temps nécessaire à un cycle de remodelage est variable selon le site osseux et il est plus long pour l'os trabéculaire que pour l'os cortical.

En parallèle et en association avec la formation osseuse, a lieu l'angiogenèse, qui constitue une étape clé du remodelage osseux (Taichman 2005; Seeman 2009).

#### *2-2-1-2- Régulations*

##### **Le couplage ostéoblaste/ostéoclaste**

La régulation spatio-temporelle de l'ostéoclastogenèse et de l'ostéoblastogenèse assure le maintien de la masse osseuse. En effet, l'ostéoblastogenèse et ses régulateurs participent au contrôle de l'ostéoclastogenèse et du volume d'os à résorber et l'ostéoclastogenèse et les produits de résorption régulent l'ostéoblastogenèse (Seeman 2009). Ce couplage peut se faire par interaction directe entre les deux types cellulaires ou via la sécrétion de facteurs paracrines. Après différenciation des cellules, cette relation semble cependant moins directe (Ducy, Schinke et al. 2000).

Les ostéoblastes et leurs précurseurs secrètent les facteurs M-CSF, RANKL et ostéoprotégérine (OPG) (Kular, Tickner et al. 2012; Rosenberg, Rosenberg et al. 2012). La différenciation ostéoclastique ainsi que la polarisation des ostéoclastes se fait en réponse à l'activation de RANK par son ligand RANKL (Figure 3) (Burgess, Qian et al. 1999; Li, Sarosi et al. 2000). La sécrétion d'OPG, qui se lie à RANKL, permet de réguler la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Simonet, Lacey et al. 1997). En effet, en se liant à RANKL, OPG bloque la formation du complexe RANK-RANKL (Lacey, Timms et al. 1998; Udagawa, Takahashi et al. 2000). Ainsi, c'est la coordination de l'expression de RANKL et d'OPG qui permet de moduler la résorption osseuse en contrôlant le niveau d'activation de RANK (Boyle, Simonet et al. 2003). Par ailleurs, la diminution de RANKL induit l'apoptose des ostéoclastes (Ikeda, Matsubara et al. 2008). La régulation du ratio OPG/RANKL pourrait aussi contribuer au contrôle de la transition résorption/formation osseuse (Gori, Hofbauer et al. 2000). De plus, l'induction de NFATc1 par RANKL provoque la sécrétion d'interféron- $\beta$ , qui inhibe la différenciation ostéoclastique en interférant avec l'expression de c-Fos (Takayanagi, Kim et al. 2002; Boyce, Yao et al. 2009).

La sécrétion de facteurs de régulation, la libération de produits dérivant de la matrice dégradée ou le contact cellulaire direct sont à l'origine de la régulation de la formation des ostéoblastes par les ostéoclastes (Kular, Tickner et al. 2012). La sphingosine 1-phosphate



sécrétée par les ostéoclastes augmente la survie et la migration des ostéoblastes et des précurseurs ostéoclastiques de la circulation sanguine jusqu'à leur site de différenciation ainsi que la production de RANKL (Ryu, Kim et al. 2006; Ishii, Egen et al. 2009). La semaphorin 4D exprimée par les ostéoclastes inhibe la formation osseuse en se fixant à son récepteur ostéoblastique Plexin-B1. Cette interaction active la GTPase RhoA qui inhibe la voie IGF-1 (Negishi-Koga, Shinohara et al. 2011). De nombreux autres facteurs sécrétés par les ostéoclastes tels que des BMPs, l'IGF-1, l'IGF-2 et le TGF- $\beta$  permettent de stimuler ou d'inhiber la prolifération et/ou la différenciation des ostéoblastes (Wozney, Rosen et al. 1988; Hayden, Mohan et al. 1995; Erlebacher, Filvaroff et al. 1998). C'est l'équilibre entre ces facteurs qui détermine l'orientation des cellules.

Le contact cellule-cellule par le biais de l'ephrinB2, exprimé à la surface des ostéoclastes matures, et son ligand, la tyrosine kinase EphB4, exprimé en surface des précurseurs ostéoblastiques, inhibe la résorption osseuse en ciblant la cascade cFos/NFATc1 et favorise la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse (Zhao, Irie et al. 2006; Martin, Allan et al. 2010) facilitant ainsi la régulation spatio-temporelle entre l'ostéoclastogenèse et l'ostéoblastogenèse (Kular, Tickner et al. 2012). Par ailleurs, d'autres structures cellulaires de contact comme les jonctions serrées de type GAP, connues pour stimuler la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse, ainsi que la formation et la survie des ostéoclastes sont susceptibles d'intervenir dans ce contrôle du remodelage osseux (Jiang, Siller-Jackson et al. 2007).

### **Le rôle de l'ostéocyte**

Les osteocytes ont un rôle central dans la régulation du remodelage osseux en réponse aux signaux mécaniques et hormonaux (Long 2012). En effet, l'ablation des ostéocytes conduit à une fragilité osseuse, à des microfractures et à l'ostéoporose chez de jeunes souris (Tatsumi, Ishii et al. 2007).

Ainsi comme décrit dans le paragraphe « les ostéocytes » (page 9), les ostéocytes sont les mécanosenseurs de l'os et déclenchent le remodelage osseux (Cowin 2007) notamment via la sécrétion de facteurs pro-remodelant. En effet, les ostéocytes produisent, comme les ostéoblastes, le facteur RANKL (Nakashima, Hayashi et al. 2011). L'expression ostéocytaire et le taux de la sclérostine (codée par le gène Sost), un inhibiteur ostéoblastique sont sous le contrôle négatif de la charge mécanique (Robling, Niziolek et al. 2008). De plus, les ostéocytes expriment le facteur Dickkopf-1 (DKK1) (Kubota, Michigami et al. 2009), susceptible d'être exprimé de façon inversement proportionnelle à la charge mécanique



(Bonewald and Johnson 2008; Agholme, Isaksson et al. 2011). Tout comme la sclérostine, DKK1 est un antagoniste de la voie Lrp5/Wnt/ $\beta$ -catenin, inhibant ainsi l'activité ostéoblastique (Li, Zhang et al. 2005; Poole, van Bezooijen et al. 2005; Kubota, Michigami et al. 2009).

Selon Seeman (Seeman 2009), un autre mécanisme de contrôle passerait par l'apoptose ostéocytaire, qui pourrait être la première étape du remodelage osseux. L'apoptose des ostéocytes est induite par de nombreux facteurs dont la carence en estrogènes, les marqueurs pro-inflammatoires ou pro-oxydants ou la charge mécanique par exemple (Bonewald 2011). En effet, l'apoptose des ostéocytes précède l'ostéoclastogenèse *in vivo* (Clark, Smith et al. 2005; Aguirre, Plotkin et al. 2006). Cependant, les étapes de régulation qui lient l'apoptose des ostéocytes à la mise en place du remodelage osseux ne sont pas connues (Seeman 2009).

#### **L'homéostasie du calcium**

L'hormone parathyroïdienne (PTH) et la calcitonine participent au métabolisme phosphocalcique, tout comme la vitamine D qui sera décrite dans le paragraphe 3-3. Une faible quantité de calcium circulant déclenche la libération de PTH par les glandes parathyroïdiennes. La PTH se fixe à son récepteur situé à la surface des ostéoblastes, ce qui engendre la sécrétion de molécules permettant d'induire la résorption osseuse (Raggatt and Partridge 2010) et d'aboutir à la libération de calcium de la matrice osseuse. La calcitonine, sécrétée par la glande thyroïde, inhibe la résorption osseuse en agissant principalement sur les ostéoclastes (Holt and Wysolmerski 2011).

D'un point de vue moléculaire, la PTH induit l'expression de RANKL et la protéolyse de Runx2 et inhibe l'expression d'OPG par les ostéoblastes (Lee and Lorenzo 1999; Bellido, Ali et al. 2003). Au niveau ostéocytaire, elle diminue l'expression de la sclérostine (Bellido, Ali et al. 2005). Cette induction de RANKL mais aussi de M-CSF par la PTH serait due à une activation par l'IGF-1 ostéoblastique (Tahimic, Wang et al. 2013). Comme vu précédemment, ces régulations participent à l'activation de la résorption osseuse. A l'inverse, la calcitonine inhibe l'ostéoclastogenèse principalement en réduisant la motilité des ostéoclastes et la production de TRAP (Holt and Wysolmerski 2011).

Il est important de noter que donnée par intermittence et à faible dose à des femmes post-ménopausées ayant eu une fracture vertébrale, la PTH avait une action anabolique sur l'os (Neer, Arnaud et al. 2001). Cet effet peut s'expliquer par l'augmentation, induite par le traitement, de l'expression de l'ephrinB2 dans les ostéoclastes, favorisant la différenciation

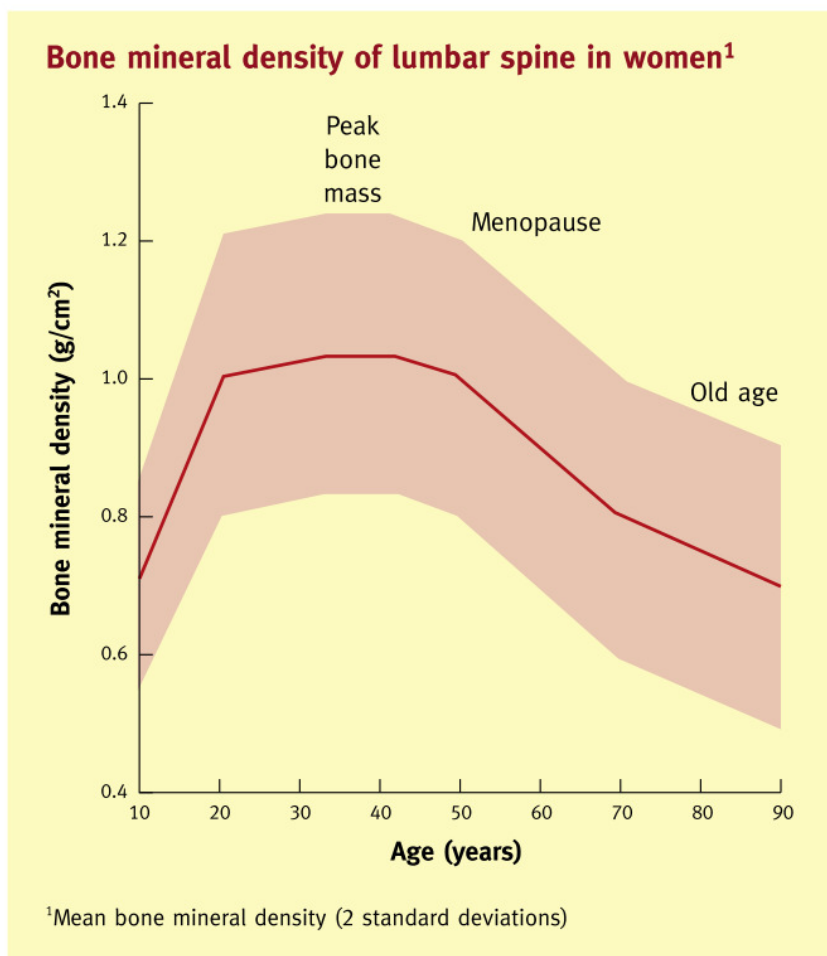


ostéoblastique (Allan, Hausler et al. 2008). Des injections intermittentes de PTH limitaient l'apoptose des ostéoblastes en augmentant l'expression de Runx2 (Bellido, Ali et al. 2003) et diminuaient l'expression de la sclérostine chez le rat (Keller and Kneissel 2005). Par ailleurs, l'administration de PTH par intermittence était à l'origine de l'augmentation de l'expression des gènes de l'OCN, de l'ALP et du Col1a1 chez le rat (Dobnig and Turner 1995; Halloran, Bikle et al. 1997). Ce traitement aurait aussi un effet positif sur la prolifération et la maturation des précurseurs ostéoblastiques comme le suggérait l'augmentation de colonies positives à l'ALP formées par les cellules souches mésenchymateuses mises en culture en présence de PTH (Nishida, Yamaguchi et al. 1994). Enfin, la médiation de l'effet anabolique de la PTH par IGF-1 a été récemment modélisée par Tahimic (Tahimic, Wang et al. 2013). La production d'IGF-1 par les ostéoblastes matures serait induite par la PTH, ce qui stimulerait la prolifération et la différenciation des ostéoprogéniteurs.

### **Contrôles hormonaux**

Outres les hormones calciotropes, les estrogènes sont également d'importants régulateurs hormonaux du métabolisme osseux chez la femme mais aussi chez l'homme (Khosla, Melton et al. 2011). Ils ont des effets directs et indirects au niveau des ostéoclastes pour contrôler la résorption osseuse mais régulent aussi la formation osseuse. Il a été montré que les ostéoclastes et les ostéoblastes expriment des récepteurs aux estrogènes (ER) (Eriksen, Colvard et al. 1988; Oursler, Osdoby et al. 1991). Même s'il existe deux récepteurs aux estrogènes i.e. ER $\alpha$  et ER $\beta$ , les estrogènes agissent sur le tissu osseux principalement via l'ER $\alpha$  (Sorensen, Henriksen et al. 2006; Denger, Reid et al. 2008; Melville, Kelly et al. 2014). La délétion spécifique de l'ER $\alpha$  au niveau des ostéoblastes chez la souris femelle adulte a permis de mettre en évidence une diminution de la masse osseuse trabéculaire et corticale associée à une réduction de l'activité ostéoblastique (Melville, Kelly et al. 2014). Dans le cas des ostéocytes, la délétion spécifique de ce récepteur était associée à une réduction de la BMD trabéculaire chez la souris femelle mais pas chez le male (Kondoh, Inoue et al. 2014). En ce qui concerne les ostéoclastes, la délétion spécifique de l'ER $\alpha$  chez la souris femelle adulte induisait une diminution de la masse osseuse trabéculaire (Nakamura, Imai et al. 2007; Martin-Millan, Almeida et al. 2010). Ceci est en partie attribué à l'augmentation de la durée de vie des ostéoclastes due à la réduction de leur apoptose (Hughes, Dai et al. 1996). Inversement, une étude sur des biopsies osseuses de femmes a mis en évidence que l'apoptose des ostéocytes était induite par la carence en estrogènes (Tomkinson, Reeve et al. 1997). Comme cette étape serait à l'origine du remodelage osseux, les estrogènes contrôleraient





**Figure 25 : Evolution de la masse osseuse au cours de la vie (Eastell 2013).**  
Mesure effectuée au niveau du rachis lombaire chez la femme.

indirectement la résorption osseuse en modulant la durée de vie des ostéocytes. Ainsi, l'initiation de nouvelles BMUs et donc le renouvellement osseux sont inhibés par les estrogènes. De plus, les estrogènes induisent une augmentation de l'expression ostéoblastique d'OPG et une réduction de celle de RANKL, conduisant à une diminution du nombre d'ostéoclastes activés (Hofbauer, Khosla et al. 1999; Eriksen 2010). La différenciation des précurseurs ostéoclastiques induite par RANKL pourrait aussi être bloquée par l'inhibition de l'expression et de la phosphorylation de c-Jun par les estrogènes (Shevde, Bendixen et al. 2000; Srivastava, Toraldo et al. 2001). De plus, les estrogènes induisent la formation du complexe ER $\alpha$  avec la protéine d'échafaudage breast cancer anti-estrogen resistance protein-1 (BCAR1) qui séquestre TRAF6 (Robinson, Yaroslavskiy et al. 2009). Cette séquestration diminue l'activation de NF- $\kappa$ B et par conséquent l'activation de l'ostéoclastogenèse par RANKL (Figure 3) (Robinson, Yaroslavskiy et al. 2009). Les estrogènes réguleraient aussi l'ostéoclastogenèse par la diminution de la production de cytokines agissant sur la résorption osseuse comme IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ , par les cellules de la moelle osseuse (Kimble, Vannice et al. 1994; Kitazawa, Kimble et al. 1994; Manolagas and Jilka 1995).

De la même façon, l'apoptose des ostéoblastes est sous le contrôle des estrogènes, qui l'inhibent augmentant ainsi la durée de vie de ces cellules (Kousteni, Bellido et al. 2001). Ce mécanisme permet de maintenir la formation osseuse. De plus, il a été montré que les estrogènes amélioraient la différenciation ostéoblastique *in vitro* (Okazaki, Inoue et al. 2002). Cependant, les données de la littérature sont variables et cet effet semble dépendre du modèle utilisé (Khosla, Melton et al. 2011). En accord avec la diminution du remodelage osseux, le 17 $\beta$ -estradiol réduisait l'auto-renouvellement des progéniteurs mésenchymateux (Di Gregorio, Yamamoto et al. 2001). De plus, *in vitro*, les estrogènes favorisaient l'engagement des précurseurs en ostéoblastes au détriment de la lignée adipocytaire (Dang, van Bezooijen et al. 2002; Okazaki, Inoue et al. 2002).

### **2-2-2- Dérégulations du remodelage osseux au cours du vieillissement**

La perte osseuse est le résultat d'un déséquilibre entre les taux de formation et de résorption (Eastell 2013). Après avoir atteint le pic de masse osseuse vers 30 ans, environ 1% d'os est perdu chaque année (Figure 25). De plus, une accélération de ce processus d'ostéopénie est observée dans les 5 années qui suivent la ménopause (Eastell 2013). En effet, les taux des marqueurs de résorption (+79 à 97%) et de façon moindre de formation osseuse (+37 à 52%) sont augmentés chez la femme ménopausée (Garnero, Sornay-Rendu et al. 1996). Il a été montré que parmi 279 femmes post-ménopausées, celles ayant des taux de



remodelage dans le quartile inférieur (faibles taux sériques d'OCN et de CTX1) avaient l'épaisseur corticale la plus importante et donc une perte osseuse amoindrie (Szulc, Seeman et al. 2006). Le remodelage accéléré de la ménopause est responsable d'une diminution de la masse osseuse mais aussi d'une altération des propriétés mécaniques de l'os qui sont dues à des modifications cellulaires et de la composition et de la structure de la MEC (Manolagas and Parfitt 2010). En effet, de l'os dense est dégradé et remplacé par de l'os jeune, moins densément minéralisé, avec une dureté amoindrie (Seeman 2009). Une diminution de la réticulation (Bailey and Knott 1999) et des modifications structurelles par isomérisation (Viguet-Carrin, Garnero et al. 2006) du Colla1 réduisent la solidité de l'os au cours du vieillissement. De plus, il existe une accumulation des produits terminaux de glycation avec l'âge susceptibles d'augmenter la fragilité osseuse (Vashishth, Gibson et al. 2001).

Trois processus principaux de perte osseuse liés à l'âge ont été dégagés par l'équipe de Kubo et coll. (Chen, Zhou et al. 2013). Le premier est la perte osseuse trabéculaire due à un amincissement des travées par perturbation de la microstructure. Le second est la perte d'os cortical par l'augmentation de la porosité due à la fois à une augmentation de la résorption et à une accumulation d'ostéons pas totalement fermés. Enfin, le dernier processus est la résorption continue au niveau de l'endoste. C'est l'os trabéculaire qui est touché en premier par la perte osseuse, ce qui est justifié par l'importance de la surface d'échange. Cependant l'essentiel de la perte osseuse totale (70%) concerne l'os cortical, car il représente la majorité du tissu osseux (Seeman 2013).

Différents modèles d'ostéoporose ont été décrits. En 1983, deux types d'ostéoporose ont été définis selon la population ciblée, les sites osseux de variation de la BMD, le type de fracture et les changements hormonaux (Riggs and Melton 1983). Ainsi, l'ostéoporose de type I apparaît dans les 15 ou 20 premières années après la ménopause. Elle est caractérisée par un amincissement des travées osseuses conduisant à des fractures du poignet et à des tassements vertébraux. La cause principale serait la privation hormonale ainsi que les facteurs induits par cette perte d'estrogènes comme la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par exemple. L'ostéoporose de type II correspond à la perte osseuse lente due à l'âge, impliquant la totalité de la population âgée. Elle induit une atteinte de l'os cortical et de l'os trabéculaire, conduisant à des fractures du fémur proximal. Initialement, ce type d'ostéoporose était attribué à la combinaison de l'hyperthyroïdie secondaire (augmentation de la sécrétion de PTH qui induit une libération du calcium et du phosphore contenus dans le compartiment osseux) et d'une diminution de la synthèse osseuse (Riggs and Melton 1983). Même si ce modèle est encore utilisé aujourd'hui, il a été corrigé en 1998 par un modèle unitaire (Riggs,



Khosla et al. 1998), qui a été mis à jour en 2011 (Khosla, Melton et al. 2011). Ce modèle unitaire présente deux phases dans l'induction de l'ostéoporose qui correspondent aux deux types d'ostéoporose préalablement décrits. Cependant, dans ce nouveau modèle, les deux phases de l'ostéoporose seraient causées par une déficience en estrogènes (Riggs, Khosla et al. 1998). En ce qui concerne l'os trabéculaire, la perte osseuse précède la déficience en hormones stéroïdes dans les deux sexes. Deux hypothèses étaient alors formulées : soit il s'agit d'un mécanisme indépendant des estrogènes, soit l'os trabéculaire est sous le contrôle d'un taux plus élevé d'estrogènes (Riggs, Melton et al. 2008; Khosla, Melton et al. 2011). Pour l'os cortical, qui représente 80% du squelette et qui contribue majoritairement au risque de fracture, la carence estrogénique est la cause majeure de la perte osseuse due à la ménopause et au vieillissement dans les deux sexes (Khosla, Melton et al. 2011).

Cependant, ce modèle centré sur les estrogènes ne fait pas l'unanimité. En effet, un autre groupe de travail met le stress oxydant au centre des mécanismes de l'ostéoporose de type II (Manolagas and Parfitt 2010). Le premier argument en faveur de cette hypothèse est que la perte osseuse débute dès la 3<sup>ème</sup> décennie (Riggs, Melton et al. 2008). Deuxièmement, une augmentation du stress oxydant avec l'âge induisait une perte osseuse chez des souris femelles non ovariectomisées (Almeida, Han et al. 2007).

#### *2-2-2-1- La carence estrogénique*

La carence en estrogènes a un rôle central dans la perte osseuse au cours de la ménopause. En effet, il a été montré dans une large étude épidémiologique chez la femme âgée que celles qui avaient les taux les plus faibles en estrogènes étaient aussi les personnes ayant les BMD les plus basses et le plus fort risque de fracture (Cummings, Browner et al. 1998). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence que cette perte osseuse accélérée par la ménopause était inversée par l'administration d'un traitement hormonal de substitution (THS) (Hannon, Blumsohn et al. 1998). La déficience en estrogènes conduit à l'apoptose des ostéocytes, et donc au potentiel déclenchement de cycles de remodelage (Manolagas 2006; Seeman 2009). Comme mentionné dans les paragraphes précédents, les estrogènes induisent l'apoptose des ostéoclastes. De façon cohérente, leur absence augmente la durée de vie des cellules ostéorésorbantes provoquant ainsi une augmentation de la quantité d'os résorbé par BMU (Manolagas 2000). En parallèle, l'effet protecteur des estrogènes sur les ostéoblastes disparaît au cours de la ménopause, réduisant ainsi la durée de vie des cellules ostéoformatrices. L'équilibre du ratio OPG/RANKL est aussi perturbé au cours de la perte



hormonale. En effet, la déficience en estrogènes induit une augmentation de RANKL et une diminution d'OPG. De plus, la sensibilité des ostéoclastes à l'activation par RANKL est accrue (Post, Cremers et al. 2010).

La carence estrogénique a aussi des effets indirects sur le tissu osseux en induisant notamment une augmentation de la sensibilité à la PTH (Cosman, Shen et al. 1993). Ce renforcement de la résorption osseuse est associé à une augmentation de l'excrétion urinaire de calcium et une diminution de l'absorption intestinale pour limiter le risque d'hypercalcémie (Heaney, Recker et al. 1978). La suppression de la sécrétion de PTH par l'infusion intraveineuse de calcium réduisait les différences des taux de marqueurs de résorption entre les femmes jeunes et âgées (Ledger, Burritt et al. 1995). Cela suggère fortement que l'augmentation de la résorption osseuse au cours du vieillissement serait sous le contrôle de la PTH (Riggs, Khosla et al. 1998). En outre, la production de cytokines et de facteurs du stress oxydant est sous le contrôle des estrogènes. L'association entre l'augmentation du stress oxydant et l'ostéoporose sera développée dans le paragraphe 2-4.

Globalement en l'absence d'estrogènes, la formation et la résorption osseuse sont découplées, en faveur du catabolisme qui engendre une perte osseuse.

#### 2-2-2-2- *Le vieillissement*

La carence estrogénique n'est pas le seul mécanisme affectant le tissu osseux. En effet, le vieillissement peut directement altérer les cellules osseuses (Marie 2014). Il a été montré récemment que, en l'absence de tout dérèglement (hormonal, etc...), la résorption osseuse augmentait au cours du vieillissement (Chung, Zhou et al. 2014). Les expressions de c-fms et RANK étaient augmentées dans les progéniteurs ostéoclastiques humains *in vitro* de même que l'ostéoclastogenèse (Chung, Zhou et al. 2014). En parallèle, une augmentation de l'expression de RANKL et une diminution de l'expression d'OPG ont été observées dans les cellules souches mésenchymateuses humaines (Chung, Zhou et al. 2014).

En ce qui concerne les ostéocytes, l'augmentation de leur apoptose a été aussi constatée au cours du vieillissement chez le rat (Chen, Yang et al. 2014) et chez la souris (Almeida, Han et al. 2007). L'excès de glucocorticoïdes et la diminution de la charge mécanique au cours du vieillissement sont des mécanismes pouvant induire l'apoptose ostéocytaire (Jilka, Weinstein et al. 2007). Chez des rats âgés, cette dernière a été corrélée à une diminution de l'autophagie (mécanisme d'endocytose médié par les lysosomes, qui





permet le recyclage du matériel cellulaire) (Chen, Yang et al. 2014). Cette réduction a elle-même été reliée à la diminution de la BMD du tibia proximal au cours du vieillissement. Ainsi, le processus de vieillissement serait accéléré avec la réduction de l'autophagie alors que la stimulation de celle-ci aurait des effets anti-vieillessement (Rajawat, Hilioti et al. 2009; Madeo, Tavernarakis et al. 2010). Le stress oxydant est fortement suspecté d'être à l'origine de ce mécanisme (Manolagas and Parfitt 2010).

Il existe une association intime entre les ostéoblastes et les adipocytes provenant de leur origine commune. Au cours du vieillissement, la différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses est favorisée au détriment des ostéoblastes (Kawai, de Paula et al. 2012). Ainsi, il a été constaté que la perte osseuse liée à l'âge était associée à une augmentation de l'adiposité médullaire (Rozman, Feliu et al. 1989). En effet, la fraction volumique de tissu adipeux de biopsies de crêtes iliaques, passait de 40% à l'âge de 30 ans à 68% à l'âge de 100 ans (Justesen, Stenderup et al. 2001). De plus, ce résultat était corrélé à une diminution de la fraction volumique osseuse (Justesen, Stenderup et al. 2001). Ce phénotype est régulé par l'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ 2 mais aussi par la réduction des facteurs impliqués dans l'ostéoblastogenèse comme Wnt/ $\beta$ -catenin et IGF-1 et l'altération des voies de signalisation TGF- $\beta$  et des BMPs avec l'âge (Moerman, Teng et al. 2004; Kawai, de Paula et al. 2012).

### *2-2-2-3- Autres facteurs*

Le pic de masse osseuse est un facteur affectant la perte osseuse au cours du vieillissement. En effet, les personnes ayant atteint un pic de masse osseuse plus important seraient moins susceptibles de développer de l'ostéoporose. Un modèle bioinformatique a permis d'évaluer qu'une augmentation de 10% du pic de masse osseuse retarderait de 13 ans le développement de l'ostéoporose, faisant de ce paramètre un puissant prédicteur de l'ostéoporose (Hernandez, Beaupre et al. 2003). Plusieurs facteurs influencent ce pic de masse osseuse et ont fait l'objet d'une revue (Stagi, Cavalli et al. 2013). Ainsi, jusqu'à 80% de la densité minérale osseuse serait déterminée génétiquement. Les 20% restants ont été attribués aux facteurs environnementaux tels que l'exercice physique et la nutrition et en particulier l'apport de calcium et de vitamine D.

L'exercice physique au cours de l'adolescence permet de renforcer la masse osseuse mais aussi la structure de l'os, qui contribuent tous deux à la qualité du squelette (Karlsson and Rosengren 2012). Ainsi, le risque de fracture était diminué chez des anciens athlètes de



plus de 60 ans par rapport au groupe contrôle (Nordstrom, Karlsson et al. 2005). De même, deux études de cohortes ont montré une relation inverse entre l'activité physique et le risque de fracture de la hanche (Feskanich, Willett et al. 2002; Robbins, Aragaki et al. 2007). De façon plus générale, une étude canadienne récente a permis de mettre en évidence que l'augmentation de l'activité physique quotidienne par la réalisation de tâches simples, pouvait participer à la prévention de la perte osseuse post-ménopausique (Muir, Ye et al. 2013). Cependant, le vieillissement est généralement associé à une diminution de l'activité physique et donc de la charge mécanique exercée sur le squelette. Cette moindre charge mécanique induit une diminution de la sécrétion d'OPG avec une augmentation de l'expression de RANKL par les ostéoblastes, ce qui stimule l'ostéoclastogénèse (Duque and Troen 2008).

Les facteurs nutritionnels influençant l'ostéoporose et le risque fracturaire seront développés dans la partie 3, Stratégies nutritionnelles.

La consommation d'alcool, de cigarettes, ainsi que des facteurs médicaux comme l'utilisation de corticostéroïdes ou le syndrome de malabsorption par exemple influencent négativement la qualité osseuse et augmentent le risque fracturaire (Sampson 2002; Seibel, Cooper et al. 2013).

### **2-2-3- Traitements**

Il existe différentes stratégies médicamenteuses de prise en charge de la ménopause et des troubles climatériques et osseux associés.

La première est l'utilisation d'estrogènes en association ou non avec des progestatifs pour remplacer les hormones qui ne sont plus sécrétées. Ces traitements sont rassemblés sous le terme de THS. Ils permettent de diminuer l'excrétion de marqueurs de résorption osseuse mais aussi de formation osseuse (Hannon, Blumsohn et al. 1998) indiquant un ralentissement du renouvellement osseux. Deuxièmement, les bisphosphonates comme l'alendronate, l'ibandronate et le risédronate, ont un effet anti-catabolique en inhibant l'activité et en augmentant l'apoptose ostéoclastique, ralentissant le remodelage osseux (Hughes, Wright et al. 1995; Larsson and Fazzalari 2014). Ceci est causé par la forte liaison des bisphosphonates à la surface osseuse et à l'inhibition de la farnesyl pyrophosphate synthase, protéine qui est nécessaire à la formation du cytosquelette des ostéoclastes (Tella and Gallagher 2013). Le raloxifène est un modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes. En effet, il stimule les récepteurs hépatiques et osseux sans affecter les récepteurs de l'endomètre et en ayant un rôle anti-estrogènes au niveau du tissu mammaire (Tella and Gallagher 2013). La troisième stratégie est l'utilisation du ranélate de strontium qui est décrit comme un agent de



découplage. En effet, il inhibe la résorption osseuse tout en augmentant la formation osseuse (Marie 2006). Il augmente la réplication des pré-ostéoblastes, la différenciation ostéoblastiques, la synthèse du Col1a1 et la minéralisation de la matrice osseuse. De plus, il inhibe la différenciation et l'activité ostéoclastiques via l'augmentation d'OPG et la diminution de RANKL (Fonseca 2008). L'utilisation du téraparatide, fragment 1-34 recombinant humain de la PTH, est possible mais préconisée chez les patients lorsqu'il existe au moins deux fractures vertébrales (Meier, Lamy et al. 2014). La calcitonine fait aussi partie des stratégies médicamenteuses contre l'ostéoporose. La dernière stratégie est l'utilisation du denosumab, qui est un anticorps monoclonal humain qui a pour cible RANKL (Capozzi, Lello et al. 2014). Ainsi, il inhibe la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes, ce qui diminue la résorption osseuse.

En France, le coût annuel par patient de ces différents traitements a été évalué en 2010 : alendronate : 209 euros, ibandronate : 327 euros, risédronate : 380 euros, raloxifène : 365 euros, ranélate de strontium : 579 euros (Svedbom, Hernlund et al. 2013). Au total, les coûts pharmacologiques de prévention des fractures s'élèveraient à 346 millions d'euros en 2010.

Malgré la protection osseuse et la diminution du risque fracturaire, il existe de nombreux effets secondaires délétères non négligeables. Ceux des THS sont décrits dans le rapport de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) et de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) (ANAES and AFSSAPS 2004). Les THS estroprogestatifs augmentent le nombre de cancers du sein et la prévalence des cancers de l'endomètre est majorée par les estrogènes seuls. De plus, il existe un sur-risque coronarien et de maladies veineuses thrombo-emboliques sous traitement estroprogestatif ainsi qu'un sur-risque cérébro-vasculaire sous estroprogestatif ou estrogènes seuls. Les biphosphonates peuvent causer des troubles digestifs tout comme le denosumab ainsi que des douleurs musculo-squelettiques sévères, une hypocalcémie et semblent être associés à une augmentation du risque de cancer de l'œsophage (Kennel and Drake 2009; Crandall, Newberry et al. 2014). En ce qui concerne le raloxifène, le risque cardio-vasculaire est augmenté (Crandall, Newberry et al. 2014). Le ranélate de strontium est associé au risque thrombo-embolique veineux et de nouvelles contre-indications ont été établies par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) en 2012 (ANSM 2012). Les effets indésirables principaux du téraparatide sont l'hypercalcémie et l'hypercaliurie (Crandall, Newberry et al. 2014). L'utilisation de la calcitonine a été limitée

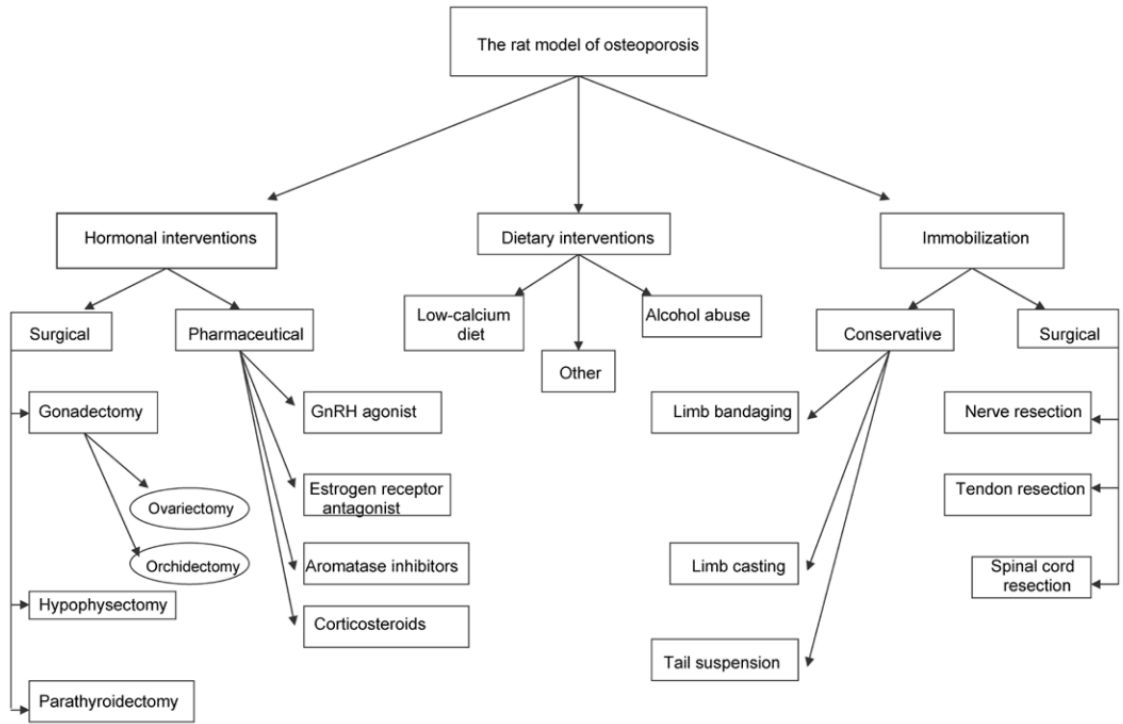


Figure 26 : Les modèles d'induction de l'ostéoporose chez le rat (Lelovas, Xanthos et al. 2008).

par l'ANSM en 2012 (ANSM 2012) en raison du risque accru de cancer associé (2013; Overman, Borse et al. 2013).

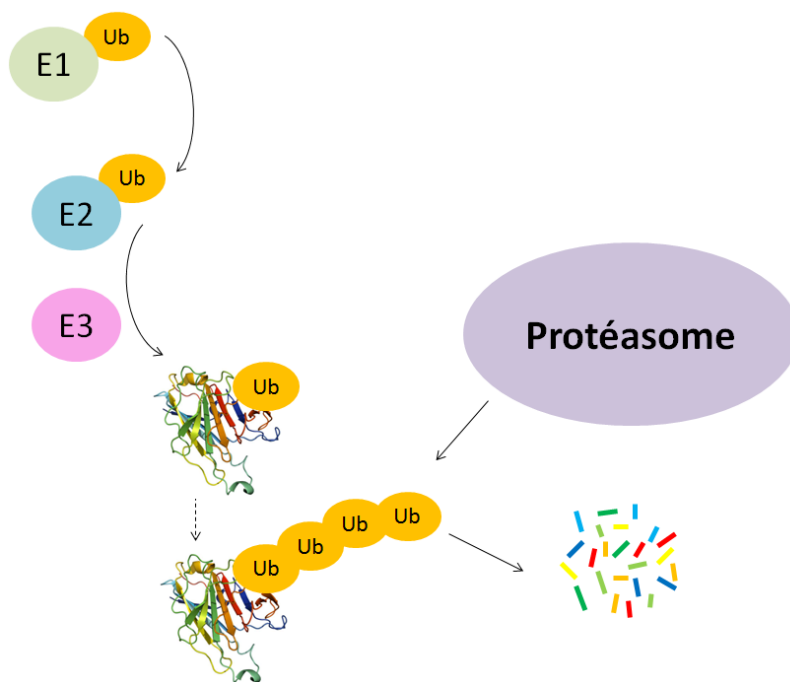
L'importance des effets secondaires tend à limiter l'utilisation de ces traitements et à identifier de nouvelles stratégies de prévention de l'ostéoporose (voir chapitre 3).

#### **2-2-4- Modélisation de l'ostéoporose : l'ovariectomie**

Il existe de nombreux modèles animaux de perte osseuse. Les modèles rats disponibles ont fait l'objet d'une revue dans laquelle 3 catégories sont distinguées : les interventions hormonales, les manipulations nutritionnelles et les immobilisations (Figure 26) (Lelovas, Xanthos et al. 2008). Le taux de perte osseuse, ainsi que son site cortical ou trabéculaire est très dépendant de la méthode utilisée pour induire l'ostéoporose (Jee and Yao 2001). De plus, la reproductibilité, le but de l'étude, le site osseux et l'âge des animaux sont essentiels dans la sélection du modèle (Lelovas, Xanthos et al. 2008). En effet, chez le rat le pic de masse osseuse est atteint vers 9 mois, qui est donc l'âge de la maturité osseuse chez ces animaux (Jee and Yao 2001). L'ovariectomie des rats dont le squelette est mature reproduit la perte osseuse de la femme ménopausée avec une augmentation du renouvellement osseux, la résorption excédant la formation, une phase initiale rapide suivie d'une phase plus lente et une perte d'os trabéculaire plus importante que la perte d'os cortical (Kalu 1991; Jee and Yao 2001). Cependant certaines différences avec l'Homme sont à noter comme la croissance pratiquement continue du squelette pendant toute la vie du rat et l'absence de remodelage haversien dans l'os cortical (Barlet, Coxam et al. 1994; Lelovas, Xanthos et al. 2008). Ainsi, la rate ovariectomisée est le modèle le plus utilisé dans la recherche sur l'ostéoporose post-ménopausique (Lelovas, Xanthos et al. 2008). L'utilisation de la souris est aussi très courante (Hayashi and Fotovati 2003).

Il est important de souligner que les fractures spontanées et dues à de faibles impacts caractéristiques de l'ostéoporose humaine ne sont pas reproduites chez la rate ovariectomisée (Lelovas, Xanthos et al. 2008).





**Figure 27 : La protéolyse par action du complexe ubiquitine-protéasome.**

L'enzyme E1 active l'ubiquitine (Ub) et la transfère à l'enzyme de conjugaison (E2) qui transporte la molécule d'Ub jusqu'à l'ubiquitine ligase (E3). L'E3 fixe l'ub sur une protéine cible ou sur une autre ubiquitine déjà fixée, créant ainsi une chaîne de poly-ubiquitination. Les protéines poly-ubiquitinées sont reconnues par le protéasome où elles sont dégradées en peptides par des protéases.

## 2-3- Les mécanismes de la sarcopénie

La sarcopénie est une pathologie qui implique de nombreux mécanismes. Les données de la littérature développées ci-dessous se limiteront aux mécanismes étudiés au cours de cette thèse. Ainsi, le renouvellement du tissu musculaire et la biogenèse mitochondriale seront décrits avant d'aborder les dérégulations de ces mécanismes à l'origine de la sarcopénie. Enfin, les contrôles hormonaux puis les traitements seront discutés. L'implication de l'inflammation et du stress oxydant fera l'objet du chapitre suivant, commun à l'ostéoporose.

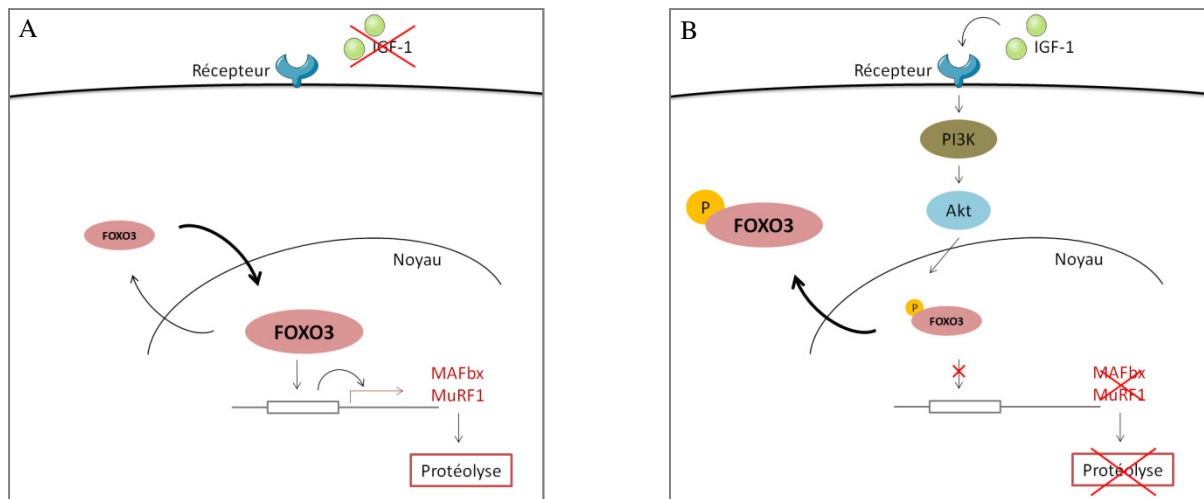
### 2-3-1- **Le renouvellement protéique du tissu musculaire**

Le maintien de la masse musculaire dépend de la balance entre la dégradation et la synthèse protéique (Attaix, Baracos et al. 2012; Koopman, Ly et al. 2014). Ces mécanismes sont interdépendants, de la même façon que pour le tissu osseux (Greising, Gransee et al. 2012).

#### 2-3-1-1- *Mécanismes de la protéolyse*

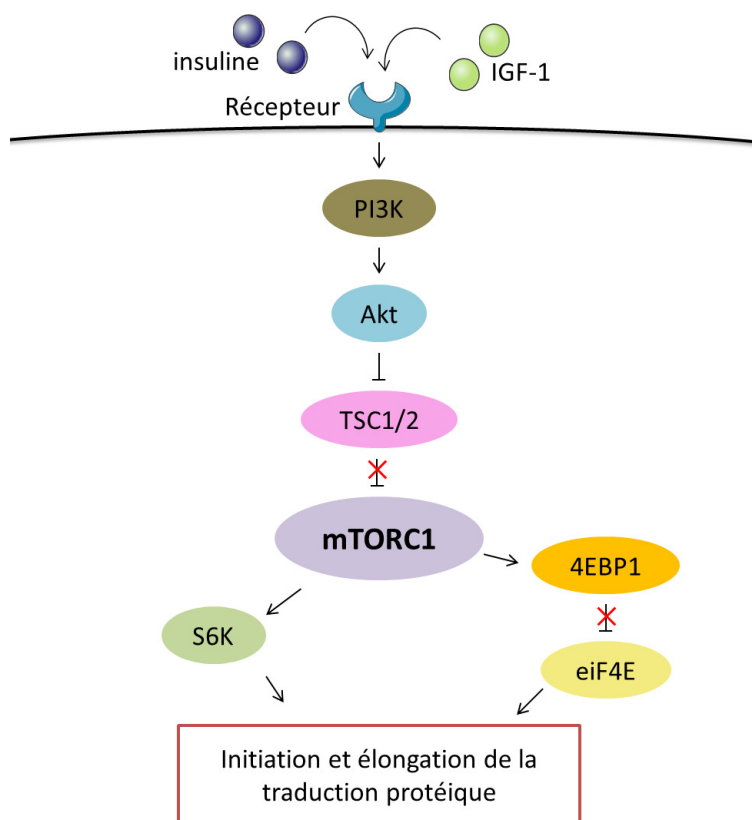
La protéolyse est en partie régulée par l'activation du système multiprotéique ubiquitine-protéasome (Mitch and Goldberg 1996), qui a fait l'objet de différentes revues récemment (Sandri 2013; Schiaffino, Dyar et al. 2013; Eggerman and Glass 2014). Trois autres systèmes protéolytiques, identifiés dans le muscle squelettique, pourraient participer à la sarcopénie : la voie lysosomale, la voie des caspases et la voie calcium dépendante (les calpaïnes) (Combaret, Dardevet et al. 2009). Les mécanismes impliqués ne seront pas développés dans ce manuscrit car seul le système ubiquitine-protéasome a été étudié dans nos expérimentations.

La cellule utilise l'ubiquitine pour marquer les protéines à dégrader comme les protéines endommagées, dépliées ou obsolètes. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui implique la fixation covalente de l'ubiquitine ou d'un polymère d'ubiquitine sur une protéine cible (Polge, Uttenweiler-Joseph et al. 2013). Ce mécanisme est hautement régulé pour éviter des dégradations anarchiques qui sont à l'origine de maladies. Ainsi, la fixation nécessite l'action combinée de 3 types d'enzymes (Figure 27). Tout d'abord, l'enzyme E1 active le processus d'ubiquitination en fixant une protéine d'ubiquitine, et ce en présence d'ATP. L'ubiquitine est alors prise en charge par l'enzyme de conjugaison (E2) qui la transfère jusqu'à une ubiquitine ligase (E3), qui va fixer l'ubiquitine sur une protéine cible



**Figure 28 : Modèle d'inhibition des facteurs FOXO par IGF-1 et Akt.**

A, en absence d'IGF-1, le facteur FOXO3 est majoritairement situé dans le noyau. B, l'activation de la voie PI3K/Akt par IGF-1 conduit à la phosphorylation de FOXO3, qui est transféré et retenu dans le cytosol. Akt, protéine kinase B; FOXO, forkhead box O; IGF-1, insulin-like growth factor; MAFbx, muscle atrophy Fbox protein; MuRF, muscle RING finger-containing protein-1; P, phosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase.



**Figure 29 : La voie Akt/mTOR activant la synthèse protéique.**

La fixation de l'insuline ou de l'insuline-like growth factor-1 (IGF-1) à leur récepteur active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), qui active à son tour la protéine Akt. Celle-ci phosphoryle l'hétérodimère tuberosus sclerosis 1 and 2 (TSC1/2) pour l'inactiver et ainsi activer le complexe mTORC1. mTORC1 phosphoryle alors la protéine ribosomal protein S6 kinase (S6K) et le facteur eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)- binding protein 1 (4E-BP1), ce qui libère eIF4E.

ou sur une autre ubiquitine déjà fixée, créant ainsi une chaîne de poly-ubiquitination. Les protéines poly-ubiquitinées sont reconnues par le protéasome au sein duquel elles sont dégradées en acides aminés par des protéases, qui sont recyclés pour la production d'énergie ou la synthèse protéique (Pasiakos and Carbone 2014). L'ubiquitination est réversible grâce à l'action de dés-ubiquitinases (Komander, Clague et al. 2009; Reyes-Turcu, Ventii et al. 2009).

Chez l'Homme, il existe 2 types d'E1, 37 types d'E2 et plus de 600 E3 (Komander 2009). En ce qui concerne la cellule musculaire, de nombreux modèles d'atrophie musculaire induisent une augmentation de la régulation transcriptionnelle de certaines E3, telles que les E3 ligases muscle RING finger-containing protein 1 (MuRF1) et muscle atrophy Fbox protein (MAFbx) (Bodine, Latres et al. 2001; Gomes, Lecker et al. 2001). MuRF1 est localisé au niveau du sarcomère et peut ubiquitiner les MHC ainsi que d'autres protéines des filaments épais (Clarke, Drujan et al. 2007; Cohen, Brault et al. 2009), causant leur protéolyse. MyoD est une des cibles potentielles de MAFbx (Egerman and Glass 2014). Ainsi, la surexpression de MAFbx diminue la différenciation myoblastique en induisant la dégradation de MyoD (Tintignac, Lagirand et al. 2005; Lagirand-Cantaloube, Cornille et al. 2009). MAFbx ubiquitine le facteur d'initiation de la synthèse protéique eIF3f (Lagirand-Cantaloube, Offner et al. 2008; Csibi, Cornille et al. 2010; Sanchez, Csibi et al. 2013), suggérant son rôle dans la régulation négative de la synthèse protéique (Egerman and Glass 2014). MuRF1 et MAFbx sont régulés par les facteurs de transcription forkhead box O (FOXO) (Egerman and Glass 2014). L'activation de FOXO3 et de FOXO1 induit un phénotype d'atrophie musculaire (Figure 28A) (Sandri, Sandri et al. 2004; Mammucari, Milan et al. 2007; McLoughlin, Smith et al. 2009).

### *2-3-1-2- Mécanismes de la synthèse protéique*

La principale voie de contrôle de la synthèse protéique est la voie protéine kinase B (Akt) / mammalian target of rapamycin (mTOR) (Figure 29). mTOR interagit avec 5 autres protéines pour former le complexe mTORC1 et 6 autres protéines pour former le complexe mTORC2 (Laplanche and Sabatini 2012). Le complexe mTORC2, contrairement au complexe mTORC1, est insensible aux nutriments et ne sera donc pas développé ici. A noter simplement qu'il module l'organisation du cytosquelette et promeut la survie cellulaire (Laplanche and Sabatini 2012).

La voie de signalisation mTORC1 intègre différents signaux provenant de facteurs de croissance, du stress, du statut énergétique, de l'oxygène et des acides aminés notamment, et



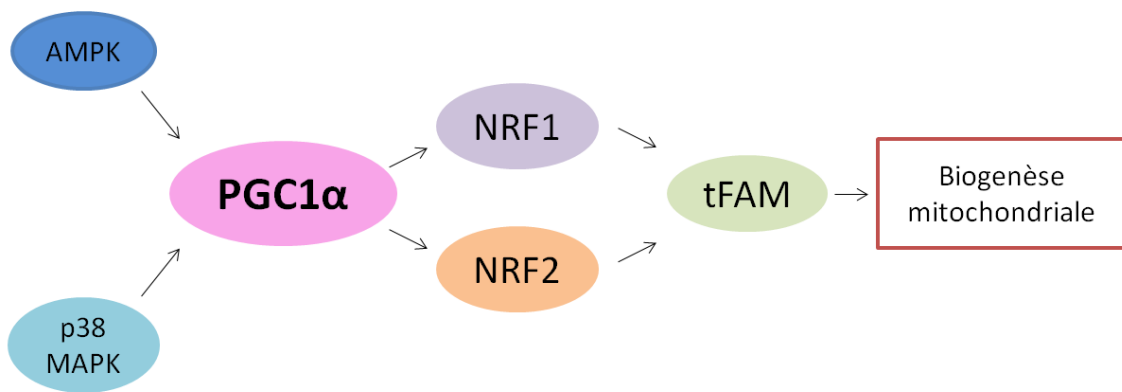
contrôle de nombreux processus cellulaires comme les synthèses protéique et lipidique, le métabolisme énergétique et l'autophagie (Laplante and Sabatini 2012). mTORC1 joue un rôle central dans le contrôle de l'initiation et de l'élongation de la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines (Koopman, Ly et al. 2014).

mTOR est sous le contrôle négatif de l'hétérodimère tuberous sclerosis 1 and 2 (TSC1/2) (Laplante and Sabatini 2012). De façon simplifiée, l'insuline et l'IGF-1 activent en cascade la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la protéine Akt (Figure 29) (Yap, Garrett et al. 2008; Laplante and Sabatini 2012). Cette dernière, parmi d'autres effecteurs, phosphoryle TSC1/2 pour l'inactiver et ainsi activer mTORC1. mTORC1 phosphoryle alors la protéine ribosomal protein S6 kinase (S6K), qui, par de nombreux effecteurs, participe à l'initiation et à l'élongation de la traduction protéique (Ma and Blenis 2009). De plus, mTORC1 phosphoryle le facteur eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)- binding protein 1 (4E-BP1), ce qui libère eIF4E, qui participe aussi à l'initiation de la traduction protéique (Richter and Sonenberg 2005; Laplante and Sabatini 2009).

mTORC1 est aussi activé par la voie Wnt qui inhibe la glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), un activateur de TSC2 (Inoki, Ouyang et al. 2006). Le facteur GSK3 $\beta$  est phosphorylé et inactivé par Akt (Egerman and Glass 2014). L'inhibition de GSK3 $\beta$  permet au facteur NFATc1 d'être transloqué dans le noyau pour renforcer la différenciation des myoblastes (Egerman and Glass 2014). De plus, la synthèse protéique par la voie mTOR est déterminée par la présence d'acides aminés et en particulier de leucine (Hara, Yonezawa et al. 1998; Laplante and Sabatini 2012). En effet, elle ne peut avoir lieu que si des acides aminés sont disponibles. De plus, la synthèse protéique est stimulée par la contraction musculaire (Philp, Hamilton et al. 2011).

Les acteurs de la synthèse protéique IGF-1 et Akt inhibent la protéolyse en exportant les facteurs de transcription FOXO du noyau au cytosol et en les y séquestrant (Figure 28B) (Brunet, Bonni et al. 1999; Scheck, Ohtsuka et al. 2004; Sandri, Sandri et al. 2004; Calnan and Brunet 2008). Ce mécanisme les empêche d'activer leurs gènes cibles dont font partie MAFbx et MuRF1. Après activation de la voie PI3K/Akt par IGF-1 (Sandri, Sandri et al. 2004), Akt phosphoryle le facteur FOXO3 provoquant sa rétention dans le cytoplasme (Brunet, Bonni et al. 1999). La synthèse d'ARNm de MAFbx est alors diminuée alors que sa dégradation n'est pas affectée et la quantité d'ARNm de MuRF1 est progressivement réduite (Scheck, Ohtsuka et al. 2004).

Dans 2 modèles *in vitro* d'atrophie musculaires (utilisation de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique ou privation de nutriments), l'activité de la voie PI3K/Akt était



**Figure 30 : La biogenèse mitochondriale.**

diminuée, ce qui induisait une déphosphorylation de FOXO3 (Sandri, Sandri et al. 2004). Cette déphosphorylation activait alors le promoteur et la transcription de MAFbx (Sandri, Sandri et al. 2004). Lorsque l'activation de FOXO3 était inhibée par la méthode de l'ARN interférant, l'atrophie musculaire dans les modèles précédemment cités était prévenue (Sandri, Sandri et al. 2004).

### **2-3-2- La biogenèse mitochondriale**

Nous avons vu que la mitochondrie est caractérisée par des processus biologiques particuliers tels que la  $\beta$ -oxydation des lipides, le cycle de Krebs et la respiration cellulaire. Un autre processus clé, étudié au cours de cette thèse, est développé ici : la biogenèse mitochondriale.

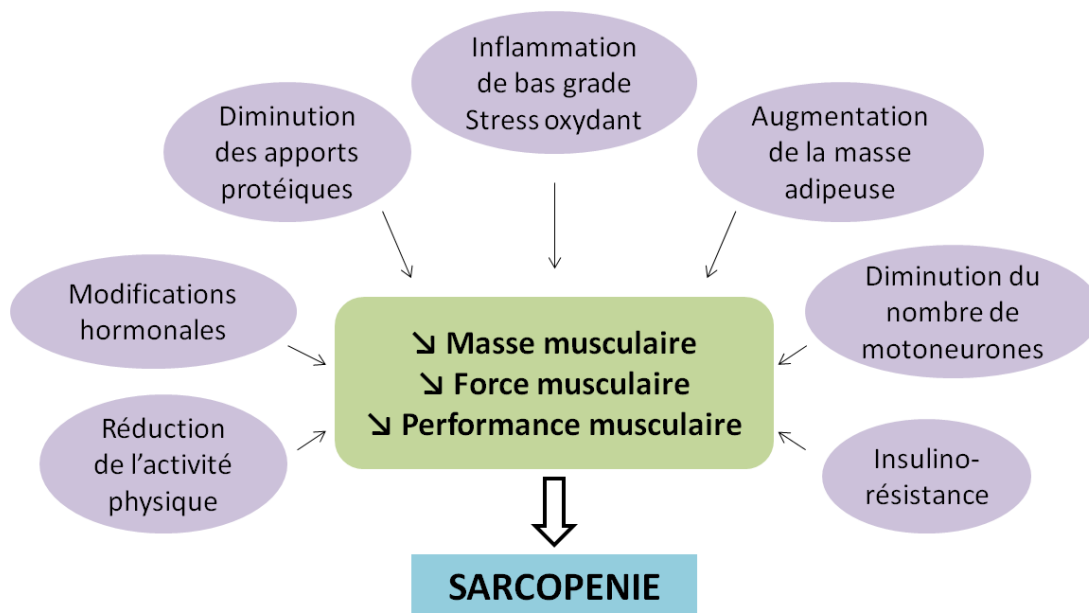
La biogenèse mitochondriale, est caractérisée par une augmentation du nombre et de la taille des mitochondries (Jornayvaz and Shulman 2010). Elle est influencée par l'exercice physique, la restriction calorique, le stress oxydant, la division et la différenciation cellulaire notamment. Il existe différentes voies de régulation de la biogenèse mitochondriale. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'une d'entre elles au cours de ces travaux. Ainsi, le facteur peroxisome-proliférateur-activé récepteur  $\gamma$  co-activateur-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) est un facteur de régulation qui induit la biogenèse mitochondriale par l'activation de différents facteurs de transcription, comme les facteurs nuclear respiratory factor 1 (NRF1) et NRF2, qui activent à leur tour le facteur mitochondrial transcription factor A (tFAM) (Figure 30) (Puigserver, Rhee et al. 2001; Jornayvaz and Shulman 2010; Scarpulla 2011). Ce dernier entraîne, par différents effecteurs, la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (Virbasius and Scarpulla 1994).

PGC1 $\alpha$  est sous le contrôle de différents facteurs dont le plus important est l'AMP-activated protein kinase (AMPK), qui agit comme un senseur énergétique (Hardie 2007; Jornayvaz and Shulman 2010). Le facteur p38 mitogène-activé protéine kinase (p38 MAPK) semble aussi jouer un rôle important dans la biogenèse mitochondriale au niveau du muscle strié squelettique.

### **2-3-3- Les mécanismes de la sarcopénie**

Une perte de masse musculaire progressive est observée à partir de l'âge de 40 ans (Malafarina, Uriz-Otano et al. 2012). Elle est estimée à environ 8% par décennie jusqu'à l'âge de 70 ans, puis à 10 à 15% par décennie (Tzankoff and Norris 1977; Grimby and Saltin 1983; Goodpaster, Park et al. 2006; Malafarina, Uriz-Otano et al. 2012). Il en résulte une perte





**Figure 31 : Facteurs de risque de la sarcopénie.**

moyenne de la masse musculaire totale de 30 à 40 % entre 50 et 80 ans. En parallèle, une perte de 10 à 15% par décennie de la force des jambes est observée jusqu'à 70 ans, ensuite accélérée jusqu'à 25 à 40% (Hughes, Frontera et al. 2001; Goodpaster, Park et al. 2006). Ces mécanismes sont accompagnés d'une diminution de la force maximale et d'un ralentissement de la contraction et de la relaxation musculaire (Ryall, Schertzer et al. 2008).

La sarcopénie est majoritairement due à une atrophie (diminution de la taille des fibres) et à une réduction du nombre de fibres musculaires, notamment les fibres de type II (Nair 2005; Walrand, Guillet et al. 2011).

Dans une étude récente, le profil d'expression génétique du muscle de rat au cours du vieillissement a été étudié (Ibebunjo, Chick et al. 2013). Les effets spécifiques de la sarcopénie et du vieillissement étaient discriminés par l'analyse des corrélations entre les expressions géniques et la masse musculaire ou l'âge des animaux respectivement. Les modifications des expressions des gènes associés au métabolisme mitochondrial, à la jonction neuromusculaire, à la dégradation protéique et à l'inflammation étaient corrélés à la diminution de la masse musculaire et donc à la sarcopénie. En effet, même si les mécanismes de la sarcopénie ne sont pas totalement élucidés, il est clair qu'elle est multifactorielle (Figure 31) et seuls les mécanismes étudiés au cours de mes travaux de thèse seront discutés ici. Ainsi, le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique, les altérations mitochondriales et la dérégulation des hormones anaboliques (insuline, facteurs de croissance et estrogènes) feront l'objet des paragraphes suivants. De plus, la production de cytokines sera discutée dans le paragraphe 2-4.

#### *2-3-3-1- L'altération de la balance synthèse/dégradation protéique*

La synthèse protéique au niveau du muscle squelettique diminue avec l'âge (Nair 2005). La voie Akt/mTOR, principal régulateur de la synthèse protéique musculaire est altérée au cours du vieillissement (Guillet, Prod'homme et al. 2004; Sanchis-Gomar, Garcia-Gimenez et al. 2014). Les modifications d'expression et de phosphorylation des nombreux acteurs de cette voie de signalisation entraînent la diminution de l'activation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Wu, Liu et al. 2010). Ce mécanisme est à mettre en relation avec la diminution de la capacité du muscle à répondre aux stimuli anaboliques comme la prise alimentaire, au cours du vieillissement (Mosoni, Valluy et al. 1995). Ce phénomène serait majoritairement expliqué par la diminution de la sensibilité aux acides aminés (Cuthbertson, Smith et al. 2005; Katsanos, Kobayashi et al. 2005; Prod'homme,



Balage et al. 2005), et en particulier à la leucine (Dardevet, Sornet et al. 2000; Marzani, Balage et al. 2008). De plus, l'activation de la voie Akt/mTOR induite par la contraction musculaire est aussi réduite avec l'âge (Funai, Parkington et al. 2006; Haddad and Adams 2006).

Le repliement des protéines, étape clé dans l'acquisition de la structure tridimensionnelle, a lieu dans le réticulum endoplasmique et est garanti par des protéines chaperonnes et des enzymes. L'expression et l'activité de celles-ci étant diminuées avec l'âge, le nombre de protéines mal repliées augmente (Deldicque 2013). Ce mécanisme de stress du réticulum endoplasmique agit directement sur le muscle en induisant la mort cellulaire et indirectement en inhibant la voie Akt/mTOR et donc en participant à la résistance anabolique du muscle âgé.

En parallèle, la réponse du complexe protéolytique ubiquitine-protéasome aux stimuli anaboliques et cataboliques est diminuée au cours du vieillissement (Attaix, Mosoni et al. 2005). En effet, après stimulation de l'atrophie musculaire par la dexaméthasone, même si la perte musculaire était plus importante chez le rat âgé, le système ubiquitine-protéasome n'était pas activé contrairement à ce qui se produisait chez le rat adulte (Dardevet, Sornet et al. 1995). Dans un modèle d'atrophie musculaire induit par 10 jours de jeûne, la protéolyse n'était pas inhibée chez le rat âgé par rapport au rat adulte lors de la période de réalimentation (Mosoni, Malmezat et al. 1999). En situation anabolique, l'inhibition postprandiale de la protéolyse musculaire (Arnal, Mosoni et al. 2002), et plus particulièrement du système ubiquitine-protéasome (Combaret, Dardevet et al. 2005) était déficiente chez le rat âgé. Il semblerait donc que le rat âgé ait une incapacité à moduler la protéolyse et plus particulièrement le système ubiquitine-protéasome en situation catabolique ou anabolique (Combaret, Dardevet et al. 2009).

L'altération de la synthèse et de la dégradation protéiques conduit à une perte de protéines mais aussi à l'accumulation de protéines endommagées mal prises en charge par les mécanismes de protéolyse (Combaret, Dardevet et al. 2009; Walrand, Guillet et al. 2011). Ces altérations structurelles pourraient être à l'origine de la diminution de la fonction musculaire au cours du vieillissement. Par exemple, la diminution de l'excitabilité du sarcolemme mise en évidence dans des fibres du muscle *EDL* de rats âgés (Pierno, Tricarico et al. 2014) pourrait être expliquée par une altération structurale des canaux ioniques. La réduction de la fraction de têtes de myosine fixées à l'actine lors de la contraction musculaire (Zhong, Lowe et al. 2006) et de l'activité ATPasique de la myosine (Lowe, Husom et al. 2004) chez le rat



âgé, mécanismes entraînant une diminution de la contractilité musculaire, pourraient être dues à des altérations de la structure des protéines contractiles.

#### 2-3-3-2- *La dégénérescence mitochondriale*

Dans l'étude de la détermination du profil génétique de la sarcopénie, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial étaient sous-exprimés et significativement corrélés à un phénotype sarcopénique (Ibebunjo, Chick et al. 2013). Ces résultats étaient confirmés par l'analyse protéomique associée (Ibebunjo, Chick et al. 2013). Les altérations mitochondriales liées à l'âge ont été mises en évidence à différents niveaux comme par exemple la multiplication des mutations au sein de l'ADN mitochondrial, une réduction des capacités oxydatives et de la biogenèse mitochondriale (Trifunovic 2006).

Une augmentation des délétions dans l'ADN mitochondrial a été observée avec l'âge chez le volontaire sain (Hsieh, Hou et al. 1994). Le nombre de copies d'ADN mitochondrial diminuait chez le rat âgé de 27 mois par rapport à des rats plus jeunes âgés de 6 mois (Barazzoni, Short et al. 2000). Cette réduction était spécifique au muscle étudié. Ainsi, les transcrits de la cytochrome c oxydase étaient préservés dans le *soleus* (muscle oxydatif) alors qu'ils étaient diminués dans le *gastrocnemius* (muscle mixte). De façon intéressante chez le rat, les lésions de l'ADN mitochondrial étaient localisées au niveau des fibres dont la chaîne respiratoire était altérée (Cao, Wanagat et al. 2001; Wanagat, Cao et al. 2001). Des résultats équivalents ont été mis en évidence chez l'Homme (Bua, Johnson et al. 2006). En effet, le nombre de fibres du *vastus lateralis* comportant des anomalies au niveau de la chaîne respiratoire passaient de 6% à 49 ans à 31% à 92 ans, ces fibres comportant toutes des mutations de l'ADN mitochondrial.

Il est important de souligner que les complexes de la chaîne respiratoire sont constitués de plusieurs sous-unités, codées soit par l'ADN génomique soit par l'ADN mitochondrial, sauf pour le complexe succinate déshydrogénase (complexe II) qui est codé entièrement par l'ADN génomique. Globalement, le taux de synthèse protéique mitochondriale du *tibialis anterior* diminuait chez le rat âgé (Zangarelli, Chanseume et al. 2006). De plus chez la souris, les activités des complexes NADH déshydrogénase (complexe I), cytochrome bc1 (complexe III) et cytochrome c oxydase (complexe IV) diminuait de 54 à 74% entre les âges de 10 et 20 mois, alors que l'activité du complexe succinate déshydrogénase (complexe II) était inchangée (Desai, Weindruch et al. 1996). De même chez



l'Homme, le vieillissement était associé à une réduction de l'activité oxydative mitochondriale du muscle squelettique (-40% entre 27 et 71 ans) (Petersen, Befroy et al. 2003). Cette réduction de l'activité des cytochromes bc1 et c oxydase mais pas du complexe succinate déshydrogénase était associée à l'augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial chez la personne âgée (Chabi, Mousson de Camaret et al. 2005). De plus, des expérimentations d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence que la majorité des fibres déficientes pour le complexe multiprotéique cytochrome c oxydase (complexe IV) avaient des expressions réduites pour la sous unité II, codée par l'ADN mitochondrial mais pas pour la sous-unité IV, codée par l'ADN génomique (Fayet, Jansson et al. 2002).

Ces altérations de l'ADN mitochondrial associées à la diminution de la synthèse et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire sont supposées être à l'origine de la perturbation de la fonction respiratoire et de la phosphorylation oxydative (Hiona and Leeuwenburgh 2008). En effet, une réduction de la consommation d'oxygène chez l'Homme (Joseph, Adihetty et al. 2012) et de la synthèse d'ATP chez le rat (Drew, Phaneuf et al. 2003) et chez l'Homme (Short, Bigelow et al. 2005) ont été mises en évidence avec le vieillissement. Cette diminution de la production d'ATP pourrait être due ou amplifiée par la réduction de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP en réponse à la contraction musculaire, récemment montrée chez le rat âgé (Gouspillou, Bourdel-Marchasson et al. 2014). De plus, une importante défaillance dans la chaîne respiratoire entraînait l'apoptose induite par la mitochondrie (Chistiakov, Sobenin et al. 2014), qui était corrélée à la faible vitesse de marche et à la réduction du volume musculaire chez la personne âgée (Marzetti, Lees et al. 2012).

Le vieillissement influence aussi la formation de mitochondries. Une revue récente conclue sur le rôle de p38 MAPK, PGC1 $\alpha$  et mTOR dans l'altération de la biogenèse mitochondriale au cours du vieillissement (Sanchis-Gomar, Garcia-Gimenez et al. 2014). En effet, l'expression de PGC1 $\alpha$ , facteur clé de la biogenèse mitochondriale (Figure 30) (Ling, Poulsen et al. 2004) et l'activité du facteur AMPK, qui tout comme p38 MAPK contrôle PGC1 $\alpha$ , (Jornayvaz and Shulman 2010) sont réduites avec l'âge. De plus, l'activation de p38 MAPK et l'induction de l'expression protéique de PGC1 $\alpha$ , NRF1 et du cytochrome c, en réponse à un stimulus comme l'exercice physique, sont aussi réduites au cours du vieillissement (Williamson, Gallagher et al. 2003; Derbre, Gomez-Cabrera et al. 2012).

Dans une étude menée sur 2 groupes de personnes âgées selon leur score SPPB permettait de mettre en évidence une réduction de la fonction mitochondriale qui serait associée à la performance physique (Joseph, Adihetty et al. 2012).





En conclusion, le vieillissement est associé à l'accumulation de dommages au niveau de l'ADN mitochondrial et à une diminution de la synthèse protéique musculaire mitochondriale qui causent, du moins en partie l'altération des protéines de la chaîne mitochondriale et de la capacité oxydative, ainsi qu'une diminution de la biogenèse de cet organe. De plus, la mitochondrie est le siège de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsables du stress oxydant, mécanisme amplifié en cas de déficience mitochondriale (Nunnari and Suomalainen 2012).

#### **2-3-4- Rôle des hormones**

La sarcopénie est renforcée par les modifications endocrines du vieillissement. Seules les hormones étudiées dans le cadre de cette thèse, l'insuline, l'IGF-1 et les estrogènes, seront développées dans ce chapitre. Cependant d'autres hormones ont un rôle dans l'étiologie de la sarcopénie comme la testostérone par exemple.

##### *2-3-4-1- L'insuline*

L'insuline est sécrétée par les cellules du pancréas en réponse à une augmentation des concentrations de glucose circulant permettant son stockage. La synthèse protéique est augmentée en réponse à l'insuline (Biolo, Declan Fleming et al. 1995), qui contrôle les états de phosphorylation des différents acteurs de la voie Akt/mTOR (Figure 29) (Kimball, Vary et al. 1994; Proud 2006). Chez le mini-porc, l'insuline augmentait la synthèse des protéines mitochondriales mais pas des protéines sarcoplasmiques ou des MHC (Boirie, Short et al. 2001). Il est important de souligner que l'acide aminé leucine peut activer certaines étapes de la voie de signalisation de l'insuline, régulant l'initiation de la traduction protéique (Anthony, Yoshizawa et al. 2000; Dardevet, Sornet et al. 2000).

Au cours du vieillissement, la sensibilité du muscle squelettique à l'insuline diminue (Cree, Newcomer et al. 2004). Chez le volontaire âgé, des doses supraphysiologiques d'insuline étaient nécessaires pour stimuler la voie Akt/mTOR (Fujita, Glynn et al. 2009). En effet, après ingestion de glucose et d'acides aminés, l'augmentation des taux d'insuline provoquait une augmentation de la synthèse protéique plus faible chez le volontaire âgé (72 ans en moyenne) que chez le sujet jeune adulte (30 ans en moyenne) (Volpi, Mittendorfer et al. 2000). Ceci pourrait être dû à un moindre effet de l'insuline sur l'état de phosphorylation de S6K, facteur essentiel pour l'initiation de la traduction protéique, mis en évidence chez le



volontaire âgé soumis à une perfusion d'insuline et d'acides aminés (Guillet, Prod'homme et al. 2004).

La résistance à l'insuline est caractérisée par la perte de la capacité cellulaire à répondre à l'insuline qui se traduit par une diminution de l'absorption, de la prise en charge et de l'oxydation du glucose ainsi que de la synthèse de glycogène (Abdul-Ghani and DeFronzo 2010). De plus, la résistance à l'insuline est associée à une dérégulation du métabolisme des acides gras et notamment de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Abdul-Ghani and DeFronzo 2010). Ce mécanisme est renforcé par la diminution du nombre de fibres de type II au profit des fibres de type I qui sont plus dépendantes du métabolisme du glucose et donc de l'insuline (Song, Kawano et al. 1999; Song, Ryder et al. 1999). A noter qu'une résistance à l'insuline pour le métabolisme protéique était mise en évidence chez des sujets âgés non insulino-résistants au niveau glucidique (Guillet, Prod'homme et al. 2004).

La dérégulation du métabolisme énergétique liée à l'âge est associée à un stockage ectopique des lipides excédentaires, appelé lipotoxicité, dans le muscle squelettique (Cree, Newcomer et al. 2004; Slawik and Vidal-Puig 2006; Tardif, Salles et al. 2014). L'infiltration lipidique au sein des fibres musculaires pourrait engendrer un affaiblissement de la contraction musculaire (Ryall, Schertzer et al. 2008), à l'origine d'une réduction de l'activité physique, qui à son tour renforcerait la résistance à l'insuline créant ainsi un cercle vicieux (Abbatecola, Paolisso et al. 2011).

L'insuline prévient la dégradation protéique en augmentant la disponibilité des acides aminés pour la synthèse protéique dans le muscle, mécanisme qui est altéré si l'individu souffre de résistance à l'insuline (Abbatecola, Paolisso et al. 2011). De plus, la dérégulation du métabolisme de l'insuline chez la souris favorisait le catabolisme protéique en augmentant l'expression des ubiquitines ligases (Wang, Hu et al. 2006).

Le lien entre la résistance à l'insuline et les dérégulations mitochondriales a fait l'objet de plusieurs revues (Turner and Heilbronn 2008; Dumas, Simard et al. 2009; Chow, From et al. 2010; Abbatecola, Paolisso et al. 2011; Dela and Helge 2013). Cependant, les mécanismes impliqués, l'existence d'une réciprocity ou d'un lien de causalité ainsi que la séquence des événements, n'ont pas encore été élucidés.

#### 2-3-4-2- *IGF-1*

L'IGF-1 peut être produit localement par le muscle squelettique ou de façon systémique grâce à sa sécrétion par le foie. Les deux sources agissent sur le muscle pour



promouvoir la synthèse protéique, la prolifération et la différenciation des fibres musculaires (Schiaffino and Mammucari 2011). De plus, l'IGF-1 améliore la survie des unités motrices et augmente l'expression des protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction (Messi and Delbono 2003; Ryall, Schertzer et al. 2008).

Au niveau hépatique, l'expression de l'IGF-1 est sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH) (Bichell, Kikuchi et al. 1992). La synthèse de la GH et de l'IGF-1 hépatiques est diminuée avec l'âge (Zadik, Chalew et al. 1985; Petrella, Kim et al. 2006). De faibles taux d'IGF-1 sérique chez la femme âgée étaient associés à la faible force des muscles extenseurs du genou, à une faible vitesse de marche et à une réduction de la mobilité (Cappola, Bandeen-Roche et al. 2001). Une association positive entre les taux sériques d'IGF-1 et la force musculaire de préhension a été mise en évidence chez la femme de plus de 60 ans et plus particulièrement chez la femme post-ménopausée mais pas chez l'homme (Taekema, Ling et al. 2011). En ce qui concerne l'expression génique d'IGF-1 musculaire, celle-ci était moins stimulée par l'exercice physique chez la personne âgée, suggérant une diminution de la production locale (Hameed, Orrell et al. 2003; Petrella, Kim et al. 2006).

#### 2-3-4-3- Les estrogènes

Dans les muscles squelettiques *soleus* et *EDL* de souris, les deux isoformes d'ER ont été identifiés (Baltgalvis, Greising et al. 2010). Chez l'Homme, les ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont été identifiés dans le muscle *vastus lateralis* de la cuisse, au niveau des noyaux des fibres musculaires (Wiik, Glenmark et al. 2003; Wiik, Ekman et al. 2005; Wiik, Ekman et al. 2009). Généralement, les deux récepteurs étaient co-exprimés dans le même noyau (Wiik, Ekman et al. 2009). Pour vérifier que les estrogènes impactent le muscle squelettique en modulant les ER, des modèles de souris invalidées pour l'ER $\alpha$  ou pour l'ER $\beta$  ont été mis en place (Brown, Ning et al. 2009). Ainsi, l'invalidation de l'ER $\alpha$  augmentait le poids corporel et le poids du *tibialis anterior* avec une diminution des propriétés contractiles des muscles *gastrocnemius* et *tibialis anterior* alors que la suppression de l'ER $\beta$  n'induisait pas de différence par rapport aux souris sauvages (Brown, Ning et al. 2009). Dans cette même étude, la suppression de l'aromatase, enzyme responsable d'une étape clé de la biosynthèse des estrogènes, induisait une augmentation du poids corporel et une diminution des propriétés contractiles des muscles *gastrocnemius* et *tibialis anterior*.

Une accélération de la perte de masse musculaire est observée au moment de la ménopause (Aloia, McGowan et al. 1991). En parallèle, une diminution de la force est



constatée, phénomène qui est inversé par les THS (Phillips, Rook et al. 1993; Rolland, Perry et al. 2007). En effet, selon une métaanalyse, la prise de THS permet d'améliorer de 5% la force musculaire chez la femme (Greising, Baltgalvis et al. 2009). Chez la souris, la perte de force musculaire après ovariectomie était associée à une diminution de la fraction de têtes de myosine fixées à l'actine lors de la contraction musculaire (Moran, Warren et al. 2006). De plus, l'ostéoporose a été récemment associée à une atrophie préférentielle des fibres musculaires de type II, de façon proportionnelle au degré de la pathologie (Terracciano, Celi et al. 2013). Il est important de noter que cette atrophie préférentielle des fibres de type II n'était pas observée chez les volontaires ostéoarthrosiques, qui subissaient une perte des fibres de type I et de type II.

L'hormone  $17\beta$ -estradiol avait un effet antiapoptotique sur les cellules musculaires *in vitro*, mécanisme qui implique la voie Akt/mTOR (Vasconsuelo, Milanesi et al. 2008). Chez la femme ostéoporotique, une réduction significative de l'expression protéique d'Akt semblait être impliquée dans l'atrophie musculaire (Terracciano, Celi et al. 2013).

La ménopause étant associée à une diminution des estrogènes mais aussi de la GH, de l'IGF-1 et de l'insuline ainsi qu'à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, il est difficile d'isoler les effets des estrogènes sur le développement de la sarcopénie (Messier, Rabasa-Lhoret et al. 2011).

## **2-3-5- Stratégies de prévention et de traitement de la sarcopénie**

### *2-3-5-1- L'exercice physique*

Il est clair que l'exercice physique a un effet bénéfique sur la masse et la force musculaires, et permet de prévenir le développement de la sarcopénie (Freiberger, Sieber et al. 2011; Montero-Fernandez and Serra-Rexach 2013). En effet, une étude clinique suggère que l'entraînement continu pendant 12 à 17 ans, en réalisant des exercices de résistance, pourrait contrecarrer les modifications de la morphologie et de la fonction au cours du vieillissement (Klitgaard, Manton et al. 1990). Chez des personnes âgées, la synthèse protéique était rapidement augmentée après un exercice physique de résistance (Schulte and Yarasheski 2001).

Ainsi, l'activité physique et plus particulièrement le renforcement musculaire et le travail de l'équilibre font partie de la stratégie de prévention des chutes de l'OMS (Aide-





mémoire N°344 Octobre 2012). Cependant, cette pratique n'est pas toujours possible chez la personne âgée (Malafarina, Uriz-Otano et al. 2012).

#### *2-3-5-2- Les traitements médicaux*

A ce jour, il n'existe pas de traitement pharmaceutique de la sarcopénie mais de nombreuses études ont été et sont menées. Les études d'administration de GH ont permis de mettre en évidence une augmentation de la masse musculaire, qui n'était cependant pas associée à une amélioration de la force musculaire (Papadakis, Grady et al. 1996). De plus, les traitements de GH entraînaient des effets secondaires comme des douleurs articulaires, le syndrome du canal carpien, des œdèmes, du diabète (Borst 2004; Malafarina, Uriz-Otano et al. 2012). Un traitement à l'aide d'IGF-1 améliorait le métabolisme protéique (Butterfield, Thompson et al. 1997) et augmentait la force musculaire (Thompson, Butterfield et al. 1998) chez la femme âgée fragile. Cependant, de nombreux effets secondaires ont été identifiés dont des douleurs articulaires et des œdèmes (Thompson, Butterfield et al. 1998).

Le rétablissement des taux de GH et d'IGF-1 par injection de GH releasing hormone (Corpas, Harman et al. 1992) a permis d'améliorer la force musculaire et l'endurance (Vittone, Blackman et al. 1997) sans effet secondaire. Ainsi, ce traitement semble être une bonne solution pour rétablir les propriétés anaboliques de l'axe GH-IGF-1 chez la personne âgée, mais nécessite plus d'investigation (Walrand, Guillet et al. 2011).

Une autre stratégie en cours d'évaluation est l'inhibition de la myostatine, un inhibiteur de la myogenèse dont l'expression est augmentée au cours du vieillissement (White and Lebrasseur 2014). Chez la souris, l'inhibition de ce facteur augmentait la masse musculaire (Collins-Hooper, Sartori et al. 2014).



## 2-4- Un modèle de dérégulation commun: Inflammation et stress oxydant

L'inflammation et le stress oxydatif sont des mécanismes communs au développement de l'ostéoporose et de la sarcopénie.

### 2-4-1- L'inflammation

L'inflammation constitue une réaction de défense immunitaire hautement régulée. Au cours du vieillissement une altération des processus de régulation exacerbe l'inflammation causant des dommages métaboliques et fonctionnels chez l'hôte (Calder 2013). Cette augmentation d'un facteur 2 à 4 des concentrations circulantes des médiateurs pro-inflammatoires est appelée inflammation de bas grade (Krabbe, Pedersen et al. 2004). Elle est induite par de nombreux facteurs dont la diminution de la production d'estrogènes et l'augmentation de la masse grasse (Krabbe, Pedersen et al. 2004). Elle est caractérisée, entre autres, par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6, mais aussi la C-reactive protein (CRP) (Beyer, Mets et al. 2012).

#### 2-4-1-1- *Inflammation et perte osseuse*

La ménopause est associée à une augmentation de la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Zheng, Vrindts et al. 1997; D'Amelio, Grimaldi et al. 2008). Ce phénomène est aussi retrouvé chez la femme après ablation des ovaires (Pacifci, Brown et al. 1991). Cette imprégnation de cytokines est responsable, au moins en partie de la perte osseuse car la surexpression d'IL-6 était associée à une ostéopénie chez la souris (De Benedetti, Rucci et al. 2006). De plus, l'inhibition de l'IL-1 (à l'aide de l'antagoniste IL-1 receptor antagonist) ou du TNF- $\alpha$  (avec la TNF-binding protein) après ovariectomie chez la souris permettait de réduire la perte osseuse (Kimble, Matayoshi et al. 1995). De façon intéressante, administrés ensemble, ces deux inhibiteurs supprimaient la perte osseuse. De même, l'ajout d'anticorps anti-IL-6 annulait l'augmentation du nombre d'ostéoclastes induite par l'ovariectomie chez la souris (Jilka, Hangoc et al. 1992). Ainsi, la neutralisation d'IL-6 supprimerait les effets stimulateurs de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (Devlin, Reddy et al. 1998).

En ce qui concerne les mécanismes impliqués, l'IL-1 augmenterait la survie des ostéoclastes en stimulant la voie PI3K/Akt (Lee, Lee et al. 2002). L'ostéoclastogenèse via l'augmentation de l'expression de RANKL est stimulée par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (Hofbauer, Lacey et al. 1999; Ma, Miyanishi et al. 2004; Wei, Kitaura et al. 2005). De plus, la formation des ostéoclastes par des mécanismes indépendants de RANKL était induite par le TNF- $\alpha$  *in*



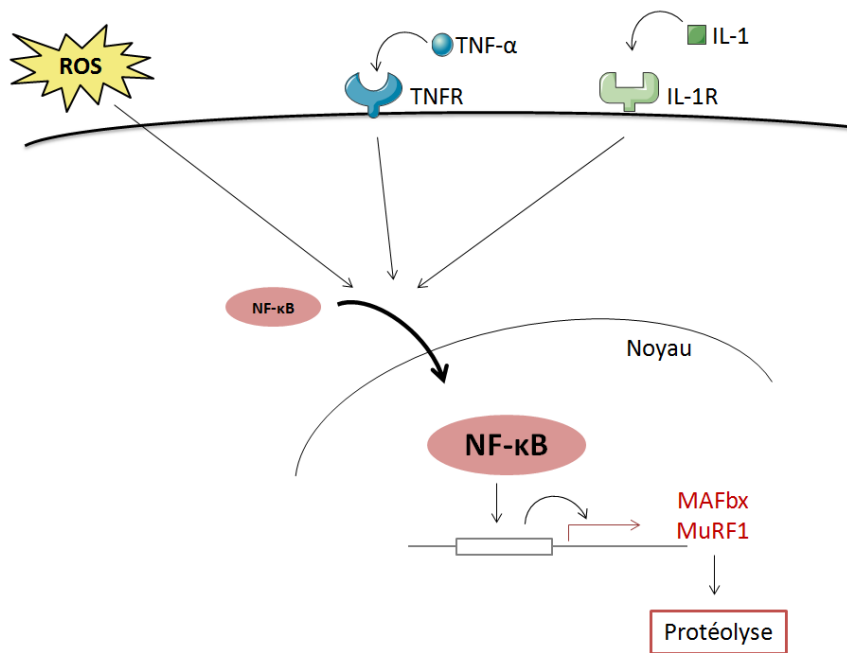
*in vitro* (Kobayashi, Takahashi et al. 2000; Hotokezaka, Sakai et al. 2007). L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont des activateurs de voies de signalisation différentes mais qui convergent vers le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Cagnetta and Patella 2012). Chez la souris, l'inhibition de NF- $\kappa$ B permettait de limiter la perte osseuse due à l'ovariectomie des animaux (Chang, Wang et al. 2009).

#### 2-4-1-2- Inflammation et sarcopénie

De la même façon que pour le tissu osseux et l'ostéoporose, l'inflammation de bas grade est associée à la sarcopénie. Les plus fortes concentrations sériques de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et de CRP ont été associées négativement à la masse musculaire (Haren, Malmstrom et al. 2010; Aleman, Esparza et al. 2011), à la force musculaire (Tiainen, Hurme et al. 2010; Bautmans, Onyema et al. 2011) et à la performance musculaire (Haren, Malmstrom et al. 2010; Tiainen, Hurme et al. 2010). Une étude de cohorte sur 326 femmes âgées de 72 à 92 ans a été menée sur 2 ans pour évaluer le potentiel des cytokines pro-inflammatoires en tant que marqueur de la sarcopénie (Payette, Roubenoff et al. 2003). Après prélèvement sanguin, les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMC) ont été récupérées puis mises en culture avant dosage des concentrations en IL-6 des surnageants. Les plus fortes concentrations d'IL-6 étaient corrélées aux plus fortes pertes de masse maigre.

Plusieurs mécanismes ont été étudiés pour expliquer les effets des cytokines pro-inflammatoires sur le développement de la sarcopénie et impliqueraient une diminution de l'anabolisme couplée à une augmentation du catabolisme musculaire.

L'administration chronique d'IL-1 chez le rat conduisait à une diminution de l'expression génique des protéines myofibrillaires (Fong, Moldawer et al. 1989). De plus, une diminution de la synthèse protéique musculaire au niveau du *soleus* et du *gastrocnemius* a été mise en évidence chez des rats traités au TNF- $\alpha$  (Lang, Frost et al. 2002). Dans une étude chez le rat âgé dans laquelle la mise en lot a été effectuée selon le statut inflammatoire, la synthèse protéique musculaire dans le *tibialis anterior* était stimulée chez les rats non inflammés mais pas chez les rats ayant une inflammation de bas grade (Balage, Averous et al. 2010). D'un point de vue mécanistique, le TNF- $\alpha$  diminue la synthèse protéique en augmentant la liaison de 4EBP1 à eIF4E et en inhibant l'association des facteurs eIF4E et eIF4G, étape essentielle à la traduction protéique (Lang, Frost et al. 2002; Williamson, Kimball et al. 2005). De plus, *in vitro*, le TNF- $\alpha$  réduisait la différenciation des myoblastes en



**Figure 32 : Augmentation de la protéolyse en réponse à NF-κB.**

NF-κB, nuclear factor-kappaB ; TNF-α, tumor necrosis factor-α ; TNFR, récepteur au TNF-α ; IL-1, interleukin-1 ; IL-1R, récepteur à l'IL-1

myotubes en bloquant l'expression du facteur de croissance musculaire MyoD (Chandran, Knobloch et al. 2007).

En parallèle, ces cytokines activent les voies NF- $\kappa$ B et p38 MAPK augmentant ainsi l'expression des E3 ligases MuRF1 et MAFbx et activant le système protéolytique ubiquitine protéasome (Figure 32) (Garcia-Martinez, Agell et al. 1993; Li and Reid 2000; Luo, Hershko et al. 2003; Li, Chen et al. 2005; Egerman and Glass 2014).

Ces mécanismes pourraient être amplifiés par l'infiltration lipidique au sein du muscle observée avec l'âge (Cesari, Leeuwenburgh et al. 2006). En effet, certains lipides et notamment le palmitate (Feng, Wang et al. 2012; Tardif, Salles et al. 2014) et les céramides (Summers 2006; Tardif, Salles et al. 2014) réduisaient l'activation d'Akt dans des cellules musculaires *in vitro*. Ce mécanisme pourrait contribuer à la résistance à l'insuline (Kewalramani, Bilan et al. 2010; Mahfouz, Khoury et al. 2014; Tardif, Salles et al. 2014), à l'apoptose des cellules musculaires (Unger and Orci 2002; Unger 2003) mais aussi à la réduction de la synthèse protéique au cours du vieillissement (Tardif, Salles et al. 2014). A noter que l'accumulation des lipides au sein des cellules musculaires est aussi associée à l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires (Olefsky and Glass 2010). La lipotoxicité musculaire pourrait ainsi contribuer et/ou amplifier l'altération des cellules musculaires au cours du vieillissement (Unger 2003; Weinberg 2006; Kewalramani, Bilan et al. 2010; Savary, Tromprier et al. 2012; Tardif, Salles et al. 2014).

#### 2-4-1-3- *Inflammation, ostéoporose et sarcopénie*

De façon très intéressante, un récent programme d'analyse génomique (genome-wide association study : GWAS), ciblant conjointement les facteurs de susceptibilité génétique de l'ostéoporose (mesure de géométrie de la hanche) et de la sarcopénie (masse maigre appendiculaire), a permis l'identification du gène METTL21C codant pour une méthyle-transférase (Huang, Hsu et al. 2014). La diminution de l'expression de ce gène dans des cellules musculaires C2C12 était associée à une réduction du nombre, de la taille et de la longueur des myotubes formés et à une augmentation de la mort cellulaire de la lignée ostéocytaire MLO-Y4. L'inactivation de ce gène a mis en évidence qu'il modulerait uniquement la voie NF- $\kappa$ B.





En conclusion, la production de cytokines pro-inflammatoires est augmentée avec le vieillissement mais aussi avec la ménopause. Ces cytokines dérèglent le remodelage osseux et le renouvellement protéique musculaire induisant ainsi une perte osseuse et musculaire.

L'inflammation n'est pas l'unique facteur commun de l'ostéoporose et de la sarcopénie. En effet, le stress oxydant joue aussi un rôle majeur dans le développement de ces pathologies et fait l'objet du paragraphe suivant.

#### **2-4-2- Le stress oxydant**

Le stress oxydant est issu d'un déséquilibre entre la production et la destruction des ROS. Le vieillissement serait dû à une accumulation de dommages moléculaires, provoqués entre autres mécanismes par les ROS, induisant une dégénérescence des tissus (Gladyshev 2014). La mitochondrie est le principal site de production des ROS (anion superoxide  $O_2^{\circ-}$ , radical hydroxyle  $HO^{\circ}$  et peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  principalement), responsables du stress oxydant, ce mécanisme étant amplifié en cas de déficience mitochondriale (Nunnari and Suomalainen 2012). L'accumulation des ROS induit des dommages oxydatifs, de façon directe mais aussi par l'activation de voies de signalisation (Uttara, Singh et al. 2009; Derbre, Gratas-Delamarche et al. 2014). Or, une augmentation des marqueurs du stress oxydant est observée au cours du vieillissement, mécanisme amplifié par la déficience en estrogènes (Almeida, Han et al. 2007).

##### *2-4-2-1- Stress oxydant et ostéoporose*

Le stress oxydant due à une augmentation des ROS et à une diminution de l'activité antioxydante serait un des mécanismes principaux de la perte osseuse consécutive à une déficience en estrogènes (Wauquier, Leotoing et al. 2009; Khosla, Oursler et al. 2012; Marie 2014). En effet, chez la femme ménopausée, l'ostéopénie est associée à l'augmentation du stress oxydant et à la diminution de la capacité antioxydante (Ozgoçmen, Kaya et al. 2007; Ozgoçmen, Kaya et al. 2007; Altindag, Erel et al. 2008). Les ROS et les autres produits issus du stress oxydant atténuent l'ostéoblastogenèse, diminuent la durée de vie des ostéoblastes et des ostéocytes tout en stimulant la génération, la fonction et la survie des ostéoclastes (Khosla, Oursler et al. 2012).

Le stress oxydant active le facteur FOXO qui se lie à la  $\beta$ -catenin, inhibant ainsi la voie Wnt et donc la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Manolagas and



Almeida 2007; Almeida 2011). Ce mécanisme de défense permettrait d'orienter la cellule vers la détoxification des ROS et la mort cellulaire.

#### 2-4-2-2- Stress oxydant et sarcopénie

La production de ROS est augmentée dans le muscle squelettique avec l'âge (Capel, Rimbart et al. 2005). Les altérations de la chaîne respiratoire sont considérées comme étant un mécanisme important dans l'augmentation de la production de  $O_2^{\cdot-}$  dans le muscle squelettique âgé (Ji 2001). En parallèle, une augmentation des mécanismes enzymatiques antioxydants est observée, mais n'est pas suffisante pour éviter la surgénération de ROS (Derbre, Gratas-Delamarche et al. 2014). De plus, l'inactivité physique est susceptible d'exacerber le stress oxydant induit par le vieillissement (Derbre, Gratas-Delamarche et al. 2014).

Les ROS altèrent le renouvellement protéique, la régénération des fibres musculaires et la contractilité du muscle. En effet, la voie Akt/mTOR était inhibée par  $H_2O_2$ ; celui-ci diminuant la phosphorylation des facteurs eIF4E et 4EBP1 dans le *soleus* de rat, étudié *ex vivo* (Wu, Liu et al. 2010). La supplémentation en antioxydants permettait de restaurer partiellement le fonctionnement de la voie Akt/mTOR et la synthèse protéique au sein du muscle de rats âgés (Marzani, Balage et al. 2008; Wu, Liu et al. 2010). De plus,  $H_2O_2$  stimulait le catabolisme musculaire en augmentant la transcription des enzymes E2 et E3 (MAFbx et MuRF1) du complexe ubiquitine protéasome dans des myotubes *in vitro* (Li, Chen et al. 2003). Dans cette dernière étude,  $H_2O_2$  augmentait la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, qui stimulait l'expression génique des ubiquitines ligases. La voie de signalisation suivante a donc été proposée : « ROS  $\rightarrow$   $\oplus$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$   $\oplus$  dégradation protéique par le protéasome » (Figure 32) (Derbre, Gratas-Delamarche et al. 2014).

Les ROS réduiraient la régénération cellulaire en activant la voie p38 MAPK, ce qui limiterait la prolifération des myoblastes (Derbre, Gratas-Delamarche et al. 2014). De plus, la réduction du stress oxydant stimulait la prolifération des cellules satellites (Chakravarthy, Spangenburg et al. 2001) et la différenciation des myoblastes *in vitro* (Hansen, Klass et al. 2007). L'altération de la régénération cellulaire s'additionnerait à la diminution du renouvellement protéique pour contribuer à la perte musculaire au cours du vieillissement.

L'atrophie musculaire n'est pas la seule conséquence du stress oxydant, et la surproduction de ROS altère aussi la contractilité des muscles. En effet, les protéines troponine, tropomyosine, myosine et actine possèdent des groupements thiols qui sont



sensibles à l'oxydation et dont la modification pourrait altérer les mécanismes de la contraction musculaire (Reid 2008; Terrill, Radley-Crabb et al. 2013). De plus, les ROS pourraient réduire la force musculaire en diminuant la sensibilité des myofilaments au calcium (Reid 2008).

#### *2-4-2-3- Stress oxydant, ostéoporose et sarcopénie*

En résumé, l'ostéoclastogenèse, l'activation des ostéoclastes et la résorption osseuse sont augmentés par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et CRP) et le stress oxydant, ce dernier étant aussi responsable d'une inhibition de la formation osseuse. De plus, l'inflammation, conjointement au stress oxydant, favorise la dégradation des protéines myofibrillaires et diminue la synthèse protéique. Globalement, tous ces mécanismes conduisent à une perte conjointe de masse osseuse et musculaire.

L'idée d'un lien entre l'inflammation, les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant a émergé au cours des années 2000 (Salvioli, Capri et al. 2006). Par exemple, il existerait un cercle vicieux entre la production de TNF- $\alpha$ , l'activation de NF- $\kappa$ B et la génération des ROS (Piantadosi and Suliman 2012). De plus, ces mécanismes seraient amplifiés par la déficience en estrogènes et l'inactivité physique. Le vieillissement est associé à une inflammation de bas grade et au stress oxydant, qui induiraient la résistance à l'insuline, et donc la résistance anabolique musculaire (Gratas-Delamarche, Derbre et al. 2014). Tous ces mécanismes seraient amplifiés par la lipotoxicité musculaire.



## 2-5- Les relations os-muscle

*Ce chapitre est un résumé car il a fait l'objet d'une revue générale de la littérature, intitulée « Muscle and bone, two interconnected tissues » présentée en Annexe de ce manuscrit.*

L'os et le muscle squelettique sont complémentaires et essentiels pour la locomotion et l'autonomie des individus, les os étant les leviers sur lesquels les muscles peuvent exercer des forces. Dans les dernières décennies, l'idée d'une unité os-muscle a émergé. De nombreuses études, de l'*in utero* jusqu'aux travaux sur le vieillissement, ont renforcé cette hypothèse. La charge mécanique est un mécanisme clé reliant les deux tissus, avec un rôle central favorable de l'activité physique. De plus, le secrétome du muscle squelettique comporte diverses molécules qui affectent l'os. Des molécules ostéo-inductrices (l'IGF-1, le FGF-2, l'IL-15, l'osteoglycin (OGN), le FAM5C, le Tmem119 et l'osteoactivin) et des ostéo-inhibitrices (l'IL-6 et la myostatine) ont été mises en évidence. Même si les études sur les effets potentiels de l'os sur le métabolisme musculaire sont plus rares, quelques ostéokines ont été identifiées. La PGE2 et le Wnt3a, qui sont sécrétées par les ostéocytes auraient des effets myo-inducteurs, tout comme l'OCN et l'IGF-1 produites par les ostéoblastes. En revanche, la sclerostin, exprimées par ces deux types cellulaires, pourrait altérer le métabolisme musculaire.

Le cartilage et le tissu adipeux sont également susceptibles de participer à cette boucle de régulation et ne doivent pas être mis de côté. En effet, les chondrocytes sont connues pour sécréter le facteur DKK1, un ostéo-inhibiteur et l'Indian Hedgehog (Ihh), qui pourrait promouvoir les métabolismes osseux et musculaire. Les adipocytes produisent de la leptine, de l'adiponectine et de l'IL-6, qui modulent potentiellement le métabolisme osseux et musculaire. La myostatine semble jouer un rôle central dans l'interconnexion de ces tissus, car elle peut influencer négativement les muscles, les os et le cartilage et promouvoir le tissu adipeux. D'autres mécanismes métaboliques tels que l'inflammation sont impliqués dans le développement de l'ostéoporose et de la sarcopénie, pathologies affectant les os et les muscles, respectivement. Les études sur les vols spatiaux et l'alitement ont permis l'identification de mécanismes sous-jacents des processus de l'ostéopénie et de la sarcopénie. L'impact bénéfique de l'exercice physique et d'une alimentation équilibrée, incluant des ingrédients clés tels que les protéines, le calcium, la vitamine D et divers micronutriments et acides gras spécifiques, semble essentiels.

De plus amples recherches sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués entre l'os et le muscle squelettique, afin de développer de nouvelles stratégies pour





lutter contre le développement de l'ostéoporose la sarcopénie conjointement. Ces stratégies pourraient inclure des interventions nutritionnelles et l'exercice physique.



## 2-6- Conclusion

L'ostéoporose et la sarcopénie sont deux pathologies qui se développent au cours du vieillissement et qui sont induites par des mécanismes communs comme l'inflammation et le stress oxydant. De plus, chez la femme, ces pathologies sont amplifiées par la déficience estrogénique de la ménopause, faisant de cette population une cible préférentielle. Actuellement, il existe différents traitements pour lutter contre la progression de l'ostéoporose, alors qu'aucun traitement n'est disponible pour lutter contre la sarcopénie. Cependant, les traitements anti-ostéoporotiques engendrent des effets secondaires néfastes pour la santé. Même si l'exercice physique apparaît comme l'une des meilleures thérapies pour prévenir le développement de ces pathologies, il reste difficile à maintenir chez la personne âgée. Ainsi, ces différentes raisons conduisent à élaborer de nouvelles stratégies de prévention et de prise en charge de l'ostéoporose et de la sarcopénie.



### **3- Les stratégies nutritionnelles**

La consommation d'aliments à fort potentiel anti-inflammatoire et/ou antioxydant pourrait contrer les mécanismes de développement de l'ostéoporose et de la sarcopénie et ainsi prévenir ces processus dégénératifs. A ce titre, l'intérêt des constituants du régime méditerranéen tels que l'huile d'olive, la vitamine D et le DHA pour prévenir l'ostéoporose, la sarcopénie et les processus inflammatoires et oxydants associés sera discuté dans les paragraphes suivants.

#### **3-1- Le régime méditerranéen**

Le régime méditerranéen est caractérisé par une consommation forte en végétaux, faible à modérée en poisson, volaille, produits laitiers et vin et faible en viande rouge avec comme source majoritaire d'acides gras, l'huile d'olive (Willett, Sacks et al. 1995; Almendros, Obrador et al. 2013). Une méta-analyse a mis en évidence une association entre l'adhésion à une alimentation de type méditerranéenne et une réduction de l'incidence des maladies neuro-dégénératives et de la mortalité due aux pathologies cardio-vasculaires et aux cancers (Sofi, Cesari et al. 2008). En effet, la consommation d'un régime méditerranéen diminue le stress oxydant, impliqué dans le développement de nombreuses maladies (Dai, Jones et al. 2008). C'est le cas en particulier pour le métabolisme osseux et le métabolisme musculaire, qui sont altérés par la présence de ROS en excès (Armour, Van et al. 1999; Arai, Shibata et al. 2007; Aoi and Sakuma 2011). Dans une étude chez des femmes pré et post-ménopausées, le maintien de la BMD était positivement associé à l'utilisation du régime méditerranéen (Rivas, Romero et al. 2013). De plus, il existe un gradient nord-sud de l'incidence des fractures en Europe, avec un taux d'apparition plus faible dans la zone méditerranéenne (Johnell, Gullberg et al. 1992; Kanis 1993). Une étude récente menée sur 188 795 personnes âgées de 49 ans en moyenne, montrait que l'adhésion au régime méditerranéen était associée à une diminution de l'apparition des fractures de la hanche (Benetou, Orfanos et al. 2013). Cependant, dans une étude française menée sur 1482 personnes de 67 ans en moyenne, une plus forte adhésion au régime méditerranéen n'était pas associée à une diminution du risque fracturaire (évalué sur la hanche, les vertèbres et le poignet) (Feart, Lorrain et al. 2013). Ces résultats peuvent s'expliquer, au moins en partie, par la puissance statistique très inférieure de la seconde étude. De façon plus précise, la consommation de fruits et légumes ou de poisson et d'huile d'olive, avec un faible apport en



viande rouge étaient corrélés positivement à la BMD chez des sujets de sexe féminin (New, Bolton-Smith et al. 1997; New, Robins et al. 2000; Kontogianni, Melistas et al. 2009).

Il apparaît au vu de la littérature actuelle, qu'au moins trois éléments clés du régime méditerranéen présentent un fort potentiel pour la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie. Ils sont représentés par l'huile d'olive, la vitamine D et le DHA.



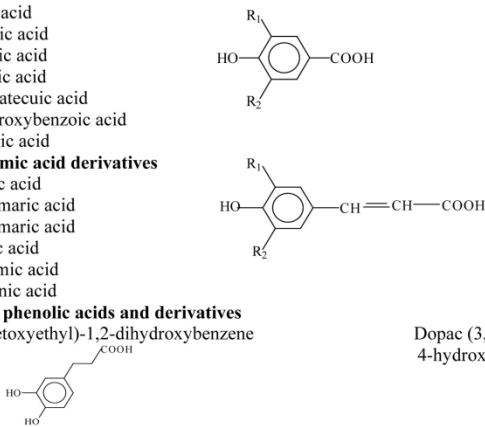
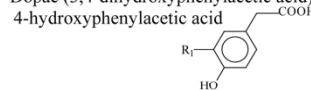
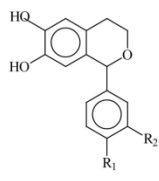
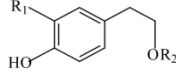
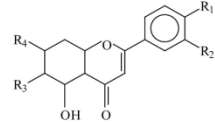

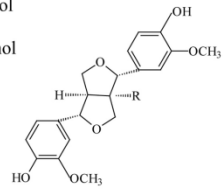
<p><b>Phenolic acids</b>  <b>Benzoic acid derivatives</b>  Gallic acid  Gentisic acid  Benzoic acid  Vanillic acid  Protocatechuic acid  <p><i>p</i>-Hydroxybenzoic acid  Syringic acid  <b>Cinnamic acid derivatives</b>  Caffeic acid  <p><i>p</i>-Coumaric acid  <i>o</i>-Coumaric acid  Ferulic acid  Cinnamic acid  Sinapinic acid  <b>Other phenolic acids and derivatives</b>  4-(Acetoxyethyl)-1,2-dihydroxybenzene</p>  <p>Dopac (3,4-dihydroxyphenylacetic acid)  4-hydroxyphenylacetic acid</p>  </p></p>	<p><b>Hydroxy-isochromans</b>  1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman  1-(3'-methoxy-4'-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman</p> 
<p><b>Phenolic alcohols</b>  (3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol (3,4-DHPEA)  <p><i>p</i>-Hydroxyphenyl)ethanol (<i>p</i>-HPEA)  (3,4-Dihydroxyphenyl)ethanol-glucoside  2-(4-hydroxyphenyl)ethyl acetate</p>  </p>	<p><b>Flavonoids</b>  <b>Flavones</b>  Apigenin  Luteolin  <b>Flavanonol</b>  (+)-Taxifolin</p> 
<p><b>Secoiridoids</b>  Oleuropein  Dialdehydic form of oleuropein aglycon  Dialdehydic form of ligstroside aglycon  Ligstroside aglycon  Oleuropein aglycon (3,4-DHPEA-EA)  Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA)  Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to <i>p</i>-HPEA (<i>p</i>-HPEA -EDA)</p>  <p>Dialdehydic forms of secoiridoids derivatives</p>	<p><b>Lignans</b>  (+)-1-Acetyypinoresinol  (+)-Pinoresinol  (+)-1-Hydroxypinoresinol</p> 

Figure 33 : Structure des polyphénols de l'huile d'olive.

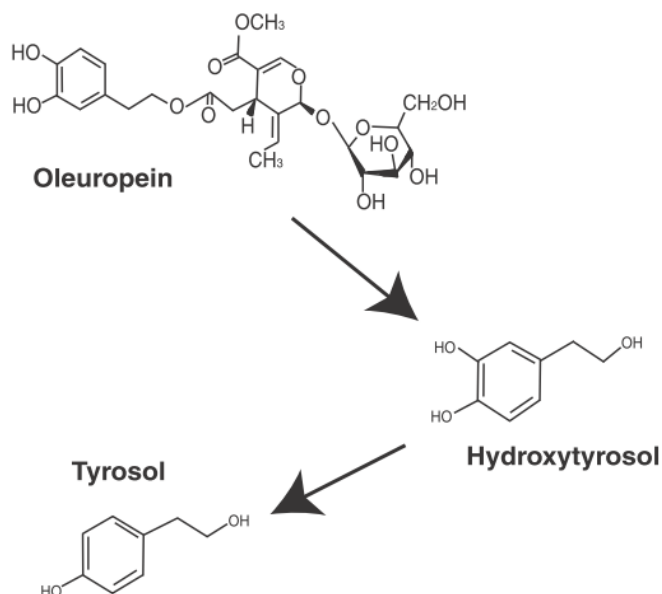


Figure 34 : Structure de l'oleuropeine et de ses métabolites (Hagiwara, Goto et al. 2011).

### 3-2- L'huile d'olive et ses polyphénols

L'huile d'olive est la source principale d'acides gras du régime méditerranéen (Perez-Lopez, Chedraui et al. 2009). En effet, dans les pays méditerranéens, 30 à 50 g d'huile d'olive sont consommés chaque jour (Vissers, Zock et al. 2004). L'huile d'olive vierge est définie par la norme Codex Stan 33-1981 du Codex Alimentarius : « *Les huiles d'olive vierges sont les huiles obtenues du fruit de l'olivier uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, particulièrement thermiques, qui n'entraînent pas d'altération de l'huile et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration* ». Différents types d'huile d'olive sont distingués selon le degré d'acidité libre exprimée en acide oléique. L'acidité libre est la quantité d'acide oléique sous forme d'acide gras libre. Elle permet d'indiquer l'état de dégradation des triglycérides, forme majoritaire des acides gras de l'huile d'olive. Ainsi, l'huile d'olive extra vierge a une acidité libre de 0,8 g/100 g maximum et l'huile d'olive vierge de 2 g/100 g maximum. L'huile raffinée a une acidité libre de 0,3 g/100 g maximum et est obtenue à partir des huiles d'olive vierges par des techniques de raffinage qui n'entraînent pas de modifications de la structure glycéridique initiale.

La composition de l'huile d'olive varie selon la zone de culture, le cultivar, les systèmes de cueillette et de stockage, le degré de maturation des fruits et la méthode de transformation (Ranalli, Ferrante et al. 1999; Mailer 2006; Galtier, Dupuy et al. 2007). Globalement, 95 à 99% de l'huile d'olive sont représentés par des triacylglycérols (Mailer 2006) dont 55 à 83% d'acide oléique (C18:1), 7,5 à 20% d'acide palmitique (C16:0) et 3,5 à 21% d'acide linoléique (C18:2) (Codex Alimentarius) (Boskou, Blekas et al. 2006). De plus, plus de 200 composés sont retrouvés dans l'huile d'olive dont des stérols, des phénols, du squalène et des tocophérols (Stark and Madar 2002; Servili, Selvaggini et al. 2004; Mailer 2006). Les polyphénols caractéristiques et majoritaires de l'huile d'olive extra vierge, vierge et raffinée figurent dans le Tableau 1 (Rothwell, Perez-Jimenez et al. 2013). La fraction polyphénolique de l'huile d'olive est constituée de plus de 30 composés dont des flavonoïdes, des acides phénoliques, des lignanes et d'autres polyphénols que sont l'oleuropéine, le ligstroside et leurs dérivés (Figure 33). Les polyphénols les plus abondants de l'huile d'olive sont les dérivés sécoïridoïdes oleuropéine- et ligstroside-aglycones, ainsi que l'hydroxytyrosol et le tyrosol, deux phénols simples dérivés de l'oleuropéine (Figure 34) (Hagiwara, Goto et al. 2011). Chaque huile d'olive a un profil polyphénolique particulier qui lui confère son goût caractéristique (Mailer 2006). La quantité de polyphénols peut varier de 20 à 500 mg/L

Huile d'olive	Extra vierge			Vierge			Raffinée			
	Autre nom	min	moy	max	min	moy	max	min	moy	max
<u>Polyphénols (µg/100 g)</u>										
<u>Acides phénoliques</u>										
Acide coumarique		10	<b>90</b>	360	0	<b>20</b>	260			
<u>Tyrosols</u>										
Hydroxytyrosol		10	<b>770</b>	3470	3	<b>350</b>	7430	170	<b>680</b>	2130
Tyrosols		70	<b>1130</b>	3560	0	<b>530</b>	6470	290	<b>410</b>	760
Hydroxytyrosol acetate	3,4 DHPEA-AC				0	<b>1350</b>	24700	90	<b>1480</b>	2810
Oleuropéine dialdéhydrique aglycone	3,4 DHPEA-EDA	80	<b>25160</b>	94200	0	<b>7780</b>	163500	1810	<b>5740</b>	7930
Ligstroside dialdéhydrique aglycone	p-HPEA-EDA	1180	<b>14280</b>	33500	120	<b>7150</b>	40690	3090	<b>3890</b>	5230
Oleuropéine aldéhydrique aglycone	3,4 DHPEA-EA	0	<b>7220</b>	25800	0	<b>9500</b>	60900	1090	<b>1090</b>	1090
<u>Lignanes</u>										
Pinosésinol		40	<b>420</b>	990	60	<b>2370</b>	5680	1340	<b>2410</b>	3760
<u>Flavonoïdes</u>										
Lutéoline		60	<b>360</b>	750	0	<b>130</b>	830	70	<b>120</b>	200
Apigénine		30	<b>1170</b>	3200	0	<b>100</b>	390	20	<b>30</b>	50

**Tableau 1 : Composition polyphénolique de l'huile d'olive extra vierge, vierge et raffinée (Phenol Explorer 3.0).**

(Owen, Mier et al. 2000; Stark and Madar 2002; Oi-Kano, Kawada et al. 2007). Le processus de raffinage permet d'éliminer la plupart de ces composés (Owen, Mier et al. 2000), 70% selon les données de Phenol Explorer (Tableau 1).

Chez l'Homme, 55 à 66% des polyphénols de l'huile d'olive seraient absorbés au niveau intestinal (Vissers, Zock et al. 2002). Cependant d'une façon générale, la biodisponibilité des polyphénols varie selon leur nature et leur source (Manach, Williamson et al. 2005). De plus, les métabolites circulant dans le sang, résultant de la digestion et de l'activité hépatique diffèrent des composés natifs de l'huile (Manach, Williamson et al. 2005). Il s'agit de formes sulfatées et glucuronidées (de la Torre 2008; Suarez, Valls et al. 2011). La concentration sanguine des métabolites des polyphénols varie de 0,1 à 10  $\mu\text{mol/L}$  (Kroon, Clifford et al. 2004; Suarez, Valls et al. 2011) et il existe une très forte variation interindividuelle (Suarez, Valls et al. 2011). Pour le cas particulier du tyrosol, dans une étude chez 8 volontaires sains, l'ingestion de 1650  $\mu\text{g}$  de tyrosol contenus dans 50 mL d'huile d'olive permettait de passer d'une excrétion urinaire basale de 2,4 - 25,2  $\mu\text{g/L}$  à un pic de 1000  $\mu\text{g/L}$ , en moyenne, entre 0 et 4 heures post-ingestion (Miro Casas, Farre Albadalejo et al. 2001). La quantité de tyrosol excrétée sur 24 heures était de 281 à 708  $\mu\text{g}$ , soit 17 à 43% avec une moyenne de 24,7% de la quantité de tyrosol consommée.

L'huile d'olive est supposée être à l'origine de la longévité des sujets suivant le régime méditerranéen (Perez-Lopez, Chedraui et al. 2009). En effet, la consommation d'huile d'olive extra vierge a été inversement associée à la mortalité globale dans l'étude European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) (Masala, Ceroti et al. 2007). Parmi tous ses composés, ce sont les polyphénols qui seraient vecteurs des effets bénéfiques de l'huile d'olive (Habauzit and Horcajada 2008; Cicerale, Lucas et al. 2010). L'impact de la consommation d'huile d'olive sur les tissus osseux et musculaires, ainsi que sur le stress oxydant et l'inflammation seront développés ci-dessous.

### **3-2-1- Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur le tissu osseux**

Les mécanismes d'action de l'huile d'olive sur le tissu osseux ont été évalués chez l'Homme, chez l'animal et au niveau cellulaire (Tableau 2).

Les premières études sur l'huile d'olive et l'os ont été menées il y a plus de 30 ans. L'acide oléique stimulerait l'absorption calcique (Laval-Jeantet and Laval-Jeantet 1976). De plus, des questionnaires complétés par 135 volontaires âgées de 28 à 86 ans, ont permis d'identifier que l'âge, la médication, l'activité physique (selon son intensité) et une seule

	Modèle	Age	Durée	Traitement	Quantité	Effet sur la santé osseuse
<u>Etude clinique</u>						
Fernandez-Real, Bullo et al. 2012	Hommes (127)	55 à 80 ans	2 ans	Régime méditerranéen enrichi en huile d'olive	Au moins 50 mL/jour	Augmentation des concentrations sanguines d'OC et de PINP et diminution de celle de CTX1 suggérant une protection osseuse
<u>Etudes animales</u>						
Puel, Mardon et al. 2007	Rats Wistar OVX Rats Wistar OVX + inflammation	6 mois	84 jours	Olives vertes Lucques Olives noires Lucques	10 g/jour 6 g/jour (correspondant à 50 g de gras/kg de régime)	Prévention de la perte osseuse du fémur total et de la diaphyse chez les rats OVX + inflammation par les olives noires
Puel, Quintin et al. 2004	Rats Wistar OVX Rats Wistar OVX + inflammation	6 mois	80 jours	Huile d'olive Oleuropéine	50 g/kg de régime 0,15 g/kg de régime (soit environ 9 mg/kg de poids corporel)	Prévention de la perte osseuse au niveau de la métaphyse fémorale et du fémur total uniquement chez les rats OVX + inflammation
Saleh and Saleh 2011	Rats Wistar OVX	12-14 mois	12 semaines (84 jours) 4 semaines avant OVX et 8 semaines après	Huile d'olive extra vierge	1 mL/100 g de poids corporel (gavage)	Prévention de la perte osseuse due à l'OVX et réduction du nombre d'ostéoclastes
Keiler, Zierau et al. 2013	Rats Lewis OVX	12 ± 1 mois	12 semaines (84 jours)	Extrait polyphénolique total d'une huile d'olive extra vierge	800 mg/kg de régime	Pas d'atténuation de la perte osseuse
Puel, Mathey et al. 2006	Rats Wistar OVX + inflammation	6 mois	100 jours	Oleuropéine	0; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 mg/kg de poids corporel	Réduction de la perte osseuse par les 4 doses d'oleuropéine
Puel, Mardon et al. 2008	Rats Wistar OVX Rats Wistar OVX + inflammation	6 mois	84 jours	Tyrosol Hydroxytyrosol	0,017% 0,017%	Prévention de la perte osseuse (fémur total et diaphyse pour les 2, et aussi métaphyse pour le tyrosol) en augmentant la formation osseuse chez les rats OVX + inflammation
Hagiwara, Goto et al. 2011	Souris Balb/c OVX	6 semaines	28 jours	Oleuropéine Hydroxytyrosol Tyrosol	10 mg/kg poids corporel (gavage tous les 3 jours)	L'hydroxytyrosol et l'oleuropéine préviennent la perte osseuse trabéculaire. Diminution dose-réponse du nombre d'ostéoclastes par les 3 polyphénols.
Kim, Jung et al. 2011	Souris C57Bl/6 OVX	8 semaines	30 jours	Lutéoline	5 mg/kg 20 mg/kg (gavage quotidien)	Prévention de la perte osseuse corticale et trabéculaire induite par l'OVX. Ralentissement du renouvellement osseux accéléré par l'OVX.
<u>Culture cellulaire</u>						
Santiago-Mora, Casado-Diaz et al. 2011	Cellules souches mésenchymateuses humaines			Oleuropéine	1, 10, 100 µM	Augmentation de la différenciation ostéoblastique et réduction de la différenciation adipocytaire
Hagiwara, Goto et al. 2011	MC3T3-E1 Ostéoclastes (à partir de cellules de rate)			Oleuropéine Hydroxytyrosol Tyrosol	1; 5; 10; 50; 100 µM	Diminution de la viabilité des MC3T3-E1 de façon dose-dépendante avec oleuropéine et hydroxytyrosol Stimulation du dépôt de calcium à forte concentration d'oleuropéine Diminution de la formation des ostéoclastes de façon dose dépendante pour les 3 polyphénols
Lee, Ahn et al. 2009	Raw264.7			Lutéoline	0,3; 1; 3; 10 µM	Inhibition de la différenciation ostéoclastique induite par RANKL à 3 et 10 µM.
Kim, Jung et al. 2011	Cellules de moelle osseuse Raw264.7			Lutéoline	1; 2; 5; 10 µM	Diminution de la différenciation ostéoclastique. Réduction de la résorption osseuse par des ostéoclastes différenciés.

**Tableau 2 : Effet de l'huile d'olive et de ses constituants sur le tissu osseux. Etudes clinique, animales et cellulaires.**

composante nutritionnelle: l'huile d'olive, étaient des facteurs déterminants de la BMD mesurée sur la troisième vertèbre lombaire (Laval-Jeantet, Gen et al. 1984; Charbonnier 1996). Les BMD les plus élevées étaient obtenues avec une consommation mensuelle de 500 à 750 mL d'huile d'olive, soit 16 à 25 mL par jour.

Une étude clinique portant sur un régime méditerranéen avec au moins 50 mL d'huile d'olive a été menée pendant 2 ans, sur des hommes de 55 à 80 ans (Fernandez-Real, Bullo et al. 2012). La consommation de ce régime permettait d'augmenter les concentrations sanguines de deux marqueurs de la formation osseuse (OCN et PINP (N-terminal propeptide of type I procollagen)) et de diminuer celle de CTX1, un marqueur de la résorption osseuse, suggérant une protection du tissu osseux.

Les études précliniques menées au sein de notre équipe ont mis en évidence que les olives noires, l'huile d'olive, ainsi que trois de ses principaux polyphénols : l'oleuropéine, le tyrosol et l'hydroxytyrosol, prévenaient la perte osseuse induite par l'ovariectomie dans le modèle d'ostéoporose sénile chez le rat (ovariectomie associée à une inflammation) (Puel, Quintin et al. 2004; Puel, Mathey et al. 2006; Puel, Mardon et al. 2007; Puel, Mardon et al. 2008). Dans ce même modèle, l'oleuropéine ainsi que l'huile d'olive augmentait la charge de rupture du fémur, qui reflète les propriétés mécaniques de l'os au niveau de la diaphyse (Puel, Quintin et al. 2004). Dans des modèles d'ostéoporose post-ménopausique, l'huile d'olive extra vierge, ainsi que l'oleuropéine, le tyrosol, l'hydroxytyrosol et la lutéoline prévenaient la perte osseuse, avec une réduction du nombre d'ostéoclastes (Hagiwara, Goto et al. 2011; Kim, Jung et al. 2011; Saleh and Saleh 2011). A l'inverse, dans une étude récente, la consommation d'un extrait polyphénolique d'huile d'olive extra vierge par le rat ovariectomisé ne limitait pas la perte osseuse (Keiler, Zierau et al. 2013).

En ce qui concerne les expérimentations *in vitro*, il est important de souligner que les doses nutritionnelles de polyphénols, qui correspondent aux concentrations plasmatiques, sont de l'ordre de 0,1 à 10  $\mu\text{M}$  (Kroon, Clifford et al. 2004). La diminution de la formation des ostéoclastes a été confirmée *in vitro* sur des précurseurs issus de la rate cultivés en présence de 10  $\mu\text{M}$  d'oleuropéine (Hagiwara, Goto et al. 2011) et sur des cellules de la lignée Raw264.7 en présence de 1 à 10  $\mu\text{M}$  de lutéoline (Lee, Ahn et al. 2009; Kim, Jung et al. 2011). Le mécanisme pourrait impliquer une inhibition de la stimulation de l'expression de NFATc1 par RANKL (Lee, Ahn et al. 2009). Des résultats similaires ont été obtenus à de plus fortes doses d'oleuropéine (50  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ), d'hydroxytyrosol (50 - 100  $\mu\text{M}$ ) ou de tyrosol (100  $\mu\text{M}$ ). De plus, l'oleuropéine à 1, 10 ou 100  $\mu\text{M}$  augmentait la différenciation ostéoblastique au détriment de la différenciation adipocytaire *in vitro* (Santiago-Mora,

Modèle	Age	Durée	Traitement	Quantité	Effet sur la santé musculaire
<u>Etudes animales</u>					
Nelson, Heird and Clarke, données non publiées (Clarke, 2002)					
Rat			Huile d'olive	40% dans le régime	Augmentation de la conversion du glucose en glycogène Diminution des dommages de l'ADN
Rodriguez, 2002	Rat Wistar (240 g)	4 semaines	Huile d'olive	190 g/kg de régime	Augmentation de la thermogenèse (UCP3) Amélioration de la synthèse protéique
Tardif, 2011	Rat Wistar 25 mois	16 semaines	Régime enrichi en oléate	210 g/kg de régime	Activation de la $\beta$ -oxydation musculaire Diminution de la résistance à l'insuline
Cao, 2014	Souris C57Bl/6J 5 semaines	17 semaines	Régime riche en graisse $\pm$ gavage avec hydroxytyrosol	10 mg/kg/day 50 mg/kg/day	Diminution de la lipotoxicité musculaire Augmentation de l'activité mitochondriale Diminution de la résistance à l'insuline Diminution de l'apoptose
Piemo, 2014	Rat Wistar 27 mois	6 semaines	Margines riches en hydroxytyrosol		Contractilité Diminution de la concentration intracellulaire en calcium Augmentation de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique
Feng, 2011	Rat Sprague Dawley 8 semaines	8 semaines	Hydroxytyrosol et excès d'exercice physique	25 mg/kg/day	Amélioration de l'endurance Diminution de l'expression d'atrogin-1 et de MuRF1 Diminution de l'expression de FOXO3 Augmentation de l'activité des complexes mitochondriaux
<u>Culture cellulaire</u>					
Coll, 2008	C2C12	4 jours après induction de la différenciation	Oléate + palmitate + 100 nM insulín pendant 10 min	0,1 ou 0,3 mM oléate + 0,5 mM palmitate	Réduction de la résistance à l'insuline induite par le palmitate
Burattini, 2013	C2C12	30 min avant l'ajout d'H2O2	Hydroxytyrosol	20 $\mu$ M	Réduction de l'apoptose induite par H2O2
Drira, 2013	C2C12	12 heures	Hydroxytyrosol acétate	25, 50 et 75 $\mu$ M	Augmentation de la consommation de glucose

**Tableau 3 : Effet de l'huile d'olive et de ses constituants sur le tissu musculaire. Etudes animales et cellulaires.**

Casado-Diaz et al. 2011). En présence de 1 ou 10  $\mu\text{M}$  d'oleuropéine, l'expression des facteurs Runx2, osterix, ALP, Col1a1, OCN mais aussi OPG était augmentée. L'oleuropéine à forte concentration (100  $\mu\text{M}$ ) stimulait le dépôt de calcium des MC3T3-E1 (Hagiwara, Goto et al. 2011). Cependant, l'oleuropéine de 1 à 10  $\mu\text{M}$  et l'hydroxytyrosol à 10  $\mu\text{M}$  diminuaient l'activité métabolique et donc la viabilité des pré-ostéoblastes MC3T3-E1 après 69 heures de culture, contrairement au tyrosol (Hagiwara, Goto et al. 2011). Des résultats équivalents ont été obtenus à de plus fortes concentration d'oleuropéine (à partir de 50  $\mu\text{M}$  après 45 heures ou 69 heures de culture) et d'hydroxytyrosol (100  $\mu\text{M}$  après 69 heures de culture).

En conclusion, l'huile d'olive et ses composés jouent un rôle dans la protection osseuse en prévenant la perte osseuse induite par une déplétion hormonale, en augmentant la formation osseuse et en diminuant la formation ostéoclastique (Garcia-Martinez, Rivas et al. 2014), constituant ainsi de très bons candidats pour la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose.

### **3-2-2- Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur le tissu musculaire**

Différentes études ont été menées sur l'impact de l'huile d'olive et ses composés sur le muscle. En effet, la consommation d'huile d'olive, d'oléate et d'hydroxytyrosol ont été évaluées *in vivo* dans des modèles rongeurs (rat, souris) et *in vitro* sur les lignées musculaires C2C12 et L6 (Tableau 3).

Tout d'abord, ces études ont mis en évidence que l'huile d'olive, et notamment l'oléate, joue un rôle régulateur important dans le métabolisme énergétique musculaire. *In vitro*, en présence d'hydroxytyrosol acétate, les cellules C2C12 consommaient plus de glucose, et de façon dose dépendante (Drira and Sakamoto 2013). De plus, une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale a été mise en évidence chez le rat âgé nourri à l'oléate (Tardif, Salles et al. 2011). Ces données sont à mettre en relation avec un accroissement de la biogenèse mitochondriale, déterminée par une élévation de l'expression protéique du facteur de transcription PGC1 $\alpha$  (Coll, Eyre et al. 2008; Yuzefovych, Wilson et al. 2010; Feng, Bai et al. 2011) et une augmentation de l'activité mitochondriale décrite chez la souris et chez le rat après consommation d'hydroxytyrosol (Feng, Bai et al. 2011; Cao, Xu et al. 2014). Une autre étude chez le rat montrait que l'huile d'olive exacerbait le taux de certaines protéines mitochondriales de découplage comme UCP3, dans le *gastrocnemius*, muscle du mollet, contrairement à l'huile de tournesol, l'huile de palme et le suif de bœuf (Rodriguez, Portillo et al. 2002). Les UCP permettent d'intensifier la thermogenèse (génération de chaleur sans





production d'ATP) et ainsi de limiter le stockage des acides gras dans le muscle (Dulloo 2011). Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la diminution de la lipotoxicité musculaire observée chez la souris consommant de l'hydroxytyrosol (Cao, Xu et al. 2014). Globalement, tous ces mécanismes sont à l'origine de l'effet protecteur de l'huile d'olive vis-à-vis de la résistance à l'insuline, elle-même augmentée par la lipotoxicité (Coll, Eyre et al. 2008; Tardif, Salles et al. 2011; Cao, Xu et al. 2014).

En vue d'une prévention de la perte musculaire au cours du vieillissement, il est intéressant de noter que la consommation d'oléate chez le rat âgé, mais pas de palmitate, augmentait la synthèse protéique musculaire en réponse à des signaux anaboliques (Tardif, Salles et al. 2011). En outre, chez des rats, la consommation d'hydroxytyrosol améliorait l'endurance et diminuait l'expression des marqueurs de l'atrophie musculaire comme MAFbx et MuRF1 et de l'autophagie comme FOXO3 dans le *soleus* (Feng, Bai et al. 2011).

L'oléate, principal constituant de l'huile d'olive, prévenait les dommages de l'ADN mitochondrial induits par le palmitate dans des myotubes L6 en culture (Yuzefovych, Wilson et al. 2010). Ces mécanismes pourraient de réduire la mort cellulaire. De plus, chez la souris, l'apoptose dans le *gastrocnemius* était inhibée par l'hydroxytyrosol (Cao, Xu et al. 2014). Ce phénomène était également observé *in vitro* dans des cellules musculaires C2C12 mises en contact avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Burattini, Salucci et al. 2013). En effet, en présence d'hydroxytyrosol, la quantité de cellules mortes passait de plus de 60% à moins de 20%.

Chez le rat, la consommation de margines d'olives (effluents issus de l'extraction de l'huile d'olive) riches en hydroxytyrosol limitait l'altération de la contractilité musculaire observée au cours du vieillissement, notamment en rétablissant l'homéostasie du calcium (diminution de la concentration calcique au repos et augmentation de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique) (Pierno, Tricarico et al. 2014).

En conclusion, l'huile d'olive et ses polyphénols ainsi que l'oléate permettent de contrecarrer, au moins partiellement, certaines modifications observées dans le muscle squelettique au cours du vieillissement, comme l'altération du métabolisme énergétique, la dérégulation du renouvellement protéique, l'augmentation de l'apoptose cellulaire et la détérioration de la contractilité musculaire.

### **3-2-3- L'huile d'olive, inflammation et stress oxydant**

Comme il a été décrit dans le paragraphe 2-4, l'inflammation et le stress oxydant sont des mécanismes communs au déclenchement et au développement de l'ostéoporose et de la



sarcopénie. Ils constituent ainsi des cibles privilégiées pour contrecarrer ces pathologies. Les effets de l'huile d'olive sur ces deux mécanismes seront développés ci-dessous.

Dans un modèle d'ostéoporose sénile induite par un stress inflammatoire, l'altération du poids de la rate, reflet du statut inflammatoire<sup>1</sup> (Pettan-Brewer and Treuting 2011), était prévenue par la consommation d'huile d'olive ou d'oleuropéine (Puel, Quintin et al. 2004; Puel, Mathey et al. 2006). Ainsi, l'effet bénéfique de l'huile d'olive sur l'os pourrait, du moins en partie, impliquer une modulation de l'inflammation. En effet, les polyphénols de l'huile d'olive semblent réguler l'inflammation en modulant la signalisation intracellulaire (Santangelo, Vari et al. 2007). L'hydroxytyrosol inhibait la production du marqueur de l'inflammation leukotriène B4 (LtB4) par des leucocytes humains, et ce de façon dose-dépendante (Petroni, Blasevich et al. 1997). Le LtB4 est un métabolite pro-inflammatoire des AGPI oméga 6 ( $\omega 6$ ) qui participe à l'inflammation de bas grade (Ilich, Kelly et al. 2014). Ces résultats sont compatibles avec ceux d'une étude clinique impliquant 12 hommes sains, dans laquelle la consommation d'huile d'olive extra vierge, mais pas celle d'huile d'olive pauvre en polyphénols ou celle d'huile de maïs, diminuait les concentrations sanguines du marqueur inflammatoire LtB4 (Bogani, Galli et al. 2007). De plus, l'hydroxytyrosol et le tyrosol étaient capables de diminuer l'expression génique de la cyclooxygénase-2 (Cox-2), nitric oxide synthase 2 (Nos-2) et NF- $\kappa$ B dans des macrophages (J774 et Raw264.7) activés (Maiuri, De Stefano et al. 2005; De Stefano, Maiuri et al. 2007) et de Cox-2, Nos-2 et TNF- $\alpha$  dans des monocytes stimulés par un composant bactérien, le lipopolysaccharide de paroi (LPS) (Zhang, Cao et al. 2009). Nos-2 et Cox-2 sont exprimés en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNF- $\alpha$  (van't Hof and Ralston 2001; Smyth, Grosser et al. 2009). Nos-2 induit la production du radical libre oxyde nitrique (NO) impliqué dans le stress oxydant (van't Hof and Ralston 2001). Cox-2 produit des prostaglandines pro-inflammatoires à partir de l'acide arachidonique qui sont impliquées dans l'inflammation de bas grade (Smyth, Grosser et al. 2009; Ilich, Kelly et al. 2014).

Chez des patients souffrant du syndrome métabolique qui est associé à une inflammation de bas grade, la consommation d'un petit déjeuner contenant 398 mg/kg de polyphénols d'huile d'olive par rapport à un petit déjeuner ne comprenant que 70 mg/kg de polyphénols d'huile d'olive, diminuait l'expression de nombreux gènes de l'inflammation dont NF- $\kappa$ B et Cox-2 dans des PBMC (Camargo, Ruano et al. 2010). De plus, la production

---

<sup>1</sup> La rate est un organe lymphoïde qui joue un rôle dans l'immunité en produisant notamment des lymphocytes et des anticorps et qui filtre les cellules sanguines endommagées.



d'IL-1 $\beta$ , était diminuée par l'oleuropéine glycosidée dans des cultures de sang total humain (Miles, Zoubouli et al. 2005). Ce résultat est à mettre en relation avec des expérimentations précliniques dans lesquelles l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol diminuaient les taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Gong, Geng et al. 2009; Impellizzeri, Esposito et al. 2011). Toutes ces données mettent en évidence que la régulation de NF- $\kappa$ B semble jouer un rôle important dans l'effet bénéfique des polyphénols de l'huile d'olive sur l'inflammation (Santangelo, Vari et al. 2007). De plus, il est important de noter que d'autres composés de l'huile d'olive présentent aussi une activité anti-inflammatoire. Ainsi, une consommation d'oléate provoquait une réduction de la concentration systémique d'IL-1 $\beta$  chez le rat âgé (Tardif, Salles et al. 2011) et de la sécrétion d'IL-6 induite par le palmitate dans des myotubes C2C12 (Coll, Eyre et al. 2008).

De nombreuses données révèlent également les effets antioxydants de l'huile d'olive et de ses composés. En effet, le potentiel de piégeage des radicaux superoxydes par l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol a été démontré *in vitro* (Visioli, Bellomo et al. 1998). Le tyrosol diminuait la production de ROS par des macrophages Raw264.7 activés (Moreno 2003). De même, les flavonoïdes de l'huile d'olive (apigénine et lutéoline) inhibaient la production de NO dans ces mêmes cellules (Kim, Cheon et al. 1999). Une troisième étude montrait le potentiel de l'oléate à restaurer la production de ROS induite par le palmitate dans des myotubes L6 (Yuzefovych, Wilson et al. 2010). En ce qui concerne les études animales, l'huile d'olive diminuait la production mitochondriale de ROS consécutive à un stress thermique dans le muscle squelettique de poulet (Mujahid, Akiba et al. 2009). De plus, chez des rats soumis à un exercice physique, la consommation d'huile d'olive extra vierge ou d'hydroxytyrosol était associée à une diminution des marqueurs du stress oxydant ainsi qu'à une augmentation des défenses antioxydantes (Feng, Bai et al. 2011; Musumeci, Maria Trovato et al. 2013). Chez l'Homme, l'ingestion de polyphénols de l'huile d'olive permettait d'augmenter la capacité antioxydante plasmatique (Visioli, Caruso et al. 2005; Bogani, Galli et al. 2007). Ainsi, la consommation d'huile d'olive était associée à la réduction des dommages oxydatifs de l'ADN chez l'homme (Machowetz, Poulsen et al. 2007) et chez la femme ménopausée (Salvini, Sera et al. 2006).

### **3-2-4- Conclusion**

De nombreuses études mettent en évidence un rôle protecteur de l'huile d'olive et de ses constituants vis-à-vis des tissus osseux et musculaires, en particulier par rapport aux effets



du vieillissement. Cette protection dépendrait, au moins en partie, d'une diminution de l'inflammation et plus particulièrement des marqueurs NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  et du stress oxydant avec une réduction de la quantité de ROS et une augmentation de la capacité antioxydante. Toutes ces données font de l'huile d'olive un candidat potentiellement efficace pour développer un aliment permettant la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie.



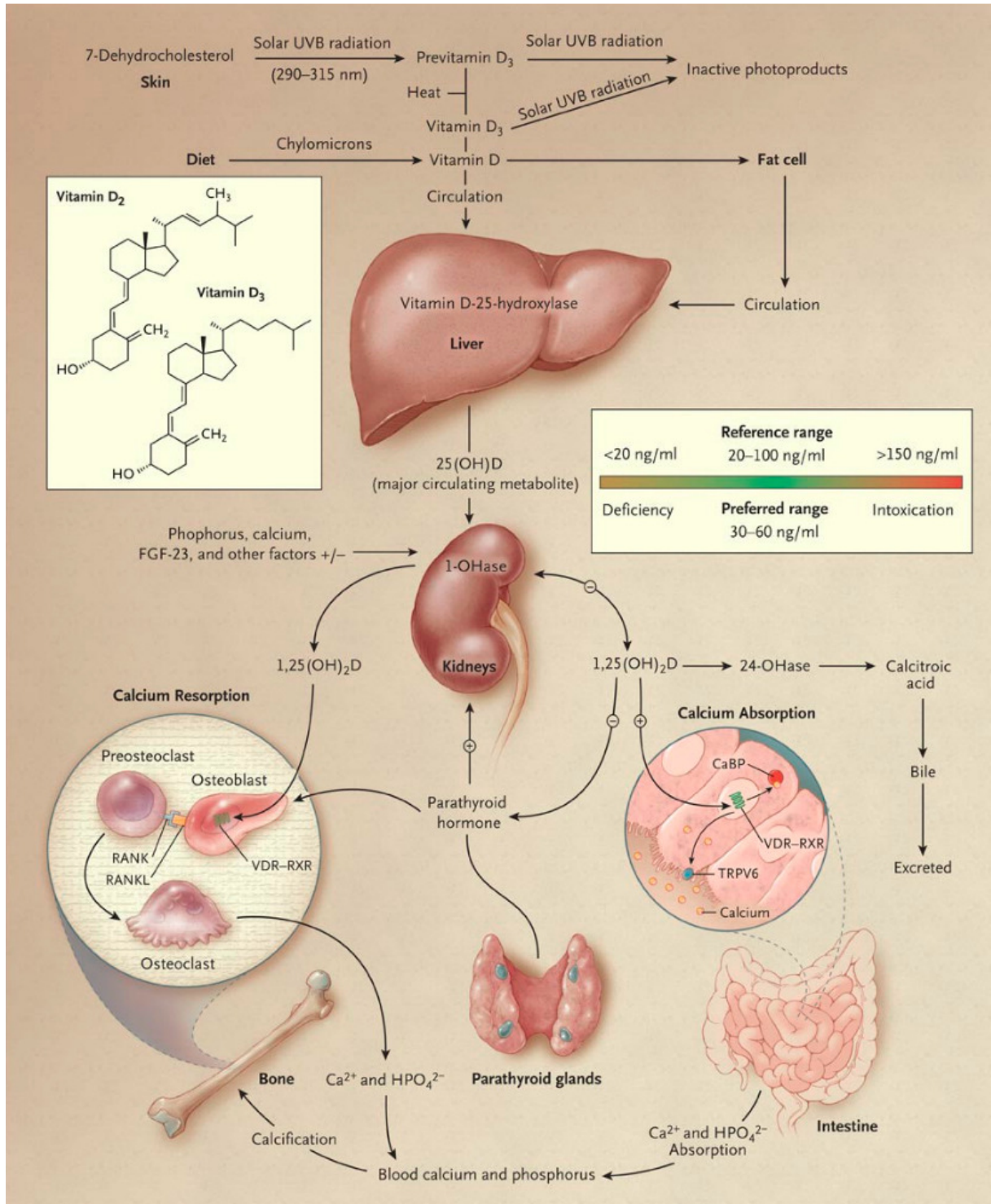


Figure 35 : Métabolisme de la vitamine D (Holick 2007).

### 3-3- La vitamine D

#### 3-3-1- **Disponibilité de la vitamine D**

On distingue différentes formes de la vitamine D, nutriment liposoluble : la vitamine D2 ou ergocalciférol et la vitamine D3 ou cholécalciférol. La source de la vitamine D2 est végétale : champignons, levures et céréales. La vitamine D3 est synthétisée au niveau cutané à partir de la pro-vitamine D3 (7-déhydrocholestérol) qui, sous l'influence du rayonnement aux ultraviolets B (UVB) (290 à 315 nm), se transforme en pré-vitamine D3 (Norman 2008). Elle est aussi obtenue par la consommation de poissons gras marins. De plus, l'enrichissement des denrées alimentaires en vitamine D a été autorisé par l'Europe et transcrit en droit français en 2010 (arrêté du 24 février 2010). La vitamine D peut aussi être reçue par voie médicamenteuse, ce qui est le cas en particulier des personnes à risque de carence comme les enfants jusqu'à 2 à 5 ans, les femmes enceintes et les personnes âgées (AFSSA 2009).

La quantité de vitamine D synthétisée dépend de nombreux facteurs dont l'ensoleillement (heure de la journée, saison, latitude), la surface de peau exposée, la pigmentation de la peau, l'âge du sujet et l'utilisation de crème solaire (Kimlin 2008). En effet, le temps d'exposition nécessaire augmente avec l'âge car la quantité de 7-déhydrocholestérol, précurseur cutané de la vitamine D3, ainsi que la capacité de la peau à former la pré-vitamine D3, diminuent au cours du vieillissement (MacLaughlin and Holick 1985). L'IMC est aussi un paramètre important. La vitamine D étant lipophile, elle est stockée dans le tissu adipeux, et n'est alors plus disponible ; les personnes souffrant d'obésité sont donc souvent déficientes en vitamine D (Candido and Bressan 2014).

Chez les personnes âgées, la diminution de la mobilité réduit l'accès à l'extérieur et donc à la vitamine D. De plus, l'American Academy of Dermatology ne recommande pas l'exposition au soleil à cause des risques de cancers et de vieillissement prématuré de la peau. L'alternative proposée est la consommation d'un régime équilibré incluant des aliments naturellement riches en vitamine D, des boissons et des aliments enrichis et/ou l'utilisation de suppléments en vitamine D.

#### 3-3-2- **Synthèse de la vitamine D**

La vitamine D endogène ainsi que les vitamines D2 et D3 alimentaires sont des composés inactifs qui subissent différentes transformations pour être activés (Figure 35) (Holick 2007). Après transfert au foie par les glycoprotéines plasmatiques vitamin D binding proteins (DBP), la vitamine D est métabolisée en 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D ou



calcidiol) par la 25-hydroxylase. La 25(OH)D est la molécule de référence pour la détermination du statut vitaminique d'un individu car cette étape d'hydroxylation est très peu régulée. C'est l'hydroxylation en 1,25(OH)<sub>2</sub>D (calcitriol) par l'enzyme rénale 1- $\alpha$ -hydroxylase, qui est régulée négativement par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D elle-même (Norman 2008). De plus, l'1- $\alpha$ -hydroxylase dépend du calcium sanguin puisque sa production est stimulée par la PTH et que son activité est réduite par la calcitonine (Fukumoto and Martin 2009; Holt and Wysolmerski 2011; Witteveen, van Lierop et al. 2012; Deluca 2014). A l'inverse, le FGF23 inhibe la sécrétion de la PTH et l'1- $\alpha$ -hydroxylation de la vitamine D (Fukumoto and Martin 2009; Witteveen, van Lierop et al. 2012).

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D est la forme active de la vitamine D. Après avoir été libérée par la DBP, elle interagit avec les récepteurs à la vitamine D (VDR) (Bikle 2014). Le VDR serait un récepteur situé sur la membrane nucléaire qui forme généralement un hétérodimère avec un des retinoid X receptors (RXR). Après son activation par l'1,25(OH)<sub>2</sub>D, le complexe VDR-RXR va se fixer sur des éléments de réponse à la vitamine D dans les promoteurs de certains gènes cibles initiant leur transcription (Yang, Ma et al. 2012). De nombreux tissus expriment le VDR (Norman 2008) et il régulerait plus de 1000 gènes (Bikle 2014).

La présence de l'1- $\alpha$ -hydroxylase au niveau d'autres tissus, comme la peau, les glandes parathyroïdiennes et le tissu mammaire permet une expression paracrine de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Adams and Hewison 2012).

### **3-3-3- Les rôles de la vitamine D**

L'historique de la découverte de la vitamine D a récemment fait l'objet d'une revue exhaustive (Deluca 2014). Entre 1922 et 1924, il a été mis en évidence que le rachitisme (maladie de la croissance et de l'ossification) pouvait être prévenue par la consommation d'huile de foie de morue (Mellanby 1921), par une nouvelle vitamine appelée vitamine D (McCollum, Simmonds et al. 1922) et par l'exposition de la peau aux UV (Goldblatt and Soames 1923). C'est en 1937 que le potentiel de la vitamine D<sub>3</sub> sur la stimulation de l'absorption intestinale du calcium a été mis en évidence (Nicolaysen 1937). En parallèle, elle permet d'augmenter la ré-absorption rénale ainsi que le remodelage osseux (Norman 2008). L'action combinée du calcium et de la vitamine D entraîne la promotion de la minéralisation osseuse.

La vitamine D a aussi d'autres actions sur certaines fonctions physiologiques comme par exemple la préservation de l'immunité, le maintien de la masse et des fonctions musculaires, la régulation de la pression artérielle et le développement foetal du cerveau

Définitions	ANZBMS, ESA, OA <sup>4</sup> (2005)	ENNS <sup>5</sup> (2006)	Conseil supérieur de la santé (Belgique) (2009)	IOF <sup>3</sup> (2010)	Canadian médical association Osteoporosis Canada (2010)	IOM <sup>1</sup> (2011)	GRIO <sup>2</sup> (2011)	US Endocrine society (2011)	Académie nationale de médecine (2012)
Carence	< 12,5 <sup>†</sup>	< 12,5 <sup>†</sup>	NR	NR	< 25	NR	< 25	< 50	< 30
Insuffisance	12,5 – 25 <sup>‡</sup>	12,5 - 25 <sup>‡</sup>	< 30	NR	25 - 75	NR	25 - 75	52,5-72.5	
	25 - 50 <sup>§</sup>	25 – 50 <sup>§</sup>		NR		NR			
Taux reco.	> 50	NR	> 50	> 75 <sup>#</sup>	> 75	> 50	75 -175	75 - 250	≈ 50** 75 - 80 <sup>††</sup>
Toxicité	NR	NR	NR	NR	> 250	125*	> 375	> 250	> 250

1 : Australian New Zealand bone and mineral society, Endocrine society of Australia ostéoporosis Australia ; 2 : Groupe de recherche et d'information sur les ostéoporoses; 3 :International osteoporosis foundation ; 4 : Institute of medicine ; 5 : Etude nationale nutrition santé

\* Suspicion d'effet indésirable ; <sup>†</sup>insuffisance sévère ; <sup>‡</sup> Insuffisance modérée ; <sup>§</sup> Insuffisance légère ; <sup>#</sup> Position non consensuelle au sein de l'IOF, deux experts recommandant un taux compris entre 50 et 75 nmol/L ; \*\* si apports calciques moyens de l'ordre de 1200 – 1500 mg/j ; <sup>††</sup> si apports calciques moyens de l'ordre de 700 – 1000 mg/j.

**Figure 36 : Valeurs de référence (nmol/L) définissant la carence, l'insuffisance, les taux recommandés et la toxicité de la vitamine D retrouvées dans la littérature.**

Tableau établi par la Haute Autorité de Santé dans le rapport de janvier 2013.

(Norman 2008; Bischoff-Ferrari 2010). De plus, la vitamine D permet de réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires, de certains cancers, comme le cancer colorectal. Une récente méta-analyse a mis en évidence une relation significative entre statut en vitamine D et mortalité (Grant 2011; Schottker, Jorde et al. 2014).

### **3-3-4- Statut en vitamine D**

#### *3-3-4-1- Les recommandations nutritionnelles*

Selon l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS 2006-2007), le statut vitaminique D des sujets adultes ne prenant pas de traitement médicamenteux à base de vitamine D est de 23 ng/mL (57,5 nmol/L) (Vernay, Sponga et al. 2012). Le statut des femmes est un peu plus faible (22,6 ng/mL soit 56,4 nmol/L) que celui des hommes (23,9 ng/mL soit 59,8 nmol/L) (Castetbon, Vernay et al. 2009).

En France, selon l'arrêté du 24 février 2010, les apports journaliers recommandés (AJR) sont de 5 µg/jour chez le sujet adulte, ce qui correspond à 200 UI. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) sont de 5 µg/jour chez les adultes et 10-15 µg/jour chez la personne âgée (ANSES 2013). L'étude INCA 2 a permis de mettre en évidence que la consommation quotidienne réelle chez les adultes de 18 à 79 ans était en moyenne de 2,56 µg/jour soit 2 fois moins que les AJR (Bénétiér, Bertin et al. 2009). Il est important de noter que la consommation moyenne par les femmes (2,4 µg par jour) était statistiquement inférieure à celle des hommes (2,7 µg par jour) ( $p < 0,05$ ).

Le paramètre d'évaluation du statut vitaminique D est le taux de 25(OH)D sanguin. Aucun consensus sur la concentration sanguine en 25(OH)D à atteindre n'a encore pu être obtenu par le manque d'essais randomisés en double aveugle disponibles. La Haute Autorité de Santé a répertorié les données de la littérature disponibles (Figure 36) (Allaire and David 2013). Deux groupes se distinguent, l'un fixant la concentration minimale de 25(OH)D à atteindre à 30 ng/mL (75 nmol/L) (Bischoff-Ferrari 2009; Cavalier, Delanaye et al. 2009; Souberbielle, Body et al. 2010; Holick, Binkley et al. 2011), alors que l'autre, principalement représenté par l'Institute of Medicine (IOM) (USA), considère qu'une concentration de 20 ng/mL (50 nmol/L) est suffisante (Ross, Manson et al. 2011; Ross, Taylor et al. 2011; Nowson, McGrath et al. 2012). Cependant, l'augmentation du taux sanguin de vitamine D de 54 à 110 nmol/L permettrait de réduire les taux de mortalité de 17,3% chez les femmes européennes (Grant 2011). En France, les recommandations suivies sont celles du Groupe de

	Taux de 25-(OH)-vitamine D	
	ng/mL	nmol/L
Carence vitaminique D	< 10	< 25
Insuffisance vitaminique D	10 à < 30	25 à < 75
Taux recommandés	30 à 70	75 à 175
Possible intoxication vitaminique D	> 150	> 375

Figure 37 : Valeurs de références pour le statut en vitamine D établies par le GRIO.

recherche et d'information sur les ostéoporoses (GRIO) avec un taux de 25(OH)D compris entre 30 et 70 ng/mL (75 et 175 nmol/L) (Figure 37) (Benhamou, Souberbielle et al. 2011).

Holick et coll. (Holick, Binkley et al. 2011) suggèrent un apport d'au moins 600 UI/jour pour les adultes de 19 à 70 ans et d'au moins 800 UI/jour au-delà de 70 ans (Holick, Binkley et al. 2011). Cependant, pour atteindre un taux sanguin de 30 ng/mL (75 nmol/L), la dose quotidienne de vitamine D pourrait être de 1500 à 2000 UI (Holick, Binkley et al. 2011).

Il est important de noter que l'efficacité de la vitamine D2 est trois fois inférieure à celle de la vitamine D3 pour augmenter le taux de 25(OH)D au cours du temps (Armas, Hollis et al. 2004). Cependant, leur efficacité pour maintenir le statut vitaminique est semblable (Holick, Biancuzzo et al. 2008). Cela a été mis en évidence dans une étude sur 68 volontaires sains de 18 à 84 ans soumis à 1000 UI de vitamine D quotidiennement pendant 11 semaines, sous forme de vitamine D2, de vitamine D3 ou un mélange des 2 (Holick, Biancuzzo et al. 2008).

#### *3-3-4-2- Toxicité*

La toxicité de la vitamine D se traduit par une hypercalcémie, une hypercalciurie, la calcification des tissus mous, et notamment vasculaires et/ou une néphrolithiase (Ross, Manson et al. 2011). De la même façon, il n'existe pas de consensus sur le seuil de toxicité de la vitamine D et les deux groupes d'opinions sur les recommandations nutritionnelles retrouvés ici. En effet, selon Holick et coll. (Holick, Binkley et al. 2011), la plupart des études suggère qu'un taux sanguin inférieur à 150 ng/mL (375 nmol/L) ne présente pas de risque, alors que Ross et coll. (Ross, Manson et al. 2011) rapportent que des concentrations sériques supérieures à 30 ng/mL (75 nmol/L) n'apporteraient pas de bénéfices supplémentaires, et que des risques ont été identifiés pour des concentrations sériques supérieures à 50 ng/mL (soit 125 nmol/L). Selon le GRIO, les valeurs retenues en France pour une intoxication potentielle à la vitamine D sont des taux circulants supérieurs à 150 ng/mL (375 nmol/L) (Figure 37).

La limite de sécurité pour la consommation de vitamine D recommandée par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) est de 50 µg quotidien (2000 UI) (AFSSA 2009). Dans son rapport du 30 novembre 2010, l'IOM a fixé la limite supérieure pour la prise quotidienne de vitamine D à 100 µg (4000 UI) (Ross, Taylor et al. 2011).





### 3-3-4-3- *La prévention des chutes et des fractures*

De nombreuses études mettent en évidence que des suppléments en vitamine D permettent de limiter le nombre de chutes et de fractures chez les personnes âgées. Ces deux effets de la vitamine D seront détaillés dans les paragraphes ci-dessous.

#### **La prévention des chutes**

Dans une première étude, deux groupes de volontaires institutionnalisés de 83 ans en moyenne ont été comparés (Flicker, MacInnis et al. 2005). Tous ont reçu une dose quotidienne de 600 mg de calcium et un des deux groupes a été supplémenté avec 10 000 UI de vitamine D par semaine puis de 1000 UI par jour pendant 2 ans. L'incidence des chutes était réduite de 27% dans le groupe ayant reçu de la vitamine D. Dans une autre étude, 1 g de calcium ou 1 g de calcium + 800 UI de vitamine D par jour pendant 12 mois ont été donnés à des individus de 77 ans en moyenne, qui ont été suivis tout au long de la supplémentation ainsi que pendant les 8 mois suivants (Pfeifer, Begerow et al. 2009). Le nombre de sujets ayant subi une première chute était diminué de 27% à 12 mois et de 39% 8 mois plus tard pour le groupe calcium et vitamine D comparé au groupe calcium seul. L'efficacité de la supplémentation en vitamine D sur la prévention des chutes a été évaluée par une méta-analyse publiée en 2004 qui concluait à une diminution du risque de chutes de plus de 20% chez les personnes âgées en ambulatoire ou institutionnalisés recevant de la vitamine D3 (400 ou 800 UI), de la 25(OH)D (1 µg) ou de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D (0,5 µg) (Bischoff-Ferrari, Dawson-Hughes et al. 2004). Dans une seconde méta-analyse, il a été démontré que l'efficacité de la vitamine D sur les chutes dépend de la dose (Bischoff-Ferrari, Dawson-Hughes et al. 2009), avec une absence d'effet bénéfique pour une supplémentation quotidienne inférieure à 700 UI, alors qu'une prise de 700 à 1000 UI par jour permettait de réduire les chutes de 19%.

#### **Eviter la conséquence des chutes : la fracture**

Une supplémentation quotidienne de 800 UI de vitamine D3 associée à 1,2 g de calcium pendant 18 mois réduisait de 43% les fractures de la hanche et de 32% les fractures non vertébrales chez des femmes âgées de 84 ans en moyenne (Chapuy, Arlot et al. 1992).

Même si l'efficacité de la supplémentation en vitamine D est consensuelle, la dose utilisée est essentielle dans la prévention des fractures. Ainsi, une méta-analyse a mis en évidence qu'une dose inférieure ou égale à 400 UI par jour ne réduisait pas le risque de fracture alors qu'une supplémentation comprise entre 482 et 770 UI par jour diminuait les fractures de la hanche de 18% et les fractures non vertébrales de 20% (Bischoff-Ferrari,



Willett et al. 2009). Dans une analyse combinée, les effets de l'apport réel de vitamine D (plutôt que de la dose à laquelle le participant a été assignée) ont été évalués (Bischoff-Ferrari, Willett et al. 2012). Une prise quotidienne de 792 à 2000 UI de vitamine D réduisait de 30% le risque de fracture de la hanche et de 14% celui de fracture vertébrale.

Une étude uni-centrique avec des volontaires australiennes de 70 ans ou plus a remis en question les bienfaits de la vitamine D. En effet, après une supplémentation annuelle de 500 000 UI de cholécalciférol pendant 3 à 5 ans, un plus grand nombre de chutes (15%) et de fractures (26%) a été observé dans le groupe supplémenté par rapport au groupe contrôle (Sanders, Stuart et al. 2010). Ces résultats ont été discutés par un autre groupe (Annweiler and Beauchet 2010)). Selon eux, une forte dose de vitamine D, qui est un stéroïde, aurait eu un effet dopant sur les muscles, conférant aux volontaires une forte capacité musculaire avec une incapacité à contrôler le gain de mobilité, engendrant des chutes et des fractures.

### **3-3-5- Mécanismes d'action de la vitamine D sur l'os**

En plus de la promotion de la minéralisation osseuse par un meilleur statut calcique, la vitamine D a des effets directs sur les cellules osseuses, qui expriment le VDR (Morris 2014). L'impact de la vitamine D sur les ostéoblastes a fait l'objet d'une revue (van de Peppel and van Leeuwen 2014). Chez l'Homme, la vitamine D stimule la minéralisation en activant la transcription des gènes ALP, OCN et OPN. De plus, l'augmentation de l'expression de Runx2 permettrait une différenciation des ostéoblastes plus importante.

Les données de la littérature sont contradictoires sur l'effet de la vitamine D sur les ostéoclastes *in vitro* et *in vivo* (Suda, Takahashi et al. 2012). Cela peut être expliqué par la différence des concentrations en vitamine D utilisées dans les expérimentations. Cependant, *in vivo*, la vitamine D diminuait le nombre de précurseurs ostéoclastiques (Shibata, Shira-Ishi et al. 2002), ainsi que l'expression de RANKL et la resorption osseuse associée (Takahashi, Udagawa et al. 2014).

Globalement, les effets mis en évidence sur les ostéoblastes et les ostéoclastes tendent à augmenter la BMD. Cependant, l'importance du couple vitamine D et calcium est à souligner. En effet, dans une récente méta-analyse, l'impact de la vitamine D seule sur la BMD a été évaluée et seul un effet bénéfique sur la BMD du col du fémur était identifié (Reid, Bolland et al. 2014).



### **3-3-6- La vitamine D et le muscle**

Une des caractéristiques de la déficience en vitamine D est la faiblesse musculaire (Bischoff-Ferrari 2012). Des concentrations en 25(OH)D inférieures à 20 ng/mL étaient associées aux plus faibles performances physiques et au plus fort affaiblissement de la performance physique au cours des 3 années d'une étude clinique menée chez la personne âgée (Wicherts, van Schoor et al. 2007). De plus, le statut vitaminique D et la force ou la fonction musculaire semblent être associés positivement (Bischoff-Ferrari, Dietrich et al. 2004). Enfin, sous supplémentation en vitamine D, la force musculaire est augmentée. En effet, la prise de vitamine D augmentait la force des quadriceps de 8% chez des personnes âgées (Pfeifer, Begerow et al. 2009). Dans une étude réalisée sur 96 femmes hémiplegiques suite à un accident vasculaire cérébral, 48 ont reçu quotidiennement 1000 UI de vitamine D2 et 48 ont reçu un placebo, pendant 2 ans. Une augmentation du nombre et de la taille des fibres de type II, ainsi que de la force musculaire dans le groupe vitamine D ont été mis en évidence (Sato, Iwamoto et al. 2005).

En termes de mécanisme, les cellules musculaires expriment le VDR et cette expression est diminuée avec l'âge (Bischoff-Ferrari, Borchers et al. 2004). L'activation du VDR semble promouvoir la synthèse protéique (Bischoff-Ferrari 2012; Salles, Chanet et al. 2013).

### **3-3-7- Vitamine D et inflammation**

En plus des effets directs sur les tissus osseux et musculaires, la vitamine D pourrait aussi réduire l'inflammation de bas grade impliquée dans l'ostéoporose et la sarcopénie.

Une étude chez le sujet âgé suggère que l'apport alimentaire de vitamine D influence négativement l'activité de l'IL-2 (Payette, Rola-Pleszczynski et al. 1990). Chez la femme post-ménopausée, une supplémentation quotidienne de 800 UI de vitamine D3 pendant 4 mois, diminuait les concentrations plasmatiques de marqueurs de l'inflammation dont l'IL-8 et l'IL-12 (Bischoff-Ferrari, Dawson-Hughes et al. 2012). Chez des patientes post-ménopausées ostéoporotiques, une prise quotidienne de 0,5 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D et de 1 g de calcium pendant 6 mois permettait de diminuer les concentrations sériques d'IL-1 et de TNF-α tout en augmentant la BMD au niveau du trochanter et des vertèbres L1-L4 par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu que du calcium (Inanir, Ozoran et al. 2004). Ainsi, les effets bénéfiques de la vitamine D sur le risque de fracture pourrait être dus, au moins en partie, à l'impact de la vitamine D sur les concentrations en cytokines (Laird, Ward et al. 2010).



De façon intéressante, des résultats similaires ont été obtenus chez le sujet adulte jeune. En effet, le faible statut en vitamine D (concentration sérique en 25(OH)D inférieure ou égales à 32 ng/mL) était associé à de plus fortes concentrations en cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) par rapport à des sujets ayant des concentrations sériques en 25(OH)D supérieures à 32 ng/mL (Barker, Martins et al. 2013).

Il est important de noter que dans une étude portant sur deux groupes de personnes âgées recevant 700 UI de vitamine D et 500 mg de calcium ou des placebos, les concentrations plasmatiques en hs-CRP et IL-6 étaient équivalentes entre les groupes (Pittas, Harris et al. 2007).

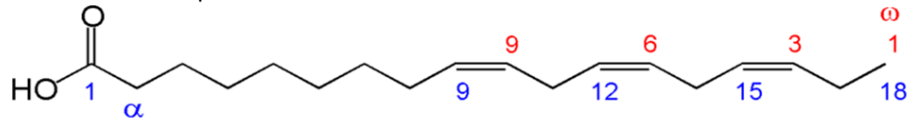
### **3-3-8- Conclusion**

Un apport suffisant en vitamine D est associé à une diminution du nombre de chutes et de fractures chez la personne âgée, avec des effets directs sur les tissus osseux et musculaires ainsi que des effets indirects via la diminution des taux sanguins des marqueurs de l'inflammation de bas grade.

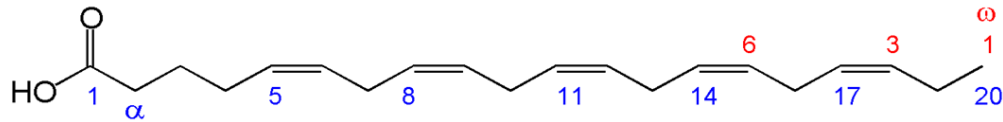
En France, les ANC de la vitamine D sont de 10 à 15  $\mu$ g par jour pour les personnes âgées avec une concentration sanguine cible de 30 à 70 ng/mL. Cependant, pour atteindre un tel taux circulant, les apports journaliers de vitamine D devraient être augmentés, et ce en particulier pour les personnes âgées. De plus, il est important de souligner que les apports réels sont inférieurs aux ANC. Une supplémentation ou un enrichissement des aliments font partie des stratégies envisagées pour compléter les apports alimentaires. La supplémentation d'une huile d'olive vierge en vitamine D pourrait donc tout à fait contribuer à l'augmentation des apports quotidiens en vitamine D et participer à la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie chez les personnes âgées.



Acide  $\alpha$ -linoléique



Acide docosahéxaénoïque



Acide eicosapentaénoïque

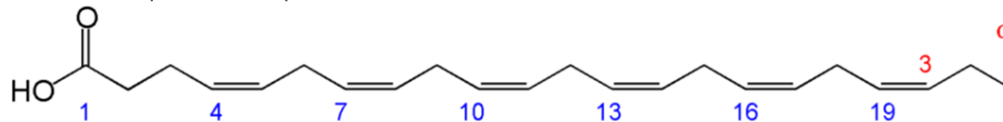


Figure 38 : Nomenclature des acides gras polyinsaturés oméga 3.

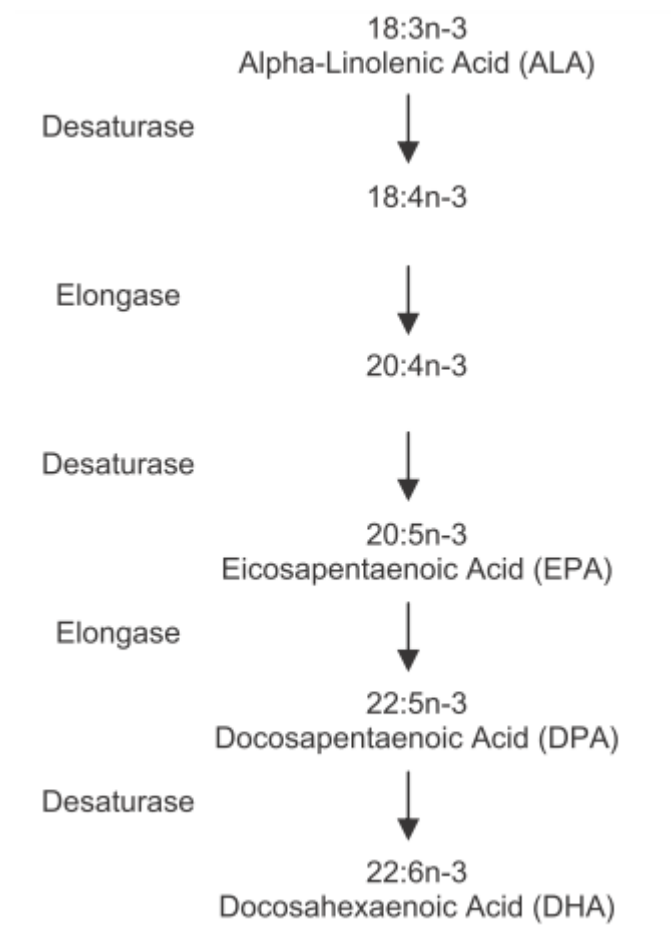


Figure 39 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés oméga 3.

L'acide alpha-linoléique (ALA) est progressivement désaturé et élongé en acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahéxaénoïque (DHA) (Kruger, Coetzee et al. 2010).

### 3-4- L'acide docosahéaénoïque

Le DHA fait partie de la famille des AGPI  $\omega$ 3 tout comme l'acide  $\alpha$ -linoléinique (ALA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Les acides gras peuvent être désignés par une nomenclature indiquant le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle (Figure 38). Ainsi, pour les AGPI  $\omega$ 3, la première double liaison est située au niveau du troisième carbone à partir de l'extrémité méthyle terminale. L'ALA est un AGPI  $\omega$ 3 à longue chaîne (18:3(n-3)); l'EPA et le DHA ont quant à eux de très longues chaînes (20:5(n-3) et 22:6(n-3) respectivement).

#### 3-4-1- Sources et apports

L'ALA est retrouvé dans certains végétaux comme le lin, le colza, le pourpier et la mâche. Bien que l'Homme ne puisse pas synthétiser l'ALA, il est capable de le métaboliser par des étapes successives de désaturation et d'élongation pour obtenir de l'EPA et du DHA (Figure 39) (Kruger, Coetzee et al. 2010; Calder 2013). Il est important de noter que cette conversion est faible, rendant l'apport alimentaire d'EPA et de DHA nécessaire (Brenna 2002; Plourde and Cunnane 2007). Le DHA ainsi que l'EPA sont retrouvés dans les poissons comme le saumon, la sardine, le hareng et le thon (Pinel, Morio-Liondore et al. 2014).

Selon le rapport d'expertise de l'ANSES (ANSES, 2011), le besoin physiologique minimal ainsi que l'ANC pour le DHA est de 250 mg/j, ce qui correspond à un apport énergétique de 0,1% (Astorg, Bougnoux et al. 2011). L'enjeu nutritionnel est un apport suffisant d'AGPI  $\omega$ 3 pour maintenir le rapport AGPI  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 inférieur à 5. En effet, un fort rapport est associé à une inflammation de bas grade (Kelly, Gilman et al. 2013). De plus, le faible apport d'AGPI  $\omega$ 3, caractéristique du régime alimentaire occidental, contribue à l'ostéoporose et à l'obésité (Kelly, Gilman et al. 2013).

Pour comparaison, l'apport moyen de DHA est de  $273 \pm 191$  mg/j chez l'homme et de  $226 \pm 171$  mg/j chez les femmes, selon les données de l'étude SUVIMAX (Astorg, Arnault et al. 2004). Il faut noter l'importance de la variabilité interindividuelle, les valeurs allant de 6,5 à 1770 mg/jour avec des médianes à 221 pour les hommes et 177 pour les femmes.

#### 3-4-2- L'acide docosahéaénoïque et l'os

Un certain nombre d'études, qu'elles soient *in vitro*, pré-cliniques et cliniques suggère un effet ostéoprotecteur du DHA, cependant aucune n'a permis à l'heure actuelle de démontrer un effet direct des AGPI  $\omega$ 3 sur l'ostéoporose ni sur la réduction du risque



fracturaire (Orchard, Pan et al. 2012; Kajarabille, Diaz-Castro et al. 2013; Mangano, Sahni et al. 2013).

Des données épidémiologiques suggèrent un effet bénéfique de ces acides gras sur le métabolisme osseux. En effet, une étude transversale incluant 1532 volontaires de 45 à 90 ans a mis en évidence une relation inverse entre le rapport d'AGPI  $\omega 6/\omega 3$  et la BMD du col du fémur chez les toutes femmes de l'étude et aussi au niveau vertébral chez les femmes sans THS (Weiss, Barrett-Connor et al. 2005). Dans une autre étude chez le volontaire âgé de plus de 60 ans, la consommation d'AGPI  $\omega 3$  était associée positivement à la BMD (Rousseau, Kleppinger et al. 2009). D'une façon ciblée sur le DHA, une étude de cohorte menée chez des jeunes hommes sains (moyenne d'âge en début d'étude : 16,7 ans) a mis en évidence une corrélation positive entre les taux plasmatiques de DHA et les BMD totale et vertébrale, ainsi que sur l'évolution de la BMD vertébrale entre les âges de 16 et 22 ans (Hogstrom, Nordstrom et al. 2007).

Chez des souris Balb/c de 8 semaines, l'augmentation plasmatique de DHA due à une consommation d'un régime enrichi en huile de poisson, limitait la perte osseuse induite par l'ovariectomie (Sun, Krishnan et al. 2003). La perte de BMC induite par l'ovariectomie était atténuée par la consommation de DHA chez la rate (Watkins, Li et al. 2006; Poulsen RC 2007; Matsushita, Barrios et al. 2008), phénomène associé à une plus forte quantité d'os formé par rapport au lot contrôle consommant de l'huile de soja (Matsushita, Barrios et al. 2008). De plus, chez des souris non ovariectomisées, la consommation de DHA pendant 6 mois préservait la BMD fémorale et tibiale par rapport aux souris témoins ayant consommé de l'huile de maïs (Bhattacharya, Rahman et al. 2007). Un régime enrichi en DHA donné tout au long de la vie adulte des souris (de 3 à 17 mois) améliorait le volume osseux trabéculaire de la vertèbre caudale de 17,2% à 8 mois, alors qu'il n'était augmenté que de 3,8% dans le lot contrôle (Bonnet and Ferrari 2011). En ce qui concerne la teneur minérale osseuse (bone mineral content, BMC) fémorale, une corrélation positive a été mise en évidence avec la consommation de DHA chez le rat mâle (Li, Seifert et al. 2010).

*In vitro*, le DHA inhibait l'ostéoclastogénèse (Sun, Krishnan et al. 2003; Bhattacharya, Rahman et al. 2007; Akiyama, Nakahama et al. 2013) et ce, de façon plus importante que l'EPA (Rahman, Bhattacharya et al. 2008). Ceci est à mettre en relation avec une autre expérimentation dans laquelle le DHA diminuait l'expression de RANKL induite par la PGE2 dans des cellules de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 (Poulsen, Wolber et al. 2008). Dans cette même lignée, le DHA ne modifiait pas la sécrétion basale de RANKL contrairement à l'acide arachidonique (AGPI  $\omega 6$ ) qui l'augmentait (Coetzee, Haag et al. 2007). Le DHA



stimulait aussi la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines en ostéoblastes et l'expression des marqueurs de la minéralisation (Casado-Diaz, Santiago-Mora et al. 2013).

Un autre effet intéressant du DHA sur la santé osseuse est l'augmentation de l'absorption calcique. Celle-ci a été mise en évidence chez de jeunes rats ayant consommé de l'huile de thon pendant 8 semaines, en association avec une augmentation de la BMD tibiale (Lukas, Gigliotti et al. 2011). De plus, des entérocytes ont été isolés de l'intestin grêle de rat et mis en contact avec de l'EPA, de l'acide arachidonique ou du DHA et seul le DHA permettait d'accroître l'absorption calcique en intensifiant l'activité des Ca-ATPases, protéines qui transfèrent le calcium hors de la cellule (Haag, Magada et al. 2003).

De façon intéressante, l'effet du DHA pourrait être potentialisé par d'autres nutriments comme le calcium, certaines vitamines ou d'autres acides gras comme l'acide oléique (Martin-Bautista, Munoz-Torres et al. 2010; Genuis and Bouchard 2012; Orchard, Pan et al. 2012). Il existe aussi un effet synergique entre la consommation d'AGPI  $\omega$ 3 et l'exercice physique pour améliorer la BMD chez des femmes post-ménopausées (Tartibian, Hajizadeh Maleki et al. 2011).

Outre le remodelage osseux et de la balance calcique, les AGPI  $\omega$ 3 modulent aussi l'inflammation (Maggio, Artoni et al. 2009), qui sera décrite dans le paragraphe 3-4-4, commun avec le muscle.

### **3-4-3- L'acide docosahexaénoïque et le muscle**

L'effet des AGPI  $\omega$ 3 sur la sarcopénie a récemment fait l'objet d'une revue qui conclut sur le potentiel de la supplémentation en AGPI  $\omega$ 3 en association avec un stimulus anabolique (acides aminés/protéines, insuline, activité physique...) pour contrecarrer les mécanismes de la sarcopénie (Di Girolamo, Situlin et al. 2014).

Au niveau fonctionnel, il a été montré récemment chez le rat qu'un régime riche en DHA permettait de maintenir la performance contractile des muscles *gastrocnemius-plantaris-soleus*, situé dans les membres postérieurs (Peoples and McLennan 2014).

Chez l'Homme, les études cliniques n'ont pas été conduites uniquement sur le DHA, mais des données intéressantes ont été obtenues sur la prise alimentaire d'EPA et DHA ou d'huile de poisson. Ainsi, contrairement à l'huile de maïs, un mélange d'EPA et de DHA consommé pendant 8 semaines par des hommes âgés, augmentait la synthèse protéique au



sein du muscle, mais uniquement en présence d'un stimulus anabolique (Smith, Atherton et al. 2011). De plus, une étude chez la femme âgée de 64 ans en moyenne a mis en évidence que la prise quotidienne de 2 g d'huile de poisson pendant 90 jours permettait de renforcer les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la force et la capacité musculaire (Rodacki, Rodacki et al. 2012). Ces résultats ont été renforcés par une seconde étude clinique dans laquelle les femmes post-ménopausées qui ont reçu 1 g d'huile de poisson par jour pendant 6 mois avaient une meilleure amélioration de la performance physique (vitesse de marche) par rapport au groupe contrôle ayant consommé de l'huile d'olive (Hutchins-Wiese, Kleppinger et al. 2013).

En ce qui concerne les mécanismes, Smith et coll. (Smith, Atherton et al. 2011) ont montré que l'amélioration de la réponse musculaire à des stimuli anaboliques était associée à une augmentation de la phosphorylation des acteurs de la voie mTOR. De plus, la supplémentation en huile de poisson chez des femmes âgées de 64 ans en moyenne permettait d'accroître la concentration plasmatique en DHA (Rodacki, Rodacki et al. 2012). Ce phénomène pourrait être à l'origine de l'augmentation de la teneur en DHA des membranes plasmiques et mitochondriales, observée après consommation (Haugaard, Vaag et al. 2009; Herbst, Paglialunga et al. 2014). Cette augmentation de l'insaturation membranaire est très susceptible d'induire un accroissement de la fluidité des membranes plasmiques et pourrait ainsi accélérer la transmission du signal à l'origine de la contraction musculaire (Rodacki, Rodacki et al. 2012).

Au niveau métabolique, le muscle utilise une grande partie du glucose de l'organisme. Or, de nombreuses études ont mis en évidence une réduction de la résistance à l'insuline grâce à une consommation de DHA, sujet qui a fait récemment l'objet d'une revue (Lorente-Cebrian, Costa et al. 2013). La prise alimentaire de DHA diminuait l'insulinémie et l'indice de la résistance à l'insuline « homeostasis model assessment of insulin resistance » (HOMA)<sup>2</sup> chez le rongeur nourri à l'aide d'un régime gras (Kus, Flachs et al. 2011). Cet acide gras permettait également d'augmenter la sensibilité à l'insuline altérée par un régime riche en graisse chez la souris (Kuda, Jelenik et al. 2009; Kus, Flachs et al. 2011). Dans des conditions similaires, la tolérance au glucose était améliorée par la consommation d'huile de poisson

---

<sup>2</sup> L'indice HOMA est calculé selon la formule suivante : insuline plasmatique a jeun (mU/L) x glucose plasmatique a jeun (mmol/L) / 22,5.





(Lanza, Blachnio-Zabielska et al. 2013). Chez le volontaire âgé sain, un régime riche en AGPI  $\omega 3$  pendant 8 semaines améliorerait la sensibilité à l'insuline (Tsitouras, Gucciardo et al. 2008). De plus, de façon similaire à l'huile d'olive, le DHA augmentait l'expression génique d'UCP3 (permet d'accroître la thermogénèse) chez la souris, qui permet de dissiper une partie de l'énergie excédentaire (Cha, Fukushima et al. 2001).

Les études menées sur l'huile de poisson et en particulier sur le DHA ont mis en évidence que leur consommation induit un renforcement des stimuli anaboliques pour améliorer la synthèse protéique musculaire ainsi qu'une amélioration de la performance musculaire, ce qui fait du DHA un candidat pour la prévention de la sarcopénie. De plus, le DHA limite la résistance à l'insuline, connue pour exacerber cette pathologie.

#### **3-4-4- L'acide docosahexaénoïque, inflammation et stress oxydant**

Les propriétés anti-inflammatoires des AGPI  $\omega 3$  et en particulier du DHA, ont été largement étudiées, notamment dans le cadre des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique (Chapkin, Kim et al. 2009; Mozaffarian and Wu 2011; Calder 2013; Kajarabille, Diaz-Castro et al. 2013). Le DHA, qui a un potentiel anti-inflammatoire plus important que l'EPA (Rahman, Bhattacharya et al. 2008), est un précurseur de métabolites ayant des propriétés anti-inflammatoires dont font partie les résolvines et les protectines (Kelly, Gilman et al. 2013).

L'huile de poisson (Sun, Krishnan et al. 2003) et plus particulièrement le DHA (Bhattacharya, Rahman et al. 2007) diminuaient les concentrations des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le développement de l'ostéoporose et de la sarcopénie, i.e. TNF- $\alpha$  et IL-6 dans des splénocytes activés. De plus, dans une autre étude menée sur des volontaires sains, une supplémentation quotidienne de 9 grammes d'AGPI  $\omega 3$  pendant 4 semaines était associée à une inhibition de la production de TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  par des cellules sanguines mononuclées activées au LPS (Caughey, Mantzioris et al. 1996). Chez le volontaire âgé sain, la consommation du régime riche en AGPI  $\omega 3$  pendant 8 semaines diminuait les concentrations sanguines de l'IL-6 et de la CRP (Tsitouras, Gucciardo et al. 2008). Cependant, les résultats concernant la CRP restent conflictuels (Kajarabille, Diaz-Castro et al. 2013).

Les marqueurs des dommages oxydatifs, semblent peu affectés par les AGPI  $\omega 3$  chez l'Homme (Poudyal, Panchal et al. 2011). En effet, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'était pas modifiée



par la prise alimentaire d'huile de poisson chez le rat (Lanza, Blachnio-Zabielska et al. 2013) et était même augmentée chez l'Homme (Herbst, Paglialunga et al. 2014). Cependant, la consommation d'AGPI  $\omega 3$  résultait en une atténuation de la peroxydation lipidique chez le rat (Lukas, Gigliotti et al. 2011), chez des individus sains (Nalsen, Vessby et al. 2006), chez des individus diabétiques de type II et chez des hommes dyslipidémiques (Mas, Woodman et al. 2010). A noter que dans l'expérimentation animale rapportée par Lukas et coll. (Lukas, Gigliotti et al. 2011), une corrélation entre la réduction de la peroxydation lipidique et l'augmentation de la BMD du tibia a été mise en évidence (Lukas, Gigliotti et al. 2011).

En conclusion, le DHA permet de diminuer la concentration des cytokines pro-inflammatoires ainsi que la peroxydation lipidique. Ces mécanismes pourraient être à l'origine, au moins partiellement, des effets protecteurs du DHA sur les tissus osseux et musculaires.

### **3-4-5- Conclusion**

Le DHA est un nutriment à fort potentiel pour la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie. En effet, il module positivement le renouvellement osseux et renforce la réponse musculaire à des stimuli anaboliques. Ces effets pourraient être dus, tout du moins en partie, à ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes.

### **3-5- Conclusion**

L'ensemble de ces données supporte l'idée que le régime méditerranéen présente un effet santé important. Les approches cibles sur ces composants majeurs : huile olive et ses polyphénols, la vitamine D et le DHA mettent en évidence des effets anti-inflammatoires et antioxydants bénéfiques pour l'appareil locomoteur dans un contexte de vieillissement. De plus, des effets directs ont été corrélés à leur consommation ou leur administration. Ces nutriments constituent potentiellement une stratégie nutritionnelle pour contrecarrer les effets du vieillissement sur les tissus osseux et musculaires. Or, l'impact de la consommation d'huile d'olive vierge ainsi que d'éventuelles synergies avec la vitamine D et/ou le DHA pour la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie n'a jamais été évalué.

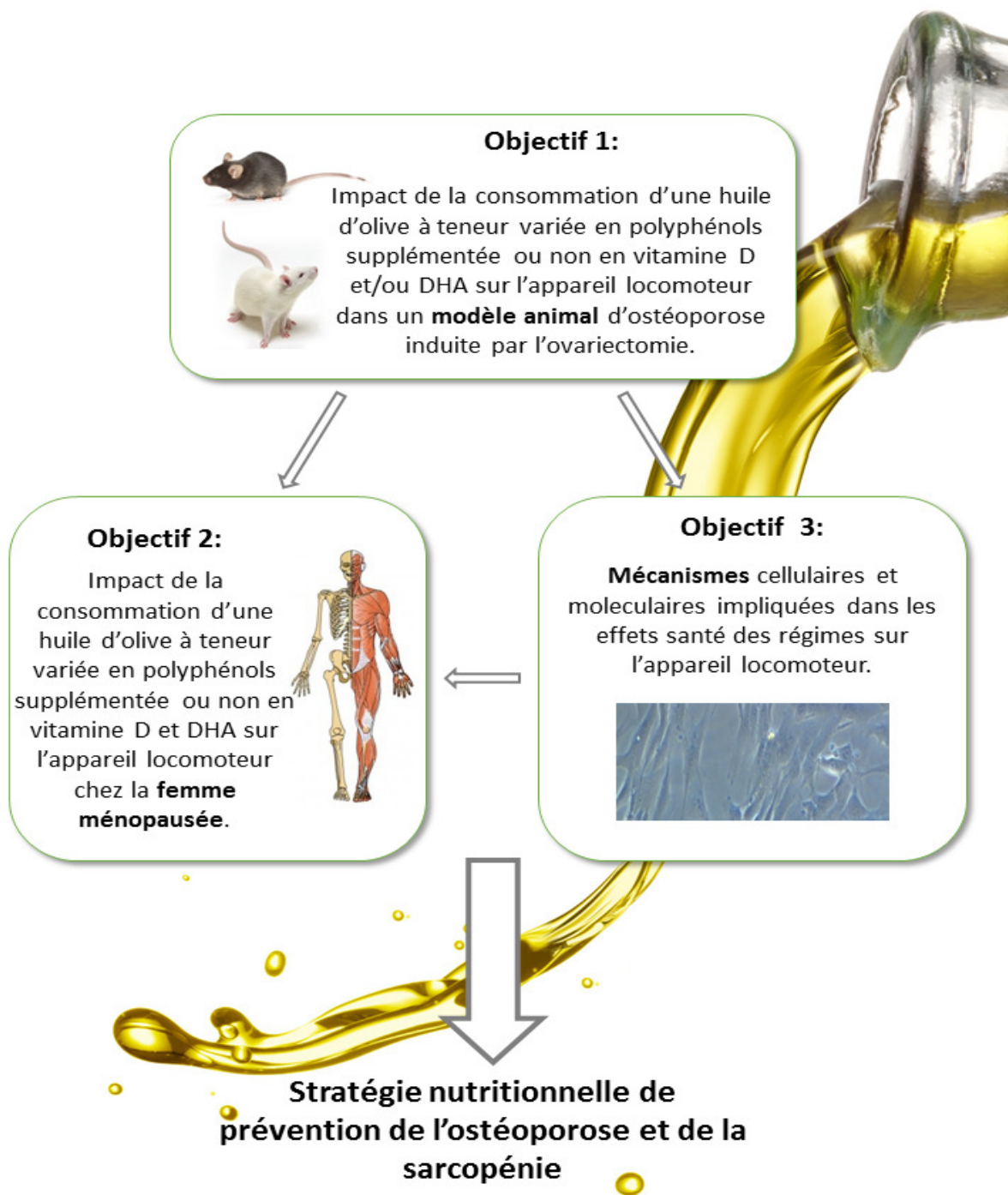


Figure 40 : Objectifs de la thèse.

# Objectifs de la thèse

L'analyse de la littérature nous a conduits à construire des stratégies nutritionnelles en se basant sur certains composés du régime méditerranéen. En effet, l'huile d'olive, la vitamine D et le DHA ont un fort potentiel en termes de santé osseuse et musculaire. Par conséquent, mon travail de thèse portait sur l'évaluation du potentiel de l'huile d'olive et plus particulièrement des polyphénols la caractérisant en synergie avec la vitamine D et/ou le DHA sur la prévention nutritionnelle de l'ostéoporose et de la sarcopénie.

Les objectifs de mon projet de thèse, qui s'inscrit dans le projet ANR PolivD3 étaient (Figure 40):

**1- d'étudier les effets biologiques de différentes huiles (en fonction de leur teneur en polyphénols) et les éventuelles synergies avec la vitamine D3 et/ou le DHA sur les tissus osseux et musculaires.**

Afin de répondre à cet objectif, une première investigation animale sur le modèle de la rate ovariectomisée a été mise en place pour étudier la consommation de deux huiles d'olive riches en polyphénols et d'une huile d'olive raffinée enrichie ou non en vitamine D et/ou DHA. Même si le plan d'expérience ne permettait pas de discriminer une huile d'olive ou une supplémentation présentant un intérêt particulier, des résultats intéressants sur l'impact de l'ovariectomie sur le tissu musculaire ont été obtenus. Ces résultats ont fait l'objet de la première publication présentée dans ce manuscrit.

Une seconde expérimentation pré-clinique a alors été mise en place sur le modèle de la souris ovariectomisée. Les résultats très encourageants obtenus ont fait l'objet de la seconde publication exposée dans ce document.

**2- d'étudier les effets biologiques de l'huile d'olive sélectionnée et son éventuelle synergie avec la vitamine D3 et/ou le DHA sur les tissus osseux et musculaires chez l'Homme.**

L'objectif principal de cette étude clinique en double aveugle était de tester le potentiel de l'huile d'olive et plus particulièrement de ses polyphénols et leur éventuelle synergie avec la vitamine D et le DHA sur l'évolution de la BMD de la femme post-



ménopausée. Trois groupes de 50 femmes ont été formés dans deux centres d'investigation clinique à Clermont-Ferrand et à Marseille, soit un recrutement de 150 volontaires au total. Le premier groupe a reçu de l'huile d'olive raffinée donc déplétée en polyphénols. Le second groupe a reçu de l'huile d'olive vierge riche en polyphénols et le dernier groupe a reçu la même huile d'olive vierge enrichie en vitamine D et en DHA. De façon quotidienne pendant 9 mois, les volontaires ont consommé 20 mL d'une des trois huiles.

L'étude étant toujours en cours, aucun résultat ne sera présenté dans ce manuscrit. Le protocole ainsi que l'avancement des recrutements seront exposés.

### **3- d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'action de ces molécules au niveau osseux par une approche *ex vivo* sur ostéoblastes.**

Est exposée ici la mise au point de la culture de la lignée ostéoblastique humaine hFOB1.19 en présence de plasma humain (culture *ex vivo*).





# Publication n°1

Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats

## 1- Présentation de la publication

### 1-1- Objectif de l'étude

La ménopause est associée à des déficiences musculo-squelettiques, qui peuvent être déclenchées par au moins deux phénomènes : l'augmentation de la masse grasse et de l'accumulation lipidique au sein des tissus et/ou la déplétion en estrogènes. L'objectif de cette étude était d'évaluer et de comparer les effets de la prise de masse grasse induite par l'ovariectomie ou par la consommation d'un régime riche en graisses sur le système musculo-squelettique.

### 1-2- Matériel et méthodes

Des rates adultes ont été ovariectomisées puis ont reçu un régime alimentaire contrôle pendant 19 semaines. Deux groupes supplémentaires d'animaux ont été pseudo-opérés<sup>3</sup> puis soumis à un régime contrôle ou à un régime riche en graisse. La BMD et les paramètres microarchitecturaux du fémur distal ont été mesurés. Les concentrations sériques en OCN et en CTX1 ont été dosées. Le métabolisme protéique, les marqueurs mitochondriaux et le contenu en triglycérides ont été déterminés dans le muscle *tibialis anterior*. De plus, le contenu en triglycérides du foie ainsi que les marqueurs inflammatoires et métaboliques sanguins ont été déterminés.

---

<sup>3</sup> Les animaux sont soumis à toutes les conditions opératoires (anesthésie, incision de la peau et du muscle, antibiotique, suture), sans ablation des ovaires.



### 1-3- Résultats

La consommation d'un régime riche en graisses et l'ovariectomie induisaient une prise similaire de masse grasse mais provoquaient des conséquences métaboliques différentes sur les tissus osseux et musculaires. La consommation d'un régime riche en graisses conduisait à une diminution de la formation osseuse (-38,4%;  $p < 0,05$ ), et, au niveau musculaire, à une altération du métabolisme mitochondrial, à une accumulation lipidique (lipotoxicité) et à une augmentation du taux de synthèse protéique. L'ovariectomie était associée à une intensification du renouvellement osseux (accroissement de la formation osseuse de +72,7% ( $p < 0,05$ ) et de la résorption osseuse de +76,4% ( $p < 0,05$ )), conduisant à une perte osseuse, à une diminution de 17,9% du taux de synthèse protéique et à une infiltration lipotoxique au niveau hépatique.

### 1-4- Conclusion

Chez la rate, un régime riche en graisse ou l'ovariectomie entraînaient des gains similaires de masse grasse avec des impacts différents sur les métabolismes osseux et musculaire. Ainsi, l'altération du système musculo-squelettique par l'ovariectomie était principalement causée par la déplétion en estrogènes, qui surpassait les effets de l'adiposité.



# Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats

Camille Tagliaferri · Jérôme Salles · Jean-François Landrier · Christophe Giraudet · Véronique Patrac · Patrice Lebecque · Marie-Jeanne Davicco · Audrey Chanet · Corinne Pouyet · Amélie Dhaussy · Alain Huertas · Yves Boirie · Yohann Wittrant · Véronique Coxam · Stéphane Walrand

Received: 1 September 2014 / Accepted: 22 October 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

## Abstract

**Purpose** The aim of this study was to evaluate and compare the musculoskeletal effects induced by ovariectomy-related fat mass deposition against the musculoskeletal effects caused by a high-fat diet.

**Methods** A group of adult female rats was ovariectomized and fed a control diet. Two additional groups were sham-operated and fed a control or a high-fat diet for 19 weeks. Distal femur and serum bone parameters were measured to assess bone metabolism. Muscle protein metabolism, mitochondrial markers and triglyceride content were evaluated in *tibialis anterior*. Triglyceride content was evaluated in liver. Circulating inflammatory and metabolic markers were determined.

**Results** The high-fat diet and ovariectomy led to similar increases in fat mass (+36.6–56.7 %;  $p < 0.05$ ) but had

different impacts on bone and muscle tissues and inflammatory markers. Consumption of the high-fat diet led to decreased bone formation (−38.4 %;  $p < 0.05$ ), impaired muscle mitochondrial metabolism, muscle lipotoxicity and a 20.9 % increase in *tibialis anterior* protein synthesis rate ( $p < 0.05$ ). Ovariectomy was associated with higher bone turnover as bone formation increased +72.7 % ( $p < 0.05$ ) and bone resorption increased +76.4 % ( $p < 0.05$ ), leading to bone loss, a 17.9 % decrease in muscle protein synthesis rate ( $p < 0.05$ ) and liver lipotoxicity.

**Conclusions** In female rats, high-fat diet and ovariectomy triggered similar gains in fat mass but had different impacts on bone and muscle metabolism. The ovariectomy-induced mechanisms affecting the musculoskeletal system are mainly caused by estrogen depletion, which surpasses the potential-independent effect of adiposity.

C. Tagliaferri · J. Salles · C. Giraudet · V. Patrac · P. Lebecque · M.-J. Davicco · A. Chanet · C. Pouyet · Y. Boirie · Y. Wittrant · V. Coxam · S. Walrand  
INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

C. Tagliaferri · J. Salles · C. Giraudet · V. Patrac · P. Lebecque · M.-J. Davicco · A. Chanet · C. Pouyet · Y. Boirie · Y. Wittrant · V. Coxam · S. Walrand  
Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

C. Tagliaferri · A. Dhaussy · A. Huertas  
Lesieur, Asnieres-Sur-Seine, France

J.-F. Landrier  
UMR 1260, INRA, 13385 Marseille, France

J.-F. Landrier  
Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique, UMR 1062, INSERM, 13385 Marseille, France

J.-F. Landrier  
Faculté de Médecine, Université d'Aix-Marseille, 13385 Marseille, France

C. Pouyet  
INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, UNH, 63000 Clermont-Ferrand, France

Y. Boirie  
CHU Clermont-Ferrand, Service de Nutrition Clinique, 63003 Clermont-Ferrand, France

S. Walrand (✉)  
Centre de recherche de Clermont-Theix-Lyon, 58 rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand, France  
e-mail: swalrand@clermont.inra.fr



**Keywords** Osteoporosis · Sarcopenia · Adipose tissue · Skeletal muscle · Bone

## Introduction

The past decade has seen the emergence of a new concept that osteoporosis and sarcopenia reinforce each other and share a common dysregulation pattern in response to decreased serum estrogen, androgen and insulin-like growth factor 1 (IGF-1), increased inflammation and oxidative stress [1]. Muscle performance has been shown to decline during the postmenopausal years, likely via a complex estrogen-dependent mechanism [2]. In addition, grip strength was shown to be an indicator of osteoporosis in large-scale cohort studies [3, 4]. In a recent clinical study, sarcopenia was associated with lower T-scores of the lumbar spine, total femur and femur neck [5]. Moreover, atrophy of type II muscle fibers and the reduced activation of muscle cell anabolic pathways—two of the main characteristics of sarcopenia—are related to osteoporosis [6]. While the role of estrogen deficiency in osteoporosis development is well established [7], the impact of estrogen loss on the onset of sarcopenia remains a controversial issue (for review, see [8]). A decline in specific force occurs around the age of menopause and can be reversed by hormone therapy (HT) [9]. Following ovariectomy, muscle force declines in mice and the maximum force deployed by *soleus* fibers declines in rats [10, 11]. A meta-analysis studying the impact of estrogens on muscle strength revealed that strength normalized to muscle size, i.e., a measure of muscle quality, was 7 % greater in rodents with circulating estradiol compared to those with estradiol deficiency [12]. In terms of mechanisms,  $17\beta$ -estradiol activated the phosphoinositide 3-kinase (PI3 K)/protein kinase B (Akt) cascade in an estrogen receptor-dependent manner in C2C12 muscle cells [13]. Moreover, the IGF-1/Akt pathway has been shown to be involved in osteoporosis-related muscle atrophy as it leads to a significant reduction in Akt activation rate [6]. However, HT was found to downregulate Akt gene expression while upregulating IGF-1, mammalian target of rapamycin (mTOR) and androgen receptor gene expression [14]. As menopause in women and ovariectomy in rodents are associated with a significant gain in fat mass, the adipose tissue cannot be ignored, since altered adipose tissue profile could help drive the metabolic changes observed in both these situations. There is growing evidence for a negative impact of adipose tissue on bone metabolism [15]. Therefore, the accumulation of adipose tissue could reinforce the negative impact of estrogen depletion on bone quality. Furthermore, the high-fat diet-induced increase in fat mass is associated with loss of skeletal muscle mass and function [16]. Hence, there is an

increasing prevalence of sarcopenia associated with visceral obesity, called ‘sarcopenic obesity’ [17]. Increased adipose tissue often correlates with insulin resistance [18], and insulin resistance has impacts on skeletal muscle metabolism, such as impaired fatty acid metabolism associated with defective mitochondrial oxidative phosphorylation [19]. Overall, menopause is associated with fat mass gain, bone loss, a decline in muscle function as well as increased oxidative stress and inflammation, but the mechanism involved is not fully understood. Here, we assessed the hypothesis that the ovariectomy-associated variation in body fat mass plays a central role in the ovariectomy-associated metabolic abnormalities observed in bone and skeletal muscle. This study was therefore designed to compare the metabolic alterations induced by adipose tissue gain in response to ovariectomy versus a high-fat diet.

## Materials and methods

### Animals

The study used 21 eight-month-old female Wistar rats obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and acclimatized for 2 weeks under standard laboratory conditions. They were housed in individual cages under a 12-h light/dark cycle at the animal facilities of the INRA’s Human Nutrition Research Unit (approval No. C6334514). The rats were randomized into three body weight-matched groups ( $n = 7/\text{group}$ ). At 8½ months of age, one group was bilaterally ovariectomized (OVX) and the other two groups were sham-operated under ketamine/xylazine anesthetic (Imalgen 1000 0.75 mL/kg body weight; Vtranquil 0.5 % 0.5 mL/kg bodyweight). Control (C) and OVX rats received a standard diet based on AIN-93 M [20], and the third group received a high-fat diet (HF; UPAE, Jouy-en-Josas, France; Table 1). The daily 21 g of food was diluted in 15 mL of water, and rats had free access to water. Body weight and intakes were regularly monitored. At the end of the experiment, body composition was assessed (QMR EchoMRI-900TM, Houston, USA) in live, unanesthetized animals. After 19 weeks, the animals were fasted overnight and then injected with L-[1- $^{13}\text{C}$ ] valine, (Eurisotop Saint-Aubin, France) 50 min before collecting blood under isoflurane anesthesia. Serum and plasma were centrifuged, aliquoted and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until performing biochemical analyses. The liver, *tibialis anterior* muscle and perirenal and subcutaneous adipose tissues were rapidly removed, weighed, portioned, frozen in nitrogen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. One femur from each animal was collected and stored in 10 % formaldehyde at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 days before being dried out for micro-computed tomography (microCT) analyses. Uterus was weighed.





**Table 1** Composition of experimental diets

Ingredients (g/kg)	Control*	High-fat
Casein	140.000	140.000
Cornstarch	465.692	355.692
Dextrin	155.000	155.000
Sucrose	100.000	100.000
Cellulose	50.000	50.000
Peanut oil	20.000	75.000
Canola seed oil	20.000	75.000
L-cystine	1.800	1.800
Choline bitartrate	2.500	2.500
t-butylhydroquinone	0.008	0.008
Mineral mix (AIN-93 M) (with 2,500 mg/g calcium)	35.000	35.000
Vitamin mix (AIN-93 M) (with 500 IU/kg vitamin D)	10.000	10.000
Proteins	141.800 (14.9 % TE)	141.800 (13.0 % TE)
Carbohydrates	720.692 (75.7 % TE)	610.692 (56.0 % TE)
Fat	40.000 (9.4 % TE)	150.000 (31.0 % TE)
Total energy (kJ/g)	15.9	18.2

All diets were developed by the INRA in Jouy-en-Josas

TE total energy

\* Based on AIN-93 M [20]

### Bone mineral density analyses

MicroCT scans (eXplore CT 120, GE Healthcare, Fairfield, CT) were performed on the dried distal femurs. Bone mineral density (BMD) of the metaphyseal trabecular bones was estimated as the mean converted grayscale level within the region-of-interest of trabecular bone. Bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th) and separation (Tb.Sp) were evaluated using MicroView Advanced Bone Analysis software (GE Healthcare, Fairfield, CT).

### Measurement of blood markers

Osteocalcin (OCN) and collagen type 1 cross-linked C-telopeptide (CTX1) were measured in serum samples using assay kits from Immunodiagnostic Systems (IDS, Paris, France) following the manufacturer's instructions. Plasma samples were used to assess soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) receptors 1 and 2 (sTNF-R1 and sTNF-R2) (R&D Systems, Lille, France) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP; Cusabio via Clinisciences, Nanterre, France), following the supplier's instructions. Plasma levels of fasting glucose, glycerol, cholesterol, triglycerides (TG) and non-esterified fatty acids (NEFA) were determined using a Konelab 20 analyzer (Thermo Electron, Waltham, MA). Plasma insulin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Alpco, Windham, NH) following the manufacturer's guidelines. Liver and *tibialis anterior* TG were determined using commercial kits from Abcam (Abcam, Cambridge, UK). Homeostasis model assessment (HOMA) was calculated from fasting glucose and insulin values using the following formula:

$HOMA = (\text{insulin} \times \text{glucose})/22.5$ , with glucose expressed as mmol/L and insulin expressed as mU/L.

### Fractional synthesis rate determination

To study muscle protein synthesis, we measured the incorporation rate of a stable isotope, i.e., a labeled amino acid (L-[1-<sup>13</sup>C] valine, Eurisotop, Saint-Aubin, France) into muscle proteins using the flooding dose method as previously described [21, 22].

### mRNA expression

Total RNA was extracted from *tibialis anterior* and perirenal adipose tissue samples using TRIzol reagent following the manufacturer's protocol (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA). mRNA expression was measured by reverse transcription followed by quantitative PCR (RT-PCR) using a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNA was reverse-transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Saint-Aubin, France). Relative RNA levels were determined by analyzing the changes in SYBR green fluorescence. Expression levels of MyoD, MuRF1, IGF-1, insulin receptor (InsR), myosin heavy chain I (MHCI), myosin heavy chain IIx (MHCIIx), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 alpha (PGC1 $\alpha$ ), mitochondrial transcription factor A (TFAM), nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and NRF2 were evaluated in the *tibialis anterior*. Leptin and TNF $\alpha$  transcripts were measured in perirenal adipose tissue. Gene expression was calculated relative to the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) for muscle samples and 18S ribosomal RNA (18S) for adipose tissue samples.



## Western blot analysis

Denatured proteins from *tibialis anterior* were separated by SDS-PAGE on a polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene membrane (Millipore, Molsheim, France). Reversible Ponceau staining was applied to the membranes to assess total protein level [23]. Immunoblots probed with the following primary antibodies: anti-phospho Akt (Ser473), anti-total Akt, anti-phospho mTOR (Ser2448), anti-total mTOR, anti-phospho S6 Kinase (Thr389), anti-total p70 S6 Kinase were obtained from Cell signaling (via Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and MitoProfile Antibody Cocktail was obtained from Mitosciences (Abcam, Paris, France). Immunoblots were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The immune reactive strips were visualized by chemiluminescence (ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA). The intensity of the strips or whole lanes was quantified using Multi Gauge v3.2 software (Fuji Film, Minato, Tokyo, Japan). The activation states were evaluated based on the ratio of phosphorylated protein-to-total protein expression [24].

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. A one-way ANOVA was performed to test the effect of the experimental conditions. When a significant effect was detected, a post hoc Fisher test was applied to locate pairwise differences between conditions. Statistical analysis was performed using StatView (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC). A  $p$  value less than or equal to 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Body weight and food consumption

Over the course of the experiment, HF and OVX rats gained 114 and 122 g, respectively, whereas *C* rats gained 51 g (Table 2). Overall, energy intake was similar between the groups.

However, when calculating weight gain relative to energy intake, the ratio was more than twofold higher for the HF and OVX groups ( $p < 0.0001$ ; Table 2). Concerning body composition, relative fat-free mass decreased by 19.3 % in HF rats and by 13.2 % in OVX rats compared to *C* rats during the study. Fat mass was increased by 56.7 % in HF rats and by 36.6 % in OVX rats. Fat mass was not significantly different between HF and OVX rats at the end of the study.

**Table 2** Body weight, body composition, body weight gain, energy intake and body weight gain-to-energy intake ratio in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	<i>C</i>	HF	OVX
Body weight (g)	361 $\pm$ 5	429 $\pm$ 10*	439 $\pm$ 11*
%Fat-free mass	76.44 $\pm$ 1.85	61.71 $\pm$ 0.87*	66.34 $\pm$ 2.06*
%Fat mass	22.68 $\pm$ 1.84	35.54 $\pm$ 1.39*	30.99 $\pm$ 1.55*
Body weight gain (g)	51 $\pm$ 6	114 $\pm$ 13*	122 $\pm$ 8*
Daily energy intake (kJ)	288 $\pm$ 4	272 $\pm$ 17	294 $\pm$ 6
Body weight gain-to-energy intake ratio	0.18 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.05*	0.42 $\pm$ 0.03*

Values are mean  $\pm$  SEM. Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

*C* control, *HF* high-fat, *OVX* ovariectomy

\*  $p < 0.05$  compared to the *C* group

### Plasma metabolic and inflammatory variables

Insulin was increased by 45.7 and 42.9 % in the HF and OVX groups, respectively, versus *C* rats, but without reaching statistical significance (Table 3). This result was associated with an increased concentration of plasma glucose in the HF group and in glycerol in the OVX group compared to *C* rats ( $p = 0.0085$  and  $p = 0.0068$ , respectively). HF-fed rats tended to have a higher HOMA index ( $p = 0.0886$ ). Moreover, cholesterol was only increased in OVX rats. Plasma TG and NEFA were similar in the three groups. All systemic inflammatory markers evaluated tended to increase in OVX rats compared to controls (Table 4), but only sTNF-R2 was significantly higher ( $p = 0.0006$ ). In addition, circulating hs-CRP tended to increase in the OVX group compared to *C* and HF rats ( $p = 0.0718$  and  $p = 0.0679$ , respectively). Moreover, plasma sTNF-R2 level was greater in the HF group compared to *C* rats ( $p = 0.0087$ ).

### Adipose tissue parameters and liver and muscle triglycerides

In accordance with the relative fat mass (Table 2), the weight of perirenal and subcutaneous fat pads (Table 5) was greatly increased in both treatment groups compared to controls. Leptin and TNF $\alpha$  expressions in adipose tissues were higher in HF rats than in the other two groups (Table 5). Interestingly, HF and OVX rats showed opposite patterns of in-tissue TG storage. TG concentrations in the *tibialis anterior* were significantly higher in HF rats compared to *C* rats, whereas TG concentrations in liver were significantly higher in OVX rats compared to the other two groups (Table 3).



**Table 3** Plasma metabolic variables, liver and *tibialis anterior* triglyceride levels in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	C	HF	OVX
Insulin (ng/mL)	0.35 ± 0.07	0.51 ± 0.06	0.50 ± 0.05
Glucose (g/L)	1.33 ± 0.05	1.52 ± 0.04*	1.41 ± 0.05
Glycerol (μmol/L)	237 ± 15	258 ± 27	323 ± 14* <sup>†</sup>
Cholesterol (g/L)	0.91 ± 0.08	0.86 ± 0.05	1.50 ± 0.10* <sup>†</sup>
Triglycerides (g/L)	0.67 ± 0.11	0.82 ± 0.08	0.66 ± 0.03
NEFA (mmol/L)	0.60 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.68 ± 0.07
HOMA	2.94 ± 0.63	4.83 ± 0.68	3.88 ± 0.27
Liver triglycerides (nmol/mg tissue)	88 ± 16	103 ± 35	219 ± 38* <sup>†</sup>
<i>Tibialis</i> triglycerides (nmol/mg tissue)	2.23 ± 0.39	5.23 ± 1.22*	3.46 ± 0.51

Values are mean ± SEM. Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

C control, HF high-fat, OVX ovariectomy, TG triglycerides, NEFA non-esterified fatty acids, HOMA homeostasis model assessment

\*  $p < 0.05$  compared to the C group. <sup>†</sup>  $p < 0.05$  compared to the HF group

**Table 4** Plasma inflammatory profile after sham operation in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	C	HF	OVX
sTNF-R1 (pg/mL)	113 ± 11	126 ± 5	135 ± 9
sTNF-R2 (pg/mL)	853 ± 107	1,086 ± 100*	1,228 ± 71*
hs-CRP (pg/mL)	275 ± 40	273 ± 43	425 ± 76

Values are mean ± SEM. Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

C control, HF high-fat, OVX ovariectomy, sTNF-R1 and sTNF-R2 soluble tumor necrosis factor-α (TNFα) receptor 1 and 2, hs-CRP high-sensitivity C-reactive protein

\*  $p < 0.05$  compared to the C group

#### Uterine weight and bone parameters

Relative uterine weight was significantly lower in OVX rats compared to HF and C rats ( $p < 0.0001$ ; Table 6). As expected, OVX animals presented osteopenia as shown by a drop in BMD of 8.6 % compared to C rats ( $p = 0.0182$ ) and 10.0 % compared to HF rats ( $p = 0.0064$ ; Table 6). In order to take the potential effect of body weight on bone density into account, we calculated a relative BMD. Relative BMD was significantly lower in OVX rats than in the two other groups and was also significantly lower in HF rats than C rats ( $p < 0.0001$ ). The bone microarchitecture was also impaired in the OVX animals, as BV/TV, Tb.N and Tb.Th decreased and Tb.Sp increased compared to C and HF rats (Table 6). Markers of both bone formation, i.e., OCN, and resorption, i.e., CTX1, were

**Table 5** Adipose tissue parameters in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	C	HF	OVX
Adipose tissue weight			
Perirenal (g)	4.79 ± 0.39	7.58 ± 0.61*	8.70 ± 0.93*
Subcutaneous (g)	3.64 ± 0.31	6.60 ± 0.38*	7.59 ± 0.48*
Transcript levels			
Leptin	1.00 ± 0.32	2.42 ± 0.33*	1.31 ± 0.21 <sup>†</sup>
TNF-α	1.00 ± 0.17	1.89 ± 0.25*	0.62 ± 0.17 <sup>†</sup>

Values are mean ± SEM. Transcript levels were evaluated in perirenal adipose tissue, and data are expressed as a ratio of gene expression to 18S gene expression. 18S ribosomal RNA was used as a housekeeping gene with stable expression in perirenal adipose tissue. Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

C control, HF high-fat, OVX ovariectomy, TNFα tumor necrosis factor-α

\*  $p < 0.05$  compared to the C group. <sup>†</sup>  $p < 0.05$  compared to the HF group

**Table 6** Uterus weight, bone mineral density, bone microarchitecture parameters and serum levels of osteocalcin and CTX1 in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	C	HF	OVX
Uterus weight (mg)	680 ± 41	790 ± 77	132 ± 5* <sup>†</sup>
BMD (mg/cc)	700 ± 12	712 ± 25	640 ± 7* <sup>†</sup>
BMD/body weight	1.94 ± 0.04	1.66 ± 0.04*	1.46 ± 0.04* <sup>†</sup>
BV/TV	0.66 ± 0.06	0.64 ± 0.06	0.11 ± 0.02* <sup>†</sup>
Tb.N (mm)	3.47 ± 0.10	3.41 ± 0.27	1.39 ± 0.20* <sup>†</sup>
Tb.Th (μm)	193 ± 24	209 ± 45	78 ± 5* <sup>†</sup>
Tb.Sp (μm)	97 ± 16	100 ± 14	748 ± 130* <sup>†</sup>
Serum OCN (ng/mL)	74.54 ± 11.27	45.89 ± 11.15*	128.75 ± 6.26* <sup>†</sup>
Serum CTX1 (ng/mL)	5.39 ± 0.63	6.71 ± 0.74	9.51 ± 0.59* <sup>†</sup>

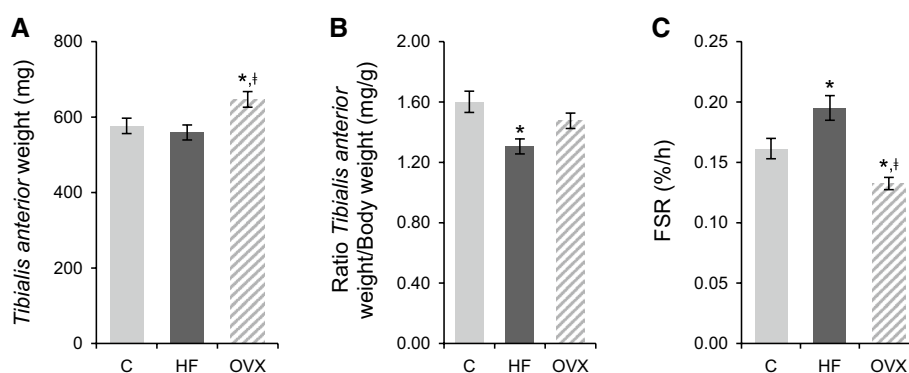
Values are mean ± SEM. Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

C control, HF high-fat, OVX ovariectomy, BMD bone mineral density, BV/TV trabecular bone volume, Tb.N trabecular number, Tb.Th trabecular thickness, Tb.Sp trabecular separation, OCN osteocalcin, CTX1 collagen type 1 cross-linked C-telopeptide

\*  $p < 0.05$  compared to the C group. <sup>†</sup>  $p < 0.05$  compared to the HF group

increased in OVX rats compared to C rats ( $p = 0.0019$  and  $p = 0.0003$ , respectively; Table 6), indicating an acceleration of bone turnover. HF rats showed a drop in OCN compared to controls ( $p < 0.05$ ) while CTX1 levels remained unchanged.

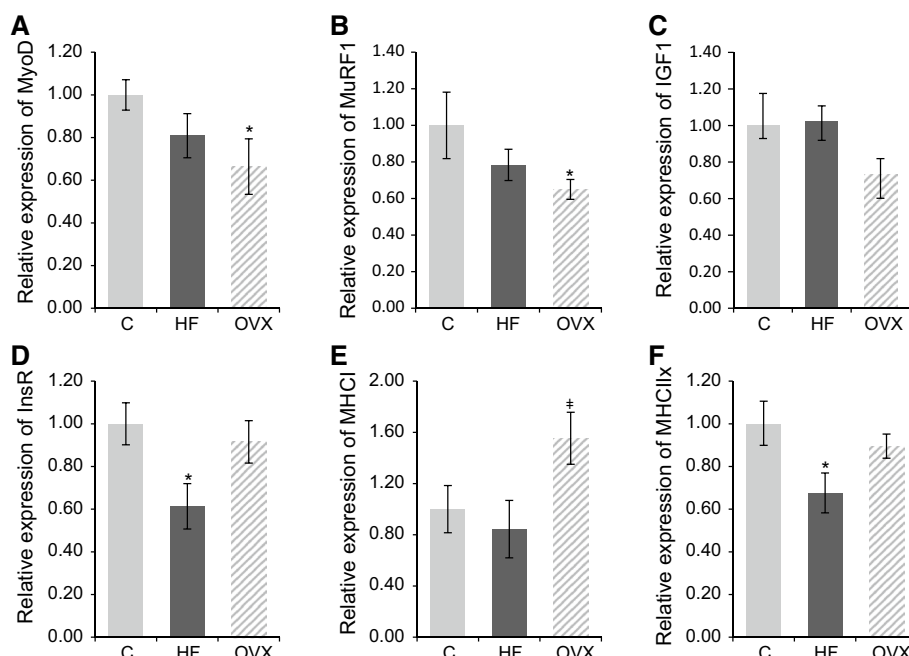




**Fig. 1** *Tibialis anterior* weight, weight-to-body weight ratio and protein synthesis. **a** *Tibialis anterior* weight, **b** *tibialis anterior* weight-to-body weight ratio, **c** *tibialis anterior* protein synthesis rate of control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats. Values are

mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to the *C* group. † $p < 0.05$  compared to the HF group. *C* control (light gray), *HF* high-fat diet (dark gray), *OVX* ovariectomy (stripes)

**Fig. 2** Transcript levels of muscle metabolism markers in *tibialis anterior*. **a** MyoD, **b** MuRF1, **c** IGF1, **d** InsR, **e** MHCI, **f** MHCIIx relative mRNA expression measured by real-time PCR in adult rat *tibialis anterior* 4 months after sham operation or ovariectomy. Data are expressed as a ratio of gene expression to HPRT gene expression. HPRT gene was used as a housekeeping gene with stable expression in *tibialis anterior*. Values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to the *C* group. † $p < 0.05$  compared to the HF group. *C* control (light gray), *HF* high-fat diet (dark gray), *OVX* ovariectomy (stripes)



## Muscle protein metabolism

Mean *tibialis anterior* weight was significantly higher in OVX rats, i.e., 12.2 % higher than *C* rats ( $p = 0.0251$ ) and 15.7 % higher than HF rats ( $p = 0.007$ ) (Fig. 1a). Muscle weight-to-body weight ratio was lower in the HF group than in the *C* and OVX groups ( $p = 0.0019$  and  $p = 0.0517$ , respectively), whereas there was no difference between *C* and OVX groups (Fig. 1b). However, protein synthesis rate was significantly higher (+20.9 %) in the HF group and lower (−17.9 %) with estrogen depletion compared to *C* rats ( $p = 0.0109$  and  $p = 0.0307$ , respectively; Fig. 1c). Gene expression of MyoD, reflecting muscle cell differentiation,

and MuRF1, a ubiquitin ligase involved in protein degradation, were 33.6 and 35.0 % lower, respectively, in OVX rats compared to controls ( $p = 0.0353$  and  $p = 0.0439$ , respectively; Fig. 2a, b). There were no among-group differences in IGF-1 transcript levels in skeletal muscle (Fig. 2c). InsR expression was lower in HF rats compared to *C* and OVX rats ( $p = 0.0194$  and  $p = 0.0510$ , respectively; Fig. 2d). MHCI was significantly upregulated in the OVX group compared to HF group ( $p = 0.0246$ ) and tended to be upregulated compared to *C* rats ( $p = 0.0717$ ; Fig. 2e). Conversely, MHCIIx transcripts were significantly downregulated in HF rats compared to *C* rats ( $p = 0.0141$ ) and tended to be downregulated in HF rats compared to OVX





rats ( $p = 0.0830$ ; Fig. 2f). To further dissect the mechanism involved, we studied the mTOR pathway but found no effect of OVX or HF diet on phosphorylation status of mTOR, Akt or ribosomal protein S6 kinase (S6 K) (data not shown).

### Muscle mitochondrial parameters

As a proportional balance among complex expressions is required for normal electron transport chain (ETC) function, ratios between complex protein expressions were calculated [21]. The ratios of complex IV to other complexes were significantly modified in the HF group, i.e., decreased with complex I, II and III and increased with complex V, which is evidence of increased protein expression of complex IV in the HF group (Table 7). mRNA expressions of PGC1 $\alpha$ , tFAM, NRF1 and NRF2 were similar between C and OVX rats, whereas mitochondrial gene expressions decreased in HF rats (Table 7), especially NRF1 ( $p = 0.0023$ ) and NRF2 ( $p = 0.0315$ ).

### Discussion

The aim of this study was to evaluate the effect of ovariectomy on both bone and skeletal muscle metabolism and to investigate the impact of fat mass variation on bone and muscle alterations. We therefore compared ovariectomized rats against high-fat-diet-fed rats.

We observed a significant and similar weight gain in ovariectomized and high-fat-fed rats compared to controls. In accordance with the literature [25, 26], weight gain was mainly caused by fat mass, with a similar fat mass gain between the two test groups compared to controls. Plasma inflammatory patterns differed between the test groups. Increased inflammation in response to hormonal loss and high-fat diet is well described in the literature [27, 28]. Further, aging is associated with a low-grade inflammation implicated in the pathophysiology of both osteoporosis and sarcopenia [29]. The ovariectomy model was validated by uterine atrophy, loss of bone mineral density and impaired bone microarchitecture associated with increased bone turnover—a mechanism well described in the literature and reviewed by Imai et al. [30]. Here and previously [31], hormonal deficiency was associated with decreased bone mass and increased adiposity due to a switch in mesenchymal stem cells from osteoblasts to adipose cells [32]. Bone mineral density-to-body weight ratio was significantly decreased in high-fat-fed animals compared to controls. This was associated with impaired bone turnover, consistently with previous reports on male rats [33]. Even though fat mass was long thought to improve bone mineral density, evidence from an increasing number of studies has now reinforced the idea that fat accumulation has a detrimental

**Table 7** Muscle mitochondrial parameters in control, high-fat-fed or ovariectomized adult rats

	C	HF	OVX
ETC protein expression ratios			
Complex I/II	0.96 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.08	0.94 $\pm$ 0.07
Complex I/III	0.85 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.07
Complex I/IV	2.68 $\pm$ 0.36	1.03 $\pm$ 0.12*	2.60 $\pm$ 0.24 <sup>‡</sup>
Complex I/V	0.89 $\pm$ 0.13	0.83 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.08
Complex II/III	0.92 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.02
Complex II/IV	3.18 $\pm$ 0.73	1.20 $\pm$ 0.22*	2.95 $\pm$ 0.44 <sup>‡</sup>
Complex II/V	0.90 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.08
Complex III/IV	3.30 $\pm$ 0.58	1.34 $\pm$ 0.18*	2.92 $\pm$ 0.45 <sup>‡</sup>
Complex III/V	1.02 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.09
Complex IV/V	0.40 $\pm$ 0.09	0.87 $\pm$ 0.11*	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>‡</sup>
Transcript levels			
PGC1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.21	0.63 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.09
tFAM	1.00 $\pm$ 0.16	0.72 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.05
NRF1	1.00 $\pm$ 0.13	0.59 $\pm$ 0.05*	0.82 $\pm$ 0.03
NRF2	1.00 $\pm$ 0.15	0.67 $\pm$ 0.08*	0.89 $\pm$ 0.04

Values are mean  $\pm$  SEM. Gene expression was calculated relative to the expression of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Following sham operation or ovariectomy, adult rats received a control or high-fat diet for 19 weeks

C control, HF high-fat, OVX ovariectomy, ETC electron transport chain, PGC1 $\alpha$  peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1, tFAM mitochondrial transcription factor A, NRF1 nuclear respiratory factor 1, NRF2 nuclear respiratory factor 2

\*  $p < 0.05$  compared to the C group. <sup>‡</sup>  $p < 0.05$  compared to the HF group

impact on bone [15]. Moreover, leptin, whose expression was increased in the perirenal adipose tissue of high-fat fed rats, has controversial effects on bone with a direct stimulatory effect and an indirect opposite effect via the central nervous system (for review see [34]). Therefore, the ovariectomy-induced fat gain could, in addition to the direct effect of estrogen depletion on bone, have a further negative effect on bone metabolism. Another important parameter that affects bone is physical activity as it was shown to reverse the effects of ovariectomy on bone loss in rats [35]. However, according to our daily observations, the animals used in the present study had little physical activity.

The fat mass gain induced by the diet or by ovary ablation also had divergent consequences at the muscle level. *Tibialis anterior* were significantly heavier in ovariectomized rats than high-fat-fed rats or controls. This was observed in previous studies and reversed by estrogen administration [36, 37]. However, the ovariectomy-induced increase in muscle mass may be due to an adaptation to body weight gain, as the differences between groups were erased when we corrected for body weight. Similar conclusions, i.e., muscle weight-to-body weight ratios unaffected



by ovariectomy, were found by Fisher et al. [38]. In contrast, *tibialis anterior* weight was similar between high-fat-fed rats and controls and, once corrected for the body weight, the ratio was significantly reduced. A recent study from our team found that fat-free mass relative to body weight also decreased after 24 weeks of high-fat diet but not after 16 weeks [16]. Taken together, the present data indicate that under estrogen depletion, skeletal muscle mass seems to be protected from atrophy in a mechanism that does not occur when the increase in adiposity is due to diet. However, this does not necessarily mean that muscle quality is conserved. Interestingly, we showed that ovariectomy led to a reduction in muscle protein synthesis rate concomitant with decreased MyoD and MuRF1 expressions, which could explain the similar muscle weight-to-body weight ratios between control and ovariectomized rats. There is still controversy in the literature on ovariectomy and MyoD expression [39, 40], but as MyoD is preferentially expressed in type II fibers [41], our results are more consistent with a fast-to-slow transition occurring during aging [42]. Skeletal muscle protein synthesis has been shown to decrease with age [43], particularly in female rats [44]. However, our results differ from a previous report that short-term ovariectomy increases protein synthesis rate [45]. Age of animals, length after ovariectomy and muscle type all vary between studies and may explain the discrepant results. Moreover, this previous study found a decrease in body fat mass in ovariectomized animals [45] that was not consistent with most of the published data. As the ovariectomy was not validated in this study [45], the model may have too short time to observe the classical effects of estrogen ablation. Interestingly, IGF-1 mRNA expression in the *EDL* and *gastrocnemius* of young rats was increased in the early post-ovariectomy period (1 week) but not after 5 weeks [46]. Therefore, protein synthesis rate might precociously increase in response to IGF-1 early after ovariectomy and then decrease with extended absence of ovarian hormones. From our data, it was not possible to explain the observed rate of muscle protein synthesis in ovariectomized rats by the rates obtained in the high-fat-diet rats, which were increased compared to controls. Therefore, the effect of ovariectomy on skeletal muscle anabolism may be more dependent on hormonal depletion than on variation in body adiposity. This result was confirmed by a previous study from our team that reported increased protein synthesis rates in both *soleus* and *tibialis anterior* muscles when rats were fed a high-fat diet for 6 weeks [47]. In a recent time-course study of high-fat diet consumption by adult rats, both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis rates were increased after 16 weeks as well as muscle mass but total protein synthesis rate was decreased after 24 weeks as muscle mass [16]. As our animals received the high-fat diet for 19 weeks

and responded with increased protein synthesis rate and decreased muscle weight-to-body weight ratio, our study might be at the transition phase between the anabolic effect of fat gain and the catabolic effect of tissue lipotoxicity described by Masgrau et al. [16]. The IGF-1/Akt pathway plays a critical role in the control of protein synthesis. IGF-1 transcript levels as well as mTOR, Akt and S6 K protein activation in *tibialis anterior* muscle were not different between the three groups. Again, the literature remains controversial [13, 14, 46], but the ovariectomy-induced differences in protein synthesis rate found here are unlikely to be due to a dysregulation of this pathway. As muscle metabolism is linked to energy metabolism, we determined body weight gain relative to energy intake. The ratio was found to be significantly higher in both the ovariectomized and high-fat groups compared to controls. Energy expenditure decreases following ovariectomy or consumption of a high-fat diet, leading to a considerable weight gain [48, 49]. The observed similar fat mass gain was associated with a differential management of surplus lipid substrates. Hence, lipotoxicity was observed in the liver of ovariectomized rats, which is consistent with the literature [36], but in the *tibialis anterior* of high-fat-fed rats, which is a more controversial result [36, 50]. Like for muscle weight and protein synthesis rate, estrogen depletion seems to trigger a mechanism to avoid skeletal muscle ectopic storage of the excess lipids by orienting it to the liver. Three possible mechanisms linking the accumulation of triglycerides in muscle of high-fat-fed rats and the increased protein synthesis rate are currently under debate. First, the profile of neosynthesized protein is not known, and the lipotoxicity induced by the high-fat diet may lead to the synthesis of proteins linked to the stress response, i.e., uncoupling proteins [51] and unfolded protein response markers [52]. Second, increased protein synthesis might be compensated by a corresponding increase in proteolysis. Third, the high-fat-fed rats showed unbalanced ratios between electron transport chain proteins and a decreased expression of key controllers of mitochondrial biogenesis, which points to an impaired oxidative capacity [53]. Interestingly, the association of increased synthesis rate partly due to a higher mitochondrial protein synthesis rate and a decreased mitochondrial enzyme activity in rats consuming a high-fat diet has already been demonstrated in muscle [47]. As described in literature, mitochondrial alterations could be due to other nutrients such as vitamin D and vitamin K as they have been shown to act synergistically [54] and to play a key role in mitochondrial metabolism [55, 56]. However, in the present study, the intake of vitamin D and vitamin K was similar between groups (data not shown). Therefore, higher fatty acid intake was more likely responsible for the impairment of mitochondrial metabolism in high-fat fed rats. In addition, impaired



mitochondrial metabolism is to be related to insulin, as it is thought to mainly regulate mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle [57] where a decreased oxidative capacity may trigger the development of insulin resistance [58]. This observation is in accordance with the increased circulating fasting glucose and insulin and the decreased expression of InsR found in high-fat-fed rats compared to controls here and previously observed in obese individuals [59]. The inhibition of glucose uptake and oxidation associated with a dysregulation of fatty acid metabolism in skeletal muscle is well described [19]. In ovariectomized animals, none of the parameters evaluated linked the decreased muscle protein turnover to mitochondria metabolism. Similarly, in a recent study [60], tFAM, NRF1 and NRF2 mRNA expressions were not modified by estrogen depletion. However, in ovariectomized rodents, degenerated mitochondria together with damaged myofibrils were noticed [61]. Overall, mitochondrial quality and efficiency could still be impaired, leading to decreased fiber contractibility. As mitochondrial metabolism was impaired by high-fat-diet-induced adiposity but unaffected by ovariectomy-induced adiposity, the absence of impaired expression of mitochondrial chain proteins is more likely to be due to a direct effect of estrogen depletion rather than to body adiposity or tissue lipotoxicity themselves. To sum up, we showed that although ovariectomy and high-fat diet induced a similar fat mass gain, the resulting lipotoxicity and the impacts on bone and muscle tissues are different. Under a high-fat diet, bone formation was decreased while neither bone microarchitecture nor bone mass was significantly modified. As classically described, ovariectomy elicited a higher bone turnover, leading to bone loss. At muscle level, total protein and presumably mitochondrial synthesis rate were increased with the high-fat diet, likely as a mechanism to counteract muscle lipotoxicity, impaired regulation of glucose homeostasis and decreased mitochondrial efficiency. Conversely, the combined decrease in protein synthesis and MyoD and MuRF1 gene expression together with a similar muscle weight-to-body weight ratio between ovariectomized rats and controls points to reduced muscle protein turnover with hormonal loss. This could imply a decline in protein renewal, leading to impaired protein quality and contractile function. The altered muscle protein turnover induced by hormonal deficiency may partly explain the muscle loss observed in menopausal years. Bone loss could cause this alteration to limit the applied force and thus the risk of fracture, especially as body weight increases [62]. Our findings could also be due to direct effects of estrogen depletion. In addition, the increase in bone turnover may require a greater amount of energy, which is then counterbalanced by a slowdown muscle metabolism. This energy expenditure by bone could also protect muscle from lipotoxicity by using locally available

triglycerides and switch the ectopic accumulation of fat to the liver. Although decreased hormonal impregnation seems to be the main cause of abnormal muscle and bone metabolism, these changes are likely to be affected by increased adiposity in estrogen-deficient rats.

**Acknowledgments** The authors thank Philippe Lhoste, Arlette Cissoire, Philippe Denis and Christophe Del'homme for providing everyday care to the animals.

**Conflict of interest** CT was funded by a CIFRE grant from the ANRT (French National Association for Research and Technology) in partnership with Lesieur. This work was supported by both the CIFRE grant and the pOLIVd3 ANR (French National Research Agency) program ANR-10-ALIA-0008. AD and AH are employed by Lesieur.

**Ethical standard** All experimental procedures were approved by the institution's animal welfare committee (Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne: CEMEEA) and were conducted in accordance with the EU guidelines on the care and use of laboratory animals (2010-63UE). Every effort was made to minimize suffering.

## References

1. Joseph C, Kenny AM, Taxel P, Lorenzo JA, Duque G, Kuchel GA (2005) Role of endocrine-immune dysregulation in osteoporosis, sarcopenia, frailty and fracture risk. *Mol Aspects Med* 26(3):181–201. doi:10.1016/j.mam.2005.01.004
2. Sirola J, Rikkinen T (2005) Muscle performance after the menopause. *J Br Menopause Soc* 11(2):45–50
3. Rikkinen T, Sirola J, Salovaara K, Tuppurainen M, Jurvelin JS, Honkanen R, Kroger H (2012) Muscle strength and body composition are clinical indicators of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 91(2):131–138. doi:10.1007/s00223-012-9618-1
4. Sjoblom S, Suuronen J, Rikkinen T, Honkanen R, Kroger H, Sirola J (2013) Relationship between postmenopausal osteoporosis and the components of clinical sarcopenia. *Maturitas* 75(2):175–180. doi:10.1016/j.maturitas.2013.03.016
5. Go SW, Cha YH, Lee JA, Park HS (2013) Association between sarcopenia, bone density, and health-related quality of life in Korean men. *Korean J Fam Med* 34(4):281–288. doi:10.4082/kjfm.2013.34.4.281
6. Terracciano C, Celi M, Lecce D, Baldi J, Rastelli E, Lena E, Massa R, Tarantino U (2013) Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int* 24(3):1095–1100. doi:10.1007/s00198-012-1990-1
7. Tella SH, Gallagher JC (2013) Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
8. Messier V, Rabasa-Lhoret R, Barbat-Artigas S, Elisha B, Karelis AD, Aubertin-Leheudre M (2011) Menopause and sarcopenia: a potential role for sex hormones. *Maturitas* 68(4):331–336. doi:10.1016/j.maturitas.2011.01.014
9. Phillips SK, Rook KM, Siddle NC, Bruce SA, Woledge RC (1993) Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin Sci (Lond)* 84(1):95–98
10. Greising SM, Baltgalvis KA, Kosir AM, Moran AL, Warren GL (1985) Low estradiol's beneficial effect on murine muscle function is independent of muscle activity. *J Appl Physiol* 110(1):109–115. doi:10.1152/jappphysiol.00852.2010



11. Wattanapernpool J, Reiser PJ (1999) Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2):H467–H473
12. Greising SM, Baltgalvis KA, Lowe DA, Warren GL (2009) Hormone therapy and skeletal muscle strength: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64(10):1071–1081. doi:10.1093/gerona/glp082
13. Vasconsuelo A, Milanesi L, Boland R (2008) 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol* 196(2):385–397. doi:10.1677/JOE-07-0250
14. Pollanen E, Ronkainen PH, Horttanainen M, Takala T, Puolakka J, Suominen H, Sipila S, Kovanen V (2010) Effects of combined hormone replacement therapy or its effective agents on the IGF-1 pathway in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res* 20(5):372–379. doi:10.1016/j.ghir.2010.07.003
15. Cao JJ (2011) Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 6:30. doi:10.1186/1749-799X-6-30
16. Masgrau A, Mishellany-Dutour A, Murakami H, Beaufre AM, Walrand S, Giraudet C, Migne C, Gerbaix M, Metz L, Courteix D, Guillet C, Boirie Y (2012) Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *J Physiol* 590(Pt 20):5199–5210. doi:10.1113/jphysiol.2012.238576
17. Kohara K (2014) Sarcopenic obesity in aging population: current status and future directions for research. *Endocrine* 45(1):15–25. doi:10.1007/s12020-013-9992-0
18. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN (2011) Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 60(10):2441–2449. doi:10.2337/db11-0425
19. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA (2010) Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010:476279. doi:10.1155/2010/476279
20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123(11):1939–1951
21. Zangarelli A, Chansaume E, Morio B, Brugere C, Mosoni L, Rousset P, Giraudet C, Patrac V, Gachon P, Boirie Y, Walrand S (2006) Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J* 20(14):2439–2450. doi:10.1096/fj.05-4544com
22. Tardif N, Salles J, Guillet C, Tordjman J, Reggio S, Landrier JF, Giraudet C, Patrac V, Bertrand-Michel J, Migne C, Collin ML, Chardigny JM, Boirie Y, Walrand S (2014) Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2alpha activation. *Aging Cell*. doi:10.1111/age.12263
23. Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401(2):318–320. doi:10.1016/j.ab.2010.02.036
24. Salles J, Chanet A, Giraudet C, Patrac V, Pierre P, Jourdan M, Luiking YC, Verlaan S, Migne C, Boirie Y, Walrand S (2013) 1,25(OH)2-vitamin D3 enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C2C12 skeletal myotubes. *Mol Nutr Food Res* 57(12):2137–2146. doi:10.1002/mnfr.201300074
25. Shen CL, Chen L, Wang S, Chyu MC (2014) Effects of dietary fat levels and feeding durations on musculoskeletal health in female rats. *Food Funct* 5(3):598–604. doi:10.1039/c3fo60334b
26. Lizcano F, Guzman G (2014) Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *BioMed Res Int* 2014:757461. doi:10.1155/2014/757461
27. Jacob PS, de Meneses Fujii TM, Yamada M, Borges MC, Pantaleao LC, Borelli P, Fock R, Rogero MM (2013) Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 31(3):244–253. doi:10.1002/cbf.2894
28. Koh JM, Khang YH, Jung CH, Bae S, Kim DJ, Chung YE, Kim GS (2005) Higher circulating hsCRP levels are associated with lower bone mineral density in healthy pre- and postmenopausal women: evidence for a link between systemic inflammation and osteoporosis. *Osteopor Int* 16(10):1263–1271. doi:10.1007/s00198-005-1840-5
29. Singh T, Newman AB (2011) Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev* 10(3):319–329. doi:10.1016/j.arr.2010.11.002
30. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S (2010) Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 24(5):877–885. doi:10.1210/me.2009-0238
31. Wade GN, Gray JM (1979) Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* 22(3):583–593
32. Ilich JZ, Kelly OJ, Inglis JE, Panton LB, Duque G, Ormsbee MJ (2014) Interrelationship among muscle, fat, and bone: connecting the dots on cellular, hormonal, and whole body levels. *Ageing research reviews* 15C:51–60. doi:10.1016/j.arr.2014.02.007
33. Bielhuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoeflich A, Bidlingmaier M (2010) Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *J Bone Miner Res* 25(2):275–284. doi:10.1359/jbmr.090813
34. Naot D, Cornish J (2014) Cytokines and hormones that contribute to the positive association between fat and bone. *Front Endocrinol* 5:70. doi:10.3389/fendo.2014.00070
35. Chen Y, Wang S, Bu S, Wang Y, Duan Y, Yang S (2011) Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPARgamma expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol* 111(8):1759–1767. doi:10.1007/s00421-010-1820-0
36. Ngo Sock ET, Cote I, Mentor JS, Prud'homme D, Bergeron R, Lavoie JM (2013) Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats. *Horm Metab Res* 45(4):283–290. doi:10.1055/s-0032-1329964
37. Pighon A, Barsalani R, Yasari S, Prud'homme D, Lavoie JM (2010) Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats? *Climacteric* 13(3):238–248. doi:10.3109/13697130903009203
38. Fisher JS, Hasser EM, Brown M (1998) Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 85(4):1316–1321
39. Pedraza-Alva G, Zingg JM, Donda A, Perez-Martinez L (2009) Estrogen receptor regulates MyoD gene expression by preventing AP-1-mediated repression. *Biochem Biophys Res Commun* 389(2):360–365. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.153
40. Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS (2010) Loss of ovarian function in mice results in abrogated skeletal muscle PPARdelta and FoxO1-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 392(1):1–3. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.072
41. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118(4):1137–1147
42. Ohlendieck K (2011) Proteomic profiling of fast-to-slow muscle transitions during aging. *Front Physiol* 2:105. doi:10.3389/fphys.2011.00105
43. Nair KS (2005) Aging muscle. *Am J Clin Nutr* 81(5):953–963





44. Garlick PJ, Maltin CA, Baillie AG, Delday MI, Grubb DA (1989) Fiber-type composition of nine rat muscles. II. Relationship to protein turnover. *Am J Physiol* 257(6 Pt 1):E828–E832
45. Toth MJ, Poehlman ET, Matthews DE, Tchernof A, MacCoss MJ (2001) Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(3):E496–E501
46. Tsai WJ, McCormick KM, Brazeau DA, Brazeau GA (2007) Estrogen effects on skeletal muscle insulin-like growth factor 1 and myostatin in ovariectomized rats. *Exp Biol Med* 232(10):1314–1325. doi:[10.3181/0704-RM-92](https://doi.org/10.3181/0704-RM-92)
47. Chanseume E, Giraudet C, Gryson C, Walrand S, Rousset P, Boirie Y, Morio B (2007) Enhanced muscle mixed and mitochondrial protein synthesis rates after a high-fat or high-sucrose diet. *Obesity* 15(4):853–859. doi:[10.1038/oby.2007.582](https://doi.org/10.1038/oby.2007.582)
48. Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS (2009) Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* 150(5):2161–2168. doi:[10.1210/en.2008-1405](https://doi.org/10.1210/en.2008-1405)
49. Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol* 251(5 Pt 1):E576–E583
50. Oosterveer MH, van Dijk TH, Tietge UJ, Boer T, Havinga R, Stellaard F, Groen AK, Kuipers F, Reijngoud DJ (2009) High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. *PLoS One* 4(6):e6066. doi:[10.1371/journal.pone.0006066](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006066)
51. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajty-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM (1999) Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 274(9):5692–5700
52. Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford ML, Delzenne NM, Francaux M, Baar K (2010) The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(5):E695–E705. doi:[10.1152/ajpendo.00038.2010](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00038.2010)
53. Turner N, Heilbronn LK (2008) Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab* 19(9):324–330. doi:[10.1016/j.tem.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.08.001)
54. Kidd PM (2010) Vitamins D and K as pleiotropic nutrients: clinical importance to the skeletal and cardiovascular systems and preliminary evidence for synergy. *Altern Med Rev* 15(3):199–222
55. Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M, Amiot MJ, Bendahan D, Bernard M, Martin JC, Giannesini B, Landrier JF (2014) Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem* 25(10):1077–1083. doi:[10.1016/j.jnutbio.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.010)
56. Vos M, Esposito G, Edirisinghe JN, Vilain S, Haddad DM, Slabbaert JR, Van Meensel S, Schaap O, De Strooper B, Meganathan R, Morais VA, Verstreken P (2012) Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science* 336(6086):1306–1310. doi:[10.1126/science.1218632](https://doi.org/10.1126/science.1218632)
57. Boirie Y (2003) Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle. *Trends Endocrinol Metab* 14(9):393–394
58. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA (1999) Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):E1130–E1141
59. Wijngaarden MA, van der Zon GC, van Dijk KW, Pijl H, Guigas B (2013) Effects of prolonged fasting on AMPK signaling, gene expression, and mitochondrial respiratory chain content in skeletal muscle from lean and obese individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304(9):E1012–E1021. doi:[10.1152/ajpendo.00008.2013](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00008.2013)
60. Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Salvador ID, Martins EG, Jardim-Messeder D, Werneck de Castro JP, Galina A, de Carvalho DP (2014) Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. *J Appl Physiol*. doi:[10.1152/jappphysiol.00121.2013](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00121.2013)
61. Moustafa AM, Boshra V (2011) The possible role of L-carnitine on the skeletal muscle of ovariectomized rats. *J Mol Histol* 42(3):217–225. doi:[10.1007/s10735-011-9326-6](https://doi.org/10.1007/s10735-011-9326-6)
62. Ma HT, Griffith JF, Xu L, Leung PC (2013) The functional muscle-bone unit in subjects of varying BMD. *Osteoporos Int*. doi:[10.1007/s00198-013-2482-7](https://doi.org/10.1007/s00198-013-2482-7)

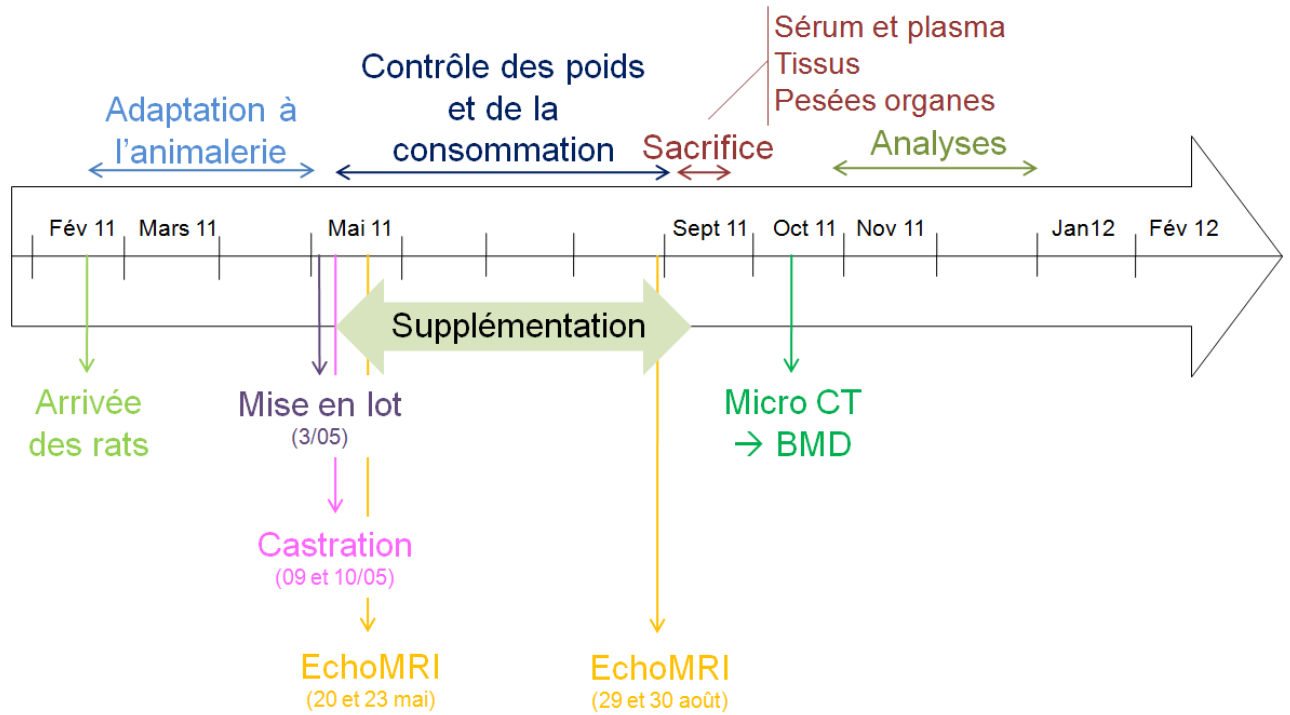


Figure 41 : Plan de l'expérimentation animale sur la rate ovariectomisée.

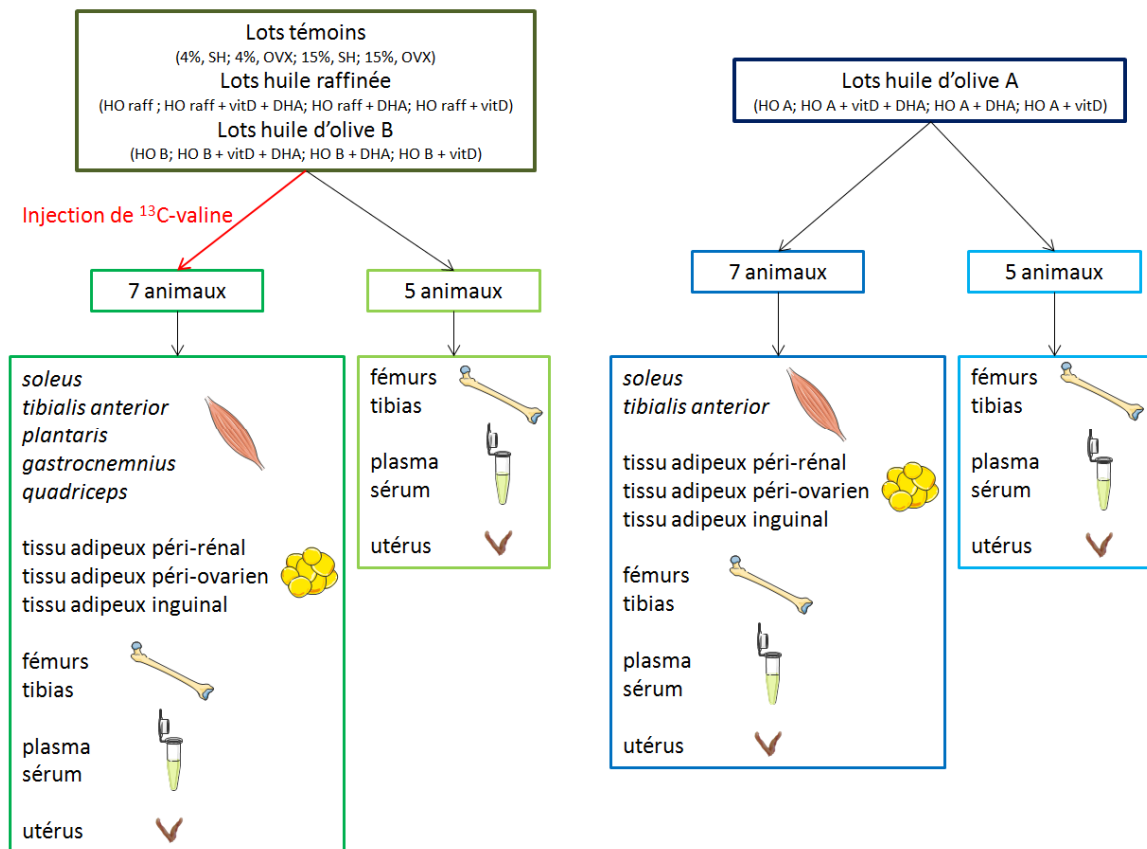


Figure 42 : Organisation des prélèvements chez le rat.

## 3- Résultats complémentaires à la publication n°1

### 3-1- Matériel et méthodes

#### 3-1-1- Animaux et régimes expérimentaux

La publication n°1 porte sur trois lots de rats (lots 1 à 3). Néanmoins, cette expérimentation animale a été menée sur un total de 16 lots d'animaux : 2 régimes témoins avec 4% ou 15% de lipides comprenant 50% d'huile d'arachide et 50% d'huile de tournesol ; et 12 régimes tests contenant 15% d'huile avec 11% d'huile d'olive, 2% d'huile de colza et 2% d'huile d'arachide. Trois huiles d'olive ont été testées : de l'huile raffinée et 2 huiles extra vierges sélectionnées pour leurs profils polyphénoliques qualitativement différents mais quantitativement équivalents (huiles A et B). Ces huiles ont été évaluées seules et en présence de vitD et/ou DHA. Les différents lots de rates ont reçu les régimes figurant dans le tableau 4.

Lot	OVX	Huile colza + arachide	Huile raffinée (HO raff)	Huile vierge A (HO A)	Huile vierge B (HO B)	DHA	vitamine D (vitD)
1 4% SH		X (4%)					
2 4% OVX	X	X (4%)					
3 15% SH		X (15%)					
4 15% OVX	X	X (15%)					
5 HO raff	X		X				
6 HO raff + vitD + DHA	X		X			X	X
7 HO raff + DHA	X		X			X	
8 HO raff + vitD	X		X				X
9 HO A	X			X			
10 HO A + vitD + DHA	X			X		X	X
11 HO A + DHA	X			X		X	
12 HO A + vitD	X			X			X
13 HOB	X				X		
14 HOB + vitD + DHA	X				X	X	X
15 HOB + DHA	X				X	X	
16 HOB + vitD	X				X		X

**Tableau 4 : Caractéristiques des différents lots de rates.**

SH, pseudo-opération; OVX, ovariectomie; 4%, 4% d'huile dans le régime; 15%, 15% d'huile dans le régime; HO, huile d'olive; raff, raffinée; vitD, vitamine D; DHA, acide docosahéxaénoïque.

Des contrôles de poids et de consommation ont été réalisés toutes les 2 semaines tout au long des 19 semaines d'investigation. De plus, la composition corporelle a été évaluée 12 jours après l'ovariectomie (J12) et juste avant le début des sacrifices (J113) (Figure 41).

#### 3-1-2- Echantillons récoltés

Sept animaux des lots 1 à 4 (lots témoins), 5 à 8 (huile raffinée) et 13 à 16 (huile d'olive B), soit 84 animaux sur 192, ont reçu une injection de <sup>13</sup>C-valine 50 minutes avant le sacrifice (Figure 42). Après sacrifice, le plasma et le sérum, les fémurs, les tibias et l'utérus



ont été prélevés chez tous les animaux. Les muscles *soleus* et *tibialis anterior* et les tissus adipeux (péri-rénal, péri-ovarien et inguinal) ont été prélevés sur 7 animaux de chacun des lots (soit 112 animaux). Les muscles *plantaris*, *gastrocnemius* et *quadriceps* ont été prélevés sur les animaux ayant reçu l'injection de  $^{13}\text{C}$ -valine.

### **3-1-3- Analyses**

#### *3-1-3-1- Densité minérale osseuse*

La BMD des fémurs a été évaluée à l'aide de la micro-computed tomography (microCT) avec un scanner eXplore CT 120 (GE Healthcare, Fairfield, CT) et de la DXA avec un QDR 4500 A (Hologic, Bedford, MA). Différentes régions d'intérêt (ROI) ont été analysées : la totalité de l'épiphyse et de la métaphyse distales (BMD distale), une pastille située juste au-dessous de la plaque de croissance (BMD pastille) et une ROI adaptée à la morphologie de chaque os ont été dessinées pour les 4 premiers lots pour les analyses avec le microCT. De même, pour les analyses de DXA, trois ROI ont été déterminées : l'os entier, la diaphyse et la partie distale du fémur.

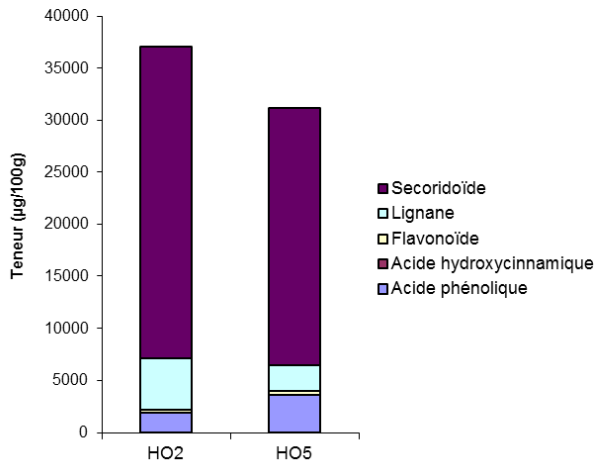
#### *3-1-3-2- Synthèse protéique musculaire*

La détermination du taux de synthèse protéique (FSR) a été réalisée sur les muscles *tibialis anterior* des rats ayant reçu l'injection de  $^{13}\text{C}$ -valine. Après hydrolyse des protéines, les acides aminés ont été dérivés et l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$ -valine des protéines hydrolysées a été mesuré par chromatographie gazeuse. Le taux de synthèse protéique, en %/h, qui représente le pourcentage de la fraction protéique considérée néo-synthétisée par unité de temps a été calculé grâce à l'équation suivante (Zangarelli, Chanseume et al. 2006):

$$\text{FSR} = (\text{Ei} \times 100) / (\text{Ep} \times t)$$

où l'Ei et Ep représentent les enrichissements en  $^{13}\text{C}$ -valine du compartiment intracellulaire d'acides aminés libres (Ep) et de la fraction protéique considérée à l'instant t (moins l'enrichissement basal).

### Composition (familles de polyphénols)



### Composition en polyphénols

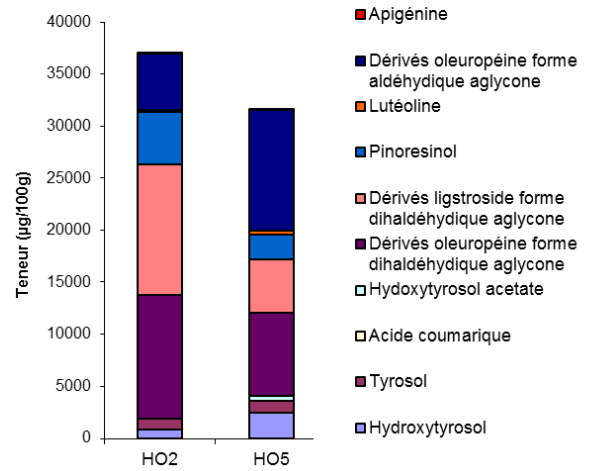


Figure 43 : Composition en polyphénols des huiles d'olive. HO2, Huile d'olive A; HO5, Huile d'olive B.

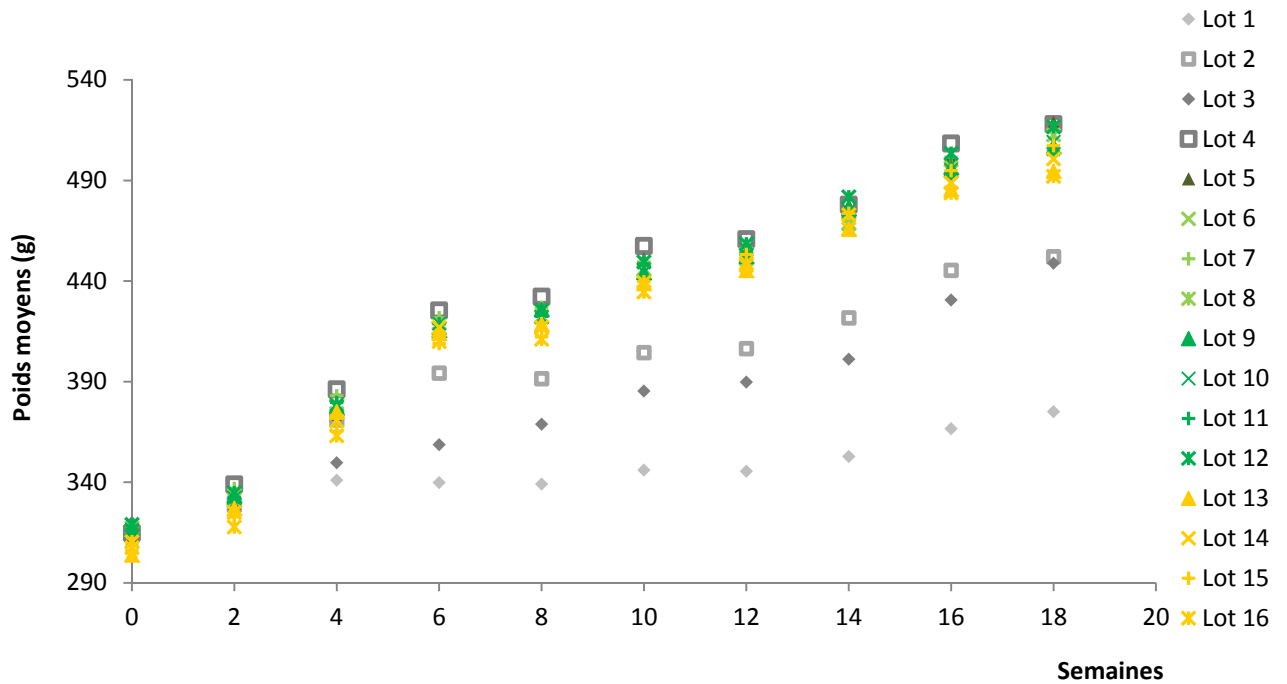


Figure 44 : Evolution du poids des animaux.

## 3-2- Résultats

### 3-2-1- Sélection des huiles d'olive

Sur la base des analyses réalisées par le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) d'Avignon, deux huiles d'olive ont été sélectionnées pour leur profil polyphénolique équivalent en quantité mais différent en qualité (Figure 43).

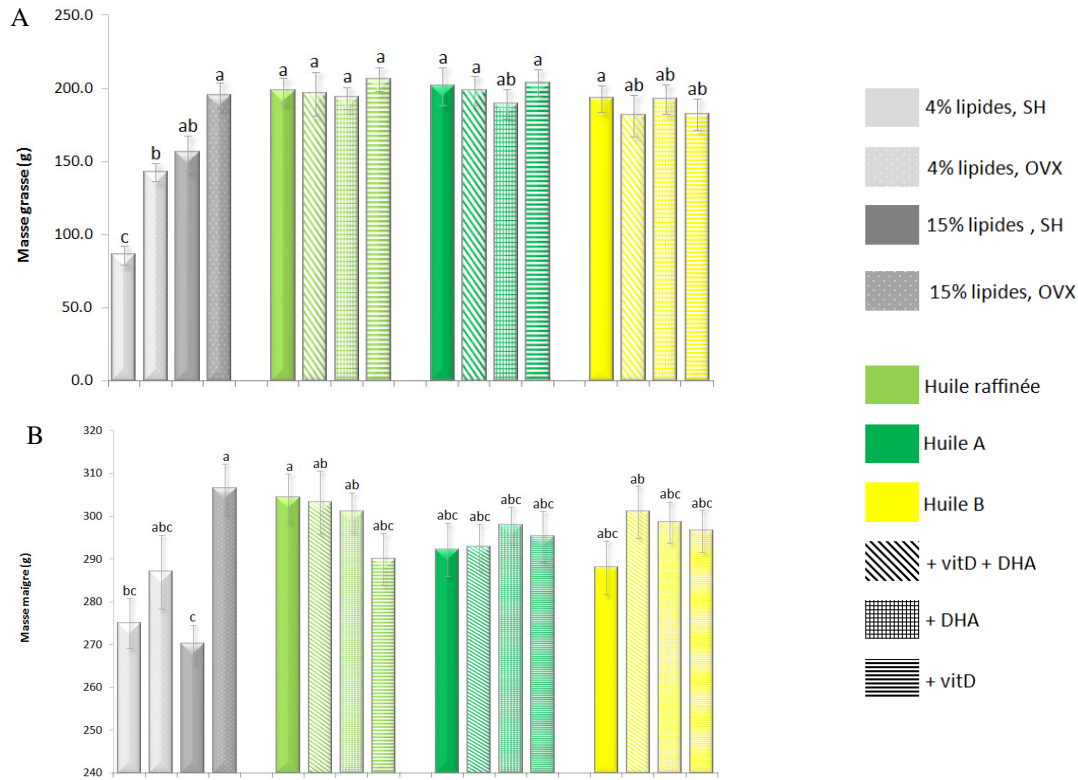
### 3-2-2- Evolution pondérale et composition corporelle

La constitution des différents groupes expérimentaux a été établie sur des critères de poids ( $p=0,848$ ) (Figure 44). En fin d'étude, il est intéressant de noter que la différence de poids entre les lots 4% SH et 15% SH ( $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = 75 \text{ g}$  soit 20,7%) et 4% OVX et 15% OVX ( $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = 71 \text{ g}$  soit 16,2%) était similaire. De même, des différences de poids similaires ont été observées entre les lots 4% SH et 4% OVX ( $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 79 \text{ g}$  soit + 21,9%) et 15% SH et 15% OVX ( $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 76 \text{ g}$  soit + 17,3%). Le régime riche en graisses ainsi que l'ovariectomie induisait une augmentation de la prise de poids de 18,4% et de 19,6%, respectivement. La différence de poids entre les lots 4% SH et 15% OVX était due au cumul des 2 effets ( $\Delta = 151 \text{ g}$  soit 41,6%). En ce qui concerne les lots tests (lots huile d'olive), les prises de poids étaient comparables à celle du lot témoin 15% OVX.

Concernant la composition corporelle, les lots étaient homogènes en termes de masse grasse et de masse maigre au début de l'expérimentation ( $p>0,05$ ). En fin d'étude, la masse grasse était augmentée par l'ovariectomie ( $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 56,6 \text{ g}$  ;  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 39,4 \text{ g}$ ), ainsi que par la consommation d'un régime riche en graisses ( $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = 69,7 \text{ g}$  ;  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = 52,6 \text{ g}$ ), effets qui étaient cumulés dans les lots d'intérêt (lots de rates ayant consommé les régimes huiles d'olive) ( $\Delta_{\text{moyenne des lots d'intérêts} - 4\% \text{ SH}} = 108,6 \text{ g}$ ) (Figure 45A). La masse maigre était aussi augmentée par l'ovariectomie ( $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 11,9 \text{ g}$  ;  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 40,0 \text{ g}$ ) et par le régime riche en graisse chez les rates OVX ( $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = 19,5 \text{ g}$ ), alors qu'elle était diminuée chez les animaux SH ( $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = -8,6 \text{ g}$ ) (Figure 45B). Un effet cumulé de l'intervention nutritionnelle et de l'ablation des ovaires était également observée sur ce paramètre ( $\Delta_{\text{moyenne des lots d'intérêts} - 4\%, \text{SH}} = 21,5 \text{ g}$ ).

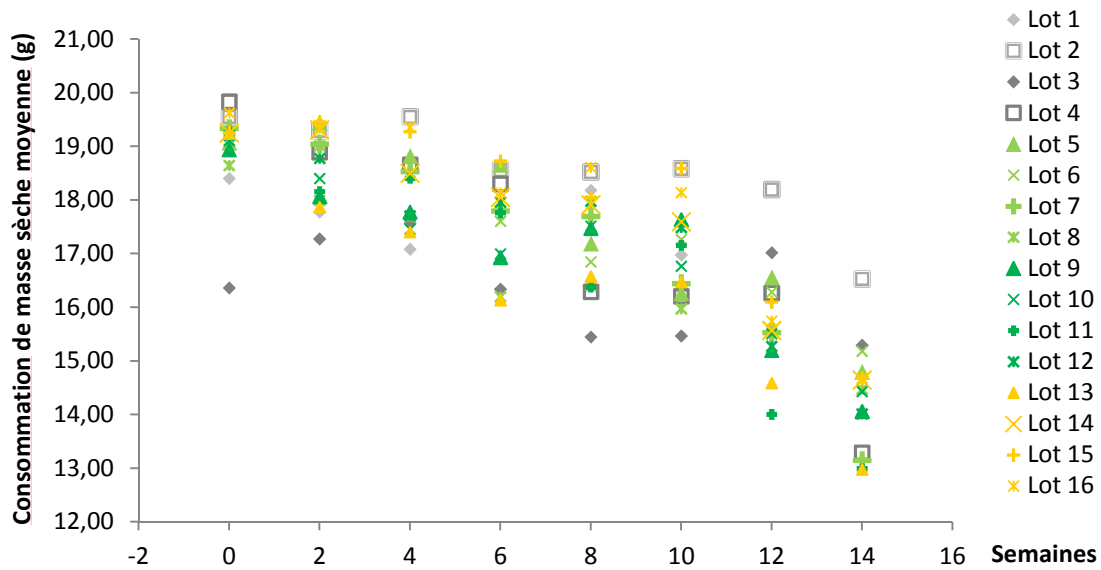
Ainsi, la prise de poids des animaux ovariectomisés était majoritairement due à une prise de masse grasse mais aussi de masse maigre.



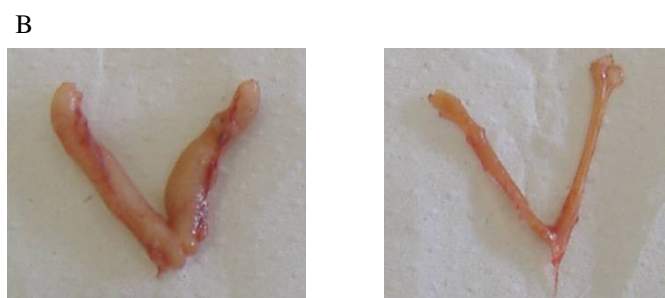


**Figure 45 : Composition corporelle en fin d'expérimentation.**

(A) Masse grasse et (B) masse maigre. J113, 113 jours après l'ovariectomie. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).

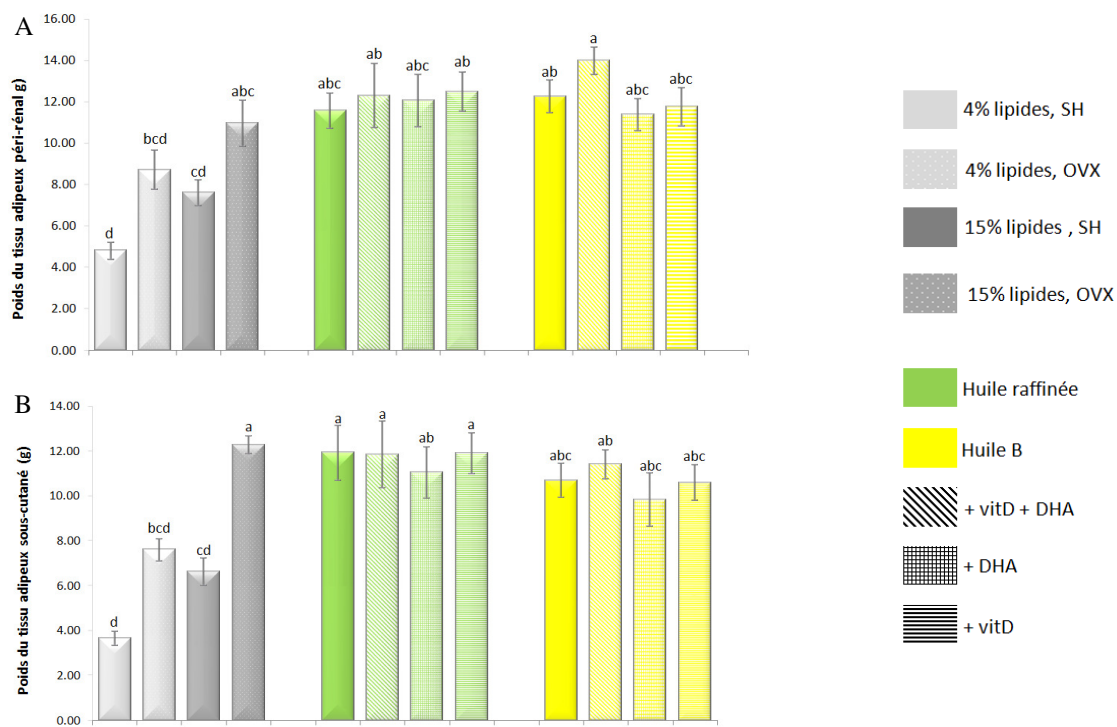


**Figure 46 : Contrôle de consommation.**



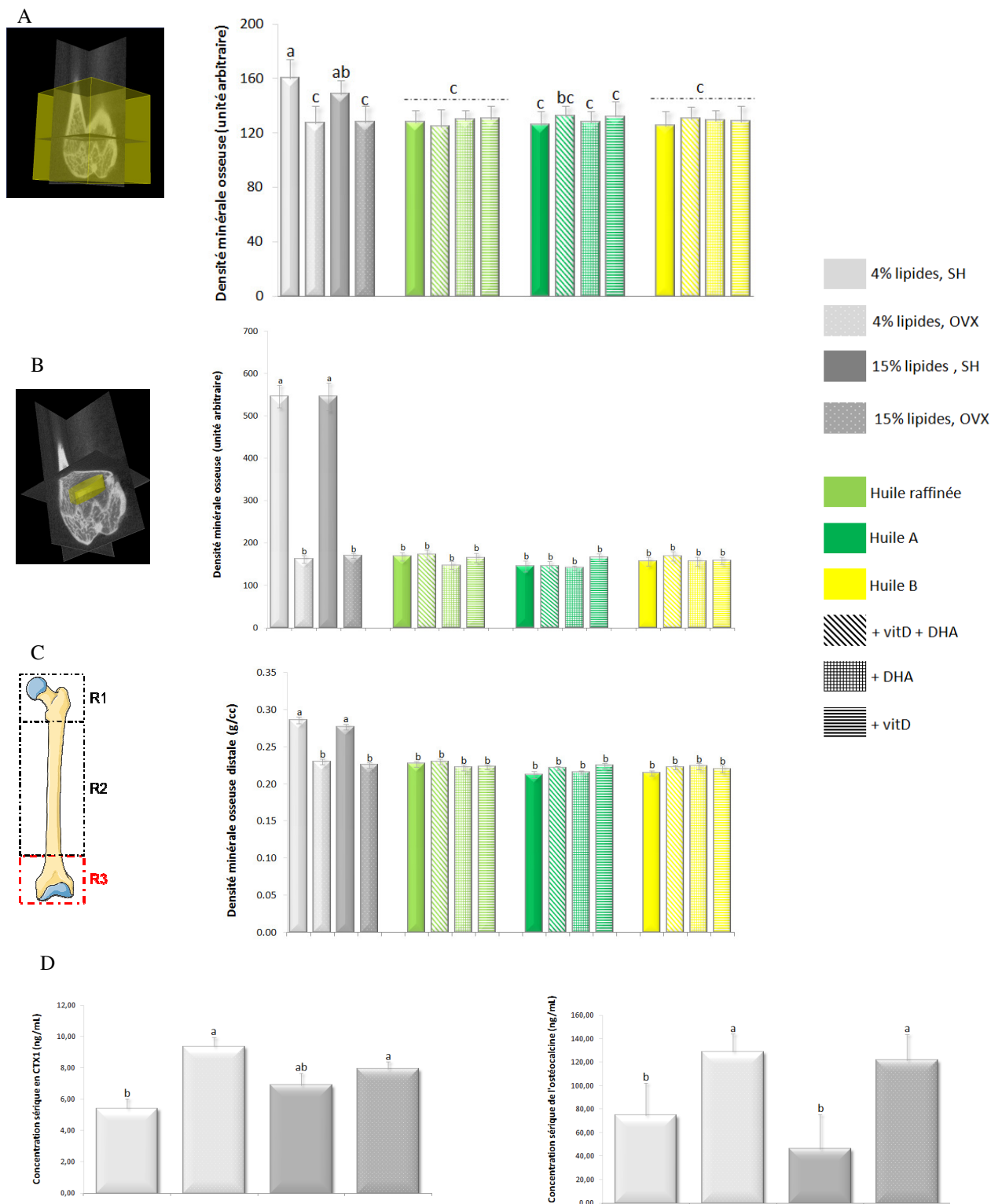
**Figure 47 : Poids et photographies des utérus.**

(A) Poids des utérus et (B) photographies d'un utérus de rat SH à gauche et de rat OVX à droite. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).



**Figure 48 : Poids des tissus adipeux.**

(A) péri-rénal et (B) sous-cutané. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).



**Figure 49 : Densité minérale osseuse et paramètres sériques osseux mesurés chez la rate.**

Densité minérale osseuse (A) distale mesurée au microCT, (B) distale trabéculaire mesurée au microCT et (C) distale mesurée à la DXA et (D) concentrations sériques en CTX1 à gauche et en OCN à droite. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ). CTX1, C-telopeptide of type 1 collagen; OCN, ostéocalcine.

### 3-2-3- Contrôle de consommation

Lors du premier contrôle de consommation, effectué 17 jours (J17) après l'opération, 2 différences significatives étaient à noter : le lot 15% SH consommait significativement moins que l'ensemble des autres lots (lot 15% SH :  $16,36 \text{ g} \pm 0,70$  par rapport aux autres lots :  $19,30 \pm 0,05 \text{ g}$  ;  $p < 0,0001$ ). De plus, le lot 15% OVX ingérait plus d'aliment que le lot 4% SH (15%, OVX :  $20,01 \pm 0,20 \text{ g}$  ; 4%, SH :  $18,58 \pm 0,21 \text{ g}$  ;  $p = 0,009$ ) (Figure 46).

Au cours de l'étude, une diminution de la prise alimentaire a été constatée pour tous les lots pour atteindre une consommation finale moyenne à J115 de  $14,52 \pm 0,16 \text{ g}$ . A J115, les lots SH consommaient significativement plus de régime que certains lots OVX (lots 15% OVX ; HO raff + DHA ; HO A + DHA et HO B ;  $p < 0,0001$ ).

### 3-2-4- Poids des organes

#### 3-2-4-1- Poids de l'utérus

Les poids des utérus des lots des animaux SH ( $735 \text{ mg} \pm 32 \text{ mg}$ ) et OVX ( $137 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ ) étaient significativement différents ( $p < 0,0001$ ) (Figure 47A et B). Ceci validait la qualité de l'intervention chirurgicale.

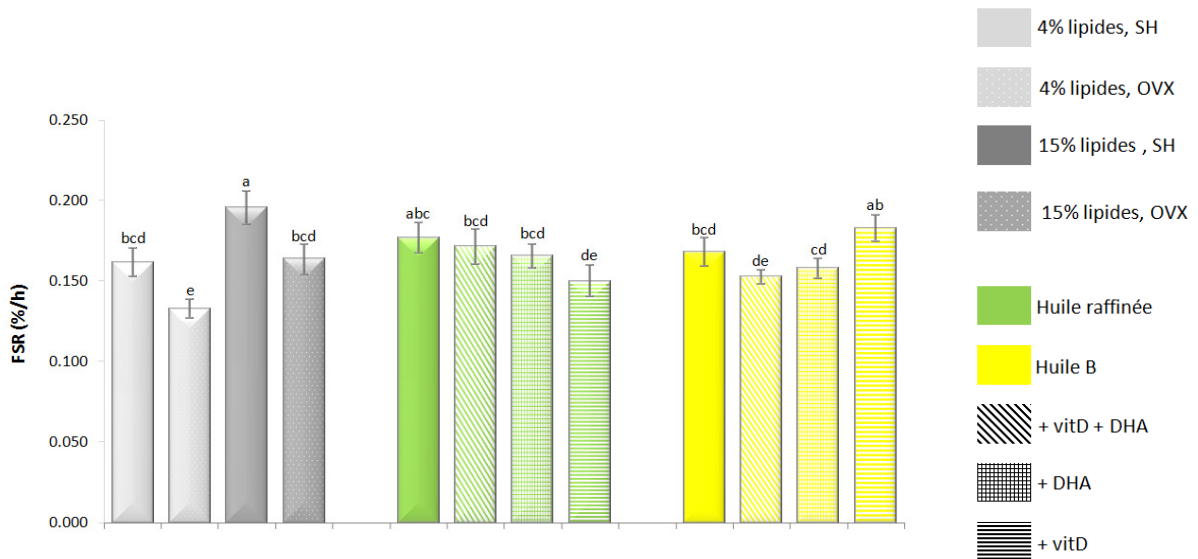
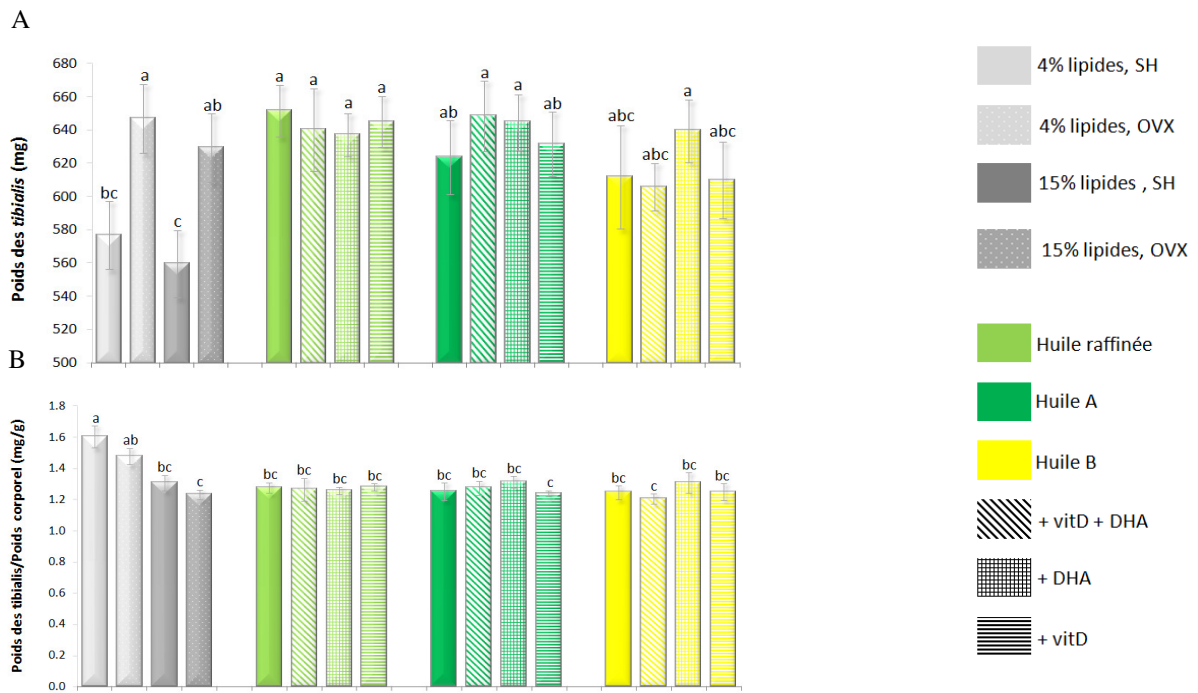
#### 3-2-4-2- Poids des tissus adipeux sous cutané et péri-rénal

Les tissus adipeux sous cutané et péri-rénal ont été prélevés chez les animaux dont les muscles ont été récupérés (Figure 42). L'ovariectomie (tissu adipeux péri-rénal :  $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 3,9 \text{ g}$  et  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 3,4 \text{ g}$  ; tissu adipeux sous-cutané :  $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 3,9 \text{ g}$ ,  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 5,7 \text{ g}$ ), ainsi que le régime riche en graisses (tissu adipeux péri-rénal :  $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = 2,8 \text{ g}$  et  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = 2,2 \text{ g}$  ; tissu adipeux sous-cutané :  $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = 3,0 \text{ g}$  et  $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = 4,7 \text{ g}$ ) engendraient une augmentation du poids des tissus adipeux (Figure 48). En ce qui concerne les lots de rats ayant consommé de l'huile d'olive, aucune différence significative n'était observée.

### 3-2-5- Les paramètres osseux

#### 3-2-5-1- La densité minérale osseuse

Les analyses réalisées au microCT et à la DXA ont mis en évidence l'impact délétère de la castration sur la BMD (Figure 49A, B et C). La qualité des huiles incorporées dans les régimes alimentaire ne permettait pas de discriminer les différents lots expérimentaux. En ce



qui concerne la BMD trabéculaire, une perte de 68,1 à 75,1% par rapport au lot contrôle 4% SH a été observée.

#### 3-2-5-2- Paramètres sériques

Les dosages de CTX1, témoin de la résorption osseuse, et d'OCN, qui reflète la formation osseuse, ont été réalisés sur les 28 animaux des 4 premiers lots. Ces paramètres étaient augmentés chez les animaux ovariectomisés (sauf entre les lots 15% SH et 15% OVX pour le paramètre CTX1) ( $p=0,003$  et  $p<0,0001$  respectivement) (Figure 49D), ce qui révélait une accélération du remodelage osseux.

### 3-2-6- Les paramètres musculaires

#### 3-2-6-1- Poids des muscles

Les poids des muscles étaient semblables entre les lots d'intérêt (ayant consommé de l'huile d'olive). Cependant, il est intéressant de noter que les animaux OVX présentaient des masses musculaires plus importantes que les animaux SH (Figure 50A). Les différences de poids des *tibialis anterior* entre les lots 4% SH et 15% SH ( $\Delta_{15\% \text{ SH} - 4\% \text{ SH}} = -17 \text{ mg}$ ) et 4% OVX et 15% OVX ( $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 4\% \text{ OVX}} = -18 \text{ mg}$ ) étaient similaires. De même, des écarts identiques ont été observés entre les lots 4% SH et 4% OVX ( $\Delta_{4\% \text{ OVX} - 4\% \text{ SH}} = 70 \text{ mg}$ ) et 15% SH et 15% OVX ( $\Delta_{15\% \text{ OVX} - 15\% \text{ SH}} = 70 \text{ mg}$ ). Ces variations observées correspondaient à une diminution de 3% du poids des muscles *tibialis anterior* avec le régime riche en graisses et une augmentation de 12% avec l'ovariectomie, par rapport au lot témoin 4% SH. Les différences entre les lots pour les masses musculaires (*soleus*, *plantaris*, *gastrocnemius* et *quadriceps*) étaient similaires à celles du *tibialis anterior*.

De façon intéressante, une réduction du rapport entre le poids des *tibialis* et le poids corporel des animaux a été mise évidence lors de la consommation d'un régime riche en graisse (Figure 50B).

#### 3-2-6-2- Synthèse protéique musculaire

La synthèse protéique musculaire était augmentée avec la consommation d'un régime riche en graisses et diminuée avec l'ovariectomie (15% SH,  $0,195 \pm 0,010 \text{ \%}/\text{h}$ ; 4% OVX,  $0,133 \pm 0,005 \text{ \%}/\text{h}$  vs 4% SH,  $0,161 \pm 0,008 \text{ \%}/\text{h}$ ;  $p= 0,005$  et  $p=0,020$  respectivement) (Figure 51). Les deux effets s'annulaient dans le lot 15% OVX, la synthèse protéique redevenant équivalente au lot témoin 4% SH (15% OVX,  $0,163 \pm 0,009 \text{ \%}/\text{h}$ ;  $p>0,05$ ).



Tous les lots recevant de l'huile d'olive étaient équivalents statistiquement au lot contrôle 15% OVX. Il est important de souligner que l'enrichissement en vitamine D diminuait significativement la synthèse protéique avec l'huile d'olive raffinée (HO raff :  $0,177 \pm 0,009$  %/h vs HO raff + vitD :  $0,150 \pm 0,010$  %/h ;  $p=0,024$ ) et l'augmentait (non significativement) avec l'huile d'olive vierge (HO B,  $0,168 \pm 0,009$  %/h vs HO B + vitD,  $0,183 \pm 0,008$  %/h ;  $p>0,05$ ). Les synthèses protéiques musculaires des lots HO raff et HO B étaient comparables ( $p>0,05$ ). Cependant, la comparaison des lots enrichis en vitamine D a permis de mettre en évidence que la synthèse protéique musculaire du lot HO B + vitD était supérieure à celle du lot HO raff + vitD ( $p=0,007$ ).

### 3-3- Discussion

Dans cette étude, la pesée des utérus a permis de valider le modèle de castration comme décrit dans la littérature (Puel, Quintin et al. 2004). De plus, comme déjà montré, l'ovariectomie (Puel, Quintin et al. 2004) et une alimentation riche en graisses (Shen, Chen et al. 2014) induisaient une augmentation du poids des animaux, effets qui se cumulaient chez les animaux ovariectomisés et soumis à un régime riche en graisses.

Cette prise de poids était associée à une moindre consommation alimentaire chez les rates ovariectomisées. En effet, l'ovariectomie et la consommation d'un régime riche en graisses pourraient être à l'origine d'une diminution de la dépense énergétique qui conduisait à une prise de poids (Storlien, James et al. 1986; Rogers, Perfield et al. 2009). L'huile d'olive ou les différentes suppléments étudiées n'avaient pas d'impact sur la consommation alimentaire ou sur la prise de poids. De façon inattendue, les ingesta diminuaient au cours de l'expérimentation dans tous les lots étudiés.

Les analyses de composition corporelle ont mis en évidence que la prise de poids était majoritairement causée par une prise de masse grasse (Lizcano and Guzman 2014; Shen, Chen et al. 2014) et ce de façon équivalente entre les lots recevant les huiles d'olive. Des variations similaires entre les lots étaient observées en ce qui concerne la masse des deux tissus adipeux prélevés et la masse grasse corporelle totale. Il est intéressant de noter que la prise de poids était aussi causée par un gain de masse maigre. Même si le test statistique ne donnait qu'une tendance ( $p=0,062$ ), le poids des *tibialis anterior* présentait des différences équivalentes à la masse maigre entre les lots. Ce phénomène, décrit dans la littérature, est reversé par l'administration d'estrogènes (Pighon, Barsalani et al. 2010; Ngo Sock, Cote et al. 2013). Cette augmentation du poids des *tibialis anterior* pourrait être due à la prise de poids



Référence	Modèle	Quantité de DHA testée	Source du DHA	Effets
Données de notre étude	Rates Wistar, de 8 mois 1/2, SH ou OVX	0,036% de Marinol dans le régime soit 0,0162% de DHA 0,108% des lipides totaux 9,7 mg/kg BW/j 0,162 g DHA/kg régime 2,8 mg de DHA/rat/j	Marinol (45% de DHA)	
	Rats Long Evans mâles, de 2 jours	1% des lipides totaux 0,1% du régime	Non précisée	Corrélation positive entre la BMC fémorale et le DHA
Poulsen RC 2007	Rates Sprague Dawley de 7 mois SH ou OVX	0,5 g/kg BW/j 0,7 à 0,9% du régime	DHA ethyl ester 80% purity 01177B-E80 Sammark, China	Atténuation de la perte de BMC induite par l'OVX
Matsushita, Barrios et al. 2008	Rates Sprague Dawley, 12 mois, SH ou OVX	4,32 g/kg de régime 0,432% du régime	Huile de poisson (alose tyran) contenant 10,8% de DHA	Meilleure BMC chez les individus OVX Augmentation de la quantité d'os formé
Watkins, Li et al. 2006	Rates Sprague Dawley, 3 mois, SH ou OVX	0,11 ; 3,53 ; 6,51 ; 6,62 ; 11,59 g DHA/kg régime 0,011 (témoïn sans supplémentation) à 1,159% du régime	DHASCO oil (DHA-rich single-cell oil, Martek Biosciences, Baltimore, MD, USA)	Amélioration de la BMC avec les faibles rapports $\omega 6/\omega 3$
Sun, Krishnan et al. 2003	Souris Balb/c de 8 semaines SH ou OVX	4,35 g de DHA/kg de régime 0,435% du régime	Huile de poisson	Limitation de la perte osseuse induite par l'OVX Inhibition de la genèse ostéoclastique dans des splénocytes Diminution de l'activité des cytokines pro-inflammatoires
Bhattacharya, Rahman et al. 2007	Souris C57BL/6 de 12 mois	0,87% de DHA dans régime	Huile de poisson (MP Biomedicals, Irvine, CA)	Maintien de la BMD fémorale et tibiale Inhibition de la genèse ostéoclastique après mise en culture de cellules de la moelle Diminution de l'activité des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ et IL-6) dans des splénocytes activés
Bonnet and Ferrari 2011	Souris C57BL/6J de 12 semaines	0,13 g de DHA/kg de régime 0,013% du régime 0,455 mg de DHA/souris/j	Huile d'anchois, de sardines et de thon	Amélioration du volume de l'os trabéculaire de la vertèbre caudale à l'âge de 8 mois

**Tableau 5 : Etudes animales sur l'effet de l'acide docosahéxaénoïque sur le tissu osseux.**

corporel. En effet, le rapport poids des *tibialis anterior* sur poids corporel était statistiquement équivalent pour les lots de rates ovariectomisées consommant un régime riche en graisses par rapport au lot contrôle 15% SH. Des résultats similaires, avec un rapport poids des muscles sur poids corporel non modifié par l'ovariectomie, étaient obtenus par Fisher et coll. (Fisher, Hasser et al. 1998). Il est important de souligner que la diminution de la synthèse protéique associée à l'ovariectomie et l'augmentation due à un régime riche en graisses se compensaient dans le lot témoin ovariectomisé ayant reçu un régime riche en graisses (15% OVX). Même si l'activation du VDR semble augmenter la synthèse protéique musculaire (Salles, Chanet et al. 2013), dans la présente étude, la vitamine D avait un impact différent sur la synthèse protéique musculaire selon la matrice huilière. On peut supposer que l'action synergique de la vitamine D et des polyphénols de l'huile d'olive provoquait une augmentation de la synthèse protéique dans le *tibialis anterior* chez les animaux ovariectomisés.

La BMD était altérée chez les animaux ovariectomisés. Ce résultat est à mettre en relation avec l'augmentation de la formation et de la résorption osseuse mise en évidence dans le lot témoin 15% OVX, qui suggère une intensification du remodelage osseux, phénomène bien décrit dans la littérature (Wronski, Cintron et al. 1988; Kalu 1991). Aucune huile ou supplémentation ne pouvait être discriminée à partir du critère principal qu'était la BMD.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer, au moins en partie, les résultats obtenus. Premièrement, le choix du compartiment osseux est crucial. En effet, Francisco et coll. (Francisco, Yu et al. 2011) observaient une meilleure sensibilité du tibia proximal à l'ovariectomie par rapport au fémur distal, au fémur proximal et aux vertèbres lombaires L3 et L4 chez le rat. Or notre étude a été menée sur le fémur distal.

Dans notre expérimentation, la quantité de calcium a été réduite de moitié (soit 0,25% du régime) par rapport aux recommandations chez le rat (Reeves, Nielsen et al. 1993). En effet, dans les investigations ciblant la santé osseuse, les apports calciques sont classiquement réduits pour accentuer les effets de l'ovariectomie, notamment lorsque les études sont menées sur des rats jeunes. Une équipe japonaise (Omi and Ezawa 2011) montrait que des rats consommant moins de 0,3% de calcium souffraient d'ostéoporose. Une autre équipe rapportait que la BMD de rates ovariectomisées ayant consommé 0,01% ou 0,1% de calcium était inférieure à celle des animaux soumis à 0,6% (contrôle), 1,2% ou 2,4% de calcium (Agata, Park et al. 2013). Aussi, il est très probable que la réduction des apports calciques pouvait accentuer la perte osseuse des rates étudiées dans le présent travail, et que le calcium pouvait être un facteur limitant pour l'effet des molécules testées.

Acides gras (g/100 g)	Denomination	Régime huile témoin	Régime huile d'olive A
<b>Saturés</b>			
		13,43	12,50
C16:0	Palmitique	7,12	8,79
C18:0	Stéarique	2,42	2,21
C20:0	Arachidique	1,44	0,68
C22:0	Béhénique	1,45	0,47
C17:0	Margarique		0,03
C24:0	Lignocérique	1,00	0,31
<b>Monoinsaturés</b>			
		56,86	73,37
C18:1 $\omega$ 9	Oléique	53,35	72,11
C16:1 $\omega$ 7	Palmitoléique	0,30	0,40
C20:1	Eicosénoïque	2,93	0,78
C22:1		0,29	0,08
<b>Polyinsaturés</b>			
		27,13	12,38
C18:2 $\omega$ 6	Linoléique	22,00	10,49
C18:3 $\omega$ 3	Linoléinique	5,13	1,89
$\omega$ 6/ $\omega$ 3		4,29	5,56
Sat/Insat		0,16	0,15
Tocophérols (mg/100g)		40,50	20,33
Vitamine K ( $\mu$ g/100g)		75,35	44,29
Stérols totaux (mg/100g)		244,00	168,47

**Tableau 6 : Composition de l'huile du régime témoin et de l'huile du régime huile d'olive A.**

Ajouté à cela, il est à noter au regard des travaux récents de la littérature, que la quantité de DHA utilisée dans notre étude (0,036% du régime) était peut-être trop faible. En effet, les effets bénéfiques sur l'os étaient observés avec des quantités de DHA de 0,1 à 1,16% du régime (Tableau 5) (Sun, Krishnan et al. 2003; Watkins, Li et al. 2006; Bhattacharya, Rahman et al. 2007; Poulsen, Firth et al. 2007; Matsushita, Barrios et al. 2008; Li, Seifert et al. 2010). Dans une étude chez la souris avec une quantité de DHA plus semblable à la nôtre, même si le volume osseux trabéculaire était augmenté chez les souris à 8 mois, la BMD vertébrale était inférieure aux animaux contrôles à 17 mois (Tableau 5) (Bonnet and Ferrari 2011).

Les compositions en acides gras, en vitamine E et en vitamine K du mélange huile A et du mélange témoin ont été estimées à l'aide du dosage des acides gras de l'huile A effectué par la société Lesieur et des tables de composition des aliments (La composition des aliments Tableaux des valeurs nutritives de Souci, Fachmann et Kraut) (Tableau 6).

Le rapport acides gras saturés/insaturés était équivalent entre les régimes huile d'olive et témoins (0,15 pour le mélange huile A et 0,16 pour le mélange huile de colza et huile d'arachide), ce qui contribuait sûrement aux résultats obtenus. En effet, l'apport en acides gras saturés était inversement associé à la densité osseuse chez l'Homme (Corwin, Hartman et al. 2006). De plus, le rapport AGPI  $\omega 6/\omega 3$  était supérieur pour le mélange huile A (5,56) par rapport à celui du mélange colza/arachide du régime témoin (4,29). Or, la BMC des fémurs était significativement plus importante chez des rats consommant des régimes avec des ratios AGPI  $\omega 6/\omega 3$  plus faibles (Watkins, Li et al. 2006). Selon les compositions moyennes des huiles de colza, d'arachide et d'olive, les quantités de vitamine E et de vitamine K seraient plus importantes dans le régime témoin (+ 99% pour la vitamine E et + 70% pour la vitamine K) (Tableau 6). Les données de la littérature mettent en évidence un effet bénéfique de la vitamine E sur le tissu osseux dans des modèles animaux d'ostéoporose grâce à ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Chin and Ima-Nirwana 2014). En ce qui concerne la vitamine K, les données sont plus controversées (Guralp and Erel 2014). Cependant, il est important de souligner qu'elle joue un rôle dans la carboxylation de l'ostéocalcine (Cranenburg, Schurgers et al. 2007).

Il est possible que la durée de l'étude ait été trop longue, particulièrement pour le tissu osseux. Généralement, les études sur le modèle de la rate Wistar ovariectomisée sont conduites pendant 12 semaines (Liu, Li et al. 2005; Puel, Mardon et al. 2007; Puel, Mardon et al. 2008; Zhao, Li et al. 2013; Ohyama, Matsushita et al. 2014). D'autres études ont été menées pendant 2 à 14 semaines post-ovariectomie (Puel, Quintin et al. 2004; Ishimi,



Sugiyama et al. 2006; Puel, Mathey et al. 2006; Uchiyama and Yamaguchi 2006; Horcajada, Habauzit et al. 2008; Yamaguchi, Lai et al. 2008; Saleh and Saleh 2011; Nakanishi, Iitsuka et al. 2013). Dans un modèle très équivalent au nôtre : rate Wistar âgée de 8 mois et ovariectomisée, les paramètres microarchitecturaux de la métaphyse du tibia proximal ont été évalués mensuellement pendant 6 mois (Boyd, Davison et al. 2006), conformément à la publication de Francisco et coll. (Francisco, Yu et al. 2011), alors que nos mesures ont été effectuées sur le fémur distal. Il a été mis en évidence que l'ovariectomie induisait une diminution de 33% du volume osseux rapporté au volume total du tissu (BV/TV) un mois après l'opération, de 72% trois mois après l'opération par rapport à la mesure initiale, pour ensuite atteindre un plateau (Boyd, Davison et al. 2006). Notre étude visant à étudier les paramètres osseux mais aussi des tissus musculaire et adipeux, les prélèvements ont été effectués environ 19 semaines après l'opération et se situait après la stabilisation de la perte osseuse, donc après la phase qui pourrait être ralentie par les interventions nutritionnelles. D'ailleurs, les données de BMD trabéculaire issues de la présente étude étaient similaires aux données de BV/TV de Boyd et coll. (Boyd, Davison et al. 2006) avec une perte de 68,1 à 75,1% par rapport au lot témoin pseudo-opéré soumis à un régime contrôle (4% SH).

### 3-4- Conclusion et perspectives

Aucun lot d'huile d'olive vierge, ni aucune supplémentation en vitamine D et/ou DHA n'a pu être discriminé en se basant sur le critère principal qu'était la BMD. Ceci pourrait être dû au choix du compartiment osseux, à la réduction des apports calciques, aux concentrations de DHA testées, au choix des huiles du régime témoin, à la durée de l'étude ou à une association de ces différentes conditions.

Les données concernant la synthèse protéique musculaire tendent à supposer qu'il existe une synergie entre la vitamine D et les polyphénols de l'huile d'olive pour augmenter ce paramètre chez les animaux ovariectomisés. Les mécanismes d'action de l'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D sur le métabolisme musculaire feront l'objet de futures investigations.

Une nouvelle expérimentation animale a ensuite été mise en place en prenant en considération toutes les hypothèses formulées. Ainsi, l'expérimentation était centrée sur le paramètre principal : la densité minérale osseuse. Pour cela, la durée de la mise sous régime après ovariectomie a été limitée. Pour un gain de temps, le modèle animal a été changé pour



utiliser la souris C57Bl/6. Pour le régime témoin, une seule huile a été testée, et non un mélange et la quantité de calcium n'a pas été réduite.





# Publication n°2

## Olive oil and vitamin D synergistically prevent bone loss in mice

La première étude animale n'ayant pas permis de sélectionner une huile d'olive enrichie d'intérêt, une seconde étude pré-clinique a été mise en place.

Pour obtenir des résultats rapidement, le modèle de la souris ovariectomisée a été choisi puisque d'après la littérature une exposition d'un mois à un régime alimentaire donné suffit pour observer des modifications significatives des principaux biomarqueurs osseux. Il s'agit d'un modèle utilisé en routine au laboratoire. Cependant, le modèle souris ne permettait pas de réaliser toutes les mesures prévues sur le modèle rat, notamment en ce qui concerne les dosages sériques et plasmatiques. Cette étude pré-clinique ciblait donc plus spécifiquement le tissu osseux, avec comme critère principal la densité minérale osseuse.

Toutes les hypothèses permettant d'expliquer, au moins en partie, les résultats obtenus lors de la première étude ont été prises en compte pour établir le protocole expérimental. Ainsi, contrairement à l'expérimentation chez la rate ovariectomisée, la quantité de calcium n'a pas été diminuée pour ne pas accentuer les effets délétères de l'ovariectomie et masquer les bénéfices potentiels des régimes expérimentaux sur le tissu osseux. De plus, les huiles ont été étudiées pures et non en mélange pour s'assurer d'avoir des profils lipidiques bien distincts. Pour ne pas multiplier les lots d'animaux, une seule huile d'olive a été étudiée. La réalisation d'études de vieillissement après différentes méthodes de stockage (congélation, température ambiante...) a mis en évidence la stabilité de l'huile A au cours du temps, par rapport à l'huile B. Pour évaluer l'impact des polyphénols, une partie des animaux a été exposée à cette huile dans sa forme raffinée. Les effets de ces deux huiles ont été comparés à ceux de l'huile de maïs (considérée comme témoin négatif de par sa richesse en acides gras saturés) et de l'huile de poisson (considérée comme témoin positif pour sa quantité d'AGPI  $\omega$ 3).



# **1- Présentation de la publication**

## **1-1- Introduction**

La consommation d'un régime méditerranéen et plus particulièrement d'huile d'olive a été associée au maintien de la santé osseuse. Les polyphénols étant supposés être à l'origine de l'effet protecteur de l'huile d'olive sur l'os, nous avons comparé les effets de la consommation d'huile d'olive raffinée (déplétée en polyphénols) à celle d'une huile d'olive vierge riche en polyphénols sur le métabolisme osseux. De plus, le régime méditerranéen étant caractérisé par une forte consommation de poisson, nous avons formulé l'hypothèse d'une possible synergie avec la vitamine D3.

## **1-2- Matériel et méthodes**

Six lots de 12 souris C57Bl/6J âgées de 8 semaines, équivalents en poids, masse grasse et masse maigre ont été constitués. Les souris ont été pseudo-opérées (SH) ou ovariectomisées (OVX) puis soumises à un régime contenant 10% d'huile d'olive raffinée (RO) ou d'huile d'olive vierge (VO) formant ainsi les lots RO-SH, RO-OVX, VO-SH et VO-OVX. Deux lots supplémentaires de souris OVX ont reçu un régime enrichi en vitamine D3 (VD3 ; 5000 UI au lieu de 1000 UI dans les 4 autres lots) : RO-OVX-VD3 et VO-OVX-VD3. Après 4 semaines d'exposition pendant lesquelles le poids, la consommation et la composition corporelle ont été régulièrement mesurés, le sérum, les fémurs, l'utérus et la rate ont été prélevés.

## **1-3- Résultats**

Conformément aux données précédentes, l'ovariectomie induisait une augmentation du renouvellement osseux conduisant à une perte osseuse. De plus, l'expression des marqueurs du stress oxydant était augmentée chez les animaux ovariectomisés. L'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D3 permettait de limiter la perte osseuse induite par l'ovariectomie. Ceci s'explique, au moins partiellement, par une réduction de l'expression génique des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation.

## **1-4- Conclusion**

Nos données suggèrent un effet protecteur de l'huile d'olive vierge, source de polyphénols et vecteur de vitamine D3, sur le métabolisme osseux, en améliorant les statuts oxydatif et inflammatoire.



RESEARCH ARTICLE

# Olive Oil and Vitamin D Synergistically Prevent Bone Loss in Mice

Camille Tagliaferri<sup>1,2,3</sup>, Marie-Jeanne Davicco<sup>1,2</sup>, Patrice Lebecque<sup>1,2</sup>, Stéphane Georgé<sup>4</sup>, Marie-Jo Amiot<sup>5,6,7</sup>, Sylvie Mercier<sup>1,2</sup>, Amélie Dhaussy<sup>3</sup>, Alain Huertas<sup>3</sup>, Stéphane Walrand<sup>1,2</sup>, Yohann Wittrant<sup>1,2</sup>, Véronique Coxam<sup>1,2\*</sup>

1. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1019, Unité de Nutrition Humaine, Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 2. Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 3. Lesieur, 29 quai Aulagnier, 92665 Asnières-sur-Seine cedex, France, 4. Biochemistry Department, Centre Technique de Conservation des Produits Agricoles (CTCPA), Site Agroparc, 84911 Avignon Cedex 9, France, 5. INRA, UMR 1260, Marseille, France, 6. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1260, "Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique", Marseille, France, 7. Université d'Aix-Marseille, Faculté de Médecine, Marseille, France

\*[veronique.coxam@clermont.inra.fr](mailto:veronique.coxam@clermont.inra.fr)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Tagliaferri C, Davicco M-J, Lebecque P, Georgé S, Amiot M-J, et al. (2014) Olive Oil and Vitamin D Synergistically Prevent Bone Loss in Mice. PLoS ONE 9(12): e115817. doi:10.1371/journal.pone.0115817

**Editor:** Luc Malaval, Université de Lyon - Université Jean Monnet, France

**Received:** July 24, 2014

**Accepted:** November 27, 2014

**Published:** December 31, 2014

**Copyright:** © 2014 Tagliaferri et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

**Funding:** CT was funded by a Conventions Industrielles de Formation par la REcherche grant (CIFRE; n° 2011/99) from the French National Association for Research and Technology (<http://www.anrt.asso.fr/>) in partnership with Lesieur. This work was supported by both the CIFRE grant and the pOLIVd3 ANR (French National Research Agency; <http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) program ANR-10-ALIA-0008. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Camille Tagliaferri, Amélie Dhaussy and Alain Huertas are employed by the commercial company Lesieur. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

## Abstract

As the Mediterranean diet (and particularly olive oil) has been associated with bone health, we investigated the impact of extra virgin oil as a source of polyphenols on bone metabolism. In that purpose sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mice were subjected to refined or virgin olive oil. Two supplementary OVX groups were given either refined or virgin olive oil fortified with vitamin D3, to assess the possible synergistic effects with another liposoluble nutrient. After 30 days of exposure, bone mineral density and gene expression were evaluated. Consistent with previous data, ovariectomy was associated with increased bone turnover and led to impaired bone mass and micro-architecture. The expression of oxidative stress markers were enhanced as well. Virgin olive oil fortified with vitamin D3 prevented such changes in terms of both bone remodeling and bone mineral density. The expression of inflammation and oxidative stress mRNA was also lower in this group. Overall, our data suggest a protective impact of virgin olive oil as a source of polyphenols in addition to vitamin D3 on bone metabolism through improvement of oxidative stress and inflammation.

## Introduction

Osteoporosis, defined as “a systemic skeletal disease characterized by low bone mass and micro-architectural deterioration of bone tissue with a consequent



increase in bone fragility and susceptibility to fracture” [1], is a leading cause of morbidity and mortality in the elderly. This is why, with an ageing population throughout much of the world, improving prevention of such a disease will play a major role in the sustainability and implementation of good personal and public health care. In this light, there is a growing interest among the medical scientists in the search of new strategies, including dietary approaches. Although calcium and vitamin D have been the primary focus of nutritional prevention, analysis of ongoing challenges has highlighted that the human diet contains, in addition to essential macronutrients, a complex array of naturally occurring bioactive micronutrients that may confer significant long term health benefits, including in the management of bone health. This issue probably explains the north-south gradient of fractures in Europe, with a lower incidence in the Mediterranean area [2–4]. Indeed, Perez-Lopez et al. [5] have highlighted the benefits for bone of the Mediterranean diet (characterized by a high consumption of plant foods, low to moderate intakes of fish, poultry, dairy products and wine, a low amount of red meat, olive oil being the major source of fat, [6]) such a dietary pattern being thought to be related to the longevity of Mediterranean people. In the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition study, increased adherence to the Mediterranean diet appears to protect against hip fracture occurrence [7]. In the same way, varied diets based on Mediterranean diet patterns have been reported to be positively associated with bone mineral density (BMD) in both pre- and post-menopausal healthy Spanish women [8]. In a holistic dietary approach, Kontogianni et al. [9] have shown that adherence to a dietary pattern close to the Mediterranean diet, i.e., high consumption of fish and olive oil and low red meat intake, was positively related to bone mass, suggesting potential bone-preserving properties of this pattern throughout adult life. It is important to know that more than 200 chemical compounds are found in olive oil, including phenols (20–500 mg/L), sterols, squalene and tocopherols [10–12], in addition to oleic acid (C18:1) (55–83%), palmitic acid (C16:0) (7.5–20%) and linoleic acid (C18:2) (3.5–21%), as stated in the Codex Alimentarius [13]. Even though olive oil composition varies according to the cultivation area, the cultivar, the harvesting and storage systems, the ripening degree of the fruits, and the processing practices [10, 14, 15], scientists have reported that both olives [16] and olive oil [17, 18] can prevent bone loss in ovariectomized rats or mice [19]. Among olive polyphenols, oleuropein and hydroxytyrosol may have critical effects on the maintenance of bone health [17, 20–22]. Besides, with regards to fish consumption, it can be a major source of vitamin D (in addition to a specific content in fatty acids). Vitamin D deficiency is actually very common worldwide [23–25] and it is associated with a 77% increased risk of fracture in women with post-menopausal osteoporosis [26]. The pooled analysis published by Bischoff-Ferrari and coworkers concluded that high-dose vitamin D supplementation ( $\geq 800$  IU daily) was somewhat favorable in the prevention of hip fracture and any non-vertebral fracture in persons 65 years of age or older [27].

As vitamin D is lipophilic, supplementation of a lipid matrix such as olive oil is feasible and might be of public interest in the management of bone health. This is





why we investigated the effect of the consumption of olive oil enriched or not with vitamin D, in the ovariectomized mice as a model of post-menopausal osteoporosis. Moreover, because the bone sparing effect of the polyphenols from olive oil has already been highlighted, possible synergy between those micronutrients and vitamin D was studied and compared to the impact of a refined olive oil (depleted in polyphenols) fortified with vitamin D or not.

## Materials & Methods

### Animals

All the experimental procedures were approved by the institution's animal welfare committee (Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne: CEMEAA) and were conducted in accordance with the European's guidelines for the care and use of laboratory animals (2010- 63UE). All efforts were made to minimize animal suffering.

Six weeks old female C57BL/6J mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France) and acclimated for 2 weeks under standard laboratory conditions. They were housed individually, on a 12-h light/dark cycle, in the animal facilities of the Human Nutrition Unit at INRA Research Center (Agreement no. C6334514), with free access to both food and water. After the acclimatization period, the rodents were randomly divided into six groups (n=12/group), although respecting similar average body weight and composition (QMR EchoMRI-900TM, Houston, USA) in each experimental group. At 8 weeks of age, 4 groups of mice were bilaterally ovariectomized (OVX) and 2 batches were sham-operated (SH) under ketamine/xylazine anesthesia, before beginning consumption of the experimental diets (Scientific Animal Food and Engineering (SAFE), Augy, France). Mice were fed a standard diet modified from the AIN-93G powdered diet. 10% of the food was given as either refined olive oil (RO) (RO-SH and RO-OVX groups) or virgin olive oil (VO) (VO-SH and VO-OVX groups). The polyphenol composition of the virgin and refined olive oil is detailed in [Table 1](#). Moreover, 2 groups of ovariectomized mice received 5000 IU/kg diet of vitamin D3 (VD3) (RO-OVX-VD3 and VO-OVX-VD3), VD3 provided in the other diets being 1000 IU/kg diet. Food was distributed every 2 days and provided ad libitum. Food consumption, body weight and body composition were regularly monitored. After 30 days of treatment, blood was collected under anesthesia and allowed to coagulate for 30 min before separation of serum by centrifugation (4000 g, 4°C, 10 min). The serum was aliquoted and stored at -80°C until biochemical analyses were performed. After cervical dislocation, uterus, liver and spleen were weighted. The two femurs of each animal were harvested: one was rapidly frozen in nitrogen and stored at -80°C for RNA analysis, the other one was stored in 10% formaldehyde at 4°C for 5 days before being dried out for microCT analyses.



**Table 1.** Polyphenol composition of the virgin olive oil.

Phenolic group	Phenolic compounds	Virgin olive oil		Refined olive oil
		Quantity (mg/kg)	Standard deviation	Quantity (mg/kg)
Simple phenols				
	Tyrosol	14.61	0.17	n.d
	Hydroxytyrosol	14.15	0.01	n.d
Secoiridoid derivatives				
	Oleuropein-aglycone di-aldehyde	195.63	0.14	n.d
	Oleuropein-aglycone mono-aldehyde	93.55	0.29	n.d
	Ligstroside-aglycone di-aldehyde	199.22	0.26	n.d
Lignan				
	Pinoresinol	65.73	0.09	n.d
Flavonoids				
	Apigenin	1.16	0.02	n.d
	Luteolin	3.21	0.02	n.d
Total		587.26		

n.d., not detected.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.t001

## Analysis

### Phenolic composition analysis

Extraction of phenolic compounds was carried out using one milliliter of syringic acid (0,015 mg/ml in methanol and used as internal standard) which was added at 2.0 g of olive oil before being evaporated under nitrogen. Then 6 mL of a methanol/water (80/20) mixture was added and vigorously mixed during 5 min. To finish, the extraction mixture was centrifuged at 5000 rpm during 25 min. The phenolic compounds were then quantified using an HPLC system (Agilent 1200 series) equipped with a diode array detector. Separation was performed on a column Waters Spherisorb ODS-2 (C18; 5 µm; 4.6 mm × 250 mm) using a ternary gradient elution (water and 0.2% of phosphoric acid; methanol and acetonitrile). The detection was made at 280 nm and the injection volume was 20 µL.

### Bone micro-architecture and bone mineral density analyses

Micro-architecture was investigated using X-ray radiation micro-CT (Viva CT 40, Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland). Scans were performed on the dried femurs at 55 keV with a 10-µm cubic resolution. The secondary spongiosa and associated cortical bone were scanned within the distal metaphysis. Trabecular bone volume (BV/TV, %), trabecular number (Tb.N./mm), trabecular thickness (Tb.Th, µm), trabecular spacing (Tb.Sp, µm), the degree of anisotropy (DA), and the structural model index (SMI) were analyzed. Cortical thickness and porosity, bone surface and area as well as medullary area were determined as well. Moreover, BMD of the primary spongiosa was determined using an eXplore CT 120 scanner (GE Healthcare, Fairfield, CT). Acquisitions were performed with



X-ray tube settings at 100 kV and 50 mA. BMD (mg/cc) was estimated as the mean converted gray-scale level within the region of interest of cortical and trabecular bone.

### Serum Bone Turnover Markers Measurement

Serum PINP (N-terminal propeptide of type I procollagen) levels, a specific and sensitive marker of bone formation, was measured using a mouse competitive enzyme immunoassay (EIA) assay (Immunodiagnostic Systems EURL, Paris, France), according to the manufacturer's protocol. The sensitivity was 0.7 ng/mL. The intra- and inter-assay precisions were 6.4 and 9.2%, respectively.

Serum CTX-1 (collagen type 1 cross-linked C-telopeptide, a bone resorption marker) was determined using a mouse-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Immunodiagnostic Systems EURL, Paris, France), according to the manufacturer's protocol. The detection limit was 2.0 ng/mL. The intra- and inter-assay variations were 5.6 and 10.5%, respectively.

### Taqman Low Density Array

Total RNA from powdered femurs was extracted using TRIzol reagent according to the protocol provided by the manufacturer (Invitrogen Life technology, Carlsbad, CA). After validating the RNA quality, high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems Life technology, Carlsbad, CA) was used to convert RNA into cDNA. Taqman Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems Life technology, Carlsbad, CA) was performed on reverse transcription products, using a 7900 HT Fast Real-Time PCR system (7900HT Fast Real-Time PCR system.). Gene expression was calculated relative to that of the house-keeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using the comparative threshold cycle method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

Sequence references are: Gapdh;Gm12070;Gm10481-Mm03302249\_g1, Trap (Acp5)-Mm00475698\_m1, Alpl-Mm01187117\_m1, Ocn (Bglap;Bglap-rs1;Bglap2)-Mm03413826\_mH, Ccl2-Mm00441243\_g1, Coll1a1-Mm00801666\_g1, Comp-Mm00489490\_m1, Ctsk-Mm00484036\_m1, Esr1-Mm00433147\_m1, Il1b-Mm99999061\_mH, Il6-Mm99999064\_m1, Itgb3-Mm00443980\_m1, Lrp5-Mm00493179\_m1, Mmp2-Mm01253621\_m1, Nos2-Mm00440488\_m1, Pparg-Mm01184322\_m1, Sfrp1-Mm03053883\_s1, Sost-Mm03024247\_g1, osterix (Sp7)-Mm00504574\_m1, osteopontin (Spp1)-Mm00436767\_m1, Tlr2-Mm00442346\_m1, Tlr4-Mm00445273\_m1, Rank (Tnfrsf11a)-Mm00437135\_m1, Opg (Tnfrsf11b)-Mm01205928\_m1, Rankl (Tnfsf11)-Mm00441908\_m1.

### Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Homoscedasticity was checked by Levene's test and the Grubbs test was used to identify outliers using XLStat (Addinsoft, Paris, France). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) using XLStat. When a significant effect was detected, a post



hoc Tukey test was applied to locate pairwise differences between conditions. A *p* value less than or equal to 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

The quality of the experiment was checked, notably castration efficiency was confirmed by uterine atrophy ( $p < 0.0001$ ) in the OVX rodents (RO-OVX:  $13.0 \pm 1.4$  mg; RO-OVX-VD3:  $18.4 \pm 2.4$  mg; VO-OVX:  $12.0 \pm 1.3$  mg; VO-OVX-VD3:  $12.3 \pm 2.6$  mg), compared to what was observed in the SH animals (RO-SH:  $94.8 \pm 17.4$  mg; VO-SH:  $97.0 \pm 9.7$  mg).

### Food consumption

Dietary consumption was evaluated twice during the experiment: 11 days (J11) then 23 days (J23) after the surgery. While the consumption did not statistically differ between the groups at J11 mice ( $3.13 \pm 0.07$ ), surprisingly at J23, the SH mice ate significantly more than the OVX (RO-OVX:  $3.29 \pm 0.12$  g; RO-OVX-VD3:  $3.11 \pm 0.14$  g; VO-OVX:  $3.22 \pm 0.11$  g; VO-OVX-VD3:  $3.09 \pm 0.15$  g vs RO-SH:  $4.05 \pm 0.22$  g; VO-SH:  $3.64 \pm 0.15$  g;  $p < 0.001$ ; ANOVA).

### Body weight and body composition (Fig. 1)

During the experimental period, mean body weight, as well as lean and fat mass, increased in all the experimental groups, which is a good indicator of health. At the end of the investigation, the OVX mice exhibited a higher body weight ( $p < 0.0001$ ) than the SH animals (RO-OVX:  $21.18 \pm 0.29$  g; RO-OVX-VD3:  $20.66 \pm 0.32$  g; VO-OVX:  $21.50 \pm 0.30$  g; VO-OVX-VD3:  $21.24 \pm 0.09$  g vs RO-SH:  $18.60 \pm 0.29$  g; VO-SH:  $18.84 \pm 0.19$  g) (Fig. 1). With regards to the body composition analysis, lean mass was significantly ( $p < 0.0001$ ; ANOVA) increased in the OVX groups compared to the controls whereas fat mass was similar between the groups ( $p > 0.05$ ; ANOVA). Therefore, body weight increases in the OVX groups are likely due to lean mass gain.

### Spleen weight

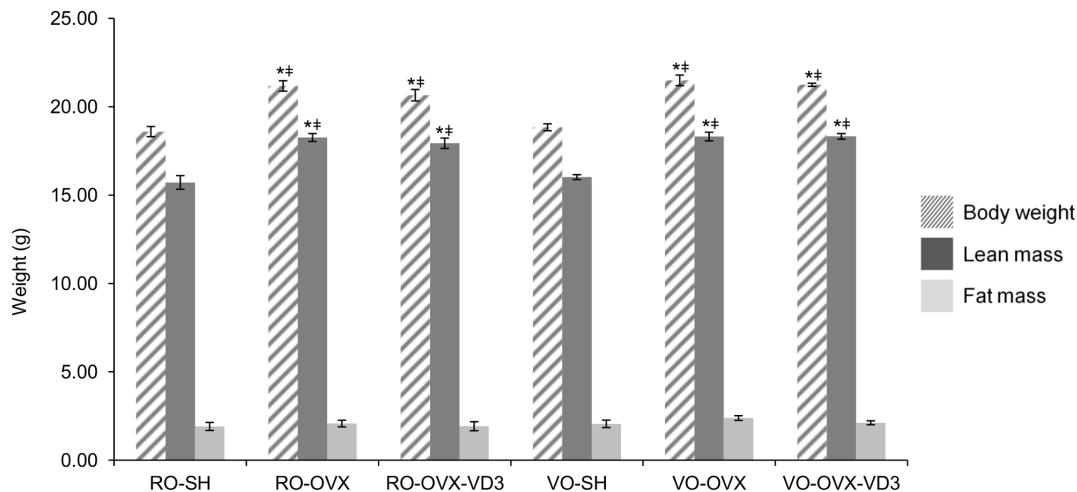
Spleen weight was evaluated as it is a primary indicator of inflammation. As expected, a splenomegaly was observed in OVX mice (RO-OVX:  $71.4 \pm 3.2$  mg; RO-OVX-VD3:  $79.6 \pm 2.6$  mg; VO-OVX:  $73.2 \pm 2.7$  mg; VO-OVX-VD3:  $76.1 \pm 4.4$  mg vs RO-SH:  $57.7 \pm 2.2$  mg; VO-SH:  $51.4 \pm 1.7$  mg;  $p < 0.0001$ ; ANOVA)). This parameter was not modified by any of the diet as all the OVX animals exhibited same values.

### Bone parameters (Fig. 2, table 2)

As expected in such an animal model, BMD of the 3 compartments of interest (i.e. cortical bone, primary and secondary spongiosa) was impaired in all the OVX







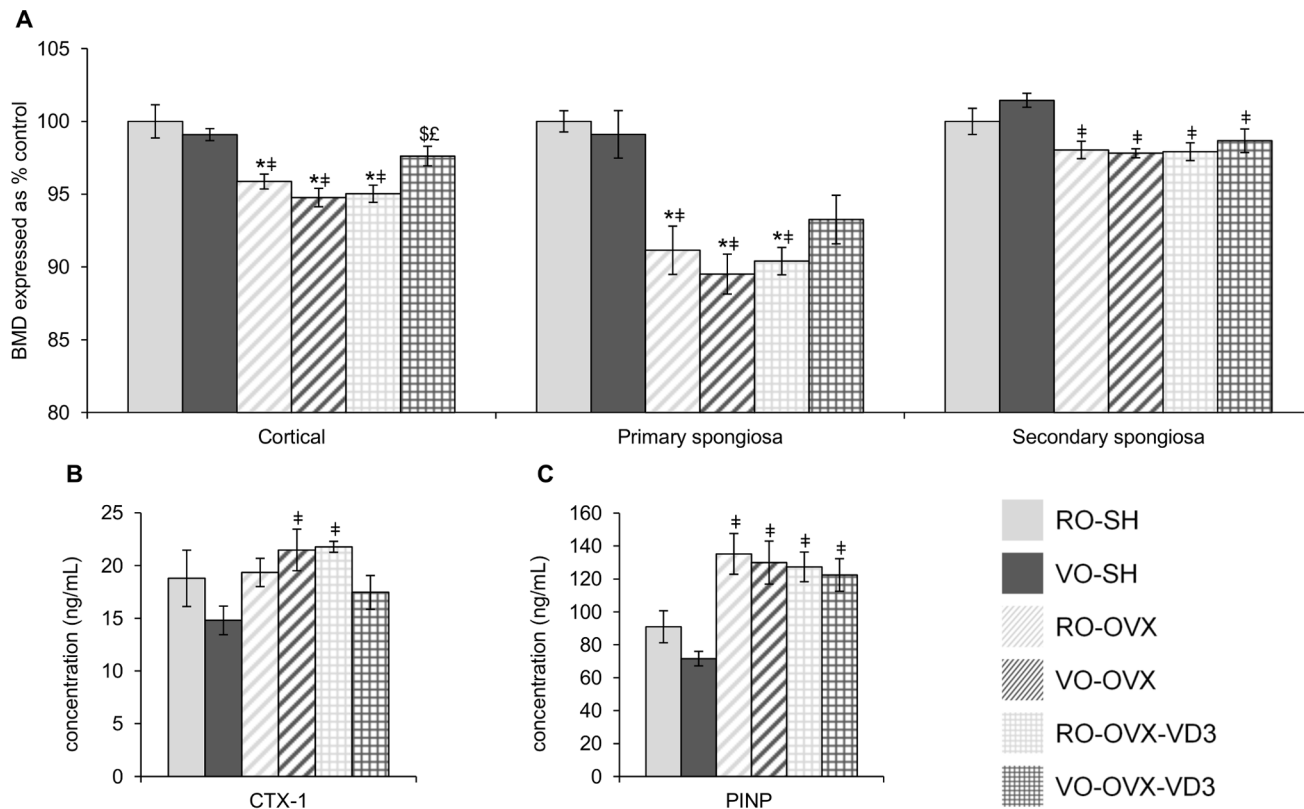
**Fig. 1. Mice body weight and composition.** Body weight and composition were assessed at the end of the experiment. Values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs RO-SH, † $p < 0.05$  vs VO-SH based on ANOVA analysis with Tukey's post hoc test. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy. Following sham operation or ovariectomy, the mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks. Two additional groups of ovariectomized mice were given refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g001

groups ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0001$ ;  $p = 0.0002$ , respectively; ANOVA) (Fig. 2A). This goes along with altered micro-architecture, parameters such as marrow area, porosity and trabecular space being enhanced while cortical thickness, bone area and volume, as well as trabecular number being decreased compared to what was measured in the SH mice (Table 2). With regards to the diet effect, quality of olive oil did not interfere with BMD as both refined or virgin oils were devoid of any bone sparing effect (VO-OVX and RO-OVX exhibited similar values), regardless of the site considered (Fig. 2A). However, fortification of the virgin oil with vitamin D allowed to significantly mitigate cortical bone loss (VO-OVX-VD3,  $1128.41 \pm 7.75$  mg/cc; VO-SH,  $1145.34 \pm 4.76$  mg/cc vs VO-OVX,  $1095.40 \pm 7.27$  mg/cc;  $p = 0.022$  and  $p < 0.0001$ , respectively; ANOVA), and partially prevent bone loss at the primary spongiosa (intermediate profile between OVX and SH animals: VO-OVX,  $89.51 \pm 1.37\%$ ; VO-OVX-VD3,  $93.26 \pm 1.67\%$ ; VO-SH,  $99.11 \pm 1.63\%$ ), while only a trend towards an improvement was observed at the secondary spongiosa ( $p = 0.022$  between VO-SH and VO-OVX-VD3 groups; ANOVA) (Fig. 2A). On the opposite, fortification of the refined oil with vitamin D was ineffective. Finally, none of the diets was able to modify any parameter of micro-architecture.

As far as biomarkers of bone metabolism are concerned, no differences were observed between the groups consuming RO (Fig. 2B and 2C). For the VO groups, the bone formation marker (PINP) was increased in the OVX groups (VO-OVX,  $129.91 \pm 13.08$  ng/mL; VO-OVX-VD3,  $122.38 \pm 9.90$  ng/mL vs VO-SH,  $71.58 \pm 4.39$  ng/mL;  $p = 0.003$  and  $p = 0.031$  respectively; ANOVA) (Fig. 2C). The bone resorption marker (CTX1) was increased in the VO-OVX group as well and has an intermediate profile in the VO-OVX-VD3 group (VO-OVX,





**Fig. 2. Bone parameters in mice fed with olive oil enriched or not with vitamin D3.** Femoral cortical, primary and secondary spongiosa bone mineral density (A) and serum levels of CTX1 and PINP (B) in mice fed with olive oil enriched or not with vitamin D3. Following sham operation or ovariectomy, the mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks: RO-SH, VO-SH, RO-OVX, VO-OVX. Two additional groups of ovariectomized mice received refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3: RO-OVX-VD3 and VO-OVX-VD3. Values are means  $\pm$  SEM. ANOVA with Tukey's post hoc test were performed. \* $p < 0.05$  vs RO-SH, † $p < 0.05$  vs VO-SH, ‡ $p < 0.05$  vs VO-OVX, § $p < 0.05$  vs RO-OVX-VD3. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy; BMD, bone mineral density; CTX-1, collagen type 1 cross-linked C-telopeptide; PINP, N-terminal propeptide of type I procollagen.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g002

$21.47 \pm 1.98$  ng/mL; VO-OVX-VD3,  $17.45 \pm 1.60$  ng/mL vs VO-SH,  $14.80 \pm 1.36$  ng/mL;  $p = 0.035$  and  $p > 0.05$  respectively; ANOVA) (Fig. 2B).

### Investigation of molecular changes by a TLDA analysis (Fig. 3)

A TLDA analysis allowed assessing the potential impact of the diets on a number of genes, in order to understand the involved mechanisms. Forty eight genes were investigated, therefore only the genes whose expression was different between the groups are presented. The RO-SH group was used as a reference.

### Biological effect of ovariectomy

Consistent with the bone biomarkers data, bone turnover genes were up-regulated in animals under estrogen deprivation. Indeed, genes representative of bone formation (osteocalcin (OCN;  $p = 0.0001$ ), osteopontin (OPN;  $p = 0.025$ ), type I collagen (Col1a1;  $p = 0.007$ ; ANOVA without the vitamin D3 groups)) (Fig. 3) and a protease involved in the degradation of several matrix proteins (matrix



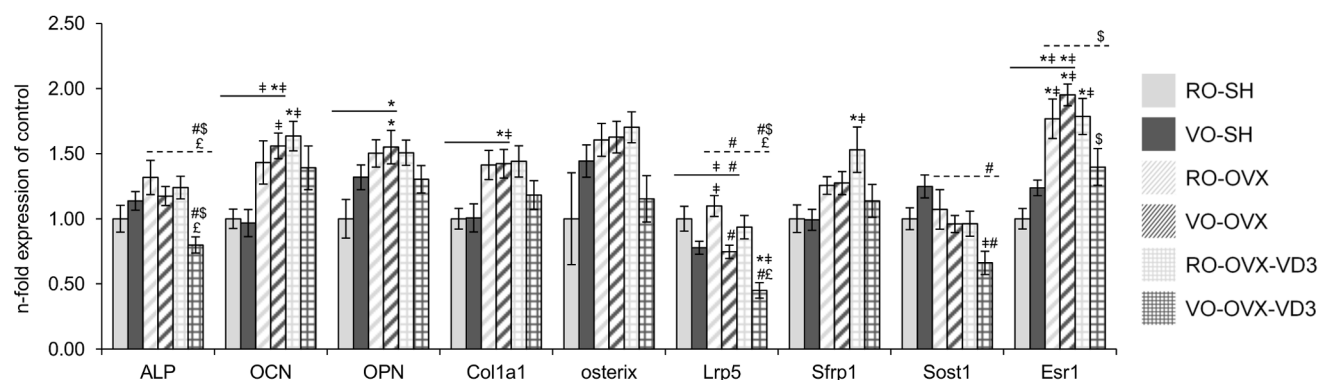
**Table 2.** Mice femoral secondary spongiosa micro-architecture parameters.

	RO-SH	VO-SH	RO-OVX	VO-OVX	RO-OVX-VD3	VO-OVX-VD3	ANOVA
<b>Marrow Area (mm<sup>2</sup>)</b>	1.57 ± 0.09	1.67 ± 0.06	1.76 ± 0.05	1.83 ± 0.08	1.83 ± 0.07	1.67 ± 0.06	NS
<b>Bone Area (mm<sup>2</sup>)</b>	0.85 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.80 ± 0.01 <sup>‡</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>*‡</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>*‡</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>*‡</sup>	p<0.000-1
<b>Cortical thickness (µm)</b>	142 ± 5	140 ± 3	136 ± 3	131 ± 4	126 ± 4	138 ± 4	NS
<b>Porosity (%)</b>	7.54 ± 0.34	7.92 ± 0.25	8.60 ± 0.35	8.98 ± 0.49	8.76 ± 0.51	7.60 ± 0.25	NS
<b>Bone Surface (mm<sup>2</sup>)</b>	0.84 ± 0.02	0.87 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.83 ± 0.01	NS
<b>SMI</b>	2.80 ± 0.10	2.79 ± 0.11	2.98 ± 0.06	3.02 ± 0.07	2.99 ± 0.05	2.92 ± 0.07	NS
<b>BV/TV (%)</b>	8.32 ± 0.84	7.87 ± 0.85	4.88 ± 0.38 <sup>*‡</sup>	4.89 ± 0.48 <sup>*‡</sup>	5.26 ± 0.44 <sup>*‡</sup>	5.31 ± 0.61 <sup>*‡</sup>	p<0.001
<b>Tb.N (1/mm)</b>	2.33 ± 0.17	2.21 ± 0.18	1.43 ± 0.10 <sup>*‡</sup>	1.45 ± 0.12 <sup>*‡</sup>	1.51 ± 0.11 <sup>*‡</sup>	1.47 ± 0.14 <sup>*‡</sup>	p<0.000-1
<b>Tb.Th (µm)</b>	35.3 ± 1.2	36.9 ± 1.2	34.1 ± 0.8	33.3 ± 0.9	34.7 ± 0.8	35.6 ± 0.8	NS
<b>Tb.Sp (µm)</b>	405 ± 33	444 ± 42	692 ± 46 <sup>*‡</sup>	708 ± 70 <sup>*‡</sup>	667 ± 58 <sup>*‡</sup>	691 ± 64 <sup>*‡</sup>	p<0.001
<b>DA</b>	1.49 ± 0.05	1.43 ± 0.02	1.51 ± 0.04	1.47 ± 0.02	1.49 ± 0.02	1.52 ± 0.02	NS

Values are means ± SEM. \*p<0.05 vs RO-SH, ‡p<0.05 vs VO-SH based on ANOVA analysis with Tukey's post hoc test. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy, SMI, structural model index; BV/TV, trabecular bone volume; Tb.N, trabecular number; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.Sp, trabecular spacing; DA, degree of anisotropy. Following sham operation or ovariectomy, mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks. Two additional groups of ovariectomized mice received refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.t002

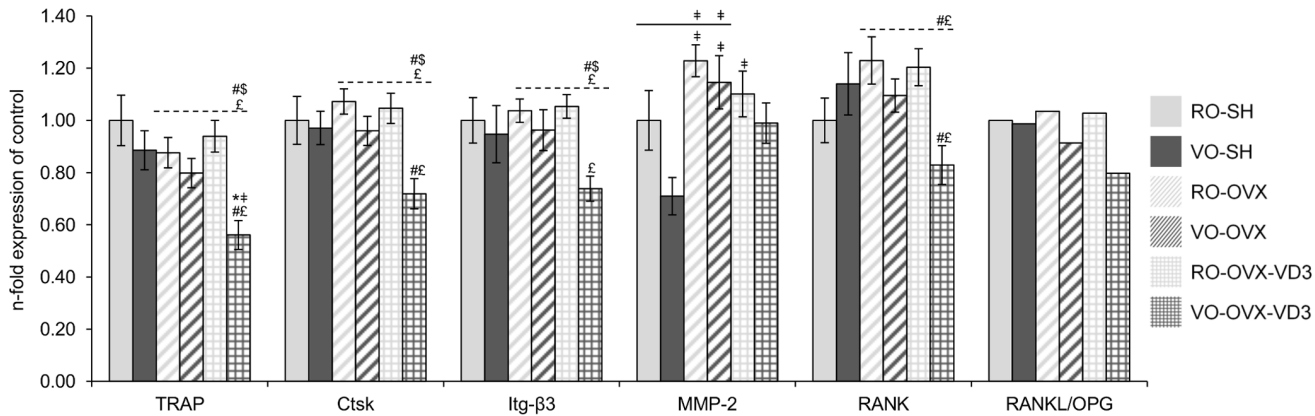
metalloproteinase 2 (MMP-2)) (Fig. 4) were enhanced in the OVX rodents, compared to what was measured in the SH animals (p=0.001;ANOVA without the vitamin D3 groups). Nevertheless, other osteoclastic markers such as cathepsin K (Ctsk), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and β3-integrin (Itg-β3) stayed unchanged (Fig. 4). Besides, markers of oxidative stress were up-regulated in the OVX mice (inducible nitric oxide synthase (Nos2; p=0.002; ANOVA without the vitamin D3 groups)) (Fig. 5). With regards to inflammation



**Fig. 3. Transcript levels of osteoblast metabolism markers in mice femurs.** Following sham operation or ovariectomy, the mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks: RO-SH, VO-SH, RO-OVX, VO-OVX. Two additional groups of ovariectomized mice were given refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3: RO-OVX-VD3 and VO-OVX-VD3. Values are means ± SEM. ANOVA with Tukey's post hoc test were performed on the 6 groups (symbols above histograms), on the 4 groups without vitamin D3 (symbols above the solid line) and on the 4 OVX groups (symbols above the dotted line). \*p<0.05 vs RO-SH, ‡p<0.05 vs VO-SH, #p<0.05 vs RO-OVX, §p<0.05 vs VO-OVX, †p<0.05 vs RO-OVX-VD3. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy; ALP, alkaline phosphatase; OCN, osteocalcin; OPN, osteopontin; Col1a1, type I collagen; Lrp5, low density lipoprotein receptor-related protein 5; Sfrp1, secreted frizzled related sequence protein 1; Sost1, sclerostin; Esr1, estrogen receptor 1.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g003

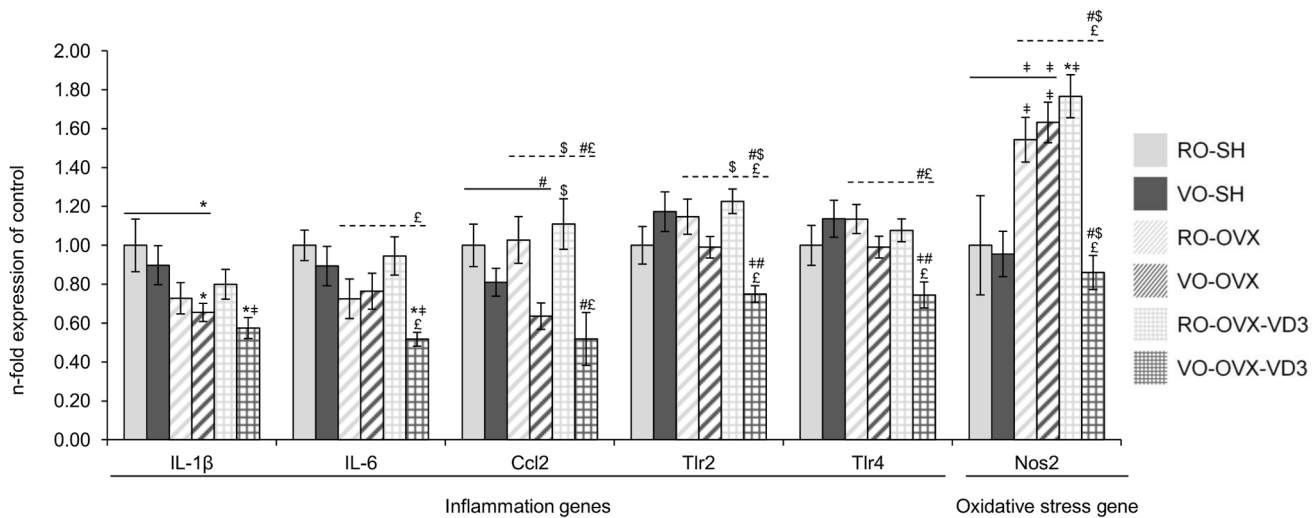




**Fig. 4. Transcript levels of osteoclast metabolism markers in mice femurs.** Following sham operation or ovariectomy, the mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks: RO-SH, VO-SH, RO-OVX, VO-OVX. Two additional groups of ovariectomized mice were given refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3: RO-OVX-VD3 and VO-OVX-VD3. Values are means  $\pm$  SEM. ANOVA with Tukey's post hoc test were performed on the 6 groups (symbols above histograms), on the 4 groups without vitamin D3 (symbols above the solid line) and on the 4 OVX groups (symbols above the dotted line). \* $p < 0.05$  vs RO-SH, † $p < 0.05$  vs VO-SH, # $p < 0.05$  vs RO-OVX, § $p < 0.05$  vs VO-OVX, £ $p < 0.05$  vs RO-OVX-VD3. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase; Ctsk, cathepsin K; Itg- $\beta$ 3,  $\beta$ 3-integrin; MMP-2, matrix metalloproteinase 2; RANK, Receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB); RANKL, RANK ligand; OPG, osteoprotegerin.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g004

pathways, no significant difference could be observed between SH and OVX animals. It is also noticeable that expression of estrogen receptor 1 (*Esr1*;  $p < 0.0001$ ; ANOVA without the vitamin D3 groups) increased in the OVX animals compared to what was measured in the SH mice, in both diets (Fig. 3).



**Fig. 5. Transcript levels of oxidative stress and inflammation markers in mice femurs.** Following sham operation or ovariectomy, the mice received refined or virgin olive oil for 4 weeks: RO-SH, VO-SH, RO-OVX, VO-OVX. Two additional groups of ovariectomized mice were given refined or virgin olive oil enriched with vitamin D3: RO-OVX-VD3 and VO-OVX-VD3. Values are means  $\pm$  SEM. ANOVA with Tukey's post hoc test were performed on the 6 groups (symbols above histograms), on the 4 groups without vitamin D3 (symbols above the solid line) and on the 4 OVX groups (symbols above the dotted line). \* $p < 0.05$  vs RO-SH, † $p < 0.05$  vs VO-SH, # $p < 0.05$  vs RO-OVX, § $p < 0.05$  vs VO-OVX, £ $p < 0.05$  vs RO-OVX-VD3. RO, refined olive oil; VO, virgin olive oil; VD3, vitamin D3; SH, sham operation; OVX, ovariectomy; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; Tlr2, toll like receptor 2; Tlr4, toll like receptor 4; Nos2, nitric oxide synthase.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g005





### Comparison of gene expression according to the quality of olive oil (RO vs VO) in the diet

As far as bone formation is concerned, osteoblast genes were not differently expressed in the SH rodents, whether olive oil was refined or not. In OVX animals, low density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5), a receptor by which the Wnt/ $\beta$ -catenin signal is transduced, was less expressed in those that were given the virgin oil ( $p=0.001$ ; ANOVA without the vitamin D3 groups) (Fig. 3). Regarding osteoclast genes, no significant effect of the diet could be detected (Fig. 4). In the same way, no major effect was elicited on genes involved in both inflammation and oxidative processes (Fig. 5).

### Synergistic effects of vitamin D and olive oil to mitigate bone loss in OVX mice

With regards to gene expression in the mice that have been given the refined oil, the only differences that were observed target OCN, secreted frizzled related sequence protein 1 (Sfrp1) and Esr1 genes (Fig. 3). Those genes were over-expressed in the RO-OVX-VD3 group compared to the RO-SH mice, but were not different from those in RO-OVX animals.

In the case of the virgin oil, fortification with vitamin D was associated to a correction of the expression of Esr1 gene (similar values in both VO-SH and VO-OVX-VD3, while the expression was higher in VO-OVX than in VO-SH) (Fig. 3). Alkaline phosphatase (ALP), Lrp5 and sclerostin (Sost1) signals were significantly reduced and there was a tendency for a reduction of osterix expression in the VO-OVX-VD3 vs the RO-OVX-VD3 group ( $p=0.058$ ; ANOVA in the OVX groups). Actually, consistently with the BMD data, the major effect targeted osteoclast genes, i.e. resorption. Indeed, the expression of TRAP, Ctsk, Itg- $\beta$ 3 and Receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) (RANK) was down regulated by virgin olive oil and vitamin D ( $p=0.0004$ ;  $p=0.001$ ;  $p=0.002$ ;  $p=0.003$  respectively; ANOVA in the OVX groups), compared to what was observed in RO-OVX-VD3 mice (Fig. 4). The decreased expression of RANK was associated with a similar RANK ligand (RANKL) to osteoprotegerin (OPG) ratio. Interestingly, cartilage oligomeric matrix protein (COMP, thrombospondin 5) was significantly down regulated in VO-OVX-VD3 as compared to VO-OVX, but not statistically different from the level in VO-SH animals, elevated COMP levels in serum being found to be predictive of developing joint destruction in osteoarthritis (RO-SH:  $1.00 \pm 0.10$ ; RO-OVX:  $1.32 \pm 0.15$ ; RO-OVX-VD3:  $1.42 \pm 0.10$ ; VO-SH:  $1.06 \pm 0.09$ ; VO-OVX:  $1.26 \pm 0.07$ ; VO-OVX-VD3:  $0.79 \pm 0.09$ ;  $p=0.0003$ ; ANOVA in the 6 groups). Finally, PPAR expression, a marker for adipogenesis, was not significantly different between the experimental groups (RO-SH:  $1.00 \pm 0.09$ ; RO-OVX:  $1.57 \pm 0.13$ ; RO-OVX-VD3:  $1.50 \pm 0.12$ ; VO-SH:  $1.29 \pm 0.12$ ; VO-OVX:  $1.34 \pm 0.10$ ; VO-OVX-VD3:  $1.26 \pm 0.15$ ;  $p=0.061$ ; ANOVA in the 6 groups). Moreover, genes involved in inflammation such as IL-1 $\beta$ , IL-6 were significantly decreased in VO-OVX-VD3, compared to the level in VO-SH group (Fig. 5). Compared to the refined oil OVX groups, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), Toll like receptors 2 (Tlr2) and Tlr4 were down regulated in the VO-OVX-VD3 mice ( $p=0.001$ ;  $p<0.0001$ ;  $p=0.001$  respectively;



ANOVA in the OVX groups). Finally, *Nos2* expression (a marker of oxidative stress) in this test group was not different from that in VO-SH rodents, but significantly lower than in VO-OVX ( $p < 0.0001$ ; ANOVA in the 6 groups) ([Fig. 5](#)).

## Discussion

Broad-based preventive strategies designed to lower the risk of osteoporosis need to be implemented. This is why the concept of a healthy diet providing adequate amounts of various micronutrients deserves mention. Actually, within Europe, conspicuous differences is encountered in the severity of osteoporosis, the lowest incidence being reported in the Mediterranean area [3], where olive oil consumption is high, as well as sun shining for vitamin D. Our results, using an extensively valued model that is sensitive to various inhibitors of bone resorption used clinically [28], show that virgin olive oil exhibited synergistic bone sparing effect with vitamin D.

### Scientific value of the experimental protocol

The ovariectomized rodent is, by far, the most widely used animal model for post-menopausal osteoporosis. Actually, characteristics of skeletal physiology in the murine model share similarities with those of early post-menopausal women, in many respects. These include: increase rate of bone turnover with resorption exceeding formation, greater loss of cancellous than cortical bone; and similar skeletal response to various stimuli.

In the present study, as expected and previously shown [29], ovariectomy (confirmed by uterine atrophy) was associated with impaired femoral BMD, whatever the compartment (cortical bone, primary and secondary spongiosa). Comparative results, i.e. 4% reduction in the femoral cortical BMD with ovariectomy, were found on a similar model: 12 weeks-old C57Bl/6 ovariectomized for 4 weeks, in which mice were subjected to a standard diet [30]. This was consistent with the micro-architectural data, as indicated by raised marrow area, porosity and trabecular space, while bone area/volume, cortical thickness and trabeculae number were diminished, compared to what was observed in the SH animals. Moreover bone remodeling was accelerated in ovariectomized rats consuming virgin olive oil (increased bone biomarkers). This was corroborated by mechanistic analysis, genes involved in bone turnover being up-regulated by estrogen deprivation, as well. This increased bone remodeling, with resorption exceeding formation following ovariectomy, is well described in the literature [28, 31]. Ovarian ablation was also associated with an enhanced oxidative stress, as shown by over expression of *Nos2*. Estrogen deficiency is known to decrease defense against oxidative stress, which leads to bone loss [32–34]. Indeed, the *Nos2* promoter has been shown to be under negative estrogen control [35]. This is why a stimulation of nitric oxide production by *Nos2* was reported in an



experimental OVX animal model and was associated with a 320% higher osteoblast apoptosis [36, 37]. In a clinical trial, F2-isoprostane levels, a marker of oxidative stress, have been negatively associated with BMD [38]. On the opposite, in OVX rats, osteopenia can be prevented by administration of a selective inhibitor of COX-2 [39]. Regarding inflammation, in the present study, ovariectomy did not elicit any significant effect on the genes involved in such a biological process, even though a splenomegaly was observed. As a matter of fact, conflicting data have been published. TGF- $\beta$ 1 mRNA and proteins expression levels have been reported to be significantly decreased in OVX rats compared to sham rats [40–42], while a significant increase in IL-1-IL-6 was observed in women with total hysterectomy and oophorectomy [43]. This was prevented in patients treated with estrogen and in those treated with estrogens and medroxyprogesteron.

### Effect of olive oil

Olive oil, whether it was refined (depleted in polyphenols) or not, was not able to prevent the increase in body weight observed in the OVX mice. This is consistent with previous data published by our team showing that neither olive oil nor oleuropein could modify this parameter in OVX rats [17, 21].

With regards to bone health, BMD was not significantly different in the OVX mice whether they were submitted to virgin or refined olive oil consumption. In other words, olive oil, when given alone, was not efficient to prevent OVX-induced osteopenia. This was consistent with the lack of significant difference in both CTX1 and OCN serum levels between those two groups. Consistently with our data, Puel et al. [17, 21] failed to see a bone sparing effect of oleuropein, olives, and olive oil. They provided evidence of efficiency of such nutrients and foods in OVX rats only when inflammation was exacerbated. The recent study conducted by Keiler et al. [44] in which a similar amount of polyphenols (10 mg/kg body weight) was evaluated corroborates our data as well. On the contrary, according to Hagiwara et al. [19] and Saleh and Saleh [18], oleuropein, hydroxytyrosol and olive oil, respectively, but not tyrosol were found to limit trabecular but not cortical bone loss induced by ovariectomy. As a matter of fact, Saleh and Saleh [18] found a positive impact of polyphenols by giving twice our and Keiler's dose (i.e. 20 mg/kg body weight). Finally, in elderly men at high cardiovascular risk, a Mediterranean-type diet enriched with olive oil was associated with increased osteocalcin and PINP serum levels [45].

### Virgin olive oil and vitamin D3 act synergistically to prevent osteopenia on OVX mice

Ovariectomy-induced bone loss was prevented (both at the cortical and trabecular levels) by the combination of virgin olive oil and vitamin D3, but not by virgin olive oil alone, or even by refined olive oil and vitamin D. Therefore, our data support the idea that the beneficial impact of the Mediterranean diet involves, at



least in part, olive oil. This food combination could be part of a strategy to restrain the development of osteoporosis and such a beneficial effect could be explained by exacerbation of the polyphenol-bone sparing properties thanks to vitamin D. Even though the impact of olive oil could be attributed to its fatty acids [46, 47], the lack of effect of the refined oil allows avoiding this hypothesis and polyphenols are thought to be at the origin of olive oil beneficial impact on bone [48]. We should not exclude the contribution of other micronutrients, such as, for example, tocopherols that are known to be decreased by refining.

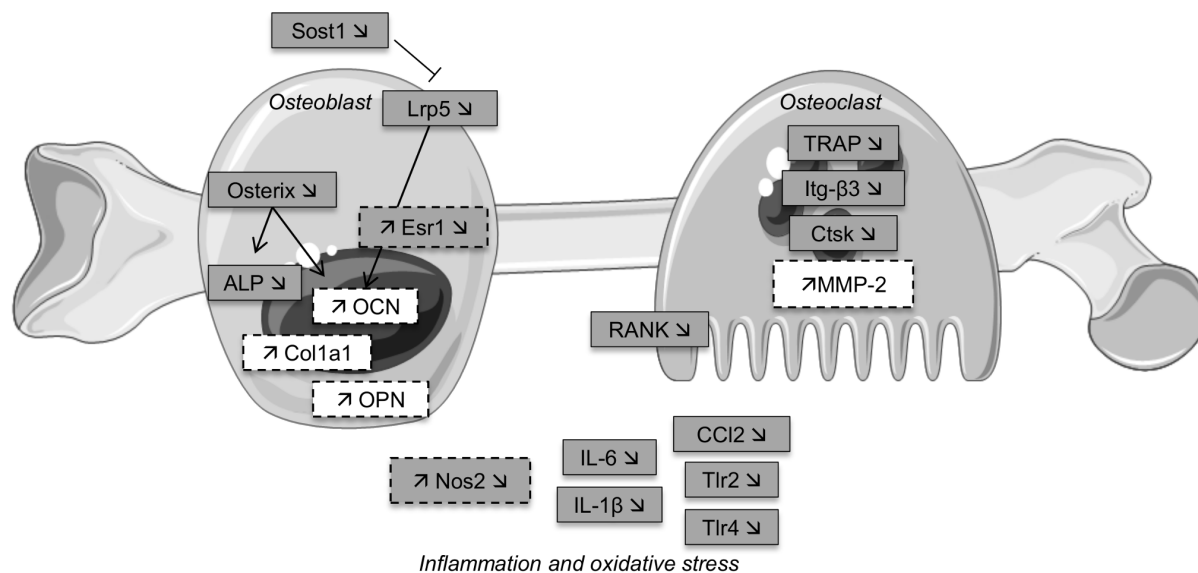
In the present case, the combination of virgin olive oil and vitamin D3 indeed slowed down the ovariectomy-accelerated bone turnover. Moreover, transcriptomic analyses showed that osteoblastic and osteoclastic markers were down-regulated in VO-OVX-VD3 mice compared to the other OVX groups (Fig. 6). Therefore, bone turnover was likely to be slowed down in this group and this led to a higher primary spongiosa and cortical BMD. Oleuropein, the major olive oil polyphenol, has previously been shown to stimulate osteoblastogenesis *in vitro* by increasing the expression of Runx2, osterix, ALP and Col1a1 in mesenchymal stem cells, while adipogenesis was inhibited [22]. Besides, Hagiwara et al. [19] showed that oleuropein can increase calcium deposition by osteoblasts, and oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol can reduce osteoclastogenesis. On another hand,  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 has been shown to directly enhance osteoblasts mineralization [49]. Recent meta-analysis showed that vitamin D in addition to calcium can reduce the risk of hip fracture [27, 50].

The bone sparing effect observed in the animals that were given the combination of virgin olive oil and vitamin D was concomitant with decreased oxidative stress and inflammation gene expressions. Bone metabolism is impaired in the presence of an excess of reactive oxygen species, which leads to bone loss [37, 51]. The Mediterranean diet has been shown to decrease the incidence of oxidative stress which is implicated in the evolution of many diseases [52]. Moreover, polyphenols are known to have an anti-oxidant impact [53–55]. As a matter of fact, extra virgin olive oil and black Luckes olives were found to counteract the increased oxidative stress induced by estrogen deficiency [16, 18]. In rats which were subjected to virgin olive oil, oxidative stress parameters have been shown to be decreased in brain, skeletal muscle and cardiac muscle as well [56–58]. The capacity of olive oil polyphenols to decrease the expression of COX-2 and Nos2 has been described in different cell types [59–65].

Regarding inflammation, virgin olive oil enriched with polyphenols has been shown to exhibit protective effects in two models of inflammation [53]. Puel et al. [16, 17, 20, 21] also demonstrated that olives, olive oil, oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol can prevent bone loss in an inflammation model of ovariectomized rats and this was partly explained by lower plasma fibrinogen and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein levels. It has been proposed that the anti-inflammatory impact of extra virgin olive oil could act through the NF-kappaB pathway [66]. Unfortunately, we were unable to test this gene. Our transcriptomic analyses showed a protective impact of virgin olive oil associated with vitamin D3 compared to refined olive oil associated with vitamin D3 on the following markers







**Fig. 6. Schematic representation of the bone sparing effect of virgin olive oil enriched with vitamin D3.** The effect of ovariectomy is represented by dotted boxes, the arrow (before the gene name), showing the modification of gene expression. The effect of virgin olive oil and vitamin D3 is represented by the grey boxes, the arrow (after the gene name) showing the impact on gene expression. The arrows between the genes outline regulation pathways. ALP, alkaline phosphatase; CCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; Col1a1, type I collagen; Ctsk, cathepsin K; Esr1, estrogen receptor 1; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; Itg- $\beta$ 3,  $\beta$ 3-integrin; Lrp5, low density lipoprotein receptor-related protein 5; MMP-2, matrix metalloproteinase 2; Nos2, nitric oxide synthase; OCN, osteocalcin; OPN, osteopontin; Sost1, sclerostin; Tlr2, toll like receptor 2; Tlr4, toll like receptor 4; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase.

doi:10.1371/journal.pone.0115817.g006

for both oxidative stress and inflammation: Nos2, IL-6, CCL2, Tlr2 and Tlr4. In the same way, in the human study published by Fito et al. [67], IL-6 was decreased in the volunteers consuming virgin olive oil compared to refined olive oil.

In conclusion, our study shows that virgin olive oil fortified with vitamin D3 is able to counteract the bone loss induced by estrogen deprivation. Such a bone sparing effect could be explained by an improvement of both inflammation status and oxidative stress. Thus, although further data are required, virgin olive oil fortified with vitamin D might be a potential nutritional alternative for osteoporosis prevention.

## Acknowledgments

The authors thank Mehdi Djelloul-Mazouz, Alexandre Teynie and Christophe Del’homme for providing everyday care to the animals. Fig. 6 was produced with the assistance of Servier Medical Art.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CT MJD PL AD AH SW YW VC. Performed the experiments: CT MJD PL SG SM. Analyzed the data: CT SG MJA YW VC. Contributed reagents/materials/analysis tools: SG MJA AD AH VC. Wrote the paper: CT VC.



## References

1. **Conference report nal** (1993) Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646–650.
2. **Johnell O, Gullberg B, Allander E, Kanis JA** (1992) The apparent incidence of hip fracture in Europe: a study of national register sources. *MEDOS Study Group. Osteoporos Int* 2: 298–302.
3. **Kanis JA** (1993) The incidence of hip fracture in Europe. *Osteoporos Int* 3 Suppl 1: 10–15.
4. **Strom O, Borgstrom F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, et al.** (2011) Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 6: 59–155.
5. **Perez-Lopez FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL** (2009) Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 64: 67–79.
6. **Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, et al.** (1995) Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 61: 1402S–1406S.
7. **Benetou V, Orfanos P, Pettersson-Kymmer U, Bergstrom U, Svensson O, et al.** (2013) Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort. *Osteoporos Int* 24: 1587–1598.
8. **Rivas A, Romero A, Mariscal-Arcas M, Monteagudo C, Feriche B, et al.** (2013) Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women. *Int J Food Sci Nutr* 64: 155–161.
9. **Kontogianni MD, Melistas L, Yannakoulia M, Malagaris I, Panagiotakos DB, et al.** (2009) Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women. *Nutrition* 25: 165–171.
10. **Mailer R** (2006) Chemistry and quality of olive oil. *Primefact* 227: 1–4.
11. **Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, et al.** (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* 1054: 113–127.
12. **Stark AH, Madar Z** (2002) Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev* 60: 170–176.
13. **Boskou D, Blekas G, Tsimidou M** (2006) Olive Oil Composition. In: Boskou D, editor. *Olive Oil Chemistry and Technology Second Edition*: AOCS Press Champaign, Illinois. 41–72.
14. **Galtier O, Dupuy N, Le Dreau Y, Ollivier D, Pinatel C, et al.** (2007) Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra. *Anal Chim Acta* 595: 136–144.
15. **Ranalli A, Ferrante ML, De Mattia G, Costantini N** (1999) Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *J Agric Food Chem* 47: 417–424.
16. **Puel C, Mardon J, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, et al.** (2007) Black Lucques olives prevented bone loss caused by ovariectomy and talc granulomatosis in rats. *Br J Nutr* 97: 1012–1020.
17. **Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, et al.** (2004) Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr* 92: 119–127.
18. **Saleh NK, Saleh HA** (2011) Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complement Altern Med* 11: 10.
19. **Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H** (2011) Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol* 662: 78–84.
20. **Puel C, Mardon J, Agalias A, Davicco MJ, Lebecque P, et al.** (2008) Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. *J Agric Food Chem* 56: 9417–9422.
21. **Puel C, Mathey J, Agalias A, Kati-Coulibaly S, Mardon J, et al.** (2006) Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin Nutr* 25: 859–868.



22. **Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De Castro MD, Quesada-Gomez JM** (2011) Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int* 22: 675–684.
23. **Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, et al.** (2014) A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 111: 23–45.
24. **Lips P** (2010) Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 297–300.
25. **Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J** (2003) Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *Proc Nutr Soc* 62: 813–821.
26. **Adami S, Giannini S, Bianchi G, Sinigaglia L, Di Munno O, et al.** (2009) Vitamin D status and response to treatment in post-menopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 20: 239–244.
27. **Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, Lips P, Meunier PJ, et al.** (2012) A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med* 367: 40–49.
28. **Kalu DN** (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15: 175–191.
29. **Spilmont M, Leotoing L, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, et al.** (2013) Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr*.
30. **Cano A, Dapia S, Noguera I, Pineda B, Hermenegildo C, et al.** (2008) Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. *Osteoporos Int* 19: 793–800.
31. **Wronski TJ, Cintron M, Dann LM** (1988) Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179–183.
32. **Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y** (2009) Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med* 15: 468–477.
33. **Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, et al.** (2007) Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 282: 27285–27297.
34. **Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, et al.** (2005) Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* 360: 81–86.
35. **Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, et al.** (2003) Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 144: 1098–1107.
36. **Armour KJ, Armour KE, van't Hof RJ, Reid DM, Wei XQ, et al.** (2001) Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis. *Arthritis Rheum* 44: 2790–2796.
37. **Armour KE, Van THRJ, Grabowski PS, Reid DM, Ralston SH** (1999) Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14: 2137–2142.
38. **Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H** (2001) Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 275–279.
39. **Gregory LS, Kelly WL, Reid RC, Fairlie DP, Forwood MR** (2006) Inhibitors of cyclo-oxygenase-2 and secretory phospholipase A2 preserve bone architecture following ovariectomy in adult rats. *Bone* 39: 134–142.
40. **Liang HD, Yu F, Tong ZH, Zhang HQ, Liang W** (2013) Cistanches Herba aqueous extract affecting serum BGP and TRAP and bone marrow Smad1 mRNA, Smad5 mRNA, TGF-beta1 mRNA and TIEG1 mRNA expression levels in osteoporosis disease. *Mol Biol Rep* 40: 757–763.
41. **Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ** (1992) Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12190–12193.
42. **Ikeda T, Shigeno C, Kasai R, Kohno H, Ohta S, et al.** (1993) Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor-beta 1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1228–1233.
43. **Cantatore FP, Loverro G, Ingrosso AM, Lacanna R, Sassanelli E, et al.** (1995) Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause. *Clin Rheumatol* 14: 157–160.

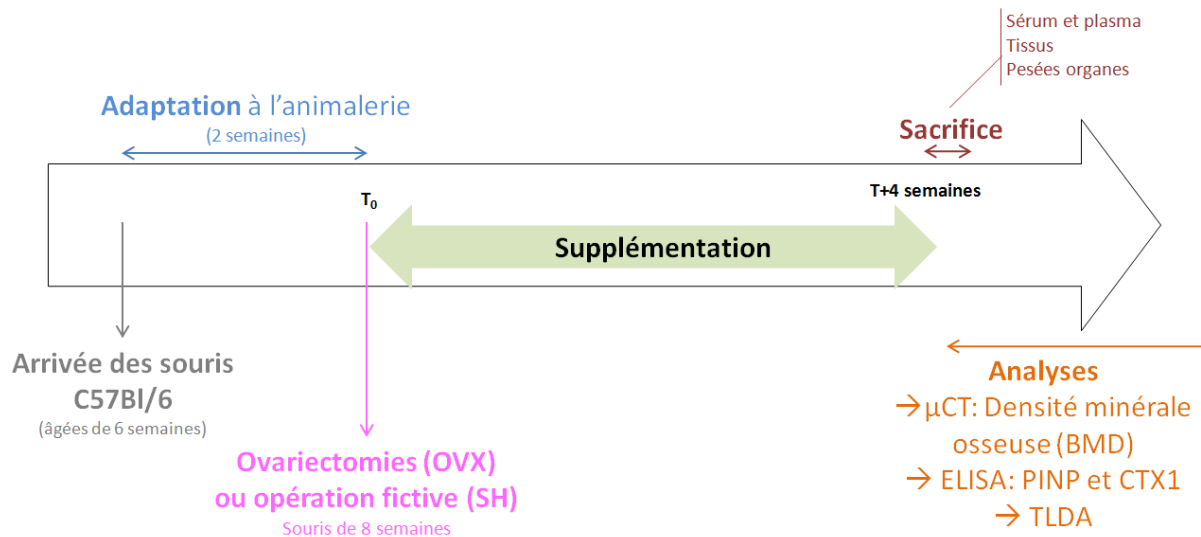


44. Keiler AM, Zierau O, Bernhardt R, Scharnweber D, Lemonakis N, et al. (2013) Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr*.
45. Fernandez-Real JM, Bullo M, Moreno-Navarrete JM, Ricart W, Ros E, et al. (2012) A Mediterranean diet enriched with olive oil is associated with higher serum total osteocalcin levels in elderly men at high cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3792–3798.
46. Trichopoulou A, Georgiou E, Bassiakos Y, Lipworth L, Lagiou P, et al. (1997) Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece. *Prev Med* 26: 395–400.
47. Park Y, Kim J, Scrimgeour AG, Condlin ML, Kim D (2013) Conjugated linoleic acid and calcium co-supplementation improves bone health in ovariectomised mice. *Food Chem* 140: 280–288.
48. Cicerale S, Lucas L, Keast R (2010) Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci* 11: 458–479.
49. van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Roelse M, Weyts F, et al. (2006) Evidence that both 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and 24-hydroxylated D3 enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 99: 922–935.
50. Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HA, Vanderschueren D, et al. (2007) Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin d supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1415–1423.
51. Arai M, Shibata Y, Pugdee K, Abiko Y, Ogata Y (2007) Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life* 59: 27–33.
52. Dai J, Jones DP, Goldberg J, Ziegler TR, Bostick RM, et al. (2008) Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 88: 1364–1370.
53. Martinez-Dominguez E, de la Puerta R, Ruiz-Gutierrez V (2001) Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflamm Res* 50: 102–106.
54. Visioli F, Bellomo G, Galli C (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 60–64.
55. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Houtl JR (1999) Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol* 57: 445–449.
56. Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GM, Diniz YS, et al. (2006) Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 239–245.
57. Gonzalez-Correa JA, Munoz-Marin J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, et al. (2007) Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids* 42: 921–929.
58. Musumeci G, Maria Trovato F, Imbesi R, Castrogiovanni P (2013) Effects of dietary extra-virgin olive oil on oxidative stress resulting from exhaustive exercise in rat skeletal muscle: A morphological study. *Acta Histochem*.
59. Khanal P, Oh WK, Yun HJ, Namgoong GM, Ahn SG, et al. (2011) p-HPEA-EDA, a phenolic compound of virgin olive oil, activates AMP-activated protein kinase to inhibit carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32: 545–553.
60. De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, et al. (2007) Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur J Pharmacol* 566: 192–199.
61. Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, et al. (2005) Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371: 457–465.
62. Moreno JJ (2003) Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med* 35: 1073–1081.
63. Zhang X, Cao J, Zhong L (2009) Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 581–586.

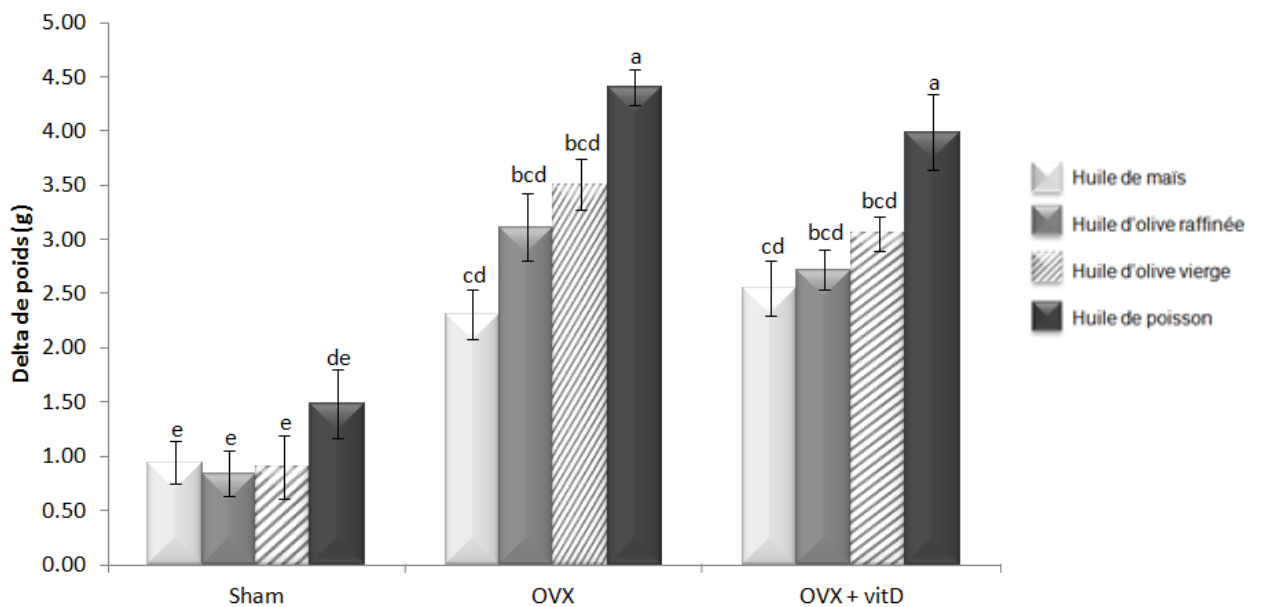




64. **Iacono A, Gomez R, Sperry J, Conde J, Bianco G, et al.** (2010) Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum* 62: 1675–1682.
65. **Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, et al.** (2005) Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437: 45–46.
66. **Viruso C, Accardi G, Colonna Romano G, Candore G, Vasto S, et al.** (2013) Nutraceutical properties of extravirgin olive oil: a natural remedy for age-related disease? *Rejuvenation Res.*
67. **Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti J, Munoz D, et al.** (2008) Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 62: 570–574.



**Figure 52 : Plan de l'expérience animale sur la souris ovariectomisée.**



**Figure 53 : Différence de poids entre les jours J25 et J-3**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. J-3, 3 jours avant l'ovariectomie ; J25, 25 jours après l'ovariectomie. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).

### 3- Résultats pré-cliniques complémentaires

#### 3-1- Matériel et méthodes

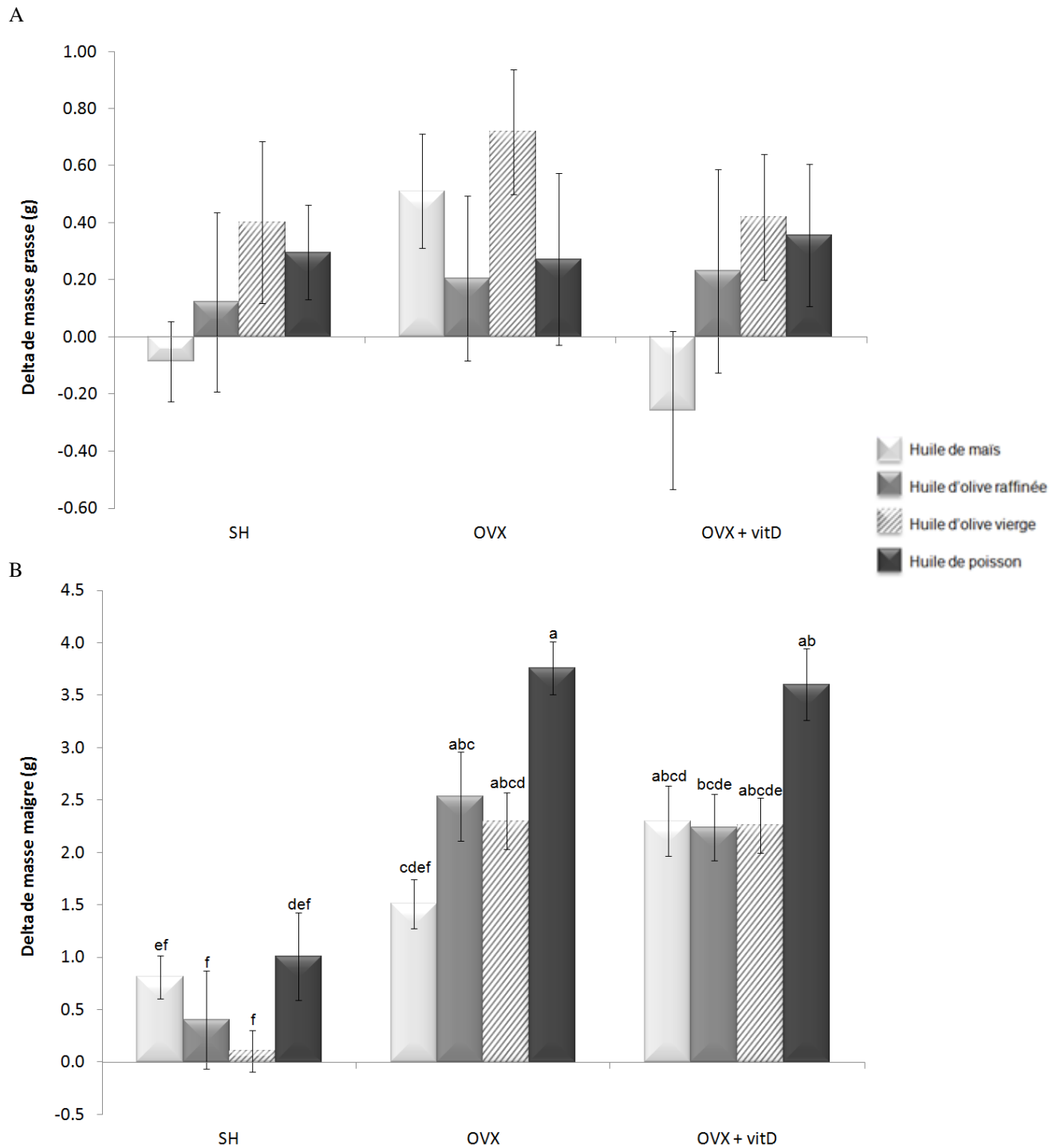
La publication de résultats porte sur 6 lots de souris (lots 4 à 9), or cette expérimentation animale a été menée sur 12 lots (Tableau 7). Les souris ont été pseudo-opérées (SH) ou ovariectomisées (OVX) puis soumises à un régime contenant 10% d'huile de maïs (HM), d'huile d'olive raffinée (RO), d'huile d'olive vierge (VO), ou d'huile de poisson (HP). Pour chaque huile, un lot supplémentaire de souris OVX a été supplémenté en vitamine D (vitD).

Lot		OVX	Huile de maïs (HM)	Huile d'olive raffinée (HO raff)	Huile d'olive vierge (HO V)	Huile de poisson (HP)	vitamine D (vitD)
1	HM, SH		X				
2	HM, OVX	X	X				
3	HM + vitD, OVX	X	X				X
4	HO, SH			X			
5	HO raff, OVX	X		X			
6	HO raff + vitD, OVX	X		X			X
7	HO raff, SH				X		
8	HO V, OVX	X			X		
9	HO V + vitD, OVX	X			X		X
10	HP, SH					X	
11	HP, OVX	X				X	
12	HP + vitD, OVX	X				X	X

**Tableau 7 : Caractéristiques des différents lots de souris.**

SH, pseudo-opération ; OVX, ovariectomie ; HM, huile de maïs ; HO raff, huile d'olive raffinée ; HO V, huile d'olive vierge ; HP, huile de poisson ; vitD, vitamine D.

Le poids, la composition corporelle et la consommation alimentaire ont été régulièrement mesurés tout au long des 30 jours de mise sous régime (Figure 52). Après prélèvement du sang, les muscles des pattes arrières (*tibialis anterior*, *gastrocnemius* et *plantaris*) ont été récupérés, pesés puis stockés à -80°C. Un fémur a été rapidement congelé dans l'azote puis stocké à -80°C pour des analyses d'expression des gènes alors que le second a été conservé dans du formaldéhyde 10% à 4°C pendant 5 jours avant d'être séché à l'air libre pour analyses au microCT. L'utérus, le foie et la rate ont été pesés.



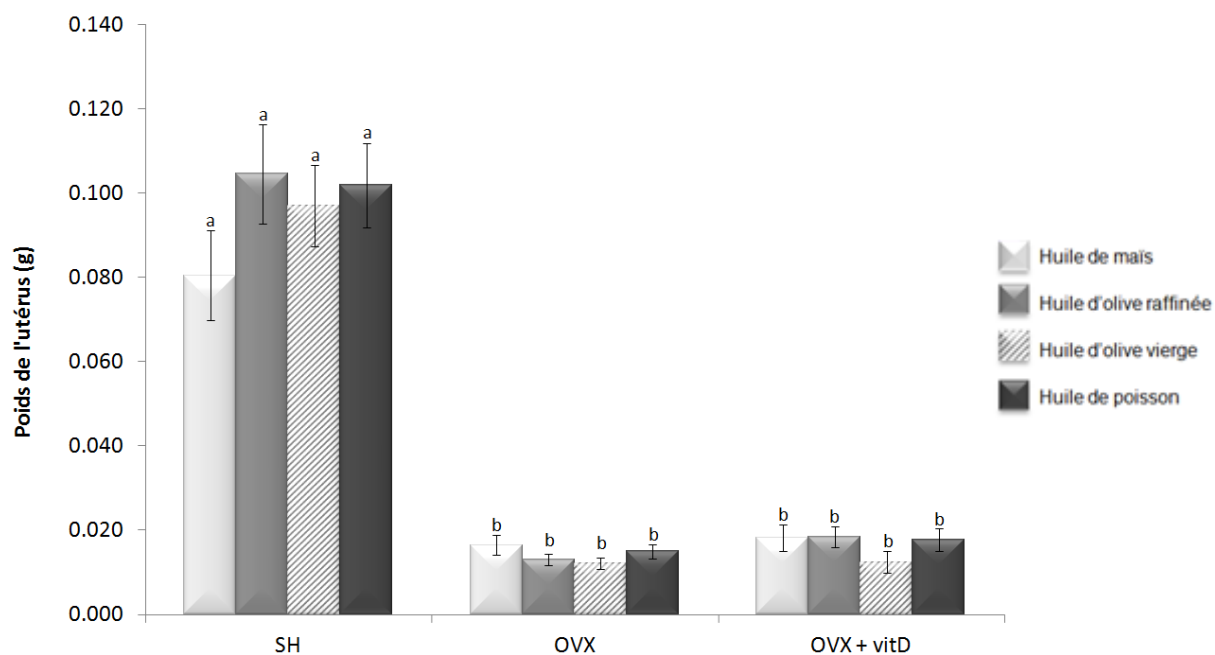
**Figure 54 : Composition corporelle des souris entre les jours J25 et J-3.**

(A) Delta de masse grasse. (B) Delta de masse maigre. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. J-3, 3 jours avant l'ovariectomie ; J25, 25 jours après l'ovariectomie. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).

Lot	J11 (g)	J23 (g)	Delta de poids/Moyenne des consommations
Lot 01: Huile de maïs, SH	3,37 ± 0,21	3,32 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,09 <sup>bcd</sup>
Lot 02: Huile de maïs, OVX	3,33 ± 0,18	3,02 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,10 <sup>abcd</sup>
Lot 03: Huile de maïs + vitD, OVX	3,26 ± 0,11	3,05 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,08 <sup>a</sup>
Lot 04: Huile raffinée, SH	3,02 ± 0,17	3,88 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,06 <sup>d</sup>
Lot 05: Huile raffinée, OVX	3,03 ± 0,16	3,32 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,73 ± 0,14 <sup>abc</sup>
Lot 06: Huile raffinée + vitD, OVX	2,98 ± 0,10	3,23 ± 0,18 <sup>ab</sup>	0,82 ± 0,09 <sup>a</sup>
Lot 07: Huile d'olive extra vierge, SH	3,24 ± 0,16	3,44 ± 0,24 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,09 <sup>cd</sup>
Lot 08: Huile d'olive extra vierge, OVX	3,15 ± 0,22	3,27 ± 0,11 <sup>ab</sup>	1,01 ± 0,11 <sup>a</sup>
Lot 09: Huile d'olive extra vierge + vitD, OVX	3,35 ± 0,16	3,08 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,12 <sup>ab</sup>
Lot 10: Huile de poisson, SH	3,67 ± 0,14	3,65 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,33 ± 0,08 <sup>bcd</sup>
Lot 11: Huile de poisson, OVX	3,49 ± 0,15	3,19 ± 0,17 <sup>ab</sup>	1,16 ± 0,14 <sup>a</sup>
Lot 12: Huile de poisson + vitD, OVX	3,43 ± 0,18	3,09 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,14 <sup>a</sup>
moyenne générale	3,27 ± 0,05	3,30 ± 0,04	0,68 ± 0,04

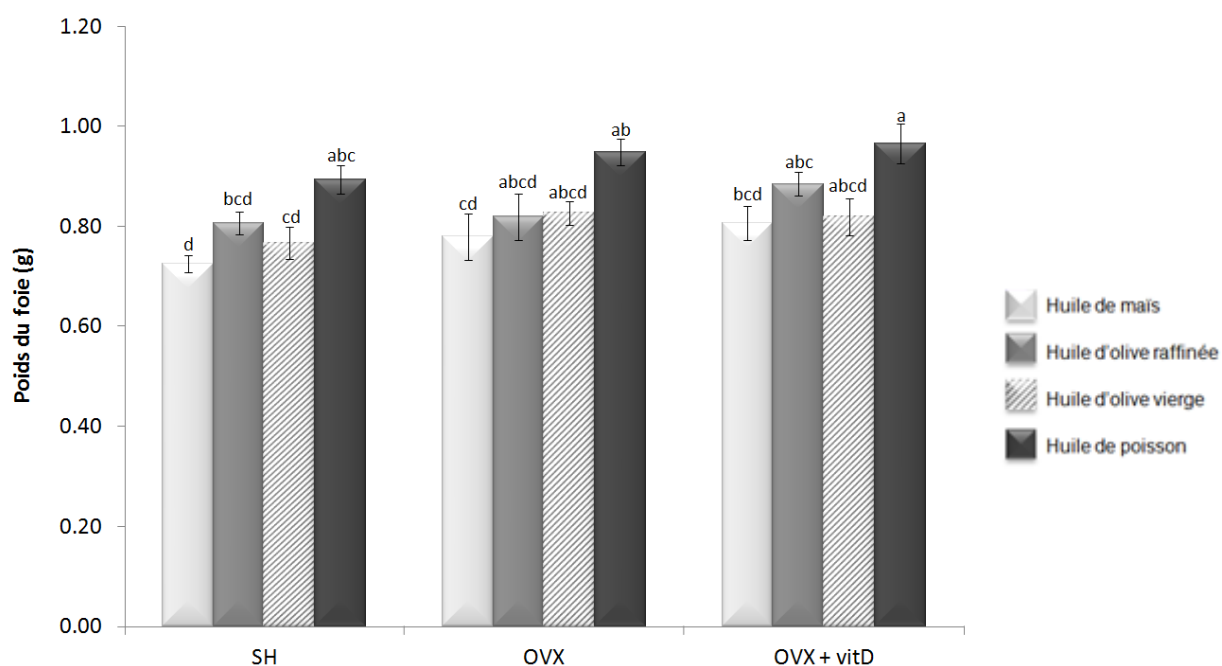
**Tableau 8 : Consommation moyenne des souris à J11 et J23 et rapport entre le poids corporel et la moyenne des consommations.**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. J11, 11 jours après l'ovariectomie ; J23, 23 jours après l'ovariectomie ; SH, sham-opération ; OVX, ovariectomie ; HM, huile de maïs ; HO raffi, huile d'olive raffinée ; HO V, huile d'olive vierge ; HP, huile de poisson ; vitD, vitamine D. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun (p<0,05).



**Figure 55 : Poids de l'utérus.**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).



**Figure 56 : Poids du foie.**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).

## 3-2- Résultats

### 3-2-1- Evolution du poids des animaux et de la composition corporelle

Les lots de souris étaient équivalents en termes de poids au début de l'expérimentation. Tous les animaux ont pris du poids au cours du mois de supplémentation mais les souris OVX en ont pris significativement plus que leur contrôle respectif (lot SH ayant consommé la même huile) (Figure 53). Ce phénomène était d'ailleurs exacerbé chez les souris ayant consommé de l'huile de poisson.

### 3-2-2- Composition corporelle

Les résultats sont exprimés sous forme de différences de masse grasse et de masse maigre entre les mesures de composition corporelle effectuées 3 jours avant (J-3) et 25 jours après l'OVX (J25).

En raison de la forte variabilité interindividuelle, aucune différence statistique entre les lots en ce qui concerne la masse grasse, n'était obtenue (Figure 54A). Pour les souris ayant consommé de l'huile d'olive raffinée, de l'huile d'olive vierge ou de l'huile de poisson, la masse maigre était significativement augmentée chez les animaux OVX (soumis ou non à la vitD), comparé aux lots SH correspondants (Figure 54B). Pour l'huile de maïs, cette augmentation significative de la masse maigre par rapport au contrôle n'était observée que pour les souris ovariectomisées supplémentées en vitD (HM + vitD, OVX).

### 3-2-3- Consommation des régimes

A J11, les quantités de croquettes consommées dans les différents groupes expérimentaux étaient équivalentes (Tableau 8). A J23, les souris pseudo-opérées soumises à l'huile d'olive vierge (HO V, SH) ont consommé significativement plus que certains lots de souris OVX.

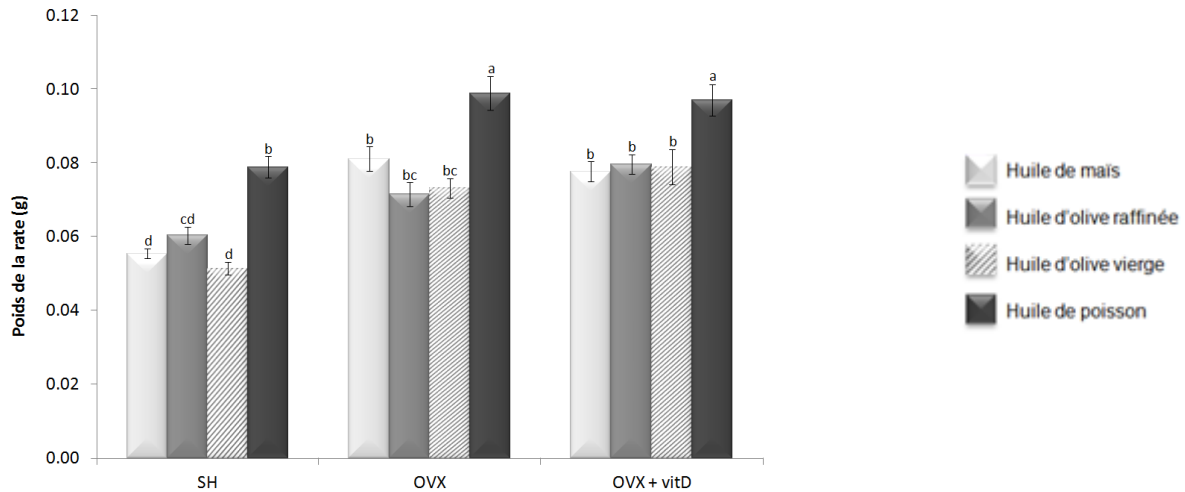
Le calcul du rapport gain de poids corporel sur la consommation permettait de mettre en évidence que la prise de poids par quantité de nourriture ingérée était plus importante chez les animaux OVX (Tableau 8).

### 3-2-4- Poids des organes

#### 3-2-4-1- Poids de l'utérus

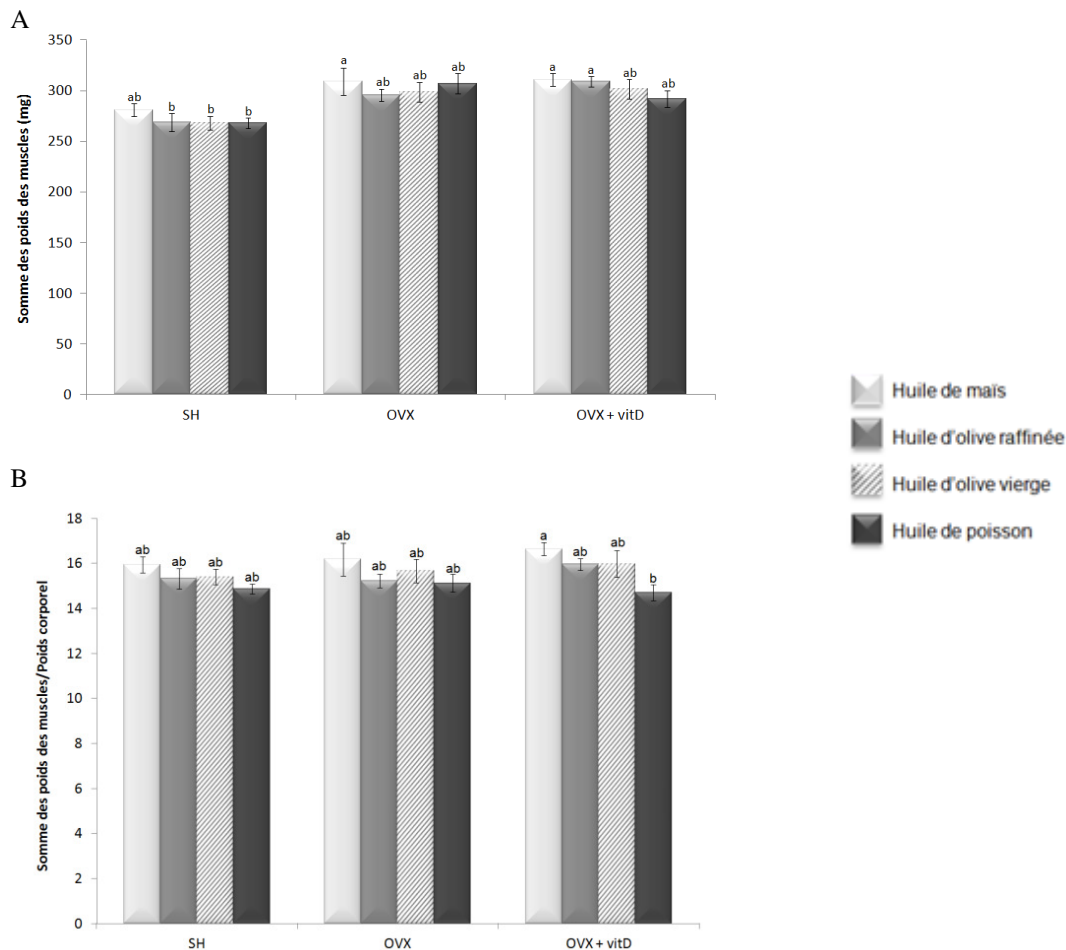
Les poids des utérus des souris OVX étaient significativement plus faibles que ceux des animaux SH (Figure 55).





**Figure 57 : Poids de la rate.**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).



**Figure 58 : Poids des muscles et poids des muscles rapportés au poids corporel.**

(A) Poids des muscles et (B) poids des muscles rapportés au poids corporel des souris SH ou OVX soumises à de l'huile de maïs, de l'huile d'olive raffinée, de l'huile d'olive vierge ou de l'huile de poisson enrichies ou non en vitamine D3. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).

#### *3-2-4-2- Poids du foie*

Les lots OVX étaient similaires au lot SH correspondant (Figure 56). De plus, le poids du foie était équivalent entre les lots de souris soumis à l'huile de maïs, l'huile d'olive raffinée ou l'huile d'olive vierge. Le poids du foie des souris ayant consommé de l'huile de poisson étaient supérieurs à celui des animaux ayant reçu de l'huile de maïs si l'on compare les lots SH, OVX et OVX + vitD entre eux.

#### *3-2-4-3- Poids de la rate*

Le poids de la rate était augmenté de façon significative avec l'OVX sauf en ce qui concerne le lot huile d'olive raffinée (HO raff, OVX) (Figure 57). Cette splénomégalie était renforcée par la consommation d'HP chez les tous individus (HP, SH ; HP, OVX et HP + vitD, OVX).

#### *3-2-4-4- Poids des muscles*

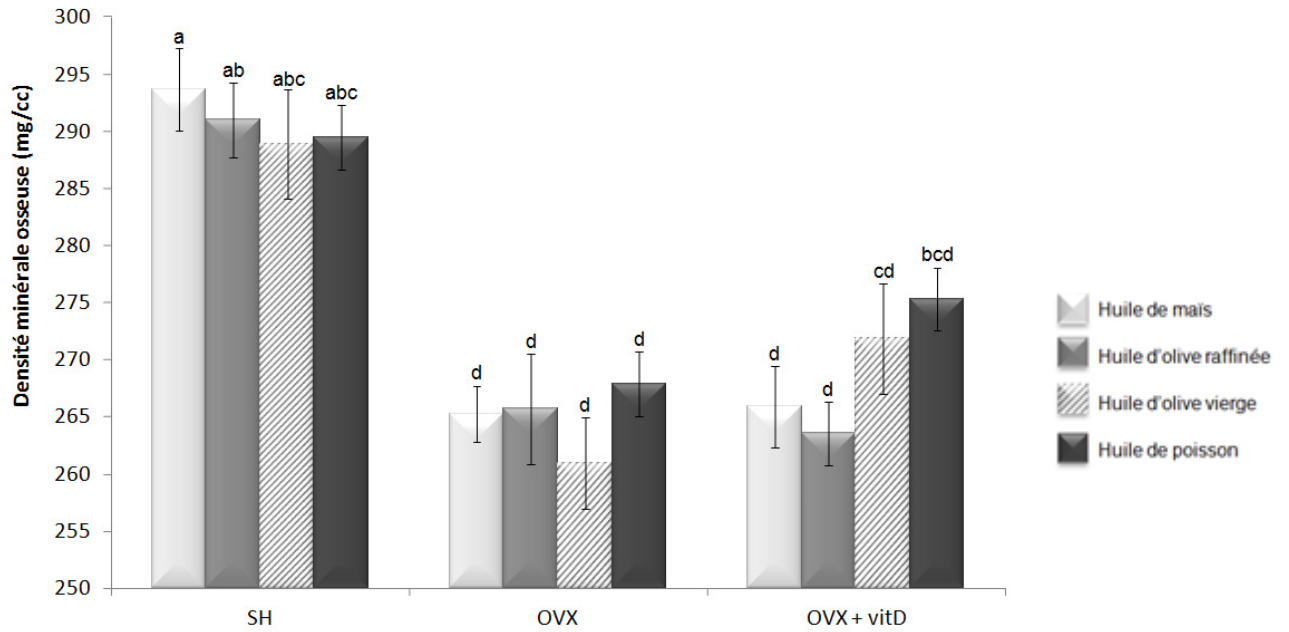
Les lots étaient globalement équivalents en termes de poids des muscles (Figure 58A). Deux résultats intéressants sont à souligner : le poids des muscles du lot d'animaux OVX soumis à l'huile raffinée supplémentée en vitD (HO raff + vitD, OVX) était significativement plus important que ceux du lot SH correspondant (HO raff, SH) ( $p=0,026$ ). De plus, le paramètre tendait à augmenter dans le lot de souris OVX ayant consommé de l'huile de poisson (HP, OVX) par rapport au lot pseudo-opéré correspondant (HP, SH) ( $p=0,059$ ).

Lorsque le poids des muscles était rapporté au poids corporel, les différences entre les lots s'annulaient ( $p=0,047$  entre les lots HM + vitD, OVX et HP + vitD, OVX) (Figure 58B).

### **3-2-5- Les paramètres osseux**

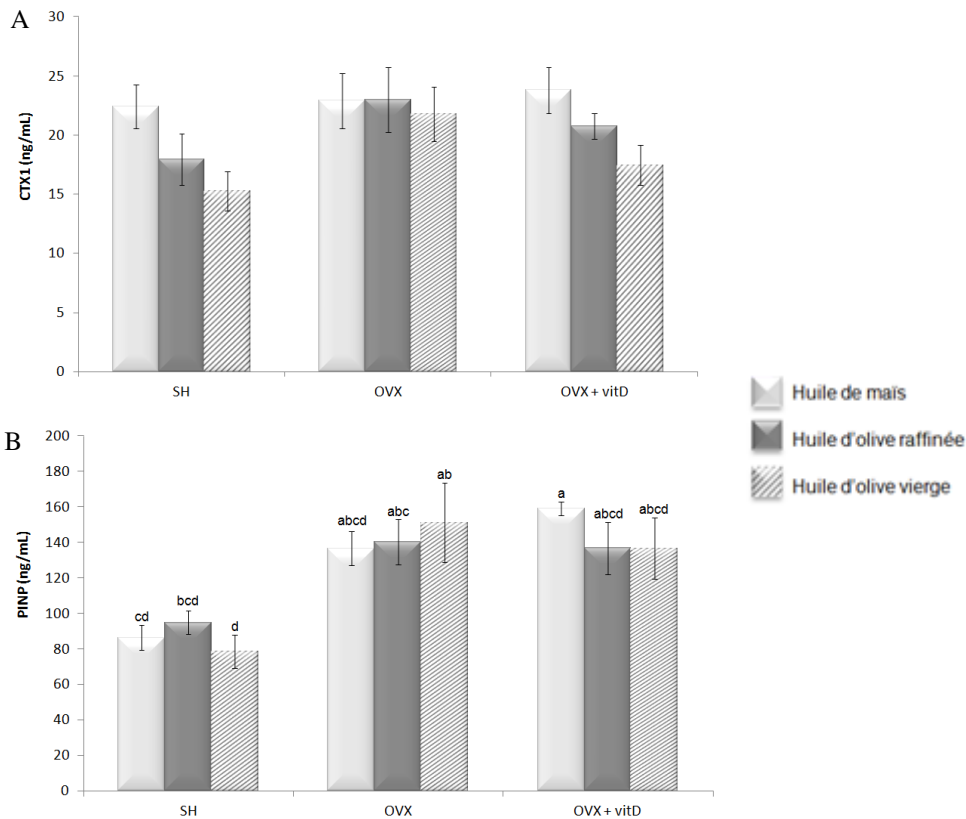
#### *3-2-5-1- Densité minérale osseuse*

Comme attendu, la BMD était diminuée significativement par l'OVX ( $p<0.0001$ ) (Figure 59). Aucun effet significatif des huiles seules que ce soit sur les animaux SH ou OVX n'était mis en évidence. Cependant, l'addition de vitD à l'huile d'olive vierge ou à l'huile de poisson permettait de réduire la perte osseuse. Ainsi, la BMD des lots HO V + vitD, OVX et HP + vitD, OVX avait un profil intermédiaire en n'étant pas différente significativement des autres lots OVX et du lot SH correspondant.



**Figure 59 : Densité minérale osseuse de l'os trabéculaire du fémur de souris.**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ).



**Figure 60 : Concentrations sériques des marqueurs du turnover osseux.**

(A) CTX1 et (B) PINP Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Deux groupes sont significativement différents s'ils n'ont aucune lettre en commun ( $p < 0,05$ ). PINP, N-terminal propeptide of type I procollagen; CTX1, C-telopeptide du collagène de type I.

### 3-2-5-2- *Dosages sériques*

Les dosages sériques ont été effectués sur des animaux des 9 premiers lots uniquement (pas sur les lots huile de poisson). Il n'y avait pas de différence significative entre les lots en ce qui concerne le dosage du marqueur de la résorption osseuse (CTX1) (Figure 60). Il existe cependant une tendance pour une plus forte résorption osseuse dans le lot HM + vitD, OVX par rapport au lot HO V, SH ( $p=0,072$ ). Le dosage du marqueur PINP permettait de mettre en évidence une augmentation de la formation osseuse chez les individus OVX.

### 3-3- Discussion

La pesée des utérus permettait de valider le modèle de castration, comme décrit dans la littérature (Modder, Riggs et al. 2004). De plus, le poids corporel était augmenté chez les animaux ovariectomisés, résultat classiquement décrit dans la littérature (Rogers, Perfield et al. 2009). Ce phénomène était associé à une diminution de la dépense énergétique mise en évidence par le calcul du rapport gain de poids sur consommation, ce qui est conforme aux données de la littérature (Rogers, Perfield et al. 2009).

Selon les données de composition corporelle, la prise de poids chez les souris ovariectomisées semblait être due à l'évolution de la masse maigre. Ceci est à mettre en relation avec l'augmentation du poids des muscles dans certains groupes de souris ovariectomisées (huile raffinée + vitD, OVX et huile de poisson, OVX). Les résultats relatifs à l'évolution pondérale des muscles étaient comparables aux observations faites dans l'expérimentation animale sur le modèle de la rate ovariectomisée (augmentation du poids des muscles qui s'annulait lorsqu'il était rapporté au poids corporel), mais de façon moins significative. Cette différence pourrait être due à la durée plus courte de l'ovariectomie. En effet, il est possible que les altérations au niveau musculaire fussent une réponse à l'altération osseuse pour limiter la force musculaire appliquée à un os fragilisé, et donc un effet plus tardif. De plus, le modèle souris conduisait à une moindre altération osseuse par rapport au rat, qui pourrait aussi expliquer une atteinte plus faible du compartiment musculaire. Cette hypothèse est basée sur l'interconnexion des tissus osseux et musculaires. Il est important de souligner qu'un groupe de muscles était ciblé dans l'expérimentation souris, alors qu'un seul muscle était étudié dans l'expérimentation rat. Ceci pouvait atténuer les effets spécifiques à certains muscles. De plus et de la même façon que pour les rats, lorsque l'on rapporte le poids des muscles au poids corporel, les différences entre les lots s'annulaient. L'augmentation du poids des muscles pourrait donc être une réponse à l'évolution pondérale globale.



Le poids du foie était augmenté chez les animaux ayant consommé l'huile de poisson par rapport à ceux ayant reçu l'huile de maïs, et ce indépendamment de l'ovariectomie. Pourtant, dans la littérature, l'huile de poisson est plutôt associée à un effet hépato-protecteur pouvant même se traduire par une réduction du poids du foie (Valenzuela, Espinosa et al. 2012). Les huiles de poisson ayant des compositions très diversifiées, il est tout à fait envisageable que les effets métaboliques diffèrent. Il est possible que dans notre modèle il y ait eu une infiltration lipidique ou une fibrose hépatique à l'origine de l'augmentation du poids du foie.

L'ovariectomie entraînait une augmentation du poids de la rate (reflète l'inflammation), résultat préalablement décrit dans la littérature (Edwards, Bain et al. 1992; Nandedkar 1992). De façon inattendue, dans la présente étude, la consommation d'huile de poisson induisait aussi une splénomégalie, qui s'additionnait aux effets de l'ovariectomie.

De façon très intéressante, l'huile de poisson enrichie en vitamine D3 permettait de limiter la perte osseuse due à l'ovariectomie, tout comme l'huile d'olive vierge associée à la vitamine D3 (qui a fait l'objet de la seconde publication). Ce résultat est en accord avec des publications précédentes chez la souris ovariectomisée (Sun, Krishnan et al. 2003) ou non (Bonnet and Ferrari 2011). Ce résultat renforce l'idée que c'est la forte consommation d'huile d'olive et de poisson et le bon statut en vitamine D qui permettent, au moins en partie, de limiter la prévalence de l'ostéoporose et des fractures (Benetou, Orfanos et al. 2013; Rivas, Romero et al. 2013).

### 3-4- Conclusions et perspectives

Cette expérimentation animale a permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'huile d'olive vierge associée à la vitamine D3 sur la perte osseuse induite par l'ovariectomie. L'huile de poisson enrichie en vitamine D3 prévenait aussi ce processus d'ostéopénie consécutif à l'ablation des ovaires, toutefois associée à une splénomégalie et à une augmentation du poids du foie. Les mécanismes impliqués restent inexpliqués.

Les observations faites sur les poids des muscles étant similaires à ce qui était mis en évidence chez le rat, les échantillons prélevés seront analysés pour poursuivre les investigations concernant l'impact de la perte hormonale sur la fonction musculaire et le lien entre les tissus osseux et musculaires au cours de la ménopause. En effet, la mise en évidence de la prise de masse musculaire avec l'ovariectomie sur deux modèles animaux différents (race murine, durée expérimentale, qualité des régimes alimentaires en terme de contenu



calcique notamment) renforce l'idée que le tissu musculaire est altéré en réponse à la perte osseuse pour limiter la force appliquée à un os fragilisé, et donc d'une interconnexion entre les deux tissus.





# Etude Clinique

Seuls le protocole et l'évolution des recrutements seront présentés dans ce manuscrit, les dernières inclusions ayant eu lieu en juillet 2014.

## 1- Objectif et autorisations

L'objectif principal était d'obtenir des preuves de recherche clinique de l'efficacité de la consommation d'huile d'olive riche en polyphénols et une éventuelle synergie avec la vitamine D et le DHA sur la fonction locomotrice. Pour cela, une étude clinique en double aveugle sur 150 sujets répartis sur les centres de Clermont-Ferrand et de Marseille a été mise en place. Ainsi, la consommation quotidienne pendant 9 mois, de 20 mL d'huile d'olive raffinée, d'huile d'olive vierge riche en polyphénols ou d'huile d'olive vierge riche en polyphénols enrichie en vitamine D3 et en DHA a été évaluée sur 3 groupes de 50 personnes.

Les autorisations du Comité de Protection des Personnes (CPP) et de l'ANSM ont été obtenues respectivement le 06 avril 2012 et le 27 novembre 2012. Au cours de l'étude, différents amendements ont été déposés et validés par le CPP les 05 octobre 2012 et 01 février 2013. La suppression des cinétiques et leur remplacement par une étude métabolomique a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès des 2 entités, qui ont été obtenues le 06 septembre 2013 et le 12 septembre 2013, respectivement.

## 2- Protocole expérimental

### 2-1- Protocole

#### 2-1-1- Les aliments tests

##### 2-1-1-1- *Les dosettes d'huile d'olive*

L'huile d'olive vierge a été produite fin 2011 par la société Patano (Bari, Italie). Six fûts de 200 kg ont été commandés parmi lesquels 2 ont été raffinés par l'ITERG pendant la semaine du 16 au 20 juillet 2012 (Pessac, France). La semaine suivante, le mélange de l'huile vierge enrichie a été réalisé. Pour cela, 17,5 kg de Marinol D-40 (Stepan, Maywood, USA) contenant 340 mg/g de DHA ainsi que 3,3 g de vitamine D3 1.0 million UI/g (soit 82 500 µg) (BASF, Ludwigshafen, Germany) ont été ajoutés à 286,5 kg d'huile d'olive vierge extra. Des



échantillons de chaque huile ont été prélevés pour analyses (acides gras, tocophérols, vitamine D, polyphénols, contaminants et pesticides) par l'ITERG. La mise en dosettes de 20 mL et le conditionnement en boîtes de 30 dosettes ont été effectués par la société Miniberia (Jerez, Espagne) les 2 et 3 octobre 2012. 387 boîtes de dosettes (soit 129 boîtes par lot) ont été livrées à l'INRA de Theix, le même nombre de boîtes ont été livré au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) d'Auvergne et 777 boîtes (soit 259 par lot) à Marseille. Dès réception, les boîtes ont été réétiquetées conformément aux données de randomisation puis stockées à -20°C. Dix boîtes d'huile par volontaire ont été prévues. Après distribution auprès des volontaires, celles-ci avaient pour consigne de les conserver à -20°C sauf pour la boîte en cours de consommation qui devait être gardée à température ambiante.

#### *2-1-1-2- Les comprimés de calcium*

Des comprimés de 400 mg de calcium ont été donnés aux volontaires à raison d'un comprimé par jour pour que toutes les volontaires aient un statut suffisant en calcium et que ce dernier ne soit pas limitant pour l'effet des molécules testées. Les comprimés de calcium ont été fabriqués par le laboratoire LPH (3iNature, Saint-Bonnet-de-Rochefort, France).

#### **2-1-2- Le cahier d'observation**

Toutes les données collectées au cours de cette étude ont été répertoriées dans des cahiers d'observation électroniques sous le logiciel Research Electronic Data Capture (REDCap) (Vanderbilt University, Nashville, USA).

### **2-2- Recrutement des volontaires**

#### **2-2-1- Les critères d'inclusion et d'exclusion**

##### *2-2-1-1- Critères d'inclusion*

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- ✓ Sexe féminin
- ✓ Ethnie caucasienne
- ✓ Femmes ne prenant pas de (THS) depuis au moins 1 an
- ✓ Femmes ayant plus de 7 ans de ménopause, ou étant âgées de 57 ans à 80 ans, valeurs extrêmes incluses
- ✓ IMC compris entre 21 et 30 kg/m<sup>2</sup>, valeurs extrêmes incluses
- ✓ Bilan hépatique et rénal normal
- ✓ Sujet considéré comme sain sur l'examen clinique et l'interrogatoire médical
- ✓ Sérologies virus d'immunodéficience humaine (VIH), hépatite C négatives



- ✓ Sujet acceptant l'inscription au fichier national des volontaires qui se prêtent à des recherches biomédicales,
- ✓ Sujet acceptant l'utilisation d'une codification anonyme y compris dans les publications scientifiques, ainsi que la confidentialité des résultats
- ✓ Personne assujettie à un régime de sécurité sociale
- ✓ Sujet ayant signé la fiche d'information, apte à donner son consentement éclairé.

#### 2-2-1-2- Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion liés à l'alimentation et à l'hygiène de vie étaient :

- ✓ Régime alimentaire végétarien, végétalien
- ✓ Sujet suivant un régime hypocalorique, ou ayant suivi un régime hypocalorique dans les 3 derniers mois, ou ayant eu une variation pondérale supérieure ou égale à 5 kg en 3 mois, ou supérieure ou égale à 10 kg en 6 mois
- ✓ Régime alimentaire en cours autre que végétarien, végétalien ou hypocalorique, jugé incompatible avec l'étude par l'investigateur ou la diététicienne
- ✓ Antécédents d'anorexie mentale, boulimie ou trouble du comportement alimentaire
- ✓ Consommation régulière de compléments alimentaires et vitaminiques et refusant d'arrêter la prise durant l'étude. (En cas d'arrêt de ces compléments il est préconisé un délai de 3 mois minimum avant le début de l'étude)
- ✓ Sujet refusant ou jugé inapte à suivre les consignes diététiques de l'étude
  
- ✓ Immobilisation prolongée ou incapacité physique
- ✓ Tabagisme excessif (>1 paquet/j) avec changement des habitudes durant les 2 derniers mois
- ✓ Consommation excessive d'alcool (>14 verres/semaine)
- ✓ Sportive de haut niveau (>5 heures/semaine).

Les critères d'exclusion liés à la biologie et physiopathologie étaient :

- ✓ Sujet ayant subi une intervention chirurgicale ou souffrant d'une affection chronique sévère jugée incompatible avec la réalisation et les objectifs de l'étude par l'investigateur, telle que : cancer, insuffisance rénale, insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire chronique, maladie inflammatoire chronique digestive, articulaire ou autre, sarcoïdose, ostéoporose (T score  $\leq$  -2.5), maladie de Paget, maladie de Cushing, troubles thrombo-emboliques, dysthyroïdie non équilibrée
- ✓ Traitements médicamenteux pris de façon chronique : THS, calcitonine, statines et autres hypolipémiants (fibrates, acides gras oméga 3, acide nicotinique), corticoïdes, tibolone, biphosphonates, dehydroepiandrosteron (DHEA), modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERM), ranélate de strontium, anti-inflammatoires, vitamine D, anticoagulants
- ✓ Statut en vitamine D (25(OH)D) supérieur ou égal à 100 nmoles/L
- ✓ CRP  $\geq$  10 mg/L.



Les autres critères d'exclusion étaient :

- ✓ Sujet inapte à suivre une étude de longue durée
- ✓ Sujet participant à une autre recherche biomédicale ou en période d'exclusion d'une précédente recherche
- ✓ Sujet ayant perçu, au cours des 12 derniers mois, des indemnités dans le cadre d'une recherche biomédicale d'un montant total égal à 4500 euros
- ✓ Sujet présentant une incapacité psychique ou linguistique de signer le consentement éclairé
- ✓ Sujet refusant de donner son consentement écrit
- ✓ Sujet privé de liberté par décision administrative ou judiciaire, sous tutelle ou curatelle.

### **2-2-2- Organisation du recrutement**

La voie médiatique a été privilégiée pour le recrutement des volontaires : 2 annonces ont été publiées dans le journal La Montagne le dimanche 16 septembre 2012 et le mercredi 2 avril 2014 et une annonce a été diffusée au journal télévisé de France 3 Auvergne du dimanche 9 décembre 2012. De plus, un accès au fichier des volontaires inscrites auprès du CRNH d'Auvergne nous a été donné. Pour chaque volontaire potentielle, un questionnaire (coordonnées, âge, date de la ménopause, prise de THS, poids, variations de poids, taille, régimes végétarien ou hypocalorique, prise de compléments alimentaires, activité physique, immobilisation prolongée, incapacité physique, consommation d'alcool et de cigarette, affection chronique, traitements médicamenteux, prise de vitamine D, participation actuelle à l'étude clinique) a été complété. Les volontaires qui ne correspondaient pas aux critères ont alors été prévenues par téléphone. Les autres ont été classées soit dans la liste principale soit dans une liste complémentaire si elles n'avaient pas tout à fait 57 ans, 7 ans de ménopause ou si elles prenaient des compléments alimentaires par exemple. Les volontaires potentielles ont alors été recontactées au fur et à mesure des disponibilités pour les visites d'inclusion.

### **2-2-3- Les visites d'inclusion V0 et V0'**

Lors de la première visite, le protocole expérimental était expliqué aux volontaires et remis sous forme d'une lettre d'information. Après signature du consentement, elles rencontraient le médecin de l'étude pour établir un bilan médical. Suite à l'autorisation du médecin, un prélèvement sanguin a jeun pour les bilans biologiques d'inclusion et de sécurité (numération formule sanguine, plaquettes, sérologies HIV et hépatite C, concentrations plasmatiques de vitamine D, PTH, CRP, lipides plasmatiques, bilans hépatique (Aspartate Amino Transférase (ASAT), Alanine Amino Transférase. (ALAT), gamma





glutamyl-transférases (gamma GT), ALP) et rénal (urée, créatinine)), ainsi que les premières mesures anthropométriques a été effectué. Ainsi, la taille, le poids, les tours de taille, hanches et cuisse ont été mesurés selon le mode opératoire (UNH-MO-ASM-TEC 23 version 1) mis en place pour la présente étude. Les diététiciennes recevaient alors les volontaires pour leur expliquer les consignes diététiques, leur remettre un relevé alimentaire à compléter sur 4 jours avant la visite V0' et les soumettre à un questionnaire ciblant plus précisément leurs apports en calcium (questionnaire de Fardellone). Enfin, elles complétaient les questionnaires d'activité physique de Baecke, de consommation d'alcool et de tabac.

La visite V0' consistait à reprendre le relevé alimentaire avec les diététiciennes et réaliser les premières mesures d'ostéodensitométrie (voir paragraphe 2-3-1).

Après vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion, les volontaires qui remplissaient tous les critères ont été incluses dans l'étude.

#### **2-2-4- Les visites au cours de l'étude**

Au cours des 9 mois d'étude, les volontaires sont venues au CRNH d'Auvergne à 0, 3 mois, 6 mois et 9 mois pour les visites V1, V2, V3 et V5 respectivement. Suite à la randomisation dans 1 des 3 groupes, les volontaires ont reçu les boîtes d'huiles ainsi que des comprimés de calcium au fur et à mesure des différentes visites. Les visites V1, V2 et V5 débutaient par une prise de sang à jeun et l'examen anthropométrique suivis d'un petit déjeuner. Les tubes de plasma (héparinate de lithium et EDTA) ont été centrifugés à 1300 g, 10 min, à 4°C. Les tubes de sérum ont été centrifugés à 4000 rpm, 10 min, à 4°C, après être restés 20 minutes à température ambiante. Les échantillons de plasma et de sérum ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Les volontaires ont ensuite été soumises à des mesures de force, au SPPB, ainsi qu'à un questionnaire d'activité physique de Baecke. A la visite V3, seuls le poids et la taille ont été mesurés. Les relevés des éventuels traitements concomitants et événements indésirables ont été effectués aux visites V2, V3 et V5. Lors de ces mêmes visites, le relevé de consommation des huiles et des comprimés de calcium a été récupéré auprès des volontaires. Deux relevés alimentaires ont été distribués à V1 et V3, complétés avant la visite suivante et validés avec les diététiciennes à V2 et V5. La visite V5 a été précédée la veille au soir de la prise d'un repas test (2 tranches de jambon blanc découenné, dégraissé, 100 g de pâtes et 1 yaourt nature accompagné de sucre blanc), en vue d'une étude métabolomique. Pour cela, l'urine de la 2<sup>ème</sup> miction du matin a été recueillie et aliquotée. A V5, une seconde mesure d'ostéodensitométrie a été effectuée. De plus, l'acceptabilité de l'huile a été évaluée juste après le début de l'étude et à V5.



## **2-3- Paramètres d'étude**

### **2-3-1- La densité minérale osseuse et la composition corporelle**

Les mesures d'ostéodensitométrie (BMD et composition corporelle) ont été réalisées selon le mode opératoire (UNH-MO-ASM-TEC-27 version 1). Le T-score a été mesuré au niveau du corps entier, de la hanche et du rachis lombaire. A chacun de ces 3 sites, il devait être supérieur à -2,5 car l'ostéoporose était un critère d'exclusion. Les mesures de composition corporelle ont été effectuées lors de l'examen corps entier.

De plus, une standardisation entre les 2 centres d'étude a été mise en place. Ainsi, le même phantom a été mesuré de façon régulière tout au long de l'étude sur les 2 appareils.

### **2-3-2- Le test de force**

Le test de force a été réalisé à l'aide d'un dynamomètre Jamar® Plus+ (Patterson Medical, Bolingbrook, USA) selon le mode opératoire (OG-UEN-MOP-03, version 2). Le test a été réalisé 3 fois de chaque côté en alternant main droite main gauche. Le meilleur des essais a été conservé.

### **2-3-3- Le test short physical performance battery**

Ce test, composé de 3 parties destinées à évaluer l'équilibre, la marche et la capacité à se lever d'une chaise, a été réalisé selon le mode opératoire (OG-UEN-MOP-02, version 1).

### **2-3-4- Les paramètres sanguins**

Le plasma et le sérum ont été prélevés en vue de doser les paramètres osseux (ALP, CTX-1, Procollagen Type II C-Propeptide (CPII), cleavage of type-II collagen (C2C), les paramètres inflammatoires (CRP, TNF- $\alpha$ , soluble tumour necrosis factor receptor-1 (sTNFR1), sTNFR2, IL-1, IL-6, IL-15, monocyte chemotactic protein 1 (MCP1 autrement appelé chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)), hormonaux (adiponectine, leptine) et les paramètres lipidiques (triglycérides, cholestérol/esters de cholestérol, phospholipides, acides gras libres, analyse des profils en acides gras libres, saturés, mono insaturés et polyinsaturés).

## **3- Le déroulement du recrutement**

Pour Clermont-Ferrand, la première campagne (annonces journalistique et télévisuelle) a permis de compléter 446 fiches de recrutement. Parmi ces volontaires potentielles, 147 ont été classées dans la liste principale, 67 sur la liste complémentaire et les

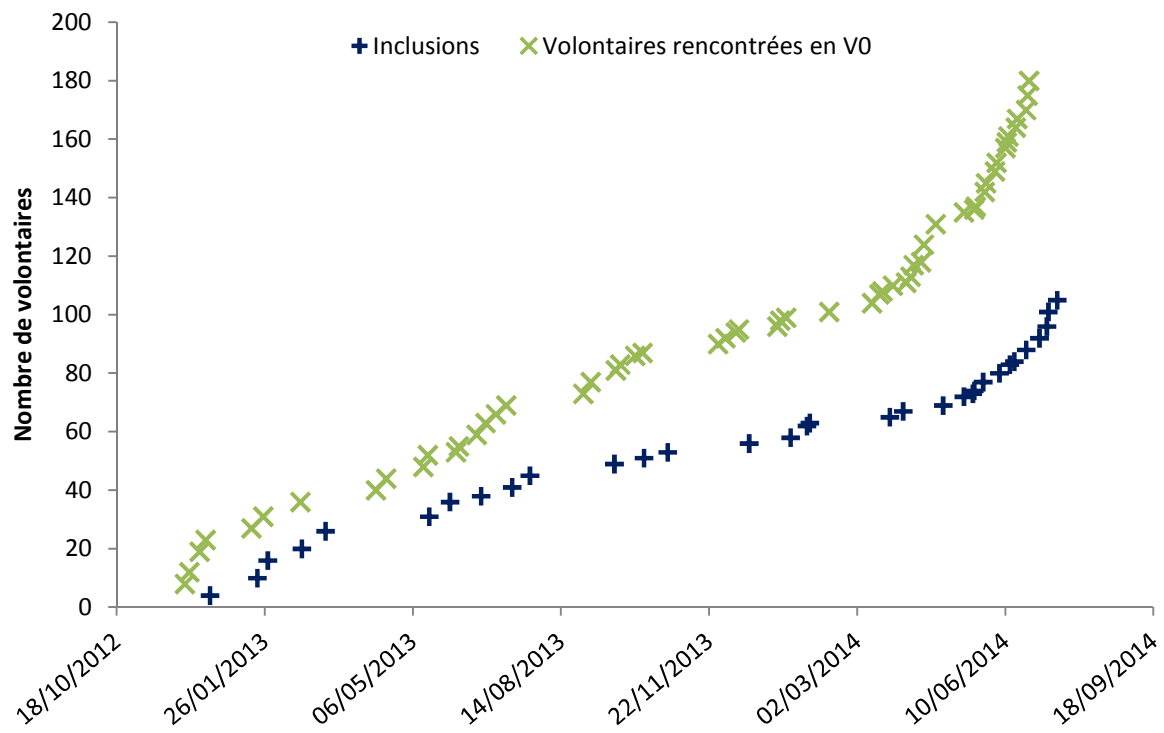


Figure 61 : Déroulement des recrutements sur le site de Clermont-Ferrand.

232 autres ont été prévenues par téléphone de leur exclusion. Les volontaires de la liste principale ont été contactées au fur et à mesure du planning de visites prévu par le CRNH tout au long de l'année 2013. Début 2014, toutes les volontaires potentielles avaient été contactées alors que 63 volontaires sur les 75 étaient incluses. Des volontaires inscrites auprès du CRNH d'Auvergne ont alors été contactées et une nouvelle annonce journalistique a été diffusée le 2 avril 2014. Ces nouveaux contacts ont permis de terminer le recrutement des 75 volontaires pour le site de Clermont-Ferrand en mars 2014 et de 30 des 75 volontaires du site de Marseille, finalement incluses sur Clermont-Ferrand, de mars 2014 à fin juin 2014 (Figure 61).



# Mise au point de la culture *ex vivo* de hFOB1.19

Le but était de mettre au point la culture *ex vivo* d'une lignée ostéoblastique humaine en vue d'évaluer les effets de plasmas issus des volontaires de l'étude clinique, exposées ou non aux polyphénols de l'huile d'olive, à la vitamine D et au DHA. Cette expérimentation sera menée dès que toutes les volontaires auront terminé les 9 mois de prise alimentaire.

La lignée ostéoblastique hFOB1.19 (CRL-11372) (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA) a été sélectionnée. Les cellules ont été cultivées sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu Dulbecco's Minimum Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture Ham (DMEM-F12 (1:1), Gibco Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Lonza, Basel, Suisse) et en présence de 0,3 mg/mL de l'antibiotique geneticin (G418, Sigma G8168), selon les indications du fournisseur.

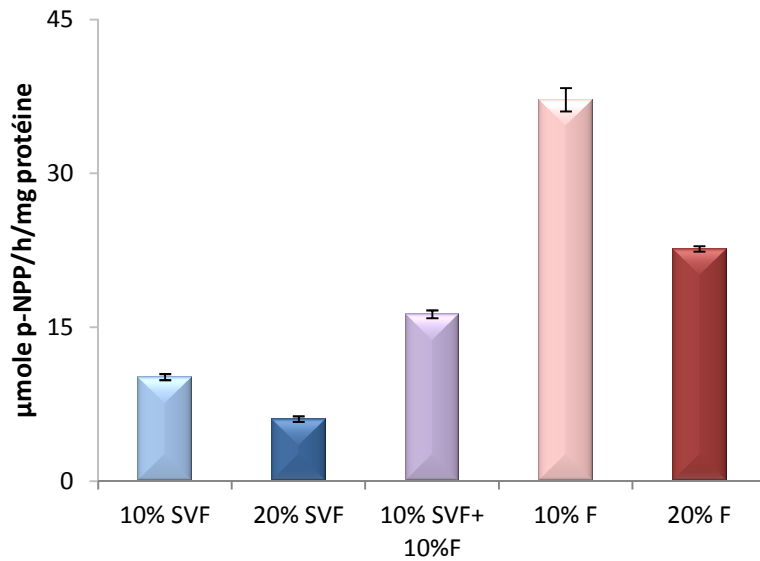
La possibilité de remplacer le SVF par du plasma humain, tout ou en partie, a été évaluée. Ensuite, les conditions idéales pour obtenir un pic d'activité de l'ALP ainsi que des nodules de calcium ont été déterminées.

## **1- Culture *ex vivo*, activité de l'alkaline phosphatase et minéralisation**

La première expérimentation a permis de mettre en évidence que le plasma humain utilisé en remplacement ou en addition du SVF n'induisait pas la mort des hFOB1.19. Cependant, après 13 jours de traitement, les tapis cellulaires commençaient à se détacher, rendant nécessaire le revêtement préalable des puits en collagène pour des expériences dont la durée est supérieure à une dizaine de jours.

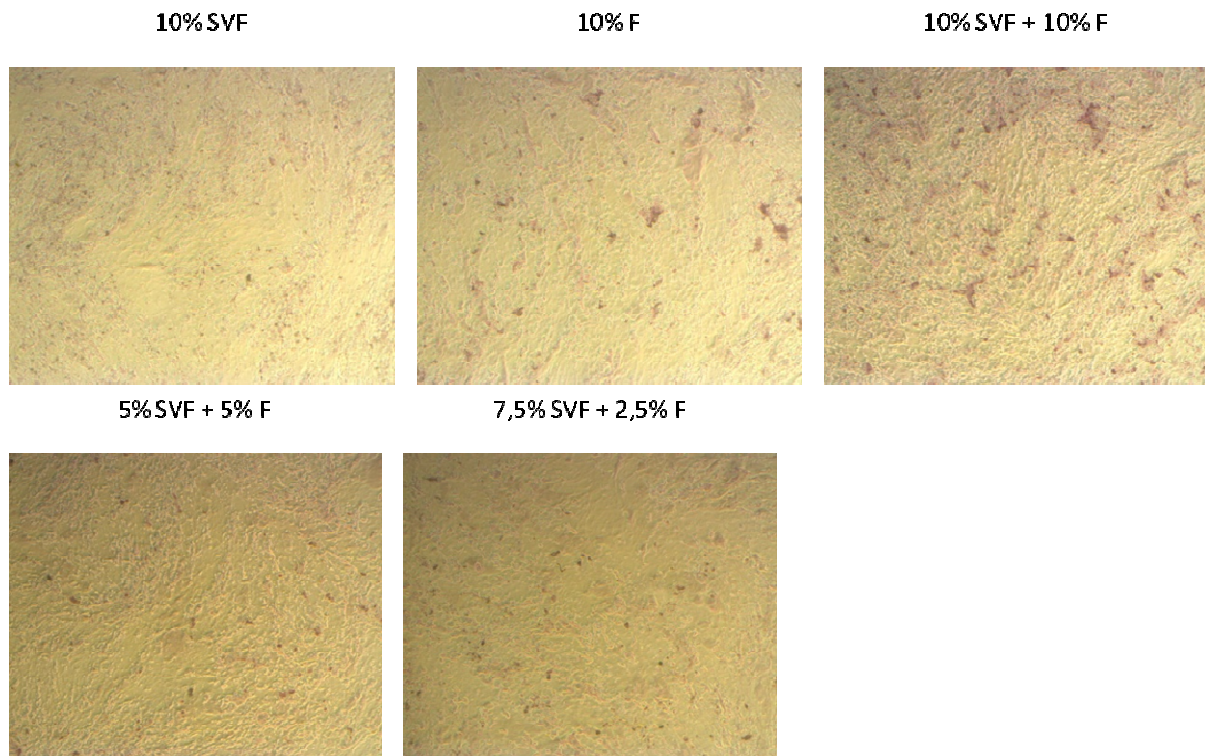
La seconde expérimentation a permis d'évaluer différentes quantités de plasma sur le pic de l'activité ALP : 10% de SVF (condition contrôle), 20% de SVF, 10% de plasma





**Figure 62 : Activité ALP des hFOB1.19 cultivées en présence de plasma humain.**

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM. ALP, alcaline phosphatase ; p-NPP, p-nitrophenyl phosphate, SVF, serum de veau fœtal ; F, plasma humain.



**Figure 63 : Observation au microscope des puits de culture des hFOB1.19 cultivées en présence de plasma humain après coloration à l'Alizarin Red.**

SVF, serum de veau fœtal ; F, plasma humain.

humain, 20% de plasma humain ou 10% de SVF + 10% de plasma humain (Figure 62). Pour cela, les cellules,ensemencées à 30000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 96 puits, ont proliféré à 33,5°C jusqu'à confluence puis ont été transférées à 37°C. Afin de limiter les quantités de plasma humain utilisées, l'activité de l'ALP a été mesurée à J7. La plus forte activité enzymatique était obtenue avec la condition 10% de plasma humain (37,20 µmole p-NPP/h/mg protéine) alors que la condition témoin 10% de SVF était à 10,16 µmole p-NPP/h/mg protéine. L'ajout de 20% de plasma humain présentait une activité intermédiaire (22,66 µmole p-NPP/h/mg protéine) et ne sera pas utilisée dans les futures expérimentations, nécessitant plus de plasma.

Pour évaluer l'impact du plasma humain sur la minéralisation des hFOB1.19, les cellulesensemencées à 30000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 12 puits, ont proliféré jusqu'à confluence à 33,5°C puis ont été transférées à 39,5°C. Différentes conditions ont été testées : 10% SVF (condition contrôle), 10% de plasma humain (F), 10% SVF + 10% F, 5% SVF + 5% F ou 7,5% SVF + 2,5% F. Les plaques ont été colorées à l'Alizarin Red après 26 jours de culture.

La plus forte densité de nodules de calcium était observée pour la condition 10% SVF + 10% F (Figure 63).

## **2- Conclusions**

Ces expérimentations préliminaires ont permis d'identifier les conditions de culture *ex vivo* de la lignée hFOB1.19. Ainsi, à J7, l'activité ALP était maximale en présence de 10% de plasma humain. Pour la minéralisation, la plus grande quantité de nodules de calcium était observée en condition 10% SVF + 10% de plasma humain.

Ces résultats vont permettre d'évaluer les effets de plasmas issus des volontaires de l'étude clinique, l'objectif étant d'élucider les éventuels mécanismes mis en jeu par la consommation d'une huile d'olive vierge enrichie en vitamine D et DHA. De plus, il sera éventuellement possible d'identifier et d'isoler le ou les métabolites actifs.



# Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans les programmes de recherche visant à développer de nouvelles stratégies de prévention nutritionnelle de l'ostéoporose et de la sarcopénie. De nombreux travaux mettent en évidence des interrelations, mécaniques et métaboliques, entre les tissus osseux et musculaires, notamment au cours du vieillissement. Par exemple, l'inflammation de bas grade et le stress oxydant sont des mécanismes communs au développement des deux syndromes. Ces atteintes de l'appareil locomoteur apparaissent chez la femme au moment de la ménopause, faisant de cette population la cible du présent travail.

Dans un premier temps, les mécanismes de l'impact de l'ovariectomie sur le muscle squelettique, en comparaison avec ceux d'un régime riche en graisses, ont été étudiés. Ce travail a permis de renforcer l'hypothèse qu'il existe un dialogue entre les deux tissus ce qui conforte la possibilité de prévenir les deux pathologies par une stratégie commune.

Les effets secondaires des traitements anti-ostéoporotiques, l'absence de traitement de la sarcopénie ainsi que la complexité de l'étiologie de ces pathologies, conduisent à poursuivre les recherches sur des traitements curatifs mais aussi à élaborer de nouvelles stratégies dont fait partie la prévention nutritionnelle. De nombreuses études mettent en évidence l'importance d'une bonne alimentation pour le maintien d'une bonne santé, notamment au cours du vieillissement. La consommation d'aliments à fort potentiel anti-inflammatoire et/ou antioxydant pourrait contrer certains mécanismes de développement des processus dégénératifs participant à ces altérations. La diminution du nombre de personnes atteintes d'ostéoporose et de fractures par l'adhésion à un régime méditerranéen nous a conduits à évaluer l'influence de l'huile d'olive enrichie ou non en vitamine D et/ou DHA sur la perte osseuse et musculaire.

	Rate	Souris
Souche	Wistar	C57Bl/6
Age	8 ½ mois	8 semaines
Durée de la supplémentation	19 semaines	4 semaines
Os	fémur	fémur
Muscle(s)	<i>tibialis anterior</i>	<i>tibialis anterior</i> <i>plantaris</i> <i>gastrocnemius</i>
Apports calciques	divisés par 2	normaux
Huile	Mélange	Pure

**Tableau 9 : Comparaison des modèles animaux étudiés.**

### *Modèles d'étude*

Les rates et les souris ovariectomisées sont classiquement utilisées pour modéliser la perte osseuse induite par la ménopause (Puel, Quintin et al. 2004; Lelovas, Xanthos et al. 2008; Spilmont, Leotoing et al. 2013). Comme la ménopause est associée à des altérations au niveau musculaire (Aloia, McGowan et al. 1991; Phillips, Rook et al. 1993; Rolland, Perry et al. 2007), ce modèle a aussi pu être utilisé pour étudier ce tissu (Fisher, Hasser et al. 1998; Moran, Warren et al. 2006).

## **Quel est l'impact de l'ovariectomie sur les tissus osseux et musculaires ?**

Pour simuler la perte osseuse associée à la ménopause, deux modèles murins ont été étudiés : la rate Wistar âgée de 8½ mois et la souris C57Bl/6 âgée de 8 semaines ovariectomisées (Tableau 9).

Dans les deux cas, la pesée des utérus permettait de valider l'ovariectomie, comme cela est décrit dans la littérature (Modder, Riggs et al. 2004; Spilmont, Leotoing et al. 2013). Conformément aux données de littérature, la castration accélérât la prise de poids corporel en association avec une diminution de la dépense énergétique (déterminée par le calcul du rapport gain de poids corporel sur consommation alimentaire) dans les deux modèles (Puel, Quintin et al. 2004; Rogers, Perfield et al. 2009). Selon les données de composition corporelle, le gain de poids était dû à une augmentation de la masse grasse et de la masse maigre chez la rate ovariectomisée alors qu'il n'était dû qu'à une augmentation de la masse maigre chez la souris ovariectomisée. Ces résultats sont en accord avec des mesures répétées de composition corporelle effectuées sur des rats ovariectomisés (Sharp, Copps et al. 2000). En effet, la masse grasse était significativement augmentée par rapport aux rats pseudo-opérés à partir de 8 semaines après l'opération, alors qu'à des temps plus précoces, le gain de poids des animaux ovariectomisés était dû à une augmentation de la masse maigre.

### *Ovariectomie et inflammation*

Chez le rat, les taux circulants de sTNF-R2 et de hs-CRP étaient augmentés avec l'ovariectomie (4% OVX par rapport à 4% SH), ce qui est en accord avec la littérature (Lizcano and Guzman 2014). Chez la souris, une splénomégalie était observée mais l'expression génique des marqueurs de l'inflammation n'était pas modifiée. Des résultats équivalents ont été mis en évidence chez le rat avec une augmentation des taux plasmatiques



des cytokines pro-inflammatoires après ovariectomie, qui était reversée par l'administration de faibles doses de 17 $\beta$ -estradiol (Abu-Taha, Rius et al. 2009). Une exception est à souligner puisque, au niveau du tissu osseux, l'expression de TGF- $\beta$  ainsi que sa concentration protéique étaient diminués avec l'ovariectomie chez le rat (Finkelman, Bell et al. 1992; Ikeda, Shigeno et al. 1993). Chez l'Homme, une augmentation des taux circulants de l'IL-8, de MCP1 et de CCL5 (RANTES) entre des femmes pré-ménopausées et post-ménopausée permettait de mettre en évidence que la ménopause induit une inflammation de bas grade (Abu-Taha, Rius et al. 2009). Une seconde étude donnait des résultats similaires avec une augmentation des taux circulants de l'IL-1 et de l'IL-6 après hystérectomie et ovariectomie chez des femmes pré-ménopausées (Cantatore, Loverro et al. 1995). Un traitement aux estrogènes permettait d'annuler ces effets. Il est important de souligner que le vieillissement est associée à une inflammation de bas grade impliquée dans la physiopathologie de l'ostéoporose et de la sarcopénie (Singh and Newman 2011), qui peut s'additionner à l'inflammation induite par la déplétion hormonale chez la femme post-ménopausée âgée.

#### ***Ovariectomie et stress oxydant***

En ce qui concerne le stress oxydant, celui-ci n'a été évalué que dans le modèle souris. L'ovariectomie exacerbat l'expression génique de la Nos-2, enzyme qui stimule la production d'oxyde nitrique impliqué dans le stress oxydant (van't Hof and Ralston 2001). Le promoteur de Nos-2 est sous le contrôle négatif des estrogènes (Cuzzocrea, Mazzon et al. 2003). Ainsi, Nos-2 jouerait un rôle central dans l'effet négatif de la déplétion en estrogènes sur le tissu osseux. En effet, le stress oxydant est connu pour participer aux mécanismes de la perte osseuse induite par la déficience en estrogènes (Muthusami, Ramachandran et al. 2005; Almeida, Han et al. 2007; Wauquier, Leotoing et al. 2009).

#### ***Ovariectomie et os***

A noter également que dans les deux modèles étudiés et comme décrit précédemment, la densité minérale osseuse mesurée au niveau du fémur distal était réduite, chez les animaux ovariectomisés par rapport aux rates pseudo-opérées. De même dans les deux cas, le volume osseux trabéculaire et le nombre de travées osseuses étaient diminués par l'ovariectomie alors que l'espace entre les travées était augmenté. Cependant, une différence de modèle a été observée, avec chez le rat, une diminution de l'épaisseur des travées liée à la déficience hormonale mais pas de modification chez la souris. Ceci est probablement dû à la réduction de la quantité de calcium dans le régime des rates. En effet, lorsque les animaux sont





uniquement ovariectomisés, des résultats équivalents à ce qui a été mis en évidence chez la souris sont décrits dans la littérature (Francisco, Yu et al. 2011; Spilmont, Leotoing et al. 2013). Dans une autre étude où les rates ovariectomisées étaient soumises à un régime pauvre en calcium, comme c'est le cas dans notre étude chez la rate ovariectomisée, l'épaisseur des travées était diminuée (Wang, Massie et al. 2007). Ces altérations de la densité et de la microarchitecture osseuses étaient accompagnées d'une augmentation du renouvellement osseux, phénomène connu et bien décrit dans la littérature (Imai, Kondoh et al. 2010). L'association de la perte osseuse et du gain de masse grasse lors d'une déficience estrogénique, observée uniquement chez la rate, est attribuée à une différenciation préférentielle des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes, au détriment des ostéoblastes (Ilich, Kelly et al. 2014). Cette augmentation de la masse adipeuse pourrait participer aux altérations du tissu osseux (Cao 2011). A noter que, les mécanismes déclenchés étaient différents lorsque la prise de poids et notamment de masse grasse était induite par un régime riche en graisses. En effet, dans cette situation, la densité minérale osseuse ainsi que les paramètres de microarchitecture étaient similaires aux animaux contrôles. Cependant, lorsque la densité minérale osseuse était rapportée au poids corporel, elle était significativement inférieure chez les rates soumises au régime hypercalorique par rapport au lot contrôle. Ce résultat était associé à une réduction des taux circulants de l'ostéocalcine, marqueur de formation osseuse, conformément à la littérature (Bielohuby, Matsuura et al. 2010).

### ***Ovariectomie et muscle***

En ce qui concerne le tissu musculaire, le poids des *tibialis anterior* était significativement plus important chez les rates ovariectomisées par rapport aux contrôles. De façon intéressante, des résultats similaires, mais moins significatifs statistiquement, étaient obtenus dans le modèle de la souris ovariectomisée. Ce phénomène, observé précédemment dans la littérature, est reversé par l'administration d'estrogènes chez la rate ovariectomisée (Pighon, Barsalani et al. 2010; Ngo Sock, Cote et al. 2013). Il est à noter néanmoins que la prise de masse musculaire pourrait être également due à l'augmentation du poids corporel car les différences entre les lots s'annulaient lorsque le poids des *tibialis anterior* était rapporté au poids corporel, et ce dans les deux modèles animaux. Des résultats équivalents, avec des poids de muscles (*soleus*, *plantaris*, *gastrocnemius*, *peroneus longus*, *EDL*) rapportés au poids corporel non affectés par l'ovariectomie, ont été mis en évidence par Fisher et coll. (Fisher, Hasser et al. 1998) et Moran et coll. (Moran, Warren et al. 2006). Dans la présente étude, les



mécanismes impliqués dans l'augmentation de la masse musculaire chez les animaux ovariectomisés étaient étudiés uniquement chez la rate. Ainsi, l'ovariectomie était associée à une diminution de la synthèse protéique musculaire.

A l'inverse chez les rates soumises à un régime riche en graisses, la synthèse protéique musculaire était augmentée par rapport au lot témoin. Ce résultat était confirmé par une étude précédente dans laquelle la synthèse protéique musculaire totale et plus particulièrement mitochondriale était augmentée chez des rats soumis à un régime riche en graisses pendant 6 semaines (Chanseau, Giraudet et al. 2007). De plus, dans notre étude, une diminution de l'expression de PGC1 $\alpha$ , tFAM, NRF1 et NRF2 était mise en évidence chez les animaux soumis au régime riche en graisses. Ce résultat suggère une diminution de la biogenèse mitochondriale qui renforce la diminution de l'activité enzymatique mitochondriale mise en évidence par Chanseau et coll. (Chanseau, Giraudet et al. 2007).

Dans le présent travail, chez les rates ovariectomisées, une réduction de l'expression des facteurs MyoD, qui reflète la différenciation des cellules musculaires, et MuRF1, une ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation protéique était également observée. La réduction de l'expression de MyoD (Pedraza-Alva, Zingg et al. 2009), qui est préférentiellement exprimé dans les fibres de type II (Hughes, Taylor et al. 1993), est en accord avec la diminution du nombre de fibres de type II au profit des fibres de type I impliquée dans l'atrophie musculaire associée au vieillissement (Nair 2005; Ohlendieck 2011). La réduction de l'expression de MyoD et de MuRF1 malgré le maintien du rapport poids des muscles sur poids corporel entre les rates ovariectomisées (4% OVX) et les rates pseudo-opérées (4% SH) suggère un ralentissement du renouvellement protéique, qui pourrait conduire à une altération de la qualité et de la fonctionnalité des protéines et donc de la contractilité musculaire. Cette observation est soutenue par la réduction de la synthèse protéique musculaire notée chez les animaux ovariectomisés. Prises dans leur ensemble, ces données pourraient expliquer, au moins en partie, la perte de masse et de force musculaires observée pendant la ménopause (Aloia, McGowan et al. 1991; Phillips, Rook et al. 1993). A noter que, ces résultats n'étaient pas associés à une altération de l'expression des paramètres mitochondriaux étudiés. Cependant, ce résultat ne garantit pas que la qualité des protéines fût préservée. En effet, il est possible que la réduction du renouvellement protéique soit associée à une accumulation de protéines altérées.

En outre, de la même façon que pour le tissu osseux, les résultats obtenus étaient très différents lorsque la prise de masse grasse était induite par le régime alimentaire. En effet,



chez ces animaux, le taux de synthèse protéique était augmenté, le métabolisme mitochondrial était altéré et une lipotoxicité musculaire était observée.

### ***Ovariectomie, os et muscle***

La perte osseuse pourrait être à l'origine de la réduction du renouvellement protéique musculaire pour limiter la force appliquée à l'os fragilisé et ainsi le risque de fracture (Ma, Griffith et al. 2013). En effet, de récentes études suggèrent que le tissu osseux, et notamment les ostéocytes, secrètent des ostéokines, qui activeraient ou inhiberaient des voies de signalisation des cellules musculaires squelettiques. Il est important de souligner que d'autres facteurs sécrétés par le muscle modulerait le métabolisme osseux comme l'IGF-1 et la myostatine par exemple (Hamrick 2012). La réduction de la masse osseuse, et donc du nombre d'ostéocytes, pourrait être associée à une moindre sécrétion du facteur Wnt3a, qui stimule la myogenèse *in vitro* en augmentant l'expression des facteurs MyoD et myogénine (Romero-Suarez, Mo et al. 2011). Une autre hypothèse serait que le couplage métabolique et mécanique entre l'os et le muscle est dérégulé au cours du vieillissement, conduisant à une altération des deux tissus. De plus, il est possible que l'accélération du renouvellement osseux nécessite une plus grande quantité d'énergie, contrebalancée par le ralentissement du métabolisme musculaire. Ces résultats pourraient aussi s'expliquer par des effets directs de la déplétion en estrogènes.

Les différences observées entre les deux modèles d'ovariectomie avec une moindre altération des tissus chez la souris que chez la rate, pourraient être dues à la durée de l'ovariectomie. En effet, les analyses étaient effectuées 4 semaines après l'opération chez la souris et 19 semaines chez la rate. Ainsi, si la perte osseuse est à l'origine des altérations musculaires, celles-ci seraient plus tardives et proportionnelles à la diminution de la masse osseuse. Il est possible que le renouvellement des protéines musculaires ait été moins altéré dans le modèle de souris ovariectomisée par rapport à celui de la rate.

### ***Conclusion et perspectives***

En conclusion, la déplétion hormonale, induite par l'ovariectomie dans deux modèles murins, était associée à une diminution de la densité minérale osseuse et à une augmentation de la masse musculaire. Il a été mis en évidence chez la rate, que la synthèse protéique musculaire était diminuée avec la perte d'estrogènes, en association avec une réduction de l'expression génique des facteurs MyoD et MuRF1, suggérant un ralentissement du



renouvellement protéique du muscle avec une diminution de la qualité et de la fonctionnalité des protéines musculaires, et plus particulièrement de la contractilité musculaire. Il est probable que ce mécanisme soit lié au processus de perte osseuse. Ce résultat renforce les données de la littérature sur les relations entre les deux tissus, et suggère la possibilité de mettre en place des leviers communs, notamment nutritionnels, pour modifier ces phénomènes. Cependant, pour élucider les mécanismes de la perte hormonale sur les tissus osseux et musculaires, il semble nécessaire de définir un modèle animal dans lequel les deux tissus pourraient être étudiés en parallèle. Pour cela, il faut identifier la fenêtre post-ovariectomie au cours de laquelle les deux tissus sont en cours d'altération. Il a été mis en évidence que le volume d'os trabéculaire était diminué de 33% quatre semaines après l'ovariectomie et de 72% douze semaines après l'opération, pour ensuite atteindre un plateau (Boyd, Davison et al. 2006). Ces résultats étaient comparables à nos observations réalisées après 19 semaines de carence hormonale. Ainsi, une étude cinétique s'intéressant aux perturbations induites par l'ovariectomie pourrait être mise en place chez la rate Wistar avec des prélèvements de muscles et d'os à 4, 6, 8, 10 et 12 semaines post-opération. D'après les données de la littérature, le compartiment osseux cible devrait être le tibia, de par sa sensibilité à l'ovariectomie (Francisco, Yu et al. 2011). Un muscle squelettique riche en fibres de type II (*tibialis anterior*, *plantaris* ou *EDL*), qui sont préférentiellement atrophiées au cours de la sarcopénie, devrait être privilégié dans cette étude. L'ostéoclastogenèse, l'ostéoblastogenèse, la synthèse protéique musculaire et la protéolyse musculaire devraient être étudiées.

En ce qui concerne le muscle, la voie IGF-1/Akt/mTOR n'était pas modifiée par l'ovariectomie chez la rate. D'autres voies de signalisation qui impliquent le facteur MyoD devront être investiguées. C'est le cas du facteur myocyte enhancer factor-2 (MEF2), lequel, se lie à MyoD et à d'autres facteurs au cours de la myogenèse afin d'activer la transcription de gènes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires (Muscat and Dressel 2000). De plus, il a été mis en évidence que ces facteurs jouent un rôle dans le maintien de la teneur en protéines de fibres musculaires (Dessalle, Euthine et al. 2012). L'expression de MyoD serait aussi sous le contrôle des ostéocytes via la sécrétion du facteur Wnt3a, un activateur de la voie Wnt/ $\beta$ -catenin. Dans des cellules musculaires C2C12, il a été mis en évidence que le facteur Wnt3a augmentait l'expression de MyoD et de la myogénine, ainsi que la taille des myotubes, et promouvrait ainsi la myogenèse (Romero-Suarez, Mo et al. 2011) et/ou le maintien de la teneur protéique des cellules musculaires (Dessalle, Euthine et al. 2012). Comme l'ovariectomie augmente la résorption osseuse et l'apoptose des ostéocytes





(Manolagas 2006; Seeman 2009), il est possible que la sécrétion de ce facteur soit diminuée avec l'absence d'estrogènes. En réponse, l'expression de MyoD pourrait aussi être réduite. Ainsi, l'interaction de MyoD avec le facteur MEF2 serait altérée tout comme la myogénèse, ce qui pourrait être à l'origine de la réduction de la synthèse protéique musculaire suite à la déplétion hormonale. De façon intéressante, la réduction de l'expression génique de Wnt3a et de MyoD et de la quantité de protéines MEF2 a été mise en évidence chez le rat obèse (Zhou, Strakovsky et al. 2012). Notre étude montrait que les mécanismes induits par la ménopause et par un régime riche en graisses sur le métabolisme musculaire étaient différents. A contrario, les résultats décrits par Zhou et coll. chez le rat obèse (Zhou, Strakovsky et al. 2012) sont plus en accord avec une réduction de la synthèse protéique et de l'expression de MyoD, décrite dans notre modèle d'ovariectomie. De plus, Masgrau et coll. (Masgrau, Mishellany-Dutour et al. 2012) ont récemment montré une augmentation de la synthèse protéique myofibrillaire et mitochondriale après 16 semaines de consommation d'un régime riche en graisses et une diminution de la synthèse protéique musculaire après 24 semaines (Masgrau, Mishellany-Dutour et al. 2012). Ainsi, il est possible que des mécanismes similaires à ceux qui ont été obtenus après ovariectomie soient mis en œuvre lorsque le régime est plus riche en graisses (Zhou, Strakovsky et al. 2012) ou lorsqu'il est consommé pendant plus longtemps (Masgrau, Mishellany-Dutour et al. 2012). Comme l'absence de myostatine était associée à une augmentation de la densité minérale osseuse chez la souris (Hamrick 2003; Montgomery, Pennington et al. 2005) et à des modifications d'expression de MEF2 et MyoD (Hennebry, Berry et al. 2009), ce paramètre devrait aussi être analysé. De plus, le facteur Hedgehog, impliqué dans la différenciation ostéoblastique (Long 2012) est associé à l'expression de MyoD, probablement via le facteur MEF2 (Voronova, Coyne et al. 2013). Ce facteur pourrait donc jouer un rôle dans le dialogue entre le facteur ostéocytaire Wnt3a et les facteurs musculaires MyoD et MEF2. En parallèle de l'étude des mécanismes impliqués, la fonction des protéines musculaires et notamment mitochondriales pourraient être évaluée. En effet, il est possible que le ralentissement du renouvellement protéique musculaire soit associé à une altération de la qualité et de la fonction des protéines. Par exemple, l'activité mitochondriale dépend des activités enzymatiques de différents complexes protéiques, dont les acides aminés des sites actifs peuvent être sensibles à des modifications post-traductionnelles et notamment à l'oxydation, qui altère la fonction mitochondriale (Nowotny, Jung et al. 2014). En effet, la mitochondrie est un important producteur de ROS et une de leur principale cible (Nowotny, Jung et al. 2014). Ces altérations conduisent à une diminution de la production d'ATP (Short, Bigelow et al. 2005) et à une augmentation de la production de ROS, créant un cercle vicieux



(Nunnari and Suomalainen 2012). Ainsi, la capacité respiratoire mitochondriale pourrait être évaluée (Lanza, Zabielski et al. 2012). En parallèle, la fonction des protéines impliquées dans la contraction musculaire pourrait être étudiée, des altérations ayant été montrées dans des modèles animaux d'ostéoporose post-ménopausique (Fisher, Hasser et al. 1998; Moran, Warren et al. 2006). Les sites ATPasique des myosines sont aussi très sensibles au stress oxydatif, qui pourrait conduire à des modifications post-traductionnelles altérant cette fonction (Lowe, Surek et al. 2001; Lowe, Husom et al. 2004).

Ce modèle commun à l'étude des tissus osseux et musculaires pourra éventuellement permettre d'identifier des marqueurs communs à l'ostéoporose et à la sarcopénie (Collino, Martin et al. 2014).

## **La consommation d'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D permet-elle de prévenir les altérations osseuses et musculaires induites par la déplétion hormonale?**

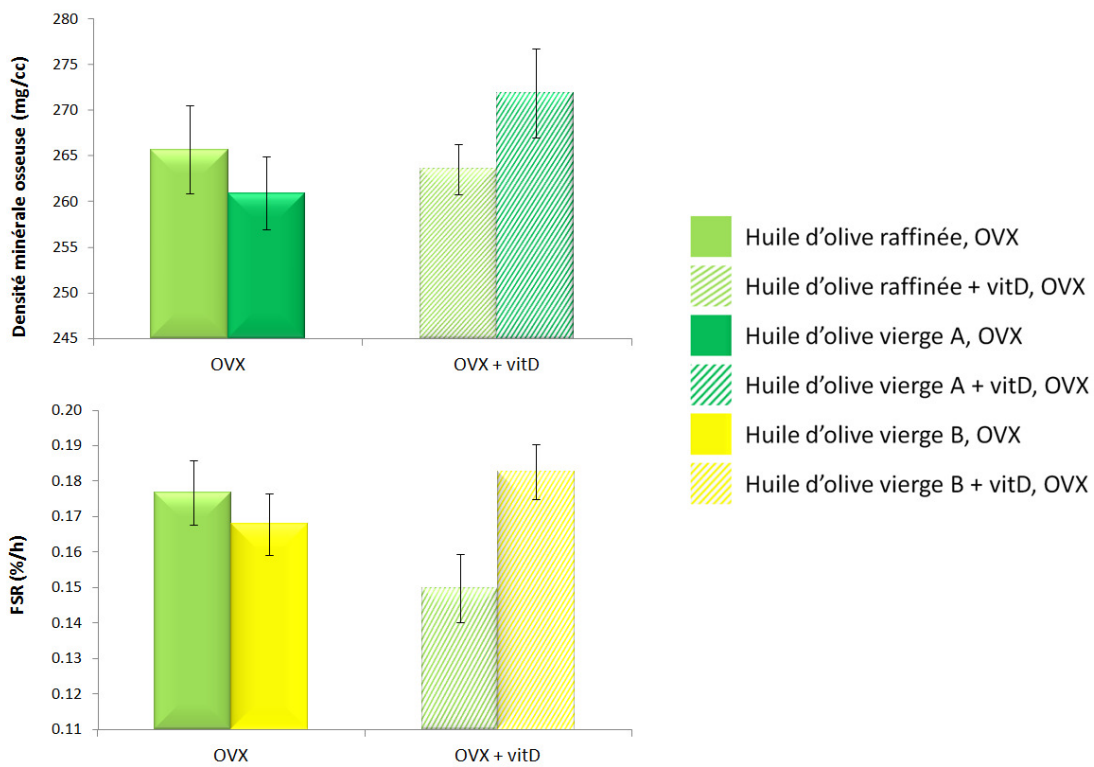
La perte osseuse induite par l'ovariectomie a été prévenue chez la souris par la consommation d'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D, mais pas par l'huile d'olive vierge seule ou par l'huile d'olive raffinée supplémentée en vitamine D. Ce résultat représente l'un des faits les plus saillants de ce travail de thèse. De même, le régime alimentaire renfermant de l'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D permettait de ralentir le renouvellement osseux, lui-même accéléré par l'ovariectomie (reflété par les taux circulants du marqueur de résorption osseuse CTX1 et de formation osseuse PINP). Ces résultats étaient en accord avec les données de transcriptomique qui mettaient en évidence une réduction de l'expression des marqueurs ostéoblastiques et ostéoclastiques dans le groupe de souris ayant consommé de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D par rapport aux autres lots ovariectomisés. De plus, la prévention de la perte osseuse était associée à une diminution de l'expression génique des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation, deux mécanismes impliqués dans le développement de l'ostéoporose (Zheng, Vrindts et al. 1997; Armour, Van et al. 1999; Arai, Shibata et al. 2007; D'Amelio, Grimaldi et al. 2008).

Les différences obtenues entre les lots consommant soit l'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D soit l'huile d'olive raffinée enrichie en vitamine D suggèrent que les effets bénéfiques de l'huile d'olive vierge n'étaient pas dus à son profil lipidique (Trichopoulou,



Georgiou et al. 1997; Park, Kim et al. 2013). Etant donné que le raffinage supprime totalement les polyphénols, ce résultat renforce l'hypothèse que ces micro-constituants sont à l'origine de l'effet protecteur de l'huile d'olive sur la santé osseuse (Cicerale, Lucas et al. 2010). Il est important de souligner que le raffinage réduit aussi la quantité d'autres molécules potentiellement bénéfiques pour le tissu osseux, mais de façon moindre. En effet, les taux de vitamine E, connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Chin and Ima-Nirwana 2014), étaient très peu diminués par le raffinage (23,2 mg/100 g pour l'huile vierge à 20,3 mg/100 g pour l'huile raffinée, soit une réduction de 12,5%). De façon similaire, le raffinage diminue peu la quantité de squalène (424 mg/100 g à 340 mg/100 g soit une réduction de 20%) (Owen, Mier et al. 2000), un intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol (Waterman and Lockwood 2007) qui possède des propriétés antioxydantes (Owen, Giacosa et al. 2000). Ainsi, les résultats obtenus chez la souris ovariectomisée soumise à un régime contenant de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D, sont susceptibles d'être explicables, au moins en partie, par la présence de polyphénols et de vitamine D au sein de l'huile d'olive.

Les résultats de la présente étude sont en accord avec des données de la littérature qui ont mis en évidence que l'huile d'olive (Puel, Quintin et al. 2004), l'oleuropéine (Puel, Mathey et al. 2006), l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Puel, Mardon et al. 2008) ne limitaient pas la perte osseuse dans un modèle d'ostéoporose post-ménopausique chez le rat (ovariectomie et inflammation). A noter de façon intéressante que ces régimes avaient un effet bénéfique lorsque les rates étaient ovariectomisées et inflammées, dans le cadre d'un modèle d'ostéoporose sénile. De même, la perte osseuse n'était pas atténuée par la consommation de 10 mg/kg d'un extrait polyphénolique d'huile d'olive chez la rate Wistar ovariectomisée (Keiler, Zierau et al. 2013). De façon très similaire, les souris de la présente étude recevaient 8,5 mg de polyphénols par kg de poids corporel. L'ensemble de ces données met en évidence la nécessité d'une réaction inflammatoire pour observer un effet bénéfique de l'huile d'olive ou de ses polyphénols sur la prévention de la perte osseuse chez des animaux ayant subi une ablation des ovaires. A l'inverse, une étude, menée chez la rate ovariectomisée, consommant deux fois plus de polyphénols (18,4 mg/kg), mettait en évidence un effet protecteur de la consommation d'huile d'olive vierge seule sur le tissu osseux (Saleh and Saleh 2011). Dans des modèles murins d'ostéoporose post-ménopausique, la consommation de polyphénols isolés (10 mg/kg d'oleuropéine ou d'hydroxytyrosol (Hagiwara, Goto et al. 2011) ou 5 et 20 mg/kg de lutéoline (Kim, Jung et al. 2011)) prévenait la perte osseuse en, respectivement, diminuant le nombre d'ostéoclastes et ralentissant le renouvellement osseux. Ainsi, dans notre étude, la concentration de chacun des polyphénols (de 0,02 à 2,85 mg/kg) devait être trop



**Figure 64 : Impact de l'association de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D sur la densité minérale osseuse de la souris et sur la synthèse protéique musculaire de la rate, après ovariectomie.**

faible pour prévenir la perte osseuse chez les souris ovariectomisée soumise à l'huile d'olive vierge non enrichie en vitamine D.

Un autre nutriment lipophile d'intérêt sur le métabolisme osseux est la vitamine D. La vitamine D possède la propriété de diminuer le nombre de précurseurs ostéoclastiques (Shibata, Shira-Ishi et al. 2002), ainsi que l'expression de RANKL et la resorption osseuse associée (Takahashi, Udagawa et al. 2014) *in vivo*. De plus, elle augmente l'absorption intestinale de calcium (Holick 2009), celle-ci étant réduite par la déplétion en estrogènes chez la femme (Devine, Prince et al. 1993; Wishart, Scopacasa et al. 2000) et chez le rat (Gaumet, Seibel et al. 1997). Cependant, comme aucun effet positif n'était obtenu dans le groupe de souris ayant consommé de l'huile d'olive raffinée enrichie en vitamine D, soit ces effets étaient amplifiés par l'huile d'olive vierge, soit ce sont les propriétés anti-inflammatoires qui étaient à l'origine de la prévention de la perte osseuse. En effet, l'huile d'olive vierge et la vitamine D possèdent des effets anti-inflammatoires (Martinez-Dominguez, de la Puerta et al. 2001; Laird, Ward et al. 2010) auxquels s'ajoutent les propriétés antioxydantes de l'huile d'olive (Saleh and Saleh 2011) et de ses polyphénols (Visioli, Bellomo et al. 1998; de la Puerta, Ruiz Gutierrez et al. 1999).

L'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D permettait de prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la souris. Les mécanismes induits impliquaient probablement une réduction de l'inflammation et du stress oxydant.

Dans le cas du modèle de la rate ovariectomisée, en se basant sur le critère principal qu'était la densité minérale osseuse, aucune huile ni aucun enrichissement n'avait pu être discriminé. Ceci pourrait s'expliquer par la durée de l'ovariectomie, le choix du compartiment osseux, la réduction des apports calciques et/ou le profil nutritionnel de l'huile consommée dans le lot témoin. Selon l'étude de Boyd et coll. (Boyd, Davison et al. 2006), l'altération du tissu osseux est progressive jusqu'à 12 semaines post-opération pour ensuite atteindre un plateau. Or les mesures ont été effectuées 19 semaines après l'opération dans la présente étude. De plus, la diminution des apports calciques dans notre étude a pu renforcer la perte osseuse due à l'ovariectomie (Omi and Ezawa 2011; Agata, Park et al. 2013). Ainsi, pour mettre en évidence un ralentissement de la perte osseuse par des interventions nutritionnelles, il aurait fallu faire ces mesures plus précocement, comme cela a été fait dans le modèle de la souris ovariectomisée. Un résultat très encourageant était obtenu en ce qui concerne le taux de synthèse protéique musculaire. En effet, la vitamine D semblait avoir un impact sur la synthèse protéique différent selon la matrice huile (Figure 64). Il est probable, que comme





pour l'os, il existe un effet additif voire une synergie entre les polyphénols de l'huile d'olive et la vitamine D pour augmenter la synthèse protéique chez les animaux ovariectomisés. Ainsi, l'expression des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant pourraient également être inhibés par ce régime dans le tissu musculaire.

L'association de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D permettaient de prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la souris et le ralentissement de la synthèse protéique musculaire chez la rate ovariectomisée. Ainsi, cette combinaison de nutriments pourrait faire partie d'une stratégie de prévention de la sarcopénie et de l'ostéoporose.

### ***Perspectives***

Les résultats obtenus dans le modèle de la souris ovariectomisée sont en cours de validation dans une étude clinique chez la femme ménopausée. En outre, une expérimentation *ex vivo* a été mise en place afin d'évaluer les mécanismes mis en jeu par la consommation d'huile d'olive vierge et de vitamine D chez la souris ovariectomisée. Ainsi, des souris ont été gavées quotidiennement et pendant 10 jours avec du sérum physiologique, de l'huile d'olive raffinée ou de l'huile d'olive vierge enrichie ou non en vitamine D et en DHA. Des cellules des lignées pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 et pré-ostéoclastiques Raw264.7 ont été cultivées en présence des séras enrichis en métabolites des nutriments d'intérêt. Les analyses sont en cours. L'étude des muscles prélevés dans l'expérimentation menée chez la souris ovariectomisée permettra de compléter les résultats mis en évidence chez la rate ovariectomisée.

La mise en place d'un modèle animal dans lequel il serait possible d'évaluer conjointement les altérations osseuses et musculaires dues à l'ovariectomie, permettra aussi d'étudier l'impact de la consommation d'une huile vierge enrichie en vitamine D sur ces deux tissus.



# Conclusions

La déplétion hormonale induite par l'ovariectomie chez le rongeur est associée à une perte osseuse et à une augmentation de la masse musculaire avec une exacerbation de l'inflammation de bas grade et du stress oxydant. La perte osseuse est le résultat de l'augmentation du renouvellement osseux, la résorption excédant la formation. Dans le cas du muscle, le taux de synthèse protéique est diminué tout comme l'expression d'un marqueur de la différenciation musculaire et d'un marqueur de la protéolyse, ceci suggère un ralentissement du renouvellement protéique musculaire. Il est très probable que l'accélération du renouvellement osseux et le ralentissement du renouvellement musculaire soient liés.

Pris dans leur ensemble, ces résultats laissent supposer qu'il est possible de prévenir l'ostéoporose et la sarcopénie par une stratégie commune. L'inflammation de bas grade et le stress oxydant étant impliqués dans le développement des deux pathologies, la consommation d'aliments ayant des propriétés anti-inflammatoires et/ou antioxydantes pourrait contrer les mécanismes de développement de ces processus dégénératifs. A ce titre, l'huile d'olive et la vitamine D pourraient représenter de bons candidats.

Aussi, l'association de l'huile d'olive vierge et de la vitamine D a permis de prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la souris, en diminuant l'expression des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant. En parallèle, un résultat encourageant a été obtenu chez la rate ovariectomisée puisque la synthèse protéique musculaire était améliorée avec l'huile d'olive vierge enrichie en vitamine D par rapport à l'huile d'olive raffinée supplémentée en vitamine D. Cette association de nutriments pourrait prévenir conjointement les altérations osseuses et musculaires induites par la déplétion hormonale.

Les nombreuses données de la littérature sur les relations entre les tissus osseux et musculaires, notamment au cours du vieillissement, associées aux résultats de ces travaux de thèse, renforcent l'hypothèse que ces tissus sont liés. Deux types de relation ont été distingués : un lien mécanique et des régulations métaboliques communes. Il semble nécessaire de prendre en compte les liens entre l'os et le muscle dans le cadre de la recherche scientifique mais aussi concernant la prise en charge des patients. La préservation de l'autonomie des personnes âgées doit conduire les professionnels de santé et les chercheurs à



élaborer des stratégies communes de prévention, de diagnostic et de traitements de l'ostéoporose et de la sarcopénie. La complexité de l'étiologie de ces pathologies doit être prise en compte. Plusieurs leviers d'actions, que sont les traitements curatifs, l'exercice physique et la nutrition sont disponibles et pourraient faire l'objet d'une stratégie globale. Ainsi, il est nécessaire d'optimiser les recherches scientifiques en définissant de nouvelles questions de recherche intégrant les dimensions physiopathologiques de ces deux tissus. Il s'agira de mieux appréhender la complexité des mécanismes mis en jeu dans les relations os-muscle, en prenant en considération les contraintes mécaniques de la locomotion, l'implication du secrétome de chacun des tissus, les composantes de régulation (inflammation, stress oxydant,...), le polymorphisme génétique du sujet... Ceci pourra permettre de comprendre, entre autres, les mécanismes qui lient l'ostéoporose à la sarcopénie. Il sera alors possible de développer des traitements curatifs, éventuellement communs aux deux pathologies, de définir des exercices physiques bénéfiques pour les deux tissus et faciles à mettre en œuvre chez la personne âgée et d'identifier des stratégies alimentaires protectrices pour les tissus osseux et musculaires, afin de les intégrer à un régime équilibré et spécifique à la personne âgée.



# Références

- (1989). "Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988." *Am J Clin Nutr* **50**(5 Suppl): 1121-1235.
- (2013). "In brief: cancer risk with salmon calcitonin." *Med Lett Drugs Ther* **55**(1414): 29.
- Abbatecola, A. M., G. Paolisso, et al. (2011). "Discovering pathways of sarcopenia in older adults: a role for insulin resistance on mitochondria dysfunction." *J Nutr Health Aging* **15**(10): 890-895.
- Abdul-Ghani, M. A. and R. A. DeFronzo (2010). "Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle." *J Biomed Biotechnol* **2010**: 476279.
- Abu-Taha, M., C. Rius, et al. (2009). "Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan." *J Immunol* **183**(2): 1393-1402.
- Adams, J. S. and M. Hewison (2012). "Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase." *Arch Biochem Biophys* **523**(1): 95-102.
- AFSSA (2009). AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des teneurs en vitamines et minéraux des denrées enrichies et des compléments alimentaires : synthèse (Saisine n° 2007-SA-0315) Maisons-Alfort.
- Agata, U., J. H. Park, et al. (2013). "The effect of different amounts of calcium intake on bone metabolism and arterial calcification in ovariectomized rats." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **59**(1): 29-36.
- Agholme, F., H. Isaksson, et al. (2011). "The effects of Dickkopf-1 antibody on metaphyseal bone and implant fixation under different loading conditions." *Bone* **48**(5): 988-996.
- Aguirre, J. I., L. I. Plotkin, et al. (2006). "Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss." *J Bone Miner Res* **21**(4): 605-615.
- Akiyama, M., K. Nakahama, et al. (2013). "Impact of docosahexaenoic acid on gene expression during osteoclastogenesis in vitro--a comprehensive analysis." *Nutrients* **5**(8): 3151-3162.
- Aleman, H., J. Esparza, et al. (2011). "Longitudinal evidence on the association between interleukin-6 and C-reactive protein with the loss of total appendicular skeletal muscle in free-living older men and women." *Age Ageing* **40**(4): 469-475.
- Allaire, O. and D. J. David (2013). Utilité clinique du dosage de la vitamine D Haute Autorité de Santé.
- Allan, E. H., K. D. Hausler, et al. (2008). "EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts." *J Bone Miner Res* **23**(8): 1170-1181.
- Almeida, M. (2011). "Unraveling the role of FoxOs in bone--insights from mouse models." *Bone* **49**(3): 319-327.
- Almeida, M., L. Han, et al. (2007). "Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids." *J Biol Chem* **282**(37): 27285-27297.
- Almendros, S. S., B. Obrador, et al. (2013). "Environmental footprints of Mediterranean versus Western dietary patterns: beyond the health benefits of the Mediterranean diet." *Environ Health* **12**(1): 118.
- Aloia, J. F., D. M. McGowan, et al. (1991). "Relationship of menopause to skeletal and muscle mass." *Am J Clin Nutr* **53**(6): 1378-1383.
- Altindag, O., O. Erel, et al. (2008). "Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis." *Rheumatol Int* **28**(4): 317-321.
- ANAES and AFSSAPS (2004). Traitements hormonaux substitutifs de la ménopause: ORIENTATIONS GÉNÉRALES CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS
- Annweiler, C. and O. Beauchet (2010). "High-dose vitamin D repletion-related falls and fractures: an uncontrolled mobility gain?" *Biofactors* **36**(6): 407.
- ANSES (2013) "Vitamine D - Présentation, sources alimentaires et besoins nutritionnels." <https://www.anses.fr/fr/content/vitamine-d>.
- ANSM (2012) "Information importante de pharmacovigilance : risque accru de cancers lors de l'utilisation au long cours de spécialités à base de calcitonine – nouvelles restrictions d'utilisation " <http://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Risque-accru-de-cancers-lors-de-l-utilisation-au-long-cours-de-specialites-a-base-de-calcitonine-nouvelles-restrictions-d-utilisation-Lettre-aux-professionnels-de-sante>.





- ANSM (2012) "Nouvelles contre-indications et précautions d'emploi du ranélate de strontium (Protelos®) - Lettre aux professionnels de santé." <http://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Nouvelles-contre-indications-et-precautions-d-emploi-du-ranelate-de-strontium-Protelos-R-Lettre-aux-professionnels-de-sante>.
- Anthony, J. C., F. Yoshizawa, et al. (2000). "Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway." *J Nutr* **130**(10): 2413-2419.
- Aoi, W. and K. Sakuma (2011). "Oxidative stress and skeletal muscle dysfunction with aging." *Curr Aging Sci* **4**(2): 101-109.
- Arai, M., Y. Shibata, et al. (2007). "Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells." *IUBMB Life* **59**(1): 27-33.
- Armas, L. A., B. W. Hollis, et al. (2004). "Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(11): 5387-5391.
- Armour, K. E., T. H. R. J. Van, et al. (1999). "Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis." *J Bone Miner Res* **14**(12): 2137-2142.
- Arnal, M. A., L. Mosoni, et al. (2002). "Pulse protein feeding pattern restores stimulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats." *J Nutr* **132**(5): 1002-1008.
- Asagiri, M. and H. Takayanagi (2007). "The molecular understanding of osteoclast differentiation." *Bone* **40**(2): 251-264.
- Astorg, P., N. Arnault, et al. (2004). "Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women." *Lipids* **39**(6): 527-535.
- Astorg, P. O., P. Bougnoux, et al. (2011). Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, ANSES.
- Attaix, D., V. E. Baracos, et al. (2012). "Muscle wasting: a crosstalk between protein synthesis and breakdown signalling." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15**(3): 209-210.
- Attaix, D., L. Mosoni, et al. (2005). "Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(10): 1962-1973.
- Bailey, A. J. and L. Knott (1999). "Molecular changes in bone collagen in osteoporosis and osteoarthritis in the elderly." *Exp Gerontol* **34**(3): 337-351.
- Balage, M., J. Averous, et al. (2010). "Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats." *J Nutr Biochem* **21**(4): 325-331.
- Baltgalvis, K. A., S. M. Greising, et al. (2010). "Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle." *PLoS One* **5**(4): e10164.
- Barazzoni, R., K. R. Short, et al. (2000). "Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart." *J Biol Chem* **275**(5): 3343-3347.
- Barker, T., T. B. Martins, et al. (2013). "Circulating pro-inflammatory cytokines are elevated and peak power output correlates with 25-hydroxyvitamin D in vitamin D insufficient adults." *Eur J Appl Physiol* **113**(6): 1523-1534.
- Barlet, J. P., V. Coxam, et al. (1994). "[Animal models of post-menopausal osteoporosis]." *Reprod Nutr Dev* **34**(3): 221-236.
- Baumgartner, R. N., K. M. Koehler, et al. (1998). "Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico." *Am J Epidemiol* **147**(8): 755-763.
- Bautmans, I., O. Onyema, et al. (2011). "Grip work estimation during sustained maximal contraction: validity and relationship with dependency and inflammation in elderly persons." *J Nutr Health Aging* **15**(8): 731-736.
- Bellido, T., A. A. Ali, et al. (2005). "Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis." *Endocrinology* **146**(11): 4577-4583.
- Bellido, T., A. A. Ali, et al. (2003). "Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism." *J Biol Chem* **278**(50): 50259-50272.
- Bénétiér, C., M. Bertin, et al. (2009). Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) 2006-2007, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Benetou, V., P. Orfanos, et al. (2013). "Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort." *Osteoporos Int* **24**(5): 1587-1598.
- Benhamou, C. L., J. C. Souberbielle, et al. (2011). La vitamine D chez l'adulte : recommandations du GRIO. L. P. Médicale, Groupe de recherche et d'information sur les ostéoporoses (GRIO). **40**
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, et al. (2012). "Building muscle: molecular regulation of myogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2).
- Beyer, I., T. Mets, et al. (2012). "Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15**(1): 12-22.



- Bhattacharya, A., M. Rahman, et al. (2007). "Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice." *J Nutr Biochem* **18**(6): 372-379.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." *Stem Cells* **19**(3): 180-192.
- Bichell, D. P., K. Kikuchi, et al. (1992). "Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo." *Mol Endocrinol* **6**(11): 1899-1908.
- Bielohuby, M., M. Matsuura, et al. (2010). "Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats." *J Bone Miner Res* **25**(2): 275-284.
- Bijlsma, A. Y., C. G. Meskers, et al. (2012). "Chronology of age-related disease definitions: osteoporosis and sarcopenia." *Ageing Res Rev* **11**(2): 320-324.
- Bikle, D. D. (2014). "Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications." *Chem Biol* **21**(3): 319-329.
- Biolo, G., R. Y. Declan Fleming, et al. (1995). "Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle." *J Clin Invest* **95**(2): 811-819.
- Bischoff-Ferrari, H. (2009). "Vitamin D: what is an adequate vitamin D level and how much supplementation is necessary?" *Best Pract Res Clin Rheumatol* **23**(6): 789-795.
- Bischoff-Ferrari, H. (2010). "Health effects of vitamin D." *Dermatol Ther* **23**(1): 23-30.
- Bischoff-Ferrari, H. (2012). "Vitamin D - from essentiality to functionality." *Int J Vitam Nutr Res* **82**(5): 321-326.
- Bischoff-Ferrari, H. A., M. Borchers, et al. (2004). "Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age." *J Bone Miner Res* **19**(2): 265-269.
- Bischoff-Ferrari, H. A., B. Dawson-Hughes, et al. (2009). "Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials." *BMJ* **339**: b3692.
- Bischoff-Ferrari, H. A., B. Dawson-Hughes, et al. (2012). "Oral supplementation with 25(OH)D3 versus vitamin D3: effects on 25(OH)D levels, lower extremity function, blood pressure, and markers of innate immunity." *J Bone Miner Res* **27**(1): 160-169.
- Bischoff-Ferrari, H. A., B. Dawson-Hughes, et al. (2004). "Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis." *JAMA* **291**(16): 1999-2006.
- Bischoff-Ferrari, H. A., T. Dietrich, et al. (2004). "Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged > or =60 y." *Am J Clin Nutr* **80**(3): 752-758.
- Bischoff-Ferrari, H. A., W. C. Willett, et al. (2012). "A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention." *N Engl J Med* **367**(1): 40-49.
- Bischoff-Ferrari, H. A., W. C. Willett, et al. (2009). "Prevention of nonvertebral fractures with oral vitamin D and dose dependency: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Arch Intern Med* **169**(6): 551-561.
- Blaauw, B. and C. Reggiani (2014). "The role of satellite cells in muscle hypertrophy." *J Muscle Res Cell Motil* **35**(1): 3-10.
- Blair, H. C., A. J. Kahn, et al. (1986). "Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone." *J Cell Biol* **102**(4): 1164-1172.
- Blair, H. C., S. L. Teitelbaum, et al. (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." *Science* **245**(4920): 855-857.
- Bodine, S. C., E. Latres, et al. (2001). "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy." *Science* **294**(5547): 1704-1708.
- Bogani, P., C. Galli, et al. (2007). "Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil." *Atherosclerosis* **190**(1): 181-186.
- Boirie, Y., K. R. Short, et al. (2001). "Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin." *Diabetes* **50**(12): 2652-2658.
- Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte." *J Bone Miner Res* **26**(2): 229-238.
- Bonewald, L. F. and M. L. Johnson (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling." *Bone* **42**(4): 606-615.
- Bonnet, N. and S. L. Ferrari (2011). "Effects of long-term supplementation with omega-3 fatty acids on longitudinal changes in bone mass and microstructure in mice." *J Nutr Biochem* **22**(7): 665-672.
- Bonnick, S. L. (1998). *Skeletal anatomy in densitometry. Bone Densitometry in Clinical Practice.* e. Bonnick SL. New York, NY, Humana Press: 35-78.
- Borst, S. E. (2004). "Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people." *Age Ageing* **33**(6): 548-555.
- Boskou, D., G. Blekas, et al. (2006). *Olive Oil Composition. Olive Oil Chemistry and Technology Second Edition.* D. Boskou, AOCS Press Champaign, Illinois: 41-72.



- Bottinelli, R. and C. Reggiani (2000). "Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity." *Prog Biophys Mol Biol* **73**(2-4): 195-262.
- Boyce, B. F., E. Rosenberg, et al. (2012). "The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease." *Eur J Clin Invest* **42**(12): 1332-1341.
- Boyce, B. F., Z. Yao, et al. (2009). "Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **19**(3): 171-180.
- Boyd, S. K., P. Davison, et al. (2006). "Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography." *Bone* **39**(4): 854-862.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet, et al. (2003). "Osteoclast differentiation and activation." *Nature* **423**(6937): 337-342.
- Brandi, M. L. (2009). "Microarchitecture, the key to bone quality." *Rheumatology (Oxford)* **48 Suppl 4**: iv3-8.
- Brenna, J. T. (2002). "Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**(2): 127-132.
- Brown, M., J. Ning, et al. (2009). "Estrogen receptor-alpha and -beta and aromatase knockout effects on lower limb muscle mass and contractile function in female mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E854-861.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.
- Bua, E., J. Johnson, et al. (2006). "Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers." *Am J Hum Genet* **79**(3): 469-480.
- Burattini, S., S. Salucci, et al. (2013). "Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate." *Food Chem Toxicol* **55**: 248-256.
- Burgess, T. L., Y. Qian, et al. (1999). "The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts." *J Cell Biol* **145**(3): 527-538.
- Butterfield, G. E., J. Thompson, et al. (1997). "Effect of rhGH and rhIGF-I treatment on protein utilization in elderly women." *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1): E94-99.
- Cagnetta, V. and V. Patella (2012). "The role of the immune system in the physiopathology of osteoporosis." *Clin Cases Miner Bone Metab* **9**(2): 85-88.
- Calder, P. C. (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?" *Br J Clin Pharmacol* **75**(3): 645-662.
- Calnan, D. R. and A. Brunet (2008). "The FoxO code." *Oncogene* **27**(16): 2276-2288.
- Camargo, A., J. Ruano, et al. (2010). "Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil." *BMC Genomics* **11**: 253.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2004). *Biologie, 2ème édition*.
- Candido, F. G. and J. Bressan (2014). "Vitamin D: link between osteoporosis, obesity, and diabetes?" *Int J Mol Sci* **15**(4): 6569-6591.
- Cantatore, F. P., G. Loverro, et al. (1995). "Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause." *Clin Rheumatol* **14**(2): 157-160.
- Cao, J. J. (2011). "Effects of obesity on bone metabolism." *J Orthop Surg Res* **6**: 30.
- Cao, K., J. Xu, et al. (2014). "Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice." *Free Radic Biol Med* **67**: 396-407.
- Cao, Z., J. Wanagat, et al. (2001). "Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection." *Nucleic Acids Res* **29**(21): 4502-4508.
- Capel, F., V. Rimbart, et al. (2005). "Due to reverse electron transfer, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved." *Mech Ageing Dev* **126**(4): 505-511.
- Capozzi, A., S. Lello, et al. (2014). "The inhibition of RANK-ligand in the management of postmenopausal osteoporosis and related fractures: the role of denosumab." *Gynecol Endocrinol*.
- Cappola, A. R., K. Bandeen-Roche, et al. (2001). "Association of IGF-I levels with muscle strength and mobility in older women." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(9): 4139-4146.
- Casado-Diaz, A., R. Santiago-Mora, et al. (2013). "The omega-6 arachidonic fatty acid, but not the omega-3 fatty acids, inhibits osteoblastogenesis and induces adipogenesis of human mesenchymal stem cells: potential implication in osteoporosis." *Osteoporos Int* **24**(5): 1647-1661.
- Castetbon, K., M. Vernay, et al. (2009). "Dietary intake, physical activity and nutritional status in adults: the French nutrition and health survey (ENNS, 2006-2007)." *Br J Nutr* **102**(5): 733-743.
- Caughey, G. E., E. Mantzioris, et al. (1996). "The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil." *Am J Clin Nutr* **63**(1): 116-122.



- Cavalier, E., P. Delanaye, et al. (2009). "Vitamin D: current status and perspectives." *Clin Chem Lab Med* **47**(2): 120-127.
- Ceafalan, L. C., B. O. Popescu, et al. (2014). "Cellular players in skeletal muscle regeneration." *Biomed Res Int* **2014**: 957014.
- Cesari, M., S. B. Kritchevsky, et al. (2009). "Added value of physical performance measures in predicting adverse health-related events: results from the Health, Aging And Body Composition Study." *J Am Geriatr Soc* **57**(2): 251-259.
- Cesari, M., C. Leeuwenburgh, et al. (2006). "Frailty syndrome and skeletal muscle: results from the Invecchiare in Chianti study." *Am J Clin Nutr* **83**(5): 1142-1148.
- Cha, S. H., A. Fukushima, et al. (2001). "Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle of aged C57BL/6Njcl mice." *J Nutr* **131**(10): 2636-2642.
- Chabi, B., B. Mousson de Camaret, et al. (2005). "Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(2): 542-549.
- Chakravarthy, M. V., E. E. Spangenburg, et al. (2001). "Culture in low levels of oxygen enhances in vitro proliferation potential of satellite cells from old skeletal muscles." *Cell Mol Life Sci* **58**(8): 1150-1158.
- Chandran, R., T. J. Knobloch, et al. (2007). "Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(1): C267-276.
- Chang, J., Z. Wang, et al. (2009). "Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB." *Nat Med* **15**(6): 682-689.
- Chanseume, E., C. Giraudet, et al. (2007). "Enhanced muscle mixed and mitochondrial protein synthesis rates after a high-fat or high-sucrose diet." *Obesity (Silver Spring)* **15**(4): 853-859.
- Chapkin, R. S., W. Kim, et al. (2009). "Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **81**(2-3): 187-191.
- Chapuy, M. C., M. E. Arlot, et al. (1992). "Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women." *N Engl J Med* **327**(23): 1637-1642.
- Charbonnier, A. (1996). *L'huile d'olive Aliment-Santé Coeur-Vaisseaux-Digestion*.
- Chen, H., X. Zhou, et al. (2013). "Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure." *Int J Endocrinol* **2013**: 213234.
- Chen, K., Y. H. Yang, et al. (2014). "Decreased activity of osteocyte autophagy with aging may contribute to the bone loss in senile population." *Histochem Cell Biol*.
- Chin, K. Y. and S. Ima-Nirwana (2014). "The effects of alpha-tocopherol on bone: a double-edged sword?" *Nutrients* **6**(4): 1424-1441.
- Chistiakov, D. A., I. A. Sobenin, et al. (2014). "Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria." *Biomed Res Int* **2014**: 238463.
- Chow, L., A. From, et al. (2010). "Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction." *Metabolism* **59**(1): 70-85.
- Chung, P. L., S. Zhou, et al. (2014). "Effect of Age on Regulation of Human Osteoclast Differentiation." *J Cell Biochem*.
- Cicerale, S., L. Lucas, et al. (2010). "Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil." *Int J Mol Sci* **11**(2): 458-479.
- Clark, W. D., E. L. Smith, et al. (2005). "Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy." *Calcif Tissue Int* **77**(5): 327-336.
- Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." *Clin J Am Soc Nephrol* **3 Suppl 3**: S131-139.
- Clarke, B. A., D. Drujan, et al. (2007). "The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle." *Cell Metab* **6**(5): 376-385.
- Coetzee, M., M. Haag, et al. (2007). "Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid, prostaglandin E(2) and parathyroid hormone on osteoprotegerin and RANKL secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells." *J Nutr Biochem* **18**(1): 54-63.
- Cohen, S., J. J. Brault, et al. (2009). "During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation." *J Cell Biol* **185**(6): 1083-1095.
- Coll, T., E. Eyre, et al. (2008). "Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells." *J Biol Chem* **283**(17): 11107-11116.
- Collino, S., F. P. Martin, et al. (2014). "Reprint of: Musculoskeletal system in the old age and the demand for healthy ageing biomarkers." *Mech Ageing Dev* **136-137**: 94-100.
- Collins-Hooper, H., R. Sartori, et al. (2014). "Propeptide-Mediated Inhibition of Myostatin Increases Muscle Mass Through Inhibiting Proteolytic Pathways in Aged Mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Combaret, L., D. Dardevet, et al. (2009). "Skeletal muscle proteolysis in aging." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**(1): 37-41.





- Combaret, L., D. Dardevet, et al. (2005). "A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle." *J Physiol* **569**(Pt 2): 489-499.
- Conference report, n. a. l. (1993). "Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis." *Am J Med* **94**(6): 646-650.
- Corpas, E., S. M. Harman, et al. (1992). "Growth hormone (GH)-releasing hormone-(1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-I levels in old men." *J Clin Endocrinol Metab* **75**(2): 530-535.
- Corwin, R. L., T. J. Hartman, et al. (2006). "Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III." *J Nutr* **136**(1): 159-165.
- Cosman, F., V. Shen, et al. (1993). "Estrogen protection against bone resorbing effects of parathyroid hormone infusion. Assessment by use of biochemical markers." *Ann Intern Med* **118**(5): 337-343.
- Court-Brown, C. M., N. D. Clement, et al. (2014). "The spectrum of fractures in the elderly." *Bone Joint J* **96-B**(3): 366-372.
- Cowin, S. C. (2007). "The significance of bone microstructure in mechanotransduction." *J Biomech* **40 Suppl 1**: S105-109.
- Crandall, C. J., S. J. Newberry, et al. (2014). "Comparative Effectiveness of Pharmacologic Treatments to Prevent Fractures: An Updated Systematic Review." *Ann Intern Med*.
- Cranenburg, E. C., L. J. Schurgers, et al. (2007). "Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent." *Thromb Haemost* **98**(1): 120-125.
- Cree, M. G., B. R. Newcomer, et al. (2004). "Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(8): 3864-3871.
- Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, et al. (2010). "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." *Age Ageing* **39**(4): 412-423.
- Csibi, A., K. Cornille, et al. (2010). "The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse." *PLoS One* **5**(2): e8994.
- Cummings, S. R., W. S. Browner, et al. (1998). "Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group." *N Engl J Med* **339**(11): 733-738.
- Cuthbertson, D., K. Smith, et al. (2005). "Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle." *FASEB J* **19**(3): 422-424.
- Cuzzocrea, S., E. Mazzon, et al. (2003). "Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice." *Endocrinology* **144**(3): 1098-1107.
- D'Amelio, P., A. Grimaldi, et al. (2008). "Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis." *Bone* **43**(1): 92-100.
- Dai, J., D. P. Jones, et al. (2008). "Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress." *Am J Clin Nutr* **88**(5): 1364-1370.
- Dallas, S. L., M. Prideaux, et al. (2013). "The osteocyte: an endocrine cell ... and more." *Endocr Rev* **34**(5): 658-690.
- Dam, T. T., K. W. Peters, et al. (2014). "An evidence-based comparison of operational criteria for the presence of sarcopenia." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**(5): 584-590.
- Danet, S. (2011). L'état de santé de la population en France. Suivi des objectifs annexés à la loi de santé publique Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques.
- Dang, Z. C., R. L. van Bezooijen, et al. (2002). "Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis." *J Bone Miner Res* **17**(3): 394-405.
- Dardevet, D., C. Sornet, et al. (2000). "Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age." *J Nutr* **130**(11): 2630-2635.
- Dardevet, D., C. Sornet, et al. (1995). "Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging." *J Clin Invest* **96**(5): 2113-2119.
- De Benedetti, F., N. Rucci, et al. (2006). "Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system." *Arthritis Rheum* **54**(11): 3551-3563.
- de la Puerta, R., V. Ruiz Gutierrez, et al. (1999). "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil." *Biochem Pharmacol* **57**(4): 445-449.
- de la Torre, R. (2008). "Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans." *Inflammopharmacology* **16**(5): 245-247.
- De Stefano, D., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma." *Eur J Pharmacol* **566**(1-3): 192-199.



- Del Fattore, A., A. Teti, et al. (2012). "Bone cells and the mechanisms of bone remodelling." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 2302-2321.
- Dela, F. and J. W. Helge (2013). "Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle." Int J Biochem Cell Biol **45**(1): 11-15.
- Delaisse, J. M., T. L. Andersen, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities." Microsc Res Tech **61**(6): 504-513.
- Deldicque, L. (2013). "Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia?" Front Physiol **4**: 236.
- Delmonico, M. J., T. B. Harris, et al. (2007). "Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women." J Am Geriatr Soc **55**(5): 769-774.
- Deluca, H. F. (2014). "History of the discovery of vitamin D and its active metabolites." Bonekey Rep **3**: 479.
- Denger, S., G. Reid, et al. (2008). "Expression of the estrogen receptor during differentiation of human osteoclasts." Steroids **73**(7): 765-774.
- Derbre, F., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2012). "Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1alpha to exercise training." Age (Dordr) **34**(3): 669-679.
- Derbre, F., A. Gratas-Delamarche, et al. (2014). "Inactivity-induced oxidative stress: a central role in age-related sarcopenia?" Eur J Sport Sci **14 Suppl 1**: S98-108.
- Desai, V. G., R. Weindruch, et al. (1996). "Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice." Arch Biochem Biophys **333**(1): 145-151.
- Devine, A., R. L. Prince, et al. (1993). "Correlates of intestinal calcium absorption in women 10 years past the menopause." Calcif Tissue Int **52**(5): 358-360.
- Devlin, R. D., S. V. Reddy, et al. (1998). "IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures." J Bone Miner Res **13**(3): 393-399.
- Di Girolamo, F. G., R. Situlin, et al. (2014). "Omega-3 fatty acids and protein metabolism: enhancement of anabolic interventions for sarcopenia." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **17**(2): 145-150.
- Di Gregorio, G. B., M. Yamamoto, et al. (2001). "Attenuation of the self-renewal of transit-amplifying osteoblast progenitors in the murine bone marrow by 17 beta-estradiol." J Clin Invest **107**(7): 803-812.
- Dickinson, M. H., C. T. Farley, et al. (2000). "How animals move: an integrative view." Science **288**(5463): 100-106.
- Dobnig, H. and R. T. Turner (1995). "Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells." Endocrinology **136**(8): 3632-3638.
- Dominique, J. C. (2009). Amélioration du taux de greffe de cellules myogéniques pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Surexpression du récepteur à l'IGF-1 sur des cellules humaines et utilisation du facteur de croissance MGF<sub>1</sub>, Université Laval.
- Drew, B., S. Phaneuf, et al. (2003). "Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(2): R474-480.
- Drira, R. and K. Sakamoto (2013). "Modulation of adipogenesis, lipolysis and glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes by hydroxytyrosol acetate: a comparative study." Biochem Biophys Res Commun **440**(4): 576-581.
- Ducy, P., T. Schinke, et al. (2000). "The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance." Science **289**(5484): 1501-1504.
- Ducy, P., R. Zhang, et al. (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." Cell **89**(5): 747-754.
- Dulloo, A. G. (2011). "The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients." Obes Rev **12**(10): 866-883.
- Dumas, J. F., G. Simard, et al. (2009). "Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans?" Diabetes Metab **35**(3): 159-167.
- Duque, G. and B. R. Troen (2008). "Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome." J Am Geriatr Soc **56**(5): 935-941.
- Eastell, R. (2013). "Osteoporosis." Medicine **41**(10): 586-591.
- Edwards, M. W., S. D. Bain, et al. (1992). "17 beta estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for the evaluation of bone-targeted estrogens." Bone **13**(1): 29-34.
- Egerman, M. A. and D. J. Glass (2014). "Signaling pathways controlling skeletal muscle mass." Crit Rev Biochem Mol Biol **49**(1): 59-68.
- Eriksen, E. F. (2010). "Cellular mechanisms of bone remodeling." Rev Endocr Metab Disord **11**(4): 219-227.
- Eriksen, E. F., D. S. Colvard, et al. (1988). "Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells." Science **241**(4861): 84-86.



- Erlebacher, A., E. H. Filvaroff, et al. (1998). "Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling." Mol Biol Cell **9**(7): 1903-1918.
- Everts, V., J. M. Delaisse, et al. (2002). "The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation." J Bone Miner Res **17**(1): 77-90.
- Fayet, G., M. Jansson, et al. (2002). "Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function." Neuromuscul Disord **12**(5): 484-493.
- Feart, C., S. Lorrain, et al. (2013). "Adherence to a Mediterranean diet and risk of fractures in French older persons." Osteoporos Int **24**(12): 3031-3041.
- Feng, X. T., T. Z. Wang, et al. (2012). "Palmitate contributes to insulin resistance through downregulation of the Src-mediated phosphorylation of Akt in C2C12 myotubes." Biosci Biotechnol Biochem **76**(7): 1356-1361.
- Feng, Z., L. Bai, et al. (2011). "Mitochondrial dynamic remodeling in strenuous exercise-induced muscle and mitochondrial dysfunction: regulatory effects of hydroxytyrosol." Free Radic Biol Med **50**(10): 1437-1446.
- Fernandez-Real, J. M., M. Bullo, et al. (2012). "A Mediterranean diet enriched with olive oil is associated with higher serum total osteocalcin levels in elderly men at high cardiovascular risk." J Clin Endocrinol Metab **97**(10): 3792-3798.
- Feskanich, D., W. Willett, et al. (2002). "Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women." JAMA **288**(18): 2300-2306.
- Finkelman, R. D., N. H. Bell, et al. (1992). "Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency-associated bone loss." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12190-12193.
- Fisher, J. S., E. M. Hasser, et al. (1998). "Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle." J Appl Physiol (1985) **85**(4): 1316-1321.
- Flicker, L., R. J. MacInnis, et al. (2005). "Should older people in residential care receive vitamin D to prevent falls? Results of a randomized trial." J Am Geriatr Soc **53**(11): 1881-1888.
- Fong, Y., L. L. Moldawer, et al. (1989). "Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins." Am J Physiol **256**(3 Pt 2): R659-665.
- Fonseca, J. E. (2008). "Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength." Rheumatology (Oxford) **47** Suppl 4: iv17-19.
- Francis, R. M. (2001). "Falls and fractures." Age Ageing **30** Suppl 4: 25-28.
- Francisco, J. I., Y. Yu, et al. (2011). "Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats." J Orthop Res **29**(2): 189-196.
- Freiberger, E., C. Sieber, et al. (2011). "Physical activity, exercise, and sarcopenia - future challenges." Wien Med Wochenschr **161**(17-18): 416-425.
- Fried, L. P., C. M. Tangen, et al. (2001). "Frailty in older adults: evidence for a phenotype." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(3): M146-156.
- Fujita, S., E. L. Glynn, et al. (2009). "Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism." Diabetologia **52**(9): 1889-1898.
- Fukumoto, S. and T. J. Martin (2009). "Bone as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab **20**(5): 230-236.
- Funai, K., J. D. Parkington, et al. (2006). "Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTor signaling in skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **290**(4): R1080-1086.
- Galtier, O., N. Dupuy, et al. (2007). "Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra." Anal Chim Acta **595**(1-2): 136-144.
- Ganz, D. A., Y. Bao, et al. (2007). "Will my patient fall?" JAMA **297**(1): 77-86.
- Garcia-Martinez, C., N. Agell, et al. (1993). "Tumour necrosis factor-alpha increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins." FEBS Lett **323**(3): 211-214.
- Garcia-Martinez, O., A. Rivas, et al. (2014). "The effect of olive oil on osteoporosis prevention." Int J Food Sci Nutr: 1-7.
- Garnero, P., E. Sornay-Rendu, et al. (1996). "Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis." J Bone Miner Res **11**(3): 337-349.
- Gaumet, N., M. J. Seibel, et al. (1997). "Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging in rats." Arch Physiol Biochem **105**(5): 435-444.
- Genuis, S. J. and T. P. Bouchard (2012). "Combination of Micronutrients for Bone (COMB) Study: bone density after micronutrient intervention." J Environ Public Health **2012**: 354151.
- Gladyshev, V. N. (2014). "The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory!" Antioxid Redox Signal **20**(4): 727-731.



- Goldblatt, H. and K. M. Soames (1923). "A Study of Rats on a Normal Diet Irradiated daily by the Mercury Vapour Quartz Lamp or kept in Darkness." *Biochem J* **17**(2): 294-297.
- Gomes, M. D., S. H. Lecker, et al. (2001). "Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14440-14445.
- Gong, D., C. Geng, et al. (2009). "Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats." *Phytother Res* **23**(5): 646-650.
- Goodpaster, B. H., S. W. Park, et al. (2006). "The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(10): 1059-1064.
- Gori, F., L. C. Hofbauer, et al. (2000). "The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated." *Endocrinology* **141**(12): 4768-4776.
- Gospillou, G., I. Bourdel-Marchasson, et al. (2014). "Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle." *Aging Cell* **13**(1): 39-48.
- Gowen, M., F. Lazner, et al. (1999). "Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization." *J Bone Miner Res* **14**(10): 1654-1663.
- Grant, W. B. (2011). "An estimate of the global reduction in mortality rates through doubling vitamin D levels." *Eur J Clin Nutr* **65**(9): 1016-1026.
- Gratas-Delamarche, A., F. Derbre, et al. (2014). "Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory loop." *Free Radic Res* **48**(1): 93-108.
- Greising, S. M., K. A. Baltgalvis, et al. (2009). "Hormone therapy and skeletal muscle strength: a meta-analysis." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**(10): 1071-1081.
- Greising, S. M., H. M. Gransee, et al. (2012). "Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**(5): 457-473.
- Grimby, G. and B. Saltin (1983). "The ageing muscle." *Clin Physiol* **3**(3): 209-218.
- Guillet, C., M. Prod'homme, et al. (2004). "Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans." *FASEB J* **18**(13): 1586-1587.
- Guralnik, J. M., L. Ferrucci, et al. (2000). "Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(4): M221-231.
- Guralnik, J. M., E. M. Simonsick, et al. (1994). "A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission." *J Gerontol* **49**(2): M85-94.
- Guralp, O. and C. T. Erel (2014). "Effects of vitamin K in postmenopausal women: mini review." *Maturitas* **77**(3): 294-299.
- Haag, M., O. N. Magada, et al. (2003). "Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**(6): 423-429.
- Habauzit, V. and M. N. Horcajada (2008). "Phenolic phytochemicals and bone." *Phytochemistry Reviews* **7**: 313-344.
- Haddad, F. and G. R. Adams (2006). "Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy." *J Appl Physiol* (1985) **100**(4): 1188-1203.
- Hagiwara, K., T. Goto, et al. (2011). "Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss." *Eur J Pharmacol* **662**(1-3): 78-84.
- Halloran, B. P., D. D. Bikle, et al. (1997). "Regional responsiveness of the tibia to intermittent administration of parathyroid hormone as affected by skeletal unloading." *J Bone Miner Res* **12**(7): 1068-1074.
- Hamalainen, N. and D. Pette (1995). "Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres." *Microsc Res Tech* **30**(5): 381-389.
- Hameed, M., R. W. Orrell, et al. (2003). "Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise." *J Physiol* **547**(Pt 1): 247-254.
- Hamrick, M. W. (2003). "Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **272**(1): 388-391.
- Hamrick, M. W. (2012). "The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk." *Bonekey Rep* **1**: 60.
- Han, Y., S. C. Cowin, et al. (2004). "Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16689-16694.
- Hannon, R., A. Blumsohn, et al. (1998). "Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability." *J Bone Miner Res* **13**(7): 1124-1133.
- Hansen, J. M., M. Klass, et al. (2007). "A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle." *Cell Biol Int* **31**(6): 546-553.





- Hara, K., K. Yonezawa, et al. (1998). "Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism." *J Biol Chem* **273**(23): 14484-14494.
- Harada, A. (2013). "[Fall risk and fracture. The incidence and mechanisms of fractures from falls]." *Clin Calcium* **23**(5): 645-651.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 774-785.
- Haren, M. T., T. K. Malmstrom, et al. (2010). "Higher C-reactive protein and soluble tumor necrosis factor receptor levels are associated with poor physical function and disability: a cross-sectional analysis of a cohort of late middle-aged African Americans." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**(3): 274-281.
- Haugaard, S. B., A. Vaag, et al. (2009). "Skeletal muscle structural lipids improve during weight-maintenance after a very low calorie dietary intervention." *Lipids Health Dis* **8**: 34.
- Hauge, E. M., D. Qvesel, et al. (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers." *J Bone Miner Res* **16**(9): 1575-1582.
- Hayashi, K. and A. Fotovati (2003). *Animal Models of Osteoporosis. Orthopaedic issues in osteoporosis*. Y. H. An. New York, CRC Press: 71-90.
- Hayden, J. M., S. Mohan, et al. (1995). "The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption." *Bone* **17**(2 Suppl): 93S-98S.
- Heaney, R. P., R. R. Recker, et al. (1978). "Menopausal changes in calcium balance performance." *J Lab Clin Med* **92**(6): 953-963.
- Hennebry, A., C. Berry, et al. (2009). "Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(3): C525-534.
- Herbst, E. A., S. Pagliarunga, et al. (2014). "Omega-3 supplementation alters mitochondrial membrane composition and respiration kinetics in human skeletal muscle." *J Physiol* **592**(Pt 6): 1341-1352.
- Hernandez, C. J., G. S. Beaupre, et al. (2003). "A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis." *Osteoporos Int* **14**(10): 843-847.
- Hernlund, E., A. Svedbom, et al. (2013). "Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)." *Arch Osteoporos* **8**(1-2): 136.
- Hiona, A. and C. Leeuwenburgh (2008). "The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging." *Exp Gerontol* **43**(1): 24-33.
- Hochberg, M. C., A. J. Silman, et al. (2011). *Rheumatology* Elsevier.
- Hofbauer, L. C., S. Khosla, et al. (1999). "Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells." *Endocrinology* **140**(9): 4367-4370.
- Hofbauer, L. C., D. L. Lacey, et al. (1999). "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells." *Bone* **25**(3): 255-259.
- Hogstrom, M., P. Nordstrom, et al. (2007). "n-3 Fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO2 Study." *Am J Clin Nutr* **85**(3): 803-807.
- Holick, M. F. (2007). "Vitamin D deficiency." *N Engl J Med* **357**(3): 266-281.
- Holick, M. F. (2009). "Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application." *Ann Epidemiol* **19**(2): 73-78.
- Holick, M. F., R. M. Biancuzzo, et al. (2008). "Vitamin D2 is as effective as vitamin D3 in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(3): 677-681.
- Holick, M. F., N. C. Binkley, et al. (2011). "Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(7): 1911-1930.
- Holt, E. and J. J. Wysolmerski (2011). *Parathyroid Hormone, Parathyroid Hormone-Related Protein, and Calcitonin. Vitamin D*. D. Feldman, J. W. Pike and J. S. Adams, Elsevier. **1**: 725-745.
- Horcajada, M. N., V. Habauzit, et al. (2008). "Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats." *J Appl Physiol* (1985) **104**(3): 648-654.
- Hotokezaka, H., E. Sakai, et al. (2007). "Molecular analysis of RANKL-independent cell fusion of osteoclast-like cells induced by TNF-alpha, lipopolysaccharide, or peptidoglycan." *J Cell Biochem* **101**(1): 122-134.
- Hsieh, R. H., J. H. Hou, et al. (1994). "Age-dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria." *Biochem Mol Biol Int* **32**(6): 1009-1022.
- Huang, H., E. J. Chang, et al. (2006). "Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **351**(1): 99-105.



- Huang, J., Y. H. Hsu, et al. (2014). "METTL21C Is a Potential Pleiotropic Gene for Osteoporosis and Sarcopenia Acting Through the Modulation of the NF-kappaB Signaling Pathway." *J Bone Miner Res* **29**(7): 1531-1540.
- Hughes, D. E., A. Dai, et al. (1996). "Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta." *Nat Med* **2**(10): 1132-1136.
- Hughes, D. E., K. R. Wright, et al. (1995). "Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo." *J Bone Miner Res* **10**(10): 1478-1487.
- Hughes, S. M., J. M. Taylor, et al. (1993). "Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." *Development* **118**(4): 1137-1147.
- Hughes, V. A., W. R. Frontera, et al. (2001). "Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**(5): B209-217.
- Hutchins-Wiese, H. L., A. Kleppinger, et al. (2013). "The impact of supplemental n-3 long chain polyunsaturated fatty acids and dietary antioxidants on physical performance in postmenopausal women." *J Nutr Health Aging* **17**(1): 76-80.
- Ibebunjo, C., J. M. Chick, et al. (2013). "Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia." *Mol Cell Biol* **33**(2): 194-212.
- Ikeda, F., T. Matsubara, et al. (2008). "JNK/c-Jun signaling mediates an anti-apoptotic effect of RANKL in osteoclasts." *J Bone Miner Res* **23**(6): 907-914.
- Ikeda, T., C. Shigeno, et al. (1993). "Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor-beta 1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* **194**(3): 1228-1233.
- Ilich, J. Z., O. J. Kelly, et al. (2014). "Low-grade chronic inflammation perpetuated by modern diet as a promoter of obesity and osteoporosis." *Arh Hig Rada Toksikol* **65**(2): 139-148.
- Imai, Y., S. Kondoh, et al. (2010). "Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha." *Mol Endocrinol* **24**(5): 877-885.
- Impellizzeri, D., E. Esposito, et al. (2011). "Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **339**(3): 859-869.
- Inanir, A., K. Ozoran, et al. (2004). "The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis." *J Int Med Res* **32**(6): 570-582.
- Inoki, K., H. Ouyang, et al. (2006). "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth." *Cell* **126**(5): 955-968.
- Ishii, M., J. G. Egen, et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis." *Nature* **458**(7237): 524-528.
- Ishimi, Y., F. Sugiyama, et al. (2006). "Effects of spirulina, a blue-green alga, on bone metabolism in ovariectomized rats and hindlimb-unloaded mice." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(2): 363-368.
- Janssen, I., R. N. Baumgartner, et al. (2004). "Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women." *Am J Epidemiol* **159**(4): 413-421.
- Janssen, I., S. B. Heymsfield, et al. (2002). "Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability." *J Am Geriatr Soc* **50**(5): 889-896.
- Javaheri, B., A. Stern, et al. (2013). "Deletion of a single beta-catenin allele in osteocytes abolishes the bone anabolic response to loading." *J Bone Miner Res*.
- Jee, W. S. and W. Yao (2001). "Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **1**(3): 193-207.
- Ji, L. L. (2001). "Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress?" *Ann N Y Acad Sci* **928**: 236-247.
- Jiang, J. X., A. J. Siller-Jackson, et al. (2007). "Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress." *Front Biosci* **12**: 1450-1462.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, et al. (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." *Science* **257**(5066): 88-91.
- Jilka, R. L., R. S. Weinstein, et al. (2007). "Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards." *J Bone Miner Res* **22**(10): 1492-1501.
- Johannsen, D. L. and E. Ravussin (2009). "The role of mitochondria in health and disease." *Curr Opin Pharmacol* **9**(6): 780-786.
- Johnell, O., B. Gullberg, et al. (1992). "The apparent incidence of hip fracture in Europe: a study of national register sources. MEDOS Study Group." *Osteoporos Int* **2**(6): 298-302.



- Jornayvaz, F. R. and G. I. Shulman (2010). "Regulation of mitochondrial biogenesis." *Essays Biochem* **47**: 69-84.
- Joseph, A. M., P. J. Adhietty, et al. (2012). "The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals." *Aging Cell* **11**(5): 801-809.
- Jurdic, P., F. Saltel, et al. (2006). "Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model." *Eur J Cell Biol* **85**(3-4): 195-202.
- Justesen, J., K. Stenderup, et al. (2001). "Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis." *Biogerontology* **2**(3): 165-171.
- Kajarabille, N., J. Diaz-Castro, et al. (2013). "A new insight to bone turnover: role of omega-3 polyunsaturated fatty acids." *ScientificWorldJournal* **2013**: 589641.
- Kalu, D. N. (1991). "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss." *Bone Miner* **15**(3): 175-191.
- Kamel, M. A., J. L. Picconi, et al. (2010). "Activation of beta-catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE2: Implications for the study of mechanosensation in bone." *Bone* **47**(5): 872-881.
- Kanis, J. A. (1993). "The incidence of hip fracture in Europe." *Osteoporos Int* **3 Suppl 1**: 10-15.
- Kanis, J. A., E. V. McCloskey, et al. (2008). "A reference standard for the description of osteoporosis." *Bone* **42**(3): 467-475.
- Karlsson, M. K. and B. E. Rosengren (2012). "Physical Activity as a Strategy to Reduce the Risk of Osteoporosis and Fragility Fractures." *International Journal of Endocrinology Metabolism* **10**(3): 527-536.
- Katsanos, C. S., H. Kobayashi, et al. (2005). "Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids." *Am J Clin Nutr* **82**(5): 1065-1073.
- Kawai, M., F. J. de Paula, et al. (2012). "New insights into osteoporosis: the bone-fat connection." *J Intern Med* **272**(4): 317-329.
- Keiler, A. M., O. Zierau, et al. (2013). "Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis." *Eur J Nutr*.
- Keller, H. and M. Kneissel (2005). "SOST is a target gene for PTH in bone." *Bone* **37**(2): 148-158.
- Kelly, O. J., J. C. Gilman, et al. (2013). "Long-chain polyunsaturated fatty acids may mutually benefit both obesity and osteoporosis." *Nutr Res* **33**(7): 521-533.
- Kennel, K. A. and M. T. Drake (2009). "Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management." *Mayo Clin Proc* **84**(7): 632-637; quiz 638.
- Kewalramani, G., P. J. Bilan, et al. (2010). "Muscle insulin resistance: assault by lipids, cytokines and local macrophages." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**(4): 382-390.
- Khosla, S., L. J. Melton, 3rd, et al. (2011). "The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed?" *J Bone Miner Res* **26**(3): 441-451.
- Khosla, S., M. J. Oursler, et al. (2012). "Estrogen and the skeleton." *Trends Endocrinol Metab* **23**(11): 576-581.
- Kim, H. H., D. E. Lee, et al. (1999). "Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase." *FEBS Lett* **443**(3): 297-302.
- Kim, H. K., B. S. Cheon, et al. (1999). "Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships." *Biochem Pharmacol* **58**(5): 759-765.
- Kim, T. H., J. W. Jung, et al. (2011). "The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss." *J Nutr Biochem* **22**(1): 8-15.
- Kim, T. N. and K. M. Choi (2013). "Sarcopenia: Definition, Epidemiology, and Pathophysiology." *J Bone Metab* **20**(1): 1-10.
- Kimball, S. R., T. C. Vary, et al. (1994). "Regulation of protein synthesis by insulin." *Annu Rev Physiol* **56**: 321-348.
- Kimble, R. B., A. B. Matayoshi, et al. (1995). "Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period." *Endocrinology* **136**(7): 3054-3061.
- Kimble, R. B., J. L. Vannice, et al. (1994). "Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats." *J Clin Invest* **93**(5): 1959-1967.
- Kimlin, M. G. (2008). "Geographic location and vitamin D synthesis." *Mol Aspects Med* **29**(6): 453-461.
- Kitazawa, R., R. B. Kimble, et al. (1994). "Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice." *J Clin Invest* **94**(6): 2397-2406.
- Klein-Nulend, J., R. G. Bacabac, et al. (2012). "Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton." *Eur Cell Mater* **24**: 278-291.
- Klein-Nulend, J., A. D. Bakker, et al. (2012). "Mechanosensation and transduction in osteocytes." *Bone*.



- Klein-Nulend, J., A. van der Plas, et al. (1995). "Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro." *FASEB J* **9**(5): 441-445.
- Klibanski, A., L. Adams-Campbell, et al. (2001). "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy." *The Journal of the American Medical Association* **285**(6): 785-795.
- Klitgaard, H., M. Mantoni, et al. (1990). "Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds." *Acta Physiologica Scand* **140**(1): 41-54.
- Klotzbuecher, C. M., P. D. Ross, et al. (2000). "Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis." *J Bone Miner Res* **15**(4): 721-739.
- Kobayashi, K., N. Takahashi, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction." *J Exp Med* **191**(2): 275-286.
- Koga, T., Y. Matsui, et al. (2005). "NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation." *Nat Med* **11**(8): 880-885.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 5): 937-953.
- Komander, D., M. J. Clague, et al. (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 550-563.
- Kondoh, S., K. Inoue, et al. (2014). "Estrogen receptor alpha in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice." *Bone* **60**: 68-77.
- Kontogianni, M. D., L. Melistas, et al. (2009). "Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women." *Nutrition* **25**(2): 165-171.
- Koopman, R., C. H. Ly, et al. (2014). "A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration." *Front Physiol* **5**: 32.
- Kousteni, S., T. Bellido, et al. (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." *Cell* **104**(5): 719-730.
- Krabbe, K. S., M. Pedersen, et al. (2004). "Inflammatory mediators in the elderly." *Exp Gerontol* **39**(5): 687-699.
- Kroon, P. A., M. N. Clifford, et al. (2004). "How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?" *Am J Clin Nutr* **80**(1): 15-21.
- Kruger, M. C., M. Coetzee, et al. (2010). "Long-chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone." *Prog Lipid Res* **49**(4): 438-449.
- Kubota, T., T. Michigami, et al. (2009). "Wnt signaling in bone metabolism." *J Bone Miner Metab* **27**(3): 265-271.
- Kuda, O., T. Jelenik, et al. (2009). "n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet." *Diabetologia* **52**(5): 941-951.
- Kular, J., J. Tickner, et al. (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level." *Clin Biochem* **45**(12): 863-873.
- Kuroda, Y. and K. Matsuo (2012). "Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts." *World J Orthop* **3**(11): 167-174.
- Kus, V., P. Flachs, et al. (2011). "Unmasking differential effects of rosiglitazone and pioglitazone in the combination treatment with n-3 fatty acids in mice fed a high-fat diet." *PLoS One* **6**(11): e27126.
- Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* **93**(2): 165-176.
- Lagirand-Cantaloube, J., K. Cornille, et al. (2009). "Inhibition of atrogenin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo." *PLoS One* **4**(3): e4973.
- Lagirand-Cantaloube, J., N. Offner, et al. (2008). "The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogenin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy." *EMBO J* **27**(8): 1266-1276.
- Laird, E., M. Ward, et al. (2010). "Vitamin D and bone health: potential mechanisms." *Nutrients* **2**(7): 693-724.
- Lakkakorpi, P., J. Tuukkanen, et al. (1989). "Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro." *J Bone Miner Res* **4**(6): 817-825.
- Landi, F., R. Liperoti, et al. (2012). "Sarcopenia as a risk factor for falls in elderly individuals: results from the iLSIRENTE study." *Clin Nutr* **31**(5): 652-658.
- Lang, C. H., R. A. Frost, et al. (2002). "TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(2): E336-347.
- Lanza, I. R., A. Blachnio-Zabielska, et al. (2013). "Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**(12): E1391-1403.
- Lanza, I. R., P. Zabielski, et al. (2012). "Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis." *Cell Metab* **16**(6): 777-788.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2009). "mTOR signaling at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 20): 3589-3594.





- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR Signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2).
- Larsson, S. and N. L. Fazzalari (2014). "Anti-osteoporosis therapy and fracture healing." *Arch Orthop Trauma Surg* **134**(2): 291-297.
- Lauretani, F., C. R. Russo, et al. (2003). "Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia." *J Appl Physiol* (1985) **95**(5): 1851-1860.
- Laval-Jeantet, A. M., P. Gen, et al. (1984). Correlations between bone density measurement and nutritional status. *Osteoporosis: Proceedings of the Copenhagen International Symposium on Osteoporosis*. Christiansen. Copenhagen: 305-309.
- Laval-Jeantet, A. M. and M. Laval-Jeantet (1976). "[Lipid calcium interactions in experimental and human nutrition (author's transl)]." *Pathol Biol (Paris)* **24**(3): 212-225.
- Ledger, G. A., M. F. Burritt, et al. (1995). "Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(11): 3304-3310.
- Lee, J. W., J. Y. Ahn, et al. (2009). "Inhibitory effect of luteolin on osteoclast differentiation and function." *Cytotechnology* **61**(3): 125-134.
- Lee, S. K. and J. A. Lorenzo (1999). "Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation." *Endocrinology* **140**(8): 3552-3561.
- Lee, Z. H., S. E. Lee, et al. (2002). "IL-1alpha stimulation of osteoclast survival through the PI 3-kinase/Akt and ERK pathways." *J Biochem* **131**(1): 161-166.
- Lelovas, P. P., T. T. Xanthos, et al. (2008). "The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research." *Comp Med* **58**(5): 424-430.
- Li, J., I. Sarosi, et al. (2000). "RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1566-1571.
- Li, X., Y. Zhang, et al. (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." *J Biol Chem* **280**(20): 19883-19887.
- Li, Y., M. F. Seifert, et al. (2010). "Bone mineral content is positively correlated to n-3 fatty acids in the femur of growing rats." *Br J Nutr* **104**(5): 674-685.
- Li, Y. P. and W. Chen (1999). "Characterization of mouse cathepsin K gene, the gene promoter, and the gene expression." *J Bone Miner Res* **14**(4): 487-499.
- Li, Y. P., Y. Chen, et al. (2005). "TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle." *FASEB J* **19**(3): 362-370.
- Li, Y. P., Y. Chen, et al. (2003). "Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes." *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(4): C806-812.
- Li, Y. P. and M. B. Reid (2000). "NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(4): R1165-1170.
- Ling, C., P. Poulsen, et al. (2004). "Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins." *J Clin Invest* **114**(10): 1518-1526.
- Liu, Z. P., W. X. Li, et al. (2005). "Effects of trans-resveratrol from Polygonum cuspidatum on bone loss using the ovariectomized rat model." *J Med Food* **8**(1): 14-19.
- Lizcano, F. and G. Guzman (2014). "Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause." *Biomed Res Int* **2014**: 757461.
- Lodish, H., D. Baltimore, et al. (1997). *Biologie moléculaire de la cellule, 3ème édition*. New York, W.H. Freeman and Company.
- Long, F. (2012). "Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(1): 27-38.
- Lorente-Cebrian, S., A. G. Costa, et al. (2013). "Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence." *J Physiol Biochem* **69**(3): 633-651.
- Lorget, F., S. Kamel, et al. (2000). "High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3): 899-903.
- Lowe, D. A., A. D. Husom, et al. (2004). "Myofibrillar myosin ATPase activity in hindlimb muscles from young and aged rats." *Mech Ageing Dev* **125**(9): 619-627.
- Lowe, D. A., J. T. Surek, et al. (2001). "Electron paramagnetic resonance reveals age-related myosin structural changes in rat skeletal muscle fibers." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(3): C540-547.
- Lukas, R., J. C. Gigliotti, et al. (2011). "Consumption of different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids by growing female rats affects long bone mass and microarchitecture." *Bone* **49**(3): 455-462.
- Lunt, S. Y. and M. G. Vander Heiden (2011). "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 441-464.



- Luo, G., D. D. Hershko, et al. (2003). "IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**(5): R1249-1254.
- Ma, H. T., J. F. Griffith, et al. (2013). "The functional muscle-bone unit in subjects of varying BMD." *Osteoporos Int*.
- Ma, T., K. Miyanishi, et al. (2004). "Human interleukin-1-induced murine osteoclastogenesis is dependent on RANKL, but independent of TNF-alpha." *Cytokine* **26**(3): 138-144.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-318.
- Machowetz, A., H. E. Poulsen, et al. (2007). "Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans." *FASEB J* **21**(1): 45-52.
- MacLaughlin, J. and M. F. Holick (1985). "Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3." *J Clin Invest* **76**(4): 1536-1538.
- Madeo, F., N. Tavernarakis, et al. (2010). "Can autophagy promote longevity?" *Nat Cell Biol* **12**(9): 842-846.
- Maggio, M., A. Artoni, et al. (2009). "The impact of omega-3 fatty acids on osteoporosis." *Curr Pharm Des* **15**(36): 4157-4164.
- Mahfouz, R., R. Khoury, et al. (2014). "Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight." *PLoS One* **9**(7): e101865.
- Mailer, R. (2006). "Chemistry and quality of olive oil." *Primefact* **227**: 1-4.
- Maiuri, M. C., D. De Stefano, et al. (2005). "Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**(6): 457-465.
- Malafarina, V., F. Uriz-Otano, et al. (2012). "Sarcopenia in the elderly: diagnosis, pathophysiology and treatment." *Maturitas* **71**(2): 109-114.
- Mammucari, C., G. Milan, et al. (2007). "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo." *Cell Metab* **6**(6): 458-471.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 230S-242S.
- Mangano, K. M., S. Sahni, et al. (2013). "Polyunsaturated fatty acids and their relation with bone and muscle health in adults." *Curr Osteoporos Rep* **11**(3): 203-212.
- Manolagas, S. C. (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis." *Endocr Rev* **21**(2): 115-137.
- Manolagas, S. C. (2006). "Choreography from the tomb: An emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling." *BoneKEY* **3**(1): 5-14.
- Manolagas, S. C. and M. Almeida (2007). "Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism." *Mol Endocrinol* **21**(11): 2605-2614.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka (1995). "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." *N Engl J Med* **332**(5): 305-311.
- Manolagas, S. C. and A. M. Parfitt (2010). "What old means to bone." *Trends Endocrinol Metab* **21**(6): 369-374.
- Marie, P. and P. Halbout (2008). "[OPG/RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis]." *Med Sci (Paris)* **24**(1): 105-110.
- Marie, P. J. (2006). "Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation." *Curr Opin Rheumatol* **18** Suppl 1: S11-15.
- Marie, P. J. (2014). "Bone cell senescence: mechanisms and perspectives." *J Bone Miner Res* **29**(6): 1311-1321.
- Marieb, E. N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines, traduction de la quatrième édition américaine*.
- Martin-Bautista, E., M. Munoz-Torres, et al. (2010). "Improvement of bone formation biomarkers after 1-year consumption with milk fortified with eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, oleic acid, and selected vitamins." *Nutr Res* **30**(5): 320-326.
- Martin-Millan, M., M. Almeida, et al. (2010). "The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone." *Mol Endocrinol* **24**(2): 323-334.
- Martin, T. J., E. H. Allan, et al. (2010). "Communication between ephrinB2 and EphB4 within the osteoblast lineage." *Adv Exp Med Biol* **658**: 51-60.
- Martinez-Dominguez, E., R. de la Puerta, et al. (2001). "Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet." *Inflamm Res* **50**(2): 102-106.
- Marzani, B., M. Balage, et al. (2008). "Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats." *J Nutr* **138**(11): 2205-2211.
- Marzetti, E., H. A. Lees, et al. (2012). "Skeletal muscle apoptotic signaling predicts thigh muscle volume and gait speed in community-dwelling older persons: an exploratory study." *PLoS One* **7**(2): e32829.
- Mas, E., R. J. Woodman, et al. (2010). "The omega-3 fatty acids EPA and DHA decrease plasma F(2)-isoprostanes: Results from two placebo-controlled interventions." *Free Radic Res* **44**(9): 983-990.



- Masala, G., M. Ceroti, et al. (2007). "A dietary pattern rich in olive oil and raw vegetables is associated with lower mortality in Italian elderly subjects." *Br J Nutr* **98**(2): 406-415.
- Masgrau, A., A. Mishellany-Dutour, et al. (2012). "Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity." *J Physiol* **590**(Pt 20): 5199-5210.
- Matsushita, H., J. A. Barrios, et al. (2008). "Dietary fish oil results in a greater bone mass and bone formation indices in aged ovariectomized rats." *J Bone Miner Metab* **26**(3): 241-247.
- McCollum, E. V., N. Simmonds, et al. (1922). "Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition." *J Biol Chem* **53**: 293-312.
- McLoughlin, T. J., S. M. Smith, et al. (2009). "FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C548-555.
- Meier, C., O. Lamy, et al. (2014). "The role of teriparatide in sequential and combination therapy of osteoporosis." *Swiss Med Wkly* **144**: w13952.
- Mellanby, E. (1921). *Experimental Rickets*, His Majesty's Stationery Office.
- Melville, K. M., N. H. Kelly, et al. (2014). "Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength." *J Bone Miner Res* **29**(2): 370-379.
- Messi, M. L. and O. Delbono (2003). "Target-derived trophic effect on skeletal muscle innervation in senescent mice." *J Neurosci* **23**(4): 1351-1359.
- Messier, V., R. Rabasa-Lhoret, et al. (2011). "Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones." *Maturitas* **68**(4): 331-336.
- Miles, E. A., P. Zoubouli, et al. (2005). "Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures." *Nutrition* **21**(3): 389-394.
- Miro Casas, E., M. Farre Albadalejo, et al. (2001). "Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil." *Clin Chem* **47**(2): 341-343.
- Mitch, W. E. and A. L. Goldberg (1996). "Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway." *N Engl J Med* **335**(25): 1897-1905.
- Modder, U. I., B. L. Riggs, et al. (2004). "Dose-response of estrogen on bone versus the uterus in ovariectomized mice." *Eur J Endocrinol* **151**(4): 503-510.
- Moerman, E. J., K. Teng, et al. (2004). "Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways." *Aging Cell* **3**(6): 379-389.
- Montero-Fernandez, N. and J. A. Serra-Rexach (2013). "Role of exercise on sarcopenia in the elderly." *Eur J Phys Rehabil Med* **49**(1): 131-143.
- Montgomery, E., C. Pennington, et al. (2005). "Muscle-bone interactions in dystrophin-deficient and myostatin-deficient mice." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **286**(1): 814-822.
- Moran, A. L., G. L. Warren, et al. (2006). "Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution." *J Appl Physiol* (1985) **100**(2): 548-559.
- Moreno, J. J. (2003). "Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7." *Free Radic Biol Med* **35**(9): 1073-1081.
- Morley, J. E., R. N. Baumgartner, et al. (2001). "Sarcopenia." *J Lab Clin Med* **137**(4): 231-243.
- Morris, H. A. (2014). "Vitamin D Activities for Health Outcomes." *Ann Lab Med* **34**(3): 181-186.
- Mosoni, L., T. Malmezat, et al. (1999). "Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): E608-616.
- Mosoni, L., M. C. Valluy, et al. (1995). "Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats." *Am J Physiol* **268**(2 Pt 1): E328-335.
- Mozaffarian, D. and J. H. Wu (2011). "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events." *J Am Coll Cardiol* **58**(20): 2047-2067.
- Muir, J. M., C. Ye, et al. (2013). "The effect of regular physical activity on bone mineral density in post-menopausal women aged 75 and over: a retrospective analysis from the Canadian multicentre osteoporosis study." *BMC Musculoskelet Disord* **14**: 253.
- Mujahid, A., Y. Akiba, et al. (2009). "Olive oil-supplemented diet alleviates acute heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**(3): R690-698.
- Muscat, G. E. and U. Dressel (2000). "Not a minute to waste." *Nat Med* **6**(11): 1216-1217.
- Musumeci, G., F. Maria Trovato, et al. (2013). "Effects of dietary extra-virgin olive oil on oxidative stress resulting from exhaustive exercise in rat skeletal muscle: A morphological study." *Acta Histochem*.
- Muthusami, S., I. Ramachandran, et al. (2005). "Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats." *Clin Chim Acta* **360**(1-2): 81-86.
- Nair, K. S. (2005). "Aging muscle." *Am J Clin Nutr* **81**(5): 953-963.



- Nakamura, T., Y. Imai, et al. (2007). "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts." *Cell* **130**(5): 811-823.
- Nakanishi, A., N. Iitsuka, et al. (2013). "Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats." *Mol Med Rep* **7**(6): 1896-1903.
- Nakashima, K., X. Zhou, et al. (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." *Cell* **108**(1): 17-29.
- Nakashima, T., M. Hayashi, et al. (2011). "Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression." *Nat Med* **17**(10): 1231-1234.
- Nalsen, C., B. Vessby, et al. (2006). "Dietary (n-3) fatty acids reduce plasma F2-isoprostanes but not prostaglandin F2alpha in healthy humans." *J Nutr* **136**(5): 1222-1228.
- Nandedkar, T. D. (1992). "Immunoendocrine interrelationship--effect of ovariectomy on spleen and thymus in mouse." *Indian J Exp Biol* **30**(11): 1101-1104.
- Neer, R. M., C. D. Arnaud, et al. (2001). "Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis." *N Engl J Med* **344**(19): 1434-1441.
- Negishi-Koga, T., M. Shinohara, et al. (2011). "Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D." *Nat Med* **17**(11): 1473-1480.
- New, S. A., C. Bolton-Smith, et al. (1997). "Nutritional influences on bone mineral density: a cross-sectional study in premenopausal women." *Am J Clin Nutr* **65**(6): 1831-1839.
- New, S. A., S. P. Robins, et al. (2000). "Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health?" *Am J Clin Nutr* **71**(1): 142-151.
- Newman, A. B., V. Kupelian, et al. (2003). "Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function." *J Am Geriatr Soc* **51**(11): 1602-1609.
- Ngo Sock, E. T., I. Cote, et al. (2013). "Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats." *Horm Metab Res* **45**(4): 283-290.
- Nicolaysen, R. (1937). "Studies upon the mode of action of vitamin D: The influence of vitamin D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat." *Biochem J* **31**(1): 122-129.
- Nishida, S., A. Yamaguchi, et al. (1994). "Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow." *Bone* **15**(6): 717-723.
- Nordstrom, A., C. Karlsson, et al. (2005). "Bone loss and fracture risk after reduced physical activity." *J Bone Miner Res* **20**(2): 202-207.
- Norman, A. W. (2008). "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health." *Am J Clin Nutr* **88**(2): 491S-499S.
- Nowotny, K., T. Jung, et al. (2014). "Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging." *Exp Gerontol* **57**: 122-131.
- Nowson, C. A., J. J. McGrath, et al. (2012). "Vitamin D and health in adults in Australia and New Zealand: a position statement." *Med J Aust* **196**(11): 686-687.
- Nunnari, J. and A. Suomalainen (2012). "Mitochondria: in sickness and in health." *Cell* **148**(6): 1145-1159.
- Ochi, M., Y. Tabara, et al. (2010). "Quadriceps sarcopenia and visceral obesity are risk factors for postural instability in the middle-aged to elderly population." *Geriatr Gerontol Int* **10**(3): 233-243.
- Ohlendieck, K. (2011). "Proteomic profiling of fast-to-slow muscle transitions during aging." *Front Physiol* **2**: 105.
- Ohyama, Y., H. Matsushita, et al. (2014). "Effect of the ethanol extract of *Pleurotus eryngii* on bone metabolism in ovariectomized rats." *Climacteric*.
- Oi-Kano, Y., T. Kawada, et al. (2007). "Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats." *J Nutr Biochem* **18**(10): 685-692.
- Okazaki, R., D. Inoue, et al. (2002). "Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta." *Endocrinology* **143**(6): 2349-2356.
- Olefsky, J. M. and C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." *Annu Rev Physiol* **72**: 219-246.
- Omi, N. and I. Ezawa (2011). "[Animal models for bone and joint disease. Low calcium diet-induced rat model of osteoporosis]." *Clin Calcium* **21**(2): 173-180.
- Orchard, T. S., X. Pan, et al. (2012). "A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis." *Br J Nutr* **107 Suppl 2**: S253-260.
- Orimo, H. (2010). "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease." *J Nippon Med Sch* **77**(1): 4-12.





- Oursler, M. J., P. Osoby, et al. (1991). "Avian osteoclasts as estrogen target cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(15): 6613-6617.
- Overman, R. A., M. Borse, et al. (2013). "Salmon calcitonin use and associated cancer risk." Ann Pharmacother **47**(12): 1675-1684.
- Owen, R. W., A. Giacosa, et al. (2000). "Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants." Lancet Oncol **1**: 107-112.
- Owen, R. W., W. Mier, et al. (2000). "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene." Food Chem Toxicol **38**(8): 647-659.
- Ozgoemren, S., H. Kaya, et al. (2007). "Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis." Mol Cell Biochem **295**(1-2): 45-52.
- Ozgoemren, S., H. Kaya, et al. (2007). "Effects of calcitonin, risedronate, and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis." Arch Med Res **38**(2): 196-205.
- Pacifici, R., C. Brown, et al. (1991). "Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5134-5138.
- Papadakis, M. A., D. Grady, et al. (1996). "Growth hormone replacement in healthy older men improves body composition but not functional ability." Ann Intern Med **124**(8): 708-716.
- Park, Y., J. Kim, et al. (2013). "Conjugated linoleic acid and calcium co-supplementation improves bone health in ovariectomized mice." Food Chem **140**(1-2): 280-288.
- Pasiakos, S. M. and J. W. Carbone (2014). "Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise." IUBMB Life.
- Payette, H., M. Rola-Pleszczynski, et al. (1990). "Nutrition factors in relation to cellular and regulatory immune variables in a free-living elderly population." Am J Clin Nutr **52**(5): 927-932.
- Payette, H., R. Roubenoff, et al. (2003). "Insulin-like growth factor-1 and interleukin 6 predict sarcopenia in very old community-living men and women: the Framingham Heart Study." J Am Geriatr Soc **51**(9): 1237-1243.
- Pedraza-Alva, G., J. M. Zingg, et al. (2009). "Estrogen receptor regulates MyoD gene expression by preventing AP-1-mediated repression." Biochem Biophys Res Commun **389**(2): 360-365.
- Peoples, G. E. and P. L. McLennan (2014). "Long-chain n-3 DHA reduces the extent of skeletal muscle fatigue in the rat in vivo hindlimb model." Br J Nutr **111**(6): 996-1003.
- Perez-Lopez, F. R., P. Chedraui, et al. (2009). "Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions." Maturitas **64**(2): 67-79.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." Science **300**(5622): 1140-1142.
- Petrella, J. K., J. S. Kim, et al. (2006). "Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(5): E937-946.
- Petroni, A., M. Blasevich, et al. (1997). "Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry." Thromb Res **87**(3): 315-322.
- Pettan-Brewer, C. and P. M. Treuting (2011). "Practical pathology of aging mice." Pathobiol Aging Age Relat Dis **1**.
- Pfaff, M. and P. Jurdic (2001). "Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin alphaVbeta3." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2775-2786.
- Pfeifer, M., B. Begerow, et al. (2009). "Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals." Osteoporos Int **20**(2): 315-322.
- Phillips, S. K., K. M. Rook, et al. (1993). "Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy." Clin Sci (Lond) **84**(1): 95-98.
- Philp, A., D. L. Hamilton, et al. (2011). "Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1." J Appl Physiol (1985) **110**(2): 561-568.
- Piantadosi, C. A. and H. B. Suliman (2012). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and its interface with inflammatory processes." Biochim Biophys Acta **1820**(4): 532-541.
- Pierno, S., D. Tricarico, et al. (2014). "An olive oil-derived antioxidant mixture ameliorates the age-related decline of skeletal muscle function." Age (Dordr) **36**(1): 73-88.
- Pighon, A., R. Barsaloni, et al. (2010). "Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats?" Climacteric **13**(3): 238-248.
- Pinel, A., B. Morio-Liondore, et al. (2014). "n-3 polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: implication for the prevention of type 2 diabetes." J Physiol Biochem **70**(2): 647-658.



- Pittas, A. G., S. S. Harris, et al. (2007). "The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults." *Diabetes Care* **30**(4): 980-986.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.
- Plourde, M. and S. C. Cunnane (2007). "Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements." *Appl Physiol Nutr Metab* **32**(4): 619-634.
- Polge, C., S. Uttenweiler-Joseph, et al. (2013). "Deciphering the ubiquitin proteome: Limits and advantages of high throughput global affinity purification-mass spectrometry approaches." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2136-2146.
- Poole, K. E., R. L. van Bezooijen, et al. (2005). "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation." *FASEB J* **19**(13): 1842-1844.
- Post, T. M., S. C. Cremers, et al. (2010). "Bone physiology, disease and treatment: towards disease system analysis in osteoporosis." *Clin Pharmacokinet* **49**(2): 89-118.
- Poudyal, H., S. K. Panchal, et al. (2011). "Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action." *Prog Lipid Res* **50**(4): 372-387.
- Poulsen RC, F. E., Rogers CW, Moughan PJ, Kruger MC. (2007). "Specific effects of gamma-linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic ethyl esters on bone post-ovariectomy in rats." *Calcif Tissue Int* **81**(6): 459-471.
- Poulsen, R. C., E. C. Firth, et al. (2007). "Specific effects of gamma-linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic ethyl esters on bone post-ovariectomy in rats." *Calcif Tissue Int* **81**(6): 459-471.
- Poulsen, R. C., F. M. Wolber, et al. (2008). "Long chain polyunsaturated fatty acids alter membrane-bound RANK-L expression and osteoprotegerin secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **85**(1-2): 42-48.
- Prod'homme, M., M. Balage, et al. (2005). "Differential effects of insulin and dietary amino acids on muscle protein synthesis in adult and old rats." *J Physiol* **563**(Pt 1): 235-248.
- Proud, C. G. (2006). "Regulation of protein synthesis by insulin." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 2): 213-216.
- Puel, C., J. Mardon, et al. (2008). "Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model." *J Agric Food Chem* **56**(20): 9417-9422.
- Puel, C., J. Mardon, et al. (2007). "Black Lucques olives prevented bone loss caused by ovariectomy and talc granulomatosis in rats." *Br J Nutr* **97**(5): 1012-1020.
- Puel, C., J. Mathey, et al. (2006). "Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat." *Clin Nutr* **25**(5): 859-868.
- Puel, C., A. Quintin, et al. (2004). "Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat." *Br J Nutr* **92**(1): 119-127.
- Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2001). "Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1." *Mol Cell* **8**(5): 971-982.
- Quesada-Gomez, J. M., M. Diaz-Curiel, et al. (2013). "Low calcium intake and inadequate vitamin D status in postmenopausal osteoporotic women." *J Steroid Biochem Mol Biol* **136**: 175-177.
- Rachner, T. D., S. Khosla, et al. (2011). "Osteoporosis: now and the future." *Lancet* **377**(9773): 1276-1287.
- Raggatt, L. J. and N. C. Partridge (2010). "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling." *J Biol Chem* **285**(33): 25103-25108.
- Rahman, M. M., A. Bhattacharya, et al. (2008). "Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid." *J Cell Physiol* **214**(1): 201-209.
- Rajawat, Y. S., Z. Hilioti, et al. (2009). "Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system." *Ageing Res Rev* **8**(3): 199-213.
- Ranalli, A., M. L. Ferrante, et al. (1999). "Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction." *J Agric Food Chem* **47**(2): 417-424.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." *J Nutr* **123**(11): 1939-1951.
- Reid, I. R., M. J. Bolland, et al. (2014). "Effects of vitamin D supplements on bone mineral density: a systematic review and meta-analysis." *Lancet* **383**(9912): 146-155.
- Reid, M. B. (2008). "Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC." *Free Radic Biol Med* **44**(2): 169-179.
- Reyes-Turcu, F. E., K. H. Ventii, et al. (2009). "Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes." *Annu Rev Biochem* **78**: 363-397.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." *Nature* **433**(7025): 477-480.



- Riggs, B. L., S. Khosla, et al. (1998). "A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men." *J Bone Miner Res* **13**(5): 763-773.
- Riggs, B. L., S. Khosla, et al. (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." *Endocr Rev* **23**(3): 279-302.
- Riggs, B. L. and L. J. Melton, 3rd (1983). "Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis." *Am J Med* **75**(6): 899-901.
- Riggs, B. L., L. J. Melton, et al. (2008). "A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men." *J Bone Miner Res* **23**(2): 205-214.
- Rivas, A., A. Romero, et al. (2013). "Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women." *Int J Food Sci Nutr* **64**(2): 155-161.
- Robbins, J., A. K. Aragaki, et al. (2007). "Factors associated with 5-year risk of hip fracture in postmenopausal women." *JAMA* **298**(20): 2389-2398.
- Robinson, L. J., B. B. Yaroslavskiy, et al. (2009). "Estrogen inhibits RANKL-stimulated osteoclastic differentiation of human monocytes through estrogen and RANKL-regulated interaction of estrogen receptor-alpha with BCAR1 and Traf6." *Exp Cell Res* **315**(7): 1287-1301.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, et al. (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin." *J Biol Chem* **283**(9): 5866-5875.
- Rodacki, C. L., A. L. Rodacki, et al. (2012). "Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women." *Am J Clin Nutr* **95**(2): 428-436.
- Rodriguez, V. M., M. P. Portillo, et al. (2002). "Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle." *Am J Clin Nutr* **75**(2): 213-220.
- Rogers, N. H., J. W. Perfield, 2nd, et al. (2009). "Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity." *Endocrinology* **150**(5): 2161-2168.
- Rolland, Y. M., H. M. Perry, 3rd, et al. (2007). "Loss of appendicular muscle mass and loss of muscle strength in young postmenopausal women." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**(3): 330-335.
- Romero-Suarez, S., C. Mo, et al. (2011). "The b-catenin activating factor, Wnt3a, stimulates skeletal myogenesis. ."
- Roodman, G. D. (1996). "Advances in bone biology: the osteoclast." *Endocr Rev* **17**(4): 308-332.
- Rosenberg, N., O. Rosenberg, et al. (2012). "Osteoblasts in bone physiology-mini review." *Rambam Maimonides Med J* **3**(2): e0013.
- Ross, A. C., J. E. Manson, et al. (2011). "The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(1): 53-58.
- Ross, A. C., C. L. Taylor, et al. (2011). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. N. A. Press. Washington, Institute of Medicine.
- Ross, F. P. (2006). "M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors." *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 110-116.
- Rothwell, J. A., J. Perez-Jimenez, et al. (2013). "Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content." *Database (Oxford)* **2013**: bat070.
- Rousseau, J. H., A. Kleppinger, et al. (2009). "Self-reported dietary intake of omega-3 fatty acids and association with bone and lower extremity function." *J Am Geriatr Soc* **57**(10): 1781-1788.
- Rozman, C., E. Feliu, et al. (1989). "Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study." *Exp Hematol* **17**(1): 34-37.
- Ryall, J. G., J. D. Schertzer, et al. (2008). "Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness." *Biogerontology* **9**(4): 213-228.
- Ryu, J., H. J. Kim, et al. (2006). "Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling." *EMBO J* **25**(24): 5840-5851.
- Sacco, S. M., M. N. Horcajada, et al. (2013). "Phytonutrients for bone health during ageing." *Br J Clin Pharmacol* **75**(3): 697-707.
- Sacheck, J. M., A. Ohtsuka, et al. (2004). "IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogen-1 and MuRF1." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(4): E591-601.
- Saleh, N. K. and H. A. Saleh (2011). "Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats." *BMC Complement Altern Med* **11**: 10.
- Salles, J., A. Chanet, et al. (2013). "1,25(OH)2-vitamin D3 enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C2C12 skeletal myotubes." *Mol Nutr Food Res* **57**(12): 2137-2146.



- Salvini, S., F. Sera, et al. (2006). "Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women." *Br J Nutr* **95**(4): 742-751.
- Salvioli, S., M. Capri, et al. (2006). "Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology." *Curr Pharm Des* **12**(24): 3161-3171.
- Sampson, H. W. (2002). "Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women." *Alcohol Res Health* **26**(4): 292-298.
- Sanchez, A. M., A. Csibi, et al. (2013). "eIF3f: a central regulator of the antagonism atrophy/hypertrophy in skeletal muscle." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2158-2162.
- Sanchis-Gomar, F., J. L. Garcia-Gimenez, et al. (2014). "Mitochondrial Biogenesis in Health and Disease. Molecular and Therapeutic Approaches." *Curr Pharm Des*.
- Sanders, K. M., A. L. Stuart, et al. (2010). "Annual high-dose oral vitamin D and falls and fractures in older women: a randomized controlled trial." *JAMA* **303**(18): 1815-1822.
- Sandri, M. (2013). "Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2121-2129.
- Sandri, M., C. Sandri, et al. (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." *Cell* **117**(3): 399-412.
- Santangelo, C., R. Vari, et al. (2007). "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." *Ann Ist Super Sanita* **43**(4): 394-405.
- Santiago-Mora, R., A. Casado-Diaz, et al. (2011). "Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow." *Osteoporos Int* **22**(2): 675-684.
- Sato, Y., J. Iwamoto, et al. (2005). "Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial." *Cerebrovasc Dis* **20**(3): 187-192.
- Savary, S., D. Trompier, et al. (2012). "Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation." *Curr Drug Metab* **13**(10): 1358-1370.
- Sawakami, K., A. G. Robling, et al. (2006). "The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment." *J Biol Chem* **281**(33): 23698-23711.
- Scarpulla, R. C. (2011). "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network." *Biochim Biophys Acta* **1813**(7): 1269-1278.
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, et al. (2013). "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy." *FEBS J* **280**(17): 4294-4314.
- Schiaffino, S. and C. Mammucari (2011). "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models." *Skelet Muscle* **1**(1): 4.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). "Fiber types in mammalian skeletal muscles." *Physiol Rev* **91**(4): 1447-1531.
- Schottker, B., R. Jorde, et al. (2014). "Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States." *BMJ* **348**: g3656.
- Schulte, J. N. and K. E. Yarasheski (2001). "Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people." *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **11 Suppl**: S111-118.
- Seeman, E. (2009). "Bone modeling and remodeling." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **19**(3): 219-233.
- Seeman, E. (2013). "Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**(10): 1218-1225.
- Seibel, M. J., M. S. Cooper, et al. (2013). "Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives." *Lancet Diabetes Endocrinol* **1**(1): 59-70.
- Servili, M., R. Selvaggini, et al. (2004). "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil." *J Chromatogr A* **1054**(1-2): 113-127.
- Sharp, J. C., J. C. Coppins, et al. (2000). "Analysis of ovariectomy and estrogen effects on body composition in rats by X-ray and magnetic resonance imaging techniques." *J Bone Miner Res* **15**(1): 138-146.
- Shen, C. L., L. Chen, et al. (2014). "Effects of dietary fat levels and feeding durations on musculoskeletal health in female rats." *Food Funct* **5**(3): 598-604.
- Shevde, N. K., A. C. Bendixen, et al. (2000). "Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7829-7834.
- Shibata, T., A. Shira-Ishi, et al. (2002). "Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow." *J Bone Miner Res* **17**(4): 622-629.
- Short, K. R., M. L. Bigelow, et al. (2005). "Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15): 5618-5623.





- Simoneau, J. A. and C. Bouchard (1989). "Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities." *Am J Physiol* **257**(4 Pt 1): E567-572.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell* **89**(2): 309-319.
- Singh, T. and A. B. Newman (2011). "Inflammatory markers in population studies of aging." *Ageing Res Rev* **10**(3): 319-329.
- Slawik, M. and A. J. Vidal-Puig (2006). "Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging." *Ageing Res Rev* **5**(2): 144-164.
- Smith, G. I., P. Atherton, et al. (2011). "Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **93**(2): 402-412.
- Smyth, E. M., T. Grosser, et al. (2009). "Prostanoids in health and disease." *J Lipid Res* **50** Suppl: S423-428.
- Sofi, F., F. Cesari, et al. (2008). "Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis." *BMJ* **337**: a1344.
- Sommerfeldt, D. W. and C. T. Rubin (2001). "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton." *Eur Spine J* **10** Suppl 2: S86-95.
- Song, X. M., Y. Kawano, et al. (1999). "Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats." *Diabetes* **48**(3): 664-670.
- Song, X. M., J. W. Ryder, et al. (1999). "Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 2): R1690-1696.
- Sorensen, M. G., K. Henriksen, et al. (2006). "Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts." *DNA Cell Biol* **25**(8): 475-483.
- Souberbielle, J. C. (2000). "Marqueurs du remodelage osseux." *Feuillets de biologie* **XXXI**(234): 51-63.
- Souberbielle, J. C., J. J. Body, et al. (2010). "Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice." *Autoimmun Rev* **9**(11): 709-715.
- Spilmont, M., L. Leotoing, et al. (2013). "Pomegranate and its derivatives can improve bone health through decreased inflammation and oxidative stress in an animal model of postmenopausal osteoporosis." *Eur J Nutr*.
- Spilmont, M., L. Leotoing, et al. (2013). "Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status." *J Nutr Biochem* **24**(11): 1840-1848.
- Srivastava, S., G. Toraldo, et al. (2001). "Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation." *J Biol Chem* **276**(12): 8836-8840.
- Stagi, S., L. Cavalli, et al. (2013). "Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass." *Clin Cases Miner Bone Metab* **10**(3): 172-179.
- Staines, K. A., V. E. MacRae, et al. (2012). "The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling." *J Endocrinol* **214**(3): 241-255.
- Stark, A. H. and Z. Madar (2002). "Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches." *Nutr Rev* **60**(6): 170-176.
- Storlien, L. H., D. E. James, et al. (1986). "Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats." *Am J Physiol* **251**(5 Pt 1): E576-583.
- Studenski, S. A., K. W. Peters, et al. (2014). "The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **69**(5): 547-558.
- Suarez, M., R. M. Valls, et al. (2011). "Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil." *Br J Nutr* **106**(11): 1691-1701.
- Suda, T., F. Takahashi, et al. (2012). "Bone effects of vitamin D - Discrepancies between in vivo and in vitro studies." *Arch Biochem Biophys* **523**(1): 22-29.
- Suda, T., N. Takahashi, et al. (1992). "Modulation of osteoclast differentiation." *Endocr Rev* **13**(1): 66-80.
- Summers, S. A. (2006). "Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity." *Prog Lipid Res* **45**(1): 42-72.
- Sun, D., A. Krishnan, et al. (2003). "Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice." *J Bone Miner Res* **18**(7): 1206-1216.
- Svedbom, A., E. Hernlund, et al. (2013). "Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports." *Arch Osteoporos* **8**(1-2): 137.
- Szulc, P., E. Seeman, et al. (2006). "Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women." *J Bone Miner Res* **21**(12): 1856-1863.
- Taekema, D. G., C. H. Ling, et al. (2011). "Circulating levels of IGF1 are associated with muscle strength in middle-aged- and oldest-old women." *Eur J Endocrinol* **164**(2): 189-196.
- Tahimic, C. G., Y. Wang, et al. (2013). "Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 6.
- Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." *Blood* **105**(7): 2631-2639.



- Takahashi, N., N. Udagawa, et al. (2014). "Vitamin D endocrine system and osteoclasts." Bonekey Rep **3**: 495.
- Takayanagi, H., S. Kim, et al. (2002). "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts." Dev Cell **3**(6): 889-901.
- Takayanagi, H., S. Kim, et al. (2002). "RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta." Nature **416**(6882): 744-749.
- Tardif, N., J. Salles, et al. (2014). "Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 $\alpha$  activation." Aging Cell sous presse.
- Tardif, N., J. Salles, et al. (2011). "Oleate-enriched diet improves insulin sensitivity and restores muscle protein synthesis in old rats." Clin Nutr **30**(6): 799-806.
- Tartibian, B., B. Hajizadeh Maleki, et al. (2011). "Long-term aerobic exercise and omega-3 supplementation modulate osteoporosis through inflammatory mechanisms in post-menopausal women: a randomized, repeated measures study." Nutr Metab (Lond) **8**: 71.
- Tatsumi, S., K. Ishii, et al. (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." Cell Metab **5**(6): 464-475.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.
- Tella, S. H. and J. C. Gallagher (2013). "Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis." J Steroid Biochem Mol Biol.
- Terracciano, C., M. Celi, et al. (2013). "Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis." Osteoporos Int **24**(3): 1095-1100.
- Terrill, J. R., H. G. Radley-Crabb, et al. (2013). "Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies." FEBS J **280**(17): 4149-4164.
- Thompson, J. L., G. E. Butterfield, et al. (1998). "Effects of human growth hormone, insulin-like growth factor I, and diet and exercise on body composition of obese postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1477-1484.
- Tiainen, K., M. Hurme, et al. (2010). "Inflammatory markers and physical performance among nonagenarians." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(6): 658-663.
- Tichet, J., S. Vol, et al. (2008). "Prevalence of sarcopenia in the French senior population." J Nutr Health Aging **12**(3): 202-206.
- Tintignac, L. A., J. Lagirand, et al. (2005). "Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase." J Biol Chem **280**(4): 2847-2856.
- Tomkinson, A., J. Reeve, et al. (1997). "The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3128-3135.
- Toppets, V., V. Pastoret, et al. (2004). "Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux." Annales de Médecine Vétérinaire: 148.
- Tortora, G. J. and S. R. Grabowski (1994). Principes d'anatomie et de physiologie, 2ème édition française.
- Trichopoulou, A., E. Georgiou, et al. (1997). "Energy intake and monounsaturated fat in relation to bone mineral density among women and men in Greece." Prev Med **26**(3): 395-400.
- Trifunovic, A. (2006). "Mitochondrial DNA and ageing." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 611-617.
- Tsitouras, P. D., F. Gucciardo, et al. (2008). "High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults." Horm Metab Res **40**(3): 199-205.
- Turner, N. and L. K. Heilbronn (2008). "Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance?" Trends Endocrinol Metab **19**(9): 324-330.
- Tzankoff, S. P. and A. H. Norris (1977). "Effect of muscle mass decrease on age-related BMR changes." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **43**(6): 1001-1006.
- Uchiyama, S. and M. Yamaguchi (2006). "Oral administration of beta-cryptoxanthin prevents bone loss in ovariectomized rats." Int J Mol Med **17**(1): 15-20.
- Udagawa, N., N. Takahashi, et al. (1990). "Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 7260-7264.
- Udagawa, N., N. Takahashi, et al. (2000). "Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function." Endocrinology **141**(9): 3478-3484.
- Unger, R. H. (2003). "The physiology of cellular liporegulation." Annu Rev Physiol **65**: 333-347.
- Unger, R. H. and L. Orci (2002). "Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 202-212.
- Uttara, B., A. V. Singh, et al. (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." Curr Neuropharmacol **7**(1): 65-74.
- Vaananen, H. K. and M. Horton (1995). "The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure." J Cell Sci **108 ( Pt 8)**: 2729-2732.



- Vaananen, H. K., H. Zhao, et al. (2000). "The cell biology of osteoclast function." *J Cell Sci* **113** ( Pt 3): 377-381.
- Vaananen, K. (2005). "Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* **57**(7): 959-971.
- Valenzuela, R., A. Espinosa, et al. (2012). "N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis." *PLoS One* **7**(10): e46400.
- van't Hof, R. J. and S. H. Ralston (2001). "Nitric oxide and bone." *Immunology* **103**(3): 255-261.
- van de Peppel, J. and J. P. van Leeuwen (2014). "Vitamin D and gene networks in human osteoblasts." *Front Physiol* **5**: 137.
- Vandenburgh, H., J. Chromiak, et al. (1999). "Space travel directly induces skeletal muscle atrophy." *FASEB J* **13**(9): 1031-1038.
- Vasconsuelo, A., L. Milanese, et al. (2008). "17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." *J Endocrinol* **196**(2): 385-397.
- Vashishth, D., G. J. Gibson, et al. (2001). "Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone." *Bone* **28**(2): 195-201.
- Vernay, M., M. Sponga, et al. (2012). Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007). *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, Institut de Veille Sanitaire. **16-17**.
- Viguet-Carrin, S., P. Garnero, et al. (2006). "The role of collagen in bone strength." *Osteoporos Int* **17**(3): 319-336.
- Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1309-1313.
- Visioli, F., G. Bellomo, et al. (1998). "Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols." *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 60-64.
- Visioli, F., D. Caruso, et al. (2005). "Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients." *Eur J Nutr* **44**(2): 121-127.
- Vissers, M. N., P. L. Zock, et al. (2004). "Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review." *Eur J Clin Nutr* **58**(6): 955-965.
- Vissers, M. N., P. L. Zock, et al. (2002). "Olive oil phenols are absorbed in humans." *J Nutr* **132**(3): 409-417.
- Vittone, J., M. R. Blackman, et al. (1997). "Effects of single nightly injections of growth hormone-releasing hormone (GHRH 1-29) in healthy elderly men." *Metabolism* **46**(1): 89-96.
- Volpi, E., B. Mittendorfer, et al. (2000). "The response of muscle protein anabolism to combined hyperaminoacidemia and glucose-induced hyperinsulinemia is impaired in the elderly." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(12): 4481-4490.
- Voronova, A., E. Coyne, et al. (2013). "Hedgehog signaling regulates MyoD expression and activity." *J Biol Chem* **288**(6): 4389-4404.
- Wagner, E. F. and G. Karsenty (2001). "Genetic control of skeletal development." *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 527-532.
- Walker, D. G. (1972). "Enzymatic and electron microscopic analysis of isolated osteoclasts." *Calcif Tissue Res* **9**(4): 296-309.
- Walrand, S., C. Guillet, et al. (2011). "Physiopathological mechanism of sarcopenia." *Clin Geriatr Med* **27**(3): 365-385.
- Walsh, M. C., G. R. Hunter, et al. (2006). "Sarcopenia in premenopausal and postmenopausal women with osteopenia, osteoporosis and normal bone mineral density." *Osteoporos Int* **17**(1): 61-67.
- Wanagat, J., Z. Cao, et al. (2001). "Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia." *FASEB J* **15**(2): 322-332.
- Wang, M. L., J. Massie, et al. (2007). "A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements." *Spine J* **7**(4): 466-474.
- Wang, X., Z. Hu, et al. (2006). "Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling." *Endocrinology* **147**(9): 4160-4168.
- Waterman, E. and B. Lockwood (2007). "Active components and clinical applications of olive oil." *Altern Med Rev* **12**(4): 331-342.
- Watkins, B. A., Y. Li, et al. (2006). "Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats." *J Nutr Biochem* **17**(4): 282-289.
- Wauquier, F., L. Leotoing, et al. (2009). "Oxidative stress in bone remodelling and disease." *Trends Mol Med* **15**(10): 468-477.



- Wei, S., H. Kitaura, et al. (2005). "IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis." *J Clin Invest* **115**(2): 282-290.
- Weinberg, J. M. (2006). "Lipotoxicity." *Kidney Int* **70**(9): 1560-1566.
- Weiss, L. A., E. Barrett-Connor, et al. (2005). "Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study." *Am J Clin Nutr* **81**(4): 934-938.
- Westendorf, J. J., R. A. Kahler, et al. (2004). "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases." *Gene* **341**: 19-39.
- White, T. A. and N. K. Lebrasseur (2014). "Myostatin and Sarcopenia: Opportunities and Challenges - A Mini-Review." *Gerontology*.
- WHO, W. H. O. (2002). Keep fit for life: Meeting the nutritional needs of older persons. Geneva, Switzerland, WHO and Tufts University School of Nutrition Science and Policy.
- Wicherts, I. S., N. M. van Schoor, et al. (2007). "Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(6): 2058-2065.
- Wiik, A., M. Ekman, et al. (2009). "Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue." *Histochem Cell Biol* **131**(2): 181-189.
- Wiik, A., M. Ekman, et al. (2005). "Oestrogen receptor beta is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue." *Histochem Cell Biol* **124**(2): 161-165.
- Wiik, A., B. Glenmark, et al. (2003). "Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level." *Acta Physiol Scand* **179**(4): 381-387.
- Willett, W. C., F. Sacks, et al. (1995). "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating." *Am J Clin Nutr* **61**(6 Suppl): 1402S-1406S.
- Williamson, D., P. Gallagher, et al. (2003). "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle." *J Physiol* **547**(Pt 3): 977-987.
- Williamson, D. L., S. R. Kimball, et al. (2005). "Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**(1): E95-104.
- Wishart, J. M., F. Scopacasa, et al. (2000). "Effect of perimenopause on calcium absorption: a longitudinal study." *Climacteric* **3**(2): 102-108.
- Witteveen, J. E., A. H. van Lierop, et al. (2012). "Increased circulating levels of FGF23: an adaptive response in primary hyperparathyroidism?" *Eur J Endocrinol* **166**(1): 55-60.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* **242**(4885): 1528-1534.
- Wronski, T. J., M. Cintron, et al. (1988). "Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* **43**(3): 179-183.
- Wu, D., M. B. Schaffler, et al. (2013). "Matrix-dependent adhesion mediates network responses to physiological stimulation of the osteocyte cell process." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(29): 12096-12101.
- Wu, M., H. Liu, et al. (2010). "Acetaminophen improves protein translational signaling in aged skeletal muscle." *Rejuvenation Res* **13**(5): 571-579.
- Yamaguchi, M., Y. L. Lai, et al. (2008). "Oral administration of phytochemical p-hydroxycinnamic acid prevents bone loss in ovariectomized rats." *Mol Cell Biochem* **311**(1-2): 31-36.
- Yang, L., J. Ma, et al. (2012). "Protective role of the vitamin D receptor." *Cell Immunol* **279**(2): 160-166.
- Yap, T. A., M. D. Garrett, et al. (2008). "Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises." *Curr Opin Pharmacol* **8**(4): 393-412.
- Yin, H., F. Price, et al. (2013). "Satellite cells and the muscle stem cell niche." *Physiol Rev* **93**(1): 23-67.
- Yu, F., M. Hedstrom, et al. (2007). "Effects of ageing and gender on contractile properties in human skeletal muscle and single fibres." *Acta Physiol (Oxf)* **190**(3): 229-241.
- Yuzefovych, L., G. Wilson, et al. (2010). "Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(6): E1096-1105.
- Zadik, Z., S. A. Chalew, et al. (1985). "The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals." *J Clin Endocrinol Metab* **60**(3): 513-516.
- Zammit, P. S. (2008). "All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others?" *J Cell Sci* **121**(Pt 18): 2975-2982.
- Zangarelli, A., E. Chanseume, et al. (2006). "Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway." *FASEB J* **20**(14): 2439-2450.
- Zhang, C. (2012). "Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation." *Beijing Da Xue Xue Bao* **44**(5): 659-665.
- Zhang, X., J. Cao, et al. (2009). "Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**(6): 581-586.





- Zhao, C., N. Irie, et al. (2006). "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis." Cell Metab **4**(2): 111-121.
- Zhao, H., X. Li, et al. (2013). "Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus." Br J Nutr: 1-11.
- Zheng, S. X., Y. Vrindts, et al. (1997). "Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis." Maturitas **26**(1): 63-71.
- Zhong, S., D. A. Lowe, et al. (2006). "Effects of hindlimb unweighting and aging on rat semimembranosus muscle and myosin." J Appl Physiol (1985) **101**(3): 873-880.
- Zhou, D., R. S. Strakovsky, et al. (2012). "The skeletal muscle Wnt pathway may modulate insulin resistance and muscle development in a diet-induced obese rat model." Obesity (Silver Spring) **20**(8): 1577-1584.



# Annexe

## Muscle and bone, two interconnected tissues

*Revue soumise au journal Ageing Research Reviews*

Camille Tagliaferri<sup>a,b,c</sup>, Yohann Wittrant<sup>a,b</sup>, Marie-Jeanne Davicco<sup>a,b</sup>, Stéphane Walrand<sup>a,b</sup>,  
Véronique Coxam<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup>Lesieur, 29 quai Aulagnier, 92665 Asnières-sur-Seine cedex (France)

\* Contact : UMR1019 INRA Université d'Auvergne – Unité de Nutrition Humaine - 63122 Saint Genès Champanelle, France – E-mail : [veronique.coxam@clermont.inra.fr](mailto:veronique.coxam@clermont.inra.fr) - Phone +33 (0)4 73 62 46 32

### Abstract

As bones are levers for skeletal muscle to exert forces, both are complementary and essential for locomotion and individual autonomy. In the past decades, the idea of a bone-muscle unit has emerged. Numerous studies have confirmed this hypothesis from *in utero* to aging works. Space flight, bed rest as well as osteoporosis and sarcopenia experimentations have allowed to accumulate considerable evidence. Mechanical loading is a key mechanism linking both tissues with a central promoting role of physical activity. Moreover, the skeletal muscle secretome accounts various molecules that affect bone including insulin-like growth factor-1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (FGF-2), interleukin-6 (IL-6), IL-15, myostatin, osteoglycin (OGN), FAM5C, Tmem119 and osteoactivin. Even though studies on the potential effects of bone on muscle metabolism are sparse, few osteokines have been identified. Prostaglandin E2 (PGE2), and Wnt3a, which are secreted by osteocytes, osteocalcin (OCN) and IGF-1, which are produced by osteoblasts and sclerostin which is secreted by both cell types, might impact skeletal muscle cells. Cartilage and adipose tissue are also likely to participate to this control loop and should not be set aside. Indeed, chondrocytes are known to secrete Dickkopf-1 (DKK-1) and Indian Hedgehog (Ihh) and adipocytes produce leptin, adiponectin and IL-6, which potentially modulate bone and muscle metabolisms. The understanding of this system will enable to define new levers to prevent/treat sarcopenia and osteoporosis at the same time. These strategies might include nutritional interventions and physical exercise.

**Key words:** locomotor system; muscle; bone; crosstalk

### 1. Introduction

Locomotion was defined by the active moving from a place to another (Campbell and Reece, 2004). Friction and gravitation tend to inertia and therefore energy is essential to create the force necessary for locomotion. According to Vandenburg et al. (Vandenburg et al., 1999), “skeletal muscle has evolved as a tissue whose primary function is to move objects against the force of gravity”. The sliding filament theory described the fact that contraction of myofilaments is at the heart of movements (Huxley and Niedergerke, 1954; Huxley and Hanson, 1954). Huxley (Huxley, 1975) then developed a 2 or 3 steps model and Cooke (Cooke, 2004) gathered information on the historical improvement of the muscle contraction model from 1972 to 2004. Muscles act as motors, but also brakes, springs, and struts (Dickinson et al., 2000). Nevertheless, even if muscle contraction is



essential for motion, the skeleton (levers) is needed to exert forces (Campbell and Reece, 2004; Marieb, 1999). Regarding bone a little upstream, arthropods are frequently described as the first land animals (MacNaughton et al., 2002; Schaefer et al., 2010), but the emergence of land life and the diversification of organisms are believed to be partly due to the evolution of the bone skeleton and its hardening by mineralization (Volkman and Baluska, 2006). This is why, in the past decades, the idea of a bone-muscle unit has emerged. Nevertheless, if the primary mechanical function of bones is to provide rigid levers for muscles to pull against, and to remain as light as possible to allow efficient locomotion (Turner, 1998), the mechanisms underlying such a relationship are still poorly understood and most of the biochemical interactions amongst the tissues and cells remain mostly unknown (Abreu et al., 2012). In recent years, a great number of scientific papers considered bone as a target of skeletal muscle secretory pattern but surprisingly, only a few mentioned the potential effects of bone on muscle metabolism. The objective of this review is thus to provide an update on the development of knowledge about the locomotor system.

## **2. Methodology**

Computer-assisted searches of publications and reviews were conducted on PubMed database to identify pertinent papers published until 2014. Database was interrogated with the following keywords: locomotor system / function, musculoskeletal system, bone, skeleton, osteoporosis, cartilage, muscle, skeletal muscle, sarcopenia, osteoblast, osteoclast, osteocyte, myoblast, chondrocyte, metabolism, formation, resorption, loss, atrophy, humoral factor, myokines, myostatin, endocrinology, secretory organ, bed rest, space flight / travel, mechanosensation, mechanical loading. Moreover, relevant references mentioned in the previously identified papers were analyzed as well.

## **3. Is there a link between muscle and bone?**

Even if Rauch et al. (Rauch et al., 2004) did not exclude that muscle and bone quality could be independently determined by genetic mechanisms (they still refer to the ‘muscle-bone unit’ in their publication), most of the available data provide evidence that both tissues closely interact. Phenotypically, this was evidenced by the fact that total body bone mineral content (BMC) and lean body mass are found to be linearly associated throughout life. This was the case in the study carried out on 1450 persons from 2 to 87 years by Ferretti et al. (Ferretti et al., 1998). In the same way, in the Finnish Twin Cohort Study, lean mass was a better predictor of whole body bone mineral density (BMD) than fat mass ( $p < 0.01$ ) (Bogal et al., 2011). In addition, a clinical study performed in boys and girls during pubertal development showed that the increase in bone strength was preceded by the increase in muscle strength (Rauch et al., 2004). Jackowski et al. (Jackowski et al., 2013) have shown that lean tissue mass accrual impacts adult bone strength.

Preclinical data strengthen the lessons from such clinical trials. Muscle bone crosstalk appears to manifest even before birth in mammals. Long bone shape and the joint is dependent on muscle contraction. In the absence of mechanical loads, the stereotypical circumferential outline of each bone is lost, leading to the development of mechanically inferior bones (Bren-Mattison et al., 2011; Sharir et al., 2011). Indeed, *MyoD*<sup>-/-</sup>/*Myf5*<sup>-/-</sup> (dd/ff) mice lack skeletal muscle, so they develop without any active movement *in utero* and die soon after birth. In the fetuses, long bones were found to be less mineralized and had altered morphological features. They also presented many more osteoclasts in the newly laid bone (Gomez et al., 2007). In a study were mice limb muscle were removed and replaced by implants of either minced skeletal muscle, nonlimb skeletal muscle, cardiac muscle, liver or nothing. Nodules of cartilage and bone were only induced by the three first ones (Zacks and Sheff, 1982). Finally, fracture healing was impaired by excision of a large muscle segment, while the diffusion of high molecular weight molecule from muscle appeared to enhance bone synthesis (Kaufman et al., 2008; Utvag et al., 2003). Liu et al. (Liu et al., 2010) reviewed the potential role of muscle in bone repair and suggested that osteo-inducible cellular populations from muscle may directly be implicated in bone formation and healing.

## **4. Understanding the relationship between muscle and bone**

### **4.1. Physiological observations**

The action of muscle on the bone adaptive response is well recognized and has been modeled in the Wolff’s law and Frost’s mechanostat (Frost, 1987, 2003; Frost and Schonau, 2000; Li et al., 2012;



Woo et al., 1981). According to those theories, mechanical loading is the most important determinant of the bone strength. There is existing preclinical and clinical evidence to show that low magnitude mechanical signals are anabolic to both bone and muscle (Chan et al., 2012; Muir et al., 2011) and this is why physical activities are known to impact both muscle and bone metabolisms, the final effect being activity dependent. Indeed, in an evaluation of the impact of different sports on BMD, the sedentary controls had the lowest bone density values which underlines the positive effect of sports on BMD (Egan et al., 2006). Comparison of football, running and controls showed that football enhances both BMD and muscle function after 16 months training (Krustrup et al., 2010). In the study carried out by Seabra et al. (Seabra et al., 2012) in 117 soccer players and 34 control subjects, at all body sites, muscle strength of knee extensors was associated with BMD. In a study performed in 7 to 9 year-old swimmers, gymnasts and controls, the authors also concluded that bone loading activities may lead to increased bone density among young girls (Cassell et al., 1996), the increase in BMD per unit increase in body weight being more among gymnasts than among swimmers and controls, while fat mass, percent body fat, and lean mass were less in gymnasts compared with swimmers and controls (all  $P < 0.05$ ). In a similar kind of trial, conducted in older women (18 to 24 years old) by Emslander et al. (Emslander et al., 1998), total body and femoral neck BMD were significantly higher in the study group that performed weight-bearing exercises than in control subjects. Swimming exercise had no effect on BMD, even though it could significantly improve shoulder, back, and grip muscle strength. Consistent with those data, in the Duncan's investigation, adolescent female runners had higher total body, femoral neck and leg BMD than swimmers (Duncan et al., 2002). A comparison of different weight bearing sports showed that BMD is consistent with the specificity of the stimulus (Heinonen et al., 1993). The same authors concluded from another study that "training including high strain rates in versatile movements and high peak forces is more effective in bone formation than training with a large number of low-force repetitions" (Heinonen et al., 1995). Actually, an increase in muscle mass impacts the interface of the 2 organs and stimulates local bone growth by stretching collagen fibers and periosteum (Kaji, 2013). Targeting more specifically the impact of exercise on muscle, resistance and endurance training are known to induce distinct muscular adaptations (Tanaka and Swensen, 1998). Billeter et al. (Billeter and Hoppeler, 2003) demonstrated that extreme fiber type distributions was different in a 50 meter crawl swimmer (about 80% type II (fast-twitch) fibers in his *vastus lateralis* muscle) and in a professional cyclist who has about 80% type I (slow-twitch) fibers. In the same way, in a study based on strength training using a one leg model during 10 weeks followed by 12 weeks detraining in 6 men, muscle force production was shown to be increased in both legs after training and strength performance was decreased after the detraining period, also in both legs. Moreover, cross sectional areas were modified in the training leg: 21 % increase in type IIa and 18% increase in type IIb (18%) fibers after training, and a decrease of 12% in type IIb fibers while detraining (Houston et al., 1983).

To summarize, physical activity can modulate the locomotor system and the negative modifications in hip geometry parameters which were observed in obese adults under restrictive diet, disappeared when they were also subjected to physical exercise (Armamento-Villareal et al., 2012). What is important to notice is that both muscle force as well as muscle size, as surrogates of mechanical loading, correlate with BMD and BMC. Nevertheless, bone is not only subjected to muscle contraction forces but also to gravitational loading (Judex and Carlson, 2009). Even though, according to Robling (Robling, 2009), a convincing body of data suggests that muscle contractions are present, significant, and capable of accounting for most of the adaptive responses, Judex and Carlson (Judex and Carlson, 2009) stated, in their review, that the alternative gravitational loading can have a significant role in determining bone mass and morphology, depending on the specific activity, the location of the bone within the skeleton, and whether the bone is weight-bearing or not. As a matter of fact, bone remodeling appears to be sensitive to both external loads arising from gravitational loading as well to internal loads generated by muscular activity. Indeed, vibrations applied at very low magnitudes may be sensed directly by transmittance of the signal through the skeleton in the absence of muscular activity (Judex and Rubin, 2010). This is why numerous studies on the impact of space flight and bed rest on muscle and bone health emphasize the central role of gravity and therefore mechanical loading. The impact of resistive exercise on both muscle and bone was assessed in the Long Time Bed Rest (LTBR) study, which was concluded by underlining the importance of mechanical stimuli (Rittweger et al., 2005).





#### **4.2. Cellular mechanisms**

In both muscle and bone, sensed mechanical stimuli can be converted to biochemical signals and elicit synthesis or catabolism. Mechanosensation is the first step of mechano-transduction and is followed by the signal reception, transduction and transmission. The complex interconnected network of osteocytes is considered to be the site of signal transduction and transmission to the osteoblasts (Cowin, 2007) as osteocytes are the most mechanosensitive cells (Klein-Nulend et al., 1995). They transduce the loading mechanical signals and release signaling molecules to recruit osteoblasts or osteoclasts (Klein-Nulend et al., 2012a; Klein-Nulend et al., 2012b). Indeed, during hindlimb unloading, introducing exercise in order to elicit a minimum number of high-intensity muscle contractions allowed to suppress unloading-induced increases in sclerostin-positive osteocytes and to restore cortical bone formation rate (Macias et al., 2012). However, osteocytes might not be the only cell responsible for mechanosensation unless 30% osteocytes are sufficient. In fact, transgenic mice lacking 70 to 80% osteocytes subjected to unloading were shown to be resistant to bone loss. Nevertheless, after 14 days of reloading, bone formation rate corrected for bone surface was increased as in the control mice (Tatsumi et al., 2007). Besides, mechanical loading has been demonstrated to induce the expression of predictive markers (bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), alkaline phosphatase (ALP) and type I collagen (Col1)) of the differentiated osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells (Lu et al., 2012). Kamel et al. (Kamel et al., 2010) compared the response of MLO-Y4 osteocytic cells, 2T3 osteoblasts and primary neonatal calvarial cells to pulsatile fluid flow shear stress. MLO-Y4 were more sensitive than 2T3 and primary neonatal calvarial osteoblasts to such a stress,  $\beta$ -catenin nuclear translocation and prostaglandin E2 (PGE2) production being more important.

#### **4.3. Molecular mechanisms**

To better understand the mechanism of mechanosensation, Li et al. (Li et al., 2012) investigated the impact of fluid shear stress on pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. Extracellular-signal-regulated kinase 5 (ERK5), a mitogen-activated protein kinase (MAPK) member, was rapidly phosphorylated and the cytoskeleton underwent reorganization upon this stress. In addition, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway seems to be one of the most important pathway activated by mechanical loading in osteocytes (estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) is involved in such a regulation) (Armstrong et al., 2007; Dallas et al., 2013), this signaling pathway being essential for bone cell viability and function and for skeletal integrity. Indeed, myotube conditioned media can protect osteocytes and osteoblastic cells from dexamethasone induced apoptosis, and this through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway for osteocytes (Jahn et al., 2012). In addition, in  $\beta$ -catenin haploinsufficient mice, deleting a single copy of  $\beta$ -catenin in osteocytes abolishes the anabolic response to loading (Javaheri et al., 2013) and trabecular bone in females was more severely affected. Lee et al. (Lee et al., 2003) also found that bone adaptive response to loading was impaired in the absence of the ER- $\alpha$  isoform. Moreover, mice lacking low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) exhibited impaired response to mechanical loading (Sawakami et al., 2006). However, in primary mouse osteoblasts and UMR-106 osteoblast-like cells, strain activated a cascade independently of Wnt/LRP5, involving insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor (IGF-1R), ER- $\alpha$  and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)-dependent activation of  $\beta$ -catenin (Sunters et al., 2010). IGF-1 is effectively known to be increased in response to load. Raab-Cullen et al. (Raab-Cullen et al., 1994) and Tahimic et al. (Tahimic et al., 2013) proposed a crosstalk between the IGF-1 and integrin signaling pathways.

### **5. Understanding the cross-talk between muscle and bone (Fig. 1)**

#### **5.1. Muscle to bone**

Hamrick proposed that muscle secretion of local growth factors can stimulate bone formation independently of mechanical loading and that both mechanical and biological stimuli function synergistically (Hamrick et al., 2010). Indeed, blood flow to the limb is proportional to muscle mass and ischemia delays fracture healing in mice (Kaji, 2013; Lu et al., 2007), but muscle is not only a vascular supply for bone as fasciocutaneous tissue, a more vascularized system, was less effective in fracture healing than muscle in mice (Harry et al., 2009). In fact, the muscle secretome consists of several hundred secreted peptides and this provides a conceptual basis and a whole new paradigm for understanding how muscles communicate with other organs, including bones. Investigation of the C2C12 cells secretome during muscle differentiation allowed to identify more than 600 proteins,



including growth factors, cytokines and metalloproteinases (Henningsen et al., 2010). In a similar study, 27 secretory proteins with a minimum of two tryptic peptides were identified (Chan et al., 2007). Some of them are involved in extracellular matrix remodeling, cellular proliferation, migration, and signaling. A putative network of proteins involving matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), osteonectin, and cystatin C that all interact with the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling has thus been postulated to contribute toward a functional role in the myogenic differentiation program. Those myokines were defined as “cytokines or other peptides that are produced, expressed and released by muscle fibres” (Pedersen and Febbraio, 2012), even though they are not muscle-specific (Hamrick, 2012). Many of those proteins produced by skeletal muscle are dependent upon contraction; therefore, physical inactivity probably leads to an altered myokine response, which could provide a potential mechanism for the association between sedentary behaviour and many chronic diseases.

### 5.1.1. Growth factors

IGF-1 which positively regulates osteoblast function, is, mainly produced in the liver but expressed in multiple extrahepatic tissues including bone and skeletal muscle (Huang et al., 2007; Ohlsson et al., 2009; Schiaffino and Mammucari, 2011). IGF-1 is known to activate IGF-1R which acts through the PI3K/Akt and the MAPK/ERK pathways (Bikle and Wang, 2011; Tahimic et al., 2013). It has been shown that, IGF-1 is localized to the muscle-bone interface of the mouse forelimb (Hamrick et al., 2010) and even if IGF-1 is expressed locally by osteocytes, some investigations provided evidence that muscle IGF-1 can modulate bone metabolism (Lean et al., 1996; Sheng et al., 2013). Indeed, during disuse muscle atrophy, electroporation and ectopic expression of IGF-I and/or Sonic hedgehog (Shh) within the *gastrocnemius/soleus* muscle, not only attenuated the decrease of muscle fiber area, muscle mass, and muscle mass density that normally occurs but inhibited parameters of osteopenia within the tibia and fibula associated with hindlimb unloading as well (Alzghoul et al., 2004). Moreover, localized overexpression of human IGF-1 in mice muscles caused muscle mass increase and cortical bone parameters enhancement (Banu et al., 2003). Female knockout (KO) hepatocyte-specific IGF-1 transgenic (KO-HIT) mice, which exclusively express IGF-1 in the liver, showed lower trabecular bone volume per total volume (%BV/TV) than controls ( $p=0,09$ ), and decreased trabecular number (Tb.N) in the distal femoral metaphysis (Elis et al., 2011). This can be caused by the lack of bone IGF-1 but possibly by the lack of muscle IGF-1 as well. IGF binding protein 5 (IGFBP-5) can stimulate osteoblast activity and therefore enhance bone formation in OVX mice, at least in part, via an IGF-1-independent mechanism (Andress, 2001; Coenen Schimke et al., 1999; Hoeflich et al., 2007; Kaji, 2013; Miyakoshi et al., 2001). As a matter of fact, 6 IGFBP regulate the interaction of IGF-1 with its receptor (Ohlsson et al., 2009; Rajaram et al., 1997). IGFBP-2 binds to IGFs and prevents its fixation to IGF receptors (Rajaram et al., 1997). Relative appendicular skeletal muscle mass (ASM) (which is associated with a number of bone parameters in women like trabecular volumetric bone mineral density at the femoral neck and spine) has been shown to be significantly inversely related to serum IGFBP-2 levels (Lebrasseur et al., 2012). Indeed, high IGFBP-2 circulating concentrations were associated with lower BMD in men and women (Amin et al., 2007).

Besides, basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF-2) and its receptor are to be localized to the muscle-bone interface and periosteum of the mouse forelimb, respectively (Hamrick et al., 2010). It was shown that mechanically induced, sarcolemma wound-mediated FGF-2 release is an important autocrine mechanism for transducing the stimulus of mechanical load into a skeletal muscle growth response (Abraham et al., 1986; Clarke and Feedback, 1996; Clarke et al., 1993). Even if further investigations are needed, FGF-2 could be an osteoinducer factor released by muscle. Intraosseous or intravenous injections of FGF-2 stimulated bone formation in ovariectomized rats (Liang et al., 1999; Nakamura et al., 1998). BMP-2 combined with low doses of FGF-2 (16, 80 and 400 ng) increased osteoinductive activity while high doses of FGF-2 (2, 10 and 50  $\mu$ g) were inhibitors (Fujimura et al., 2002). This was consistent with the data published by Nakamura et al. (Nakamura et al., 2005) showing that *in vitro*, low doses of FGF-2 (0,1 and 1 ng/mL), when pooled with BMP-2, increased the expression of BMP receptor (BMPR)-1B, phosphorylated Smad1, Noggin, and osteocalcin (OCN), contrary to high doses (10 and 100 ng/mL). Smad6 and Runt-related transcription factor 2 (Runx2/cbfa1) mRNA increased dose dependently as well and proliferation was enhanced with high doses of this growth factor.



### 5.1.2. Cytokines

The production and secretion of interleukin-6 (IL-6) by skeletal muscle has been reviewed by Pedersen and Febbraio (Pedersen and Febbraio, 2012) and it was considered by Hamrick (Hamrick, 2012) as a myokine involved in the muscle-bone crosstalk. In a recent clinical study, in which 38 postmenopausal women with osteopenia were given bisphosphonate and calcitriol, baseline serum IL-6 was negatively correlated to both handgrip strength and lumbar BMD. Even if both factors were no more correlated to IL-6 level after the 6-months treatment, all 3 parameters evolved significantly: IL-6 decreased whereas lumbar BMD and handgrip strength increased (Park et al., 2013). Another member of the IL-6 family cytokine, leukemia inhibitory factor (LIF) could also be a good myokine candidate as it is expressed by different cells including myoblast and osteoblast (Malaval and Aubin, 2001) and because its secretion by myoblasts was enhanced by exercise, which could impact periosteum osteoblasts (Broholm et al., 2008; Sims and Johnson, 2012).

The cytokine IL-15 isoform with a 48 amino acids signal peptide is mostly expressed by skeletal muscle and functions as a secretory signal peptide, the shorter 21 amino acids signal isoform being preferentially expressed in tissues such as testis and thymus (Grabstein et al., 1994; Tagaya et al., 1997). Transgenic mice with higher circulating levels of IL-15 were characterized by a higher BMC (Quinn et al., 2009).

### 5.1.3. Myostatin

Growth differentiation factor-8 (GDF-8) or myostatin, a member of TGF- $\beta$  superfamily, has been identified specifically in developing and adult skeletal muscle (McPherron et al., 1997), where it is a negative regulator of growth as GDF-8 null mice display bigger muscle, and myostatin overexpression is responsible for muscle loss (Giannesini et al., 2013; Zimmers et al., 2002). Myostatin not only impacts muscle mass but also muscle performance (Giannesini et al., 2013). Moreover, knocking out myostatin significantly increased femoral and lumbar spine BMD in mice (Hamrick, 2003; Montgomery et al., 2005). Ten years ago, Zimmers et al. (Zimmers et al., 2002) hypothesized that myostatin had a role in the preservation of appropriate tissue mass. In skeletal muscle, myostatin binds to activin receptor type IIB (ActRIIB) which leads to the regulation of the myogenic genes (Huang et al., 2011; Langley et al., 2002). A treatment with the ActRIIB-Fc fusion protein, which binds myostatin, caused a dose-dependent augmentation in N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) serum levels in mice and BMD increase (Chiu et al., 2013). Myostatin, in muscle cells, can activate the ERK1/2 cascade, modulate the Wnt pathways (repression of Wnt4 for example) and stimulate the secretion of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Steelman et al., 2006; Yang et al., 2006; Zhu et al., 2007). Moreover, *in vitro*, myostatin expression is under the control of TGF- $\beta$ 1 and IGF-1, through the activation of calcium-dependent transcription factors such as nuclear factor of activated T cells (NFAT) and cAMP response element binding protein (CREB) (Valdes et al., 2013; Zhu et al., 2007; Zuloaga et al., 2013). As these signaling pathways can be activated in bone cells, these results seem promising for the inter-regulation of the bone by muscle. However, according to Arounleut et al. (Arounleut et al., 2013), the role of myostatin on mature and intact bone could be limited. Indeed, the impact on bone accretion can be elicited via muscle, and to date whether myostatin action on bone is direct or indirect remains unclear (Buehring and Binkley, 2013). To our knowledge, nothing has been published on the effect of myostatin on cultured osteoblasts or osteoclasts. Myostatin impact seems limited to the control of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells during mechanical stimulation or fracture healing (Cho et al., 2002; Elkasrawy et al., 2012; Hamrick et al., 2007). Myostatin mRNA expression in mice tibiae is undetectable before fracture, and highly expressed the day after (Cho et al., 2002) and although myostatin deficiency increases muscle mass and bone strength, it does not prevent muscle and bone catabolism with unloading (Hamrick et al., 2007).

### 5.1.4. Other molecules

Using fibrodysplasia ossificans progressiva disorder in which muscle tissue is gradually replaced by bone to search for muscle-derived bone anabolic factors, Tanaka et al. identified osteoglycin (OGN), a protein produced in myoblastic cells which enhances bone formation parameters in osteoblasts, FAM5C, whose role in bone remains unknown and Tmem119, whose expression increases during osteoblast differentiation (Kaji, 2013; Tanaka et al., 2012a; Tanaka et al., 2012b; Tanaka et al., 2012c).



Stable overexpression of OGN in MC3T3-E1 cells was shown to suppress the expression of Runx2 and Osterix mRNA and stimulate that of ALP, Col1, and OCN, the levels of Col1 and  $\beta$ -catenin proteins, mineralization, as well as Smad3/4-responsive transcriptional activity. The enhanced levels of Col1 mRNA by OGN in osteoblasts were suggested to involve ERK1/2 (Tanaka et al., 2012b). In the same way, conditioned medium from C2C12 cells overexpressing FAM5C was associated with increased levels of osterix, ALP and OCN mRNA in MC3T3-E1 cells, while suppressed-FAM5C expression inhibited those parameters (Tanaka et al., 2012c). In Tmem119-overexpressing C2C12 cells, protein levels for osteoblast differentiation markers such as Runx2, Osterix, and ALP, as well as ALP and OCN mRNA were elevated and mineralization was induced as compared to what was observed in empty vector-transfected cells (Tanaka et al., 2012a). Moreover, Tmem119 was shown to stimulate the differentiation of myoblasts into osteoblasts through the induction of BMP-2 downstream of Runx2 and Osterix, among other pathways, and to suppress the differentiation of myoblasts into myotubes.

These experiments allowed the discovery of more molecules such as osteoactivin, which stimulates bone remodeling (Sondag et al., 2013; Tanaka et al., 2012a). Osteoactivin is upregulated under unloading conditions in muscle and also expressed in osteoclasts and osteoblasts (Abdelmagid et al., 2008; Nikawa et al., 2004; Sheng et al., 2008) and its expression is regulated by BMP-2 through the Smad-1 signaling pathway (Abdelmagid et al., 2007). It enhanced osteoblast ALP activity and mineralization and OCN production and calcium deposition were inhibited by anti-osteoactivin antibodies (Selim et al., 2003). An important fact is that osteoactivin overexpression in C2C12 cells downregulated MyoD and myogenin protein levels and upregulated ALP protein level and activity, as well as Runx2 protein synthesis. This transdifferentiation of myoblasts into osteoblasts took place under the control of focal adhesion kinase (FAK) signaling (Sondag et al., 2013). Finally, other molecules have been identified as good candidates: osteonectin, FGF-21, follistatin like-1, MMP-2, myocytes enhancer factor 2C (MEF2C) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), BMP-1, osteocrin (also named musclin) but too little information is available for the moment.

## **5.2. Bone to muscle**

The lacunocanicular system is connected to the vascular system so bone-secreted molecules can be released into the bloodstream (Ciani et al., 2009; Dallas et al., 2013). Both osteoblasts and osteocytes were shown to secrete osteokines.

### *5.2.1. Osteocyte-secreted molecules*

MLOY4 osteocyte-like cell conditioned medium, which was shown to contain 3 osteocyte-secreted factors, PGE2, sclerostin and monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), was able to accelerate myogenic differentiation of C2C12 myoblasts and this was linked to significant modifications in intracellular calcium homeostasis (Mo et al., 2012). PGE2 can activate the  $\beta$ -catenin pathway via the stimulation of PI3K in osteocyte in response to fluid shear stress (Kamel et al., 2010; Kitase et al., 2010) and it has been shown that inhibiting PI3K in skeletal muscle derived stem cells can increase the expression of Runx2 and Osterix and enhance mineralization, even if ALP activity is decreased (Payne et al., 2010). Moreover, MLO-Y4 cells exposed to mechanical loading produced various factors, such as IGF-I, vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF), which may regulate muscle growth (Juffer et al., 2012; Kaji, 2013).

Besides, pulsating fluid flow upregulated gene expression of Wnt3a, c-jun, connexin 43, and CD44 in MLO-Y4 osteocytes and downregulated gene expression of Wnt5a and c-jun in MC3T3-E1 osteoblasts. This was suppressed by the Wnt antagonist secreted frizzled related sequence protein 4 (sFRP4), suggesting that loading activates the Wnt canonical pathway through functional Wnt production, but also by the nitric oxide (NO) inhibitor L-NAME (Santos et al., 2009). In C2C12 cells, Wnt3a was found to enhance the expression of myoD and myogenin and the size of the myotubes and therefore to promote myogenesis (Romero-Suarez et al., 2011). Sclerostin which is a suppressor of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signal which is mainly produced by osteocytes but also by osteoblasts and impacts osteoblastic differentiation (Semenov et al., 2005; van Bezooijen et al., 2007; Winkler et al., 2003) has thus been identified as a factor which could link bone to muscle during exercise (Kaji,





2013), even if Mo (Mo et al., 2012) showed that it did not impact C2C12 myogenesis. As a matter of fact, during weight loss in obese adults, the increase in sclerostin levels which occurs in volunteers subjected only to diet was prevented by adding exercise (Armamento-Villareal et al., 2012). In rats, hindlimb unloading increased sclerostin-positive osteocytes. Adding resistance training led to diminish the number of these cells but not to the control level (Macias et al., 2012).

### 5.2.2. Osteoblast-derived molecules

OCN is an osteoblast-derived hormone, which has a unique known receptor: G protein-coupled receptor (GPCR). GPRC6a mechanisms are inhibited by the embryonic stem cell phosphatase (Esp) tyrosine phosphatase (Karsenty and Oury, 2012; Oury et al., 2011). An indirect effect of OCN on muscle is that it improves sensitivity to insulin (Lee et al., 2007). Moreover, intermittent injections of OCN conducted to the increase of mitochondria number and area in mice, which is said to increase energy expenditure (Ferron et al., 2012). Karsenty and co-workers presented new results on the impact of OCN on muscle during the 2012 ASBMR meeting (Abreu et al., 2012). Using *ocn*<sup>-/-</sup>, *esp*<sup>-/-</sup> and *gprc6a*<sup>-/-</sup> female mice, they provided evidence of a modulation of muscle mass, function and regeneration by OCN. Indeed, *ocn*<sup>-/-</sup> and *gprc6a*<sup>-/-</sup> mice had a reduced muscle mass, whereas *esp*<sup>-/-</sup> mice had increased muscle mass. To test muscle function, running experiments were conducted, and running distance, maximum speed and time on treadmill were all reduced in OCN null mice. Moreover, a specific osteoblast specific knockout of OCN also exhibited reduced muscle function. Finally IGF-1 can be produced by bone cells (osteoblasts as well as osteocytes) and it is well known for its activation of the PI3K/Akt pathway in skeletal muscle (Schiaffino and Mammucari, 2011). To identify the specific role of bone IGF-1 relative to systemic IGF-1, IGF-1 was deleted in cells expressing collagen type 1 $\alpha$ 2. This led to a reduction of 70% in bone IGF-1 whereas serum levels were identical to that of controls (Govoni et al., 2007). A fivefold decrease in IGF-I expression was also observed in muscle even if Col1 $\alpha$ 1 and iCre expression were much lower compared to bone. In osteocyte-IGF-1-conditional KO mice, IGF-1 mRNA expression was significantly reduced by 65% in bones and by 59% in muscles as well (Sheng et al., 2013), although the reduction in muscle was not significant, and no differences in muscle fiber morphology, size or number of nuclei was observed. Tahimic et al. (Tahimic et al., 2013), in a recent review, also concluded that muscle and bone share similar IGF-1 responsive gene networks as osteoprogenitor *igf-1r*<sup>(*Osterix-Cre*)</sup> and cartilage (*Cart<sup>+</sup>igf-1r*) conditional KO displayed both impaired muscles and skeleton.

## 6. Cartilage, the third agent

Bone and muscle form a unit but are also part of an organism. Cartilage is a good candidate for a larger system as it shares the mesenchymal stem cell origin with bone and muscle and is located in close proximity, which allows a possible paracrine communication.

Cartilage has a central role in locomotion. In each limb, joints allow the flexibility necessary for body motion and locomotion (Campbell and Reece, 2004). This is why Rittweger (Rittweger, 2008) suggested that joint-size is the 'third agent' of the bone-muscle unit and proposed appropriate peak joint forces and adapted size of the joint as leads to pursue research. As sarcopenia and osteoarthritis share common pathological pathways, treating the 2 diseases at the same time is promising (De Ceuninck et al., 2013). Moreover, Wnt, BMP, TGF- $\beta$  and MAPK signaling pathways are thought to participate in the bone-cartilage crosstalk (Hopwood et al., 2007; Sharma et al., 2013).

Chondrocytes cultured together with C2C12 muscle cells as well as in muscle cell-conditioned medium had enhanced cartilage matrix production (Cairns et al., 2010a). Moreover, these chondrocytes were able to resist to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ -induced cartilage damage (Cairns et al., 2010b). Therefore, such data allowed to think that muscle secrete molecules which play a role in chondrocytes metabolism.

As myostatin is expressed directly after fracture, the impact of this molecule on the recruitment of mesenchymal cells to promote chondrogenesis in early healing was proposed (Cho et al., 2002). Its receptor (ActRIIB) is expressed in cultured chondrocytes (Funaba et al., 2001). Myostatin treatment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced a decrease in chondrogenic differentiation markers, while myostatin deficiency significantly increased the proliferation of epiphyseal growth plate chondrocytes by 35% (Elkasrawy et al., 2011). Dickkopf-1 (DKK-1), which is a regulatory molecule of the Wnt pathway, secreted, among other sources, by chondrocytes (Fedi et al., 1999; Oh



et al., 2012), has been shown to contribute to bone loss. Anti-DKK-1 antibody were able to induce a dose-dependent decrease in the number of osteoclasts (Diarra et al., 2007). A third example is the Indian Hedgehog (Ihh) which is expressed by chondrocytes during myogenesis (Bren-Mattison et al., 2011; Vortkamp et al., 1996). *Ihh*<sup>-/-</sup> mice exhibit an impaired osteoblast development in endochondral bones and reduced muscle mass, independently of bone length (Bren-Mattison et al., 2011; St-Jacques et al., 1999).

### **7. The adipose tissue is also involved in the control loop**

The key role of adipose tissue on both skeletal muscle and bone cannot be ignored. Indeed, adipocytes, myoblasts and osteoblasts derive from the common mesenchymal stem cells (Migliaccio et al., 2011), adipose tissue is an endocrine tissue, an energy reservoir (Migliaccio et al., 2011) and produces aromatase, responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens (Perel and Killinger, 1979). This is why the role of fat in muscle-bone interactions is one of the main questions raised in a recent ASBMR workshop (Bonewald et al., 2013).

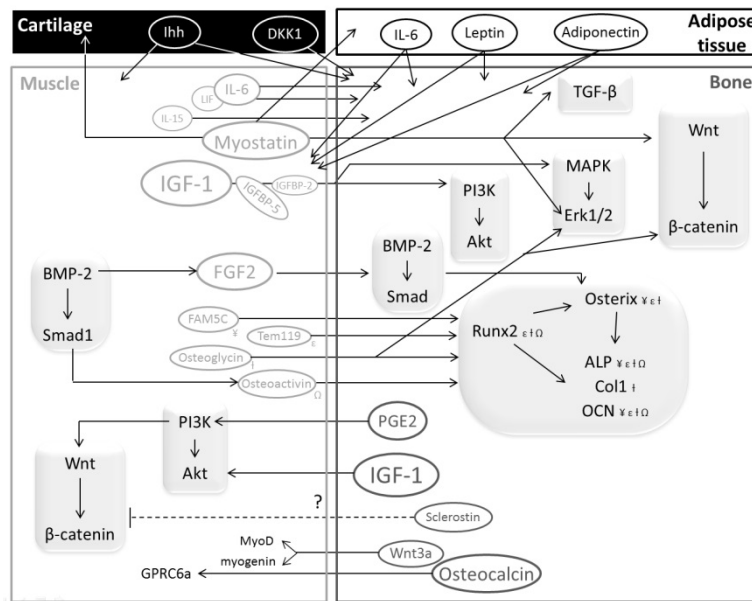
Leptin, which suppresses appetite, was the first adipokine identified (Friedman and Halaas, 1998; Zhang et al., 1994). Its impact on bone is still controversial, having a direct stimulatory effect on bone and an indirect opposite effect via the central nervous system (for review see (Naot and Cornish, 2014)). In skeletal muscle, leptin is capable of enhancing energy consumption through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (Pedersen and Febbraio, 2008; Trayhurn et al., 2011). Numerous studies have been conducted on the impact of adiponectin and bone as well and the majority of reports have indicated a negative effect (Holecki and Wiecek, 2010; Naot and Cornish, 2014). Adiponectin has a metabolic protective effect on skeletal muscle, as it promotes glucose and fatty acids homeostasis (Liu and Sweeney, 2014) while adiponectin deficiency leads to insulin resistance (Karpe, 2013). IL-6, which is produced by skeletal muscle as mentioned above, is also secreted by adipose tissue (Migliaccio et al., 2011). Therefore, it has been qualified as an adipomyokine in a recent review (Trayhurn et al., 2011). Acute increase of IL-6 levels has a positive effect on skeletal muscle cell insulin sensitivity (Weigert et al., 2005). However, chronically increased IL-6 levels are detrimental as they are associated with insulin resistance (Trayhurn et al., 2011). Moreover, IL-6 is widely recognized as a bone resorption factor (Holecki and Wiecek, 2010).

Myostatin appears to be a key factor in the integrated physiology of muscle, fat, and bone, as well. It is unclear whether it directly affects fat and bone, or indirectly via muscle, nevertheless, in parallel of increasing skeletal muscle mass and bone formation, inhibition of myostatin also decreases fat mass (Buehring and Binkley, 2013). Moreover, increased myostatin levels have been found in obesity and levels decrease after weight loss from caloric restriction.

Finally, the potential role of visfatin and resistin has also been discussed by Holecki and Wiecek (Holecki and Wiecek, 2010), Scotece et al. (Scotece et al., 2014) and Naot and Cornish (Naot and Cornish, 2014), but the authors concluded that more studies are needed before final conclusions can be drawn.

All those data explain why there is growing evidence for a negative impact of excess adipose tissue on bone metabolism, with a preferential differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes at the expense of osteoblasts and an enhanced production of pro-inflammatory cytokines (Cao, 2011). Identically, excess of adipose tissue alters skeletal muscle metabolism by increasing insulin resistance and lipotoxicity (Karpe et al., 2011).





**Figure 1: Molecular interactions between bone, skeletal muscle, cartilage and adipose tissue.**

The secreted molecules from muscle (light gray), bone (dark gray), cartilage (white) and adipose tissue (black) are represented by circles. The arrows outline regulation pathways. ¥, ε, † and Ω symbolize the effect of FAM5C, Tmem119, osteoglycin and osteoactivin respectively on the expression of Runx2, osterix, ALP, Col1 and OCN. Akt, protein kinase B; ALP, alkaline phosphatase; BMP-2, bone morphogenetic protein-2; Col1, type I collagen; DKK-1, Dickkopf-1; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinase 1/2; ERK5, extracellular-signal-regulated kinase 5; FGF-2, basic fibroblast growth factor; GPRC6a, G protein-coupled receptor 6a; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IGFBP-2, IGF binding protein 2; IGFBP-5, IGF binding protein 5; Ihh, Indian Hedgehog; IL-6, interleukin-6; IL-15, interleukin-15; LIF, leukemia inhibitory factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OCN, osteocalcin; PGE2, Prostaglandin E2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Runx2, Runt-related transcription factor 2; TGF-β, transforming growth factor β.

## 8. Lessons to be learned from specific physiological situations

### 8.1. Ageing

Ageing is associated with a decline in muscle and bone functions leading to sarcopenia and osteoporosis, respectively. Sarcopenia is defined by the age-related alteration of muscle mass and function (Bijlsma et al., 2012; Boirie, 2009; Dardevet et al., 2012), while osteoporosis is “a systemic skeletal disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue with a consequent increase in bone fragility and susceptibility to fracture”(Bijlsma et al., 2012; Conference report, 1993; Kanis et al., 2008; Klibanski et al., 2001). Recent studies have reinforced the connection between these 2 chronic age-related pathologies which share common dysregulation patterns: decline in serum estrogen, androgen, IGF-1, increased level of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF-α) and possible common genes modifications (reduced Akt levels have been related to both Type II muscle fiber atrophy and osteoporosis (Joseph et al., 2005; Karasik, 2011; Terracciano et al., 2013). Indeed, in the Kuopio Osteoporosis Risk Factor and Prevention study, the Osteoporosis Fracture Prevention study and the STRAMBO study, grip strength was shown to be an indicator of osteoporosis (Rikkonen et al., 2012; Sjoblom et al., 2013; Szulc et al., 2013). Moreover, in another clinical study involving 1397 Korean men, sarcopenia was associated with lower T-scores at the lumbar spine, total femur, and femur neck and importantly, with impaired quality of life (Go et al., 2013). This is why a new tool has even been defined under the term dysmobility syndrome to diagnosis both pathologies (Binkley et al., 2013). Interestingly, it has recently been shown that ovariectomy, a classical model of menopause, alters both bone and muscle metabolisms in rats (Tagliaferri et al., 2014). Ovarian ablation was associated with decreased bone mineral density and impaired microarchitecture. In skeletal muscle, a reduction in the protein synthesis rate associated with a decline in MuRF1 gene expression, a ubiquitin ligase involved in protein degradation, were observed, suggesting a reduced muscle protein turnover.

As a matter of fact, an important consequence of locomotor disability is falls and fractures. Falls are generally due to multiple factors: vitamin D deficiency, impaired cognition, strength, balance and gait, multiple medical prescriptions, and environmental hazards (Fraix, 2012; Tinetti, 2003). Fall-related fractures can be caused by the reduction in muscle mass and strength or by osteoporosis itself as



usually when BMD is reduced, relatively higher mechanical load is exerted on trabecular bone in osteopenic and osteoporotic subjects (Boirie, 2009; Bukhari, 2009; Kanis, 1994; Kanis et al., 1994; Ma et al., 2013; Oden et al., 2012). Falls and fractures lead to the reduction of independence and an impaired quality of life (Tappenden et al., 2012).

### **8.2. Nutrition facts**

Sarcopenia and osteoporosis are often associated with malnutrition which leads to a vicious circle promoting the frailty situation. According to Agarwal et al. (Agarwal et al., 2013), 23 to 60% of hospitalized elderly patients are malnourished. Besides, based on a Spanish study, 25.4% of community-dwelling older adults are at risk of malnutrition, while 4.3 % are undernourished (Cuervo et al., 2009). In Australia, in such a community, 38.4% are at risk of undernutrition, and 4.8% malnourished (Visvanathan et al., 2003).

If the primary role of diet is to provide sufficient nutrients to meet the metabolic requirements of an individual, there is an emerging rationale to support the hypothesis that, by modulating specific target functions in the body, it can help to achieve optimal health. Regarding osteoporosis prevention, the main goal is to provide enough bioavailable amounts of constitutive elements such as proteins and calcium (Coxam et al., 2008; Nieves, 2013). The nutritional strategy for preventing sarcopenia is based on protein intakes (Bauer et al., 2013; Deutz et al., 2014; Walrand et al., 2011). Besides, because calcium is critical to achieve optimal peak bone mass and modulate the rate of bone loss associated with ageing and because it is the most likely to be inadequate in terms of dietary intake, every strategy targeting an improvement of bioavailable calcium is very interesting. Indeed, if it is inadequate during growth, the full genetic program for skeletal mass cannot be achieved, then, if calcium intake is not enough to offset obligatory losses, acquired skeletal mass cannot be maintained (Heaney, 2003) given the small metabolic pool of calcium, circulating concentration is mainly maintained at the expense of skeletal compartment, i.e. from an increased bone resorption (Cashman, 2002). In fact, given its low absorbability, the prospect of finding substances that might improve its bioavailability has enticed many scientists. Vitamin D can help to optimize its absorption (Klibanski et al., 2001; Lee et al., 2013). This is why, many metaanalysis showed that vitamin D in addition to calcium can reduce the risk of hip fracture (Bischoff-Ferrari et al., 2012; Boonen et al., 2007). Interestingly, those nutrients, especially proteins and more recently vitamin D, have been acknowledged to be essential for muscles as well. Protein intake is associated with less lean mass loss in people aged from aged 70 to 79 years old (Houston et al., 2008), while protein quantity but also quality can prevent muscle loss progression (Boirie, 2009; Gryson et al., 2013). Importantly, calcium absorption was enhanced when dietary protein increases from 10% to 20% of energy in healthy postmenopausal women (Hunt et al., 2009), and calcium seems essential to the beneficial effect of protein on bone health (Mangano et al., 2014). As far as vitamin D is concerned, better lower-extremity function is associated with 25-hydroxyvitamin D concentrations between 40 and 94 nmol/L whereas, physical performance being impaired below 50 nmol/L (Bischoff-Ferrari et al., 2004; Wicherts et al., 2007). At least 60 nmol/L has to be achieved in serum to reduce the risk of falling (Bischoff-Ferrari et al., 2009). *In vitro*, 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has been shown to enhance mineralization in osteoblasts and to promote myogenic differentiation (Garcia et al., 2011; van Driel et al., 2006). Finally, leaving those well studied nutrients aside, the concept of a healthy diet providing adequate amounts of other constituents (including various potent micronutrients or specific fatty acids) deserves mention for both targets (Barillaro et al., 2013; Boirie et al., 2014; Coxam et al., 2008; Cruz-Jentoft et al., 2014; Nieves, 2013; Puel et al., 2007; Wauquier et al., 2009; Welch, 2014).

### **8.3. Space flight and weightlessness**

Trappe (Trappe, 2009) made a connection between bone and muscle loss caused by microgravity over several months and by ageing over decades. The most common example of alteration is the atrophy of muscle and the loss of bone during space flight (LeBlanc et al., 2000).

In 9 crewmembers with an exercise prescription, both *soleus* and *gastrocnemius* volume decreased ( $-15 \pm 2\%$  and  $-10 \pm 2\%$ , respectively ; peak power being 32% lower ( $P < 0.05$ )), after 6 months aboard the International Space Station. Furthermore, there was a 12-17% shift in myosin heavy chain phenotype of the *gastrocnemius* and *soleus* with a slow-to-fast fiber type transition (Trappe et al., 2009). In the same way, after a 5 (n=3) or 11 (n=5) days space travel, mean cross-sectional fiber areas





(measured on *vastus lateralis* biopsies) were 11 to 36% smaller and there were 6 to 8% fewer type I fibers (Edgerton et al., 1995). Similar results were observed in human *soleus* biopsies (Widrick et al., 1999). The impacts of microgravity on muscle: atrophy and decline in peak force have been summarized in Fitts' review (Fitts et al., 2001). *In vitro* embryonic avian muscle cells protein synthesis rate decreased, without any impairment of protein degradation, after 9 to 10 days aboard the Space Transportation System (Vandenburgh et al., 1999). This was speculated to be exacerbated *in vivo* as altered circulating levels of factors such as growth hormone, glucocorticoids, or anabolic steroids, were likely to also occur in such a situation.

With regards to the skeleton, space travel also slowed down bone formation (Doty, 2004; Lang et al., 2006; Wronski et al., 1987), while histological indexes of bone resorption were normal in rats, even though biochemical markers of resorption were elevated during space flight (McCarthy, 2011; Wronski et al., 1987). An *in vitro* study carried out in osteoclasts from murine bone marrow confirmed that bone resorbing cells and their precursors are direct targets for microgravity (Tamma et al., 2009). Moreover, mechanisms of osteoclastogenesis, which was doubled for osteoclasts subjected to modeled gravity (mXg) in rotary cell culture system for 24 h compared to normal gravity control (Xg), have been studied (Sambandam et al., 2010). Space travel bone loss (increased resorption coupled with decreased formation) is actually similar to that observed in postmenopausal osteoporotic women (McCarthy, 2011). An important fact is that the severity of bone demineralization and muscle atrophy generally increases with space flight duration (Meck et al., 2009).

Long-term bed rest has similar impacts on the locomotor system and is used to simulate the physiological changes which may occur in the microgravity environment (Alkner and Tesch, 2004; Droppert, 1993). Head-down tilt bed rest is another model, also used as a space flight model (Morgan et al., 2012; Spector et al., 2009; Wang et al., 2012).

Indeed, bed rest decreases muscle force production as well as skeletal muscle volume and muscle cross sectional area (Belavy et al., 2009; Bloomfield, 1997; Stuempfle and Drury, 2007). Skeletal muscle is even impaired at the cellular level: fiber size and diameter are reduced, as is capillarity (Krasnoff and Painter, 1999). In the same way, Ferrando et al. (Ferrando et al., 1995) measured a significant decrease in segmental thigh muscle volume (approximately 3,0%,  $p < 0,05$ ) after 7 days of bed rest. In another experiment conducted by Ferrando et al. (Ferrando et al., 1996), inactivity resulted in a loss of body protein which was predominantly due to a decrease in muscle protein synthesis both at the skeletal muscle and whole body levels. Protein breakdown did not change significantly.

As a matter of fact, bone is also affected by immobilization, its mineral density being reduced (Krasnoff and Painter, 1999). Such loss in bone mass could be explained by removal of the compressive forces on the skeleton (Morgan et al., 2012; Stuempfle and Drury, 2007; Wang et al., 2012). According to the short time bed rest clinical trial conducted on 12 subjects by Morgan et al. (Morgan et al., 2012), a 20% increase in urinary markers of bone resorption was observed ( $P < 0.001$ ). In the same way, in an eight weeks bed rest trial performed on 20 healthy men (Berlin Bed-Rest Study), increase in the bone resorption marker collagen type 1 cross-linked C-telopeptide (CTX) was observed within 3 days (Armbrecht et al., 2010). Consequently, under conditions of disuse, a decline in bone strength is preceded by a decline in muscle mass (Burr, 1997; Lloyd et al., 2013). The coupling between diminished bone mass and muscular strength increases the risk of fractures (Stuempfle and Drury, 2007). Furthermore, Bloomfield (Bloomfield, 1997) pointed out that muscle mass and strength are regained weeks or months before bone mass, which also contributes to the risk of fractures.

Those experimental conditions help to understand the mechanisms underlying those processes of both osteopenia and sarcopenia and to set up new strategies (resistive exercise, electrostimulation, nutrition) to limit astronauts' muscle and bone losses (Armbrecht et al., 2010; Belavy et al., 2009; Brooks et al., 2010; Mayr et al., 1999; Rittweger et al., 2005; Smith et al., 2012).

## 9. Conclusion

Numerous studies have reinforced the bone-muscle unit hypothesis. Mechanical and metabolic relations have been identified. Skeletal muscle is thought to control bone mass and mineral density by mechanical loading which promotes bone metabolism through the activation of signaling pathways, triggered, in majority, in osteocytes. Moreover, osteoinducer (IGF-1, FGF-2, IL-15, OGN, FAM5C,



Tmem119, osteoactivin) and osteoinhibitor (IL-6 and myostatin) myokines have been identified in skeletal muscle cells. Besides, bone cells have been found to secrete PGE2, Wnt3a, OCN and IGF-1, which are thought to have myoinducer properties, and sclerostin which could impair muscle metabolism. The roles of cartilage and adipose tissue are not to be forgotten as they can potentially affect bone and muscle and can in turn be affected by these tissues. Indeed, chondrocytes secrete DKK1, an osteoinhibitor molecule and Ihh which can promote both muscle and bone metabolisms. Adipocytes can modulate bone and muscle via the secretion adiponectin, leptin and IL-6. Moreover, myostatin seems to play a central role in cross-linking these tissues, as it can negatively impact muscle, bone and cartilage and promote adipose tissue. Other metabolic mechanisms such as inflammation are involved in the development of osteoporosis and sarcopenia, pathologies affecting bone and muscle respectively. Studies on space-flight and bed-rest allowed the identification of mechanisms underlying the processes of both osteopenia and sarcopenia. The beneficial impact of physical exercise and a balanced diet, including key ingredients as proteins, calcium, vitamin D and various potent micronutrients or specific fatty acids, seems essential. Further investigations are needed to fully understand the mechanisms involved between bone and skeletal muscle, in order to develop new strategies to counteract the development of both osteoporosis and sarcopenia.

## 10. Acknowledgments

CT was funded by a CIFRE grant (n°2011/99) from the ANRT (French National Association for Research and Technology) in partnership with the Lesieur company. This work was supported by both the CIFRE grant and the pOLIVd3 ANR (French National Research Agency) program ANR-10-ALIA-0008.

## 11. References

- Abdelmagid, S.M., Barbe, M.F., Arango-Hisijara, I., Owen, T.A., Popoff, S.N., Safadi, F.F., 2007. Osteoactivin acts as downstream mediator of BMP-2 effects on osteoblast function. *Journal of cellular physiology* 210, 26-37.
- Abdelmagid, S.M., Barbe, M.F., Rico, M.C., Salihoglu, S., Arango-Hisijara, I., Selim, A.H., Anderson, M.G., Owen, T.A., Popoff, S.N., Safadi, F.F., 2008. Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Experimental cell research* 314, 2334-2351.
- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Fiddes, J.C., 1986. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence, genomic organization, and expression in mammalian cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 657-668.
- Abreu, E.L., Stern, M., Brotto, M., 2012. Bone-muscle interactions: ASBMR Topical Meeting. *IBMS BoneKEy* 9, 239.
- Agarwal, E., Miller, M., Yaxley, A., Isenring, E., 2013. Malnutrition in the elderly: A narrative review. *Maturitas* 76, 296-302.
- Alkner, B.A., Tesch, P.A., 2004. Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest. *Acta physiologica Scandinavica* 181, 345-357.
- Alzghoul, M.B., Gerrard, D., Watkins, B.A., Hannon, K., 2004. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 221-223.
- Amin, S., Riggs, B.L., Melton, L.J., 3rd, Achenbach, S.J., Atkinson, E.J., Khosla, S., 2007. High serum IGFBP-2 is predictive of increased bone turnover in aging men and women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 799-807.
- Andress, D.L., 2001. IGF-binding protein-5 stimulates osteoblast activity and bone accretion in ovariectomized mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 281, E283-288.
- Armamento-Villareal, R., Sadler, C., Napoli, N., Shah, K., Chode, S., Sinacore, D.R., Qualls, C., Villareal, D.T., 2012. Weight loss in obese older adults increases serum sclerostin and impairs hip geometry but both are prevented by exercise training. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27, 1215-1221.
- Armbrecht, G., Belavy, D.L., Gast, U., Bongrazio, M., Touby, F., Beller, G., Roth, H.J., Perschel, F.H., Rittweger, J., Felsenberg, D., 2010. Resistive vibration exercise attenuates bone and muscle atrophy in 56 days of bed rest: biochemical markers of bone metabolism. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21, 597-607.



- Armstrong, V.J., Muzylak, M., Sunters, A., Zaman, G., Saxon, L.K., Price, J.S., Lanyon, L.E., 2007. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *The Journal of biological chemistry* 282, 20715-20727.
- Arounleut, P., Bialek, P., Liang, L.F., Upadhyay, S., Fulzele, S., Johnson, M., Elsalanty, M., Isales, C.M., Hamrick, M.W., 2013. A myostatin inhibitor (propeptide-Fc) increases muscle mass and muscle fiber size in aged mice but does not increase bone density or bone strength. *Experimental gerontology* 48, 898-904.
- Banu, J., Wang, L., Kalu, D.N., 2003. Effects of increased muscle mass on bone in male mice overexpressing IGF-I in skeletal muscles. *Calcified tissue international* 73, 196-201.
- Barillaro, C., Liperoti, R., Martone, A.M., Onder, G., Landi, F., 2013. The new metabolic treatments for sarcopenia. *Aging clinical and experimental research* 25, 119-127.
- Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A.J., Morley, J.E., Phillips, S., Sieber, C., Stehle, P., Teta, D., Visvanathan, R., Volpi, E., Boirie, Y., 2013. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group. *Journal of the American Medical Directors Association* 14, 542-559.
- Belavy, D.L., Miokovic, T., Armbrecht, G., Rittweger, J., Felsenberg, D., 2009. Resistive vibration exercise reduces lower limb muscle atrophy during 56-day bed-rest. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 9, 225-235.
- Bijlsma, A.Y., Meskers, C.G., Westendorp, R.G., Maier, A.B., 2012. Chronology of age-related disease definitions: osteoporosis and sarcopenia. *Ageing research reviews* 11, 320-324.
- Bikle, D.D., Wang, Y., 2011. Insulin-like growth factor-I and bone. *IBMS BoneKEY* 8, 328-341.
- Billeter, R., Hoppeler, H., 2003. Muscular basis of strength, in: Komi, P.V. (Ed.), *Strength and power in sport*, second ed. Blackwell Science, pp. 50-72.
- Binkley, N., Krueger, D., Buehring, B., 2013. What's in a name revisited: should osteoporosis and sarcopenia be considered components of "dysmobility syndrome?". *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24, 2955-2959.
- Bischoff-Ferrari, H.A., Dawson-Hughes, B., Staehelin, H.B., Orav, J.E., Stuck, A.E., Theiler, R., Wong, J.B., Egli, A., Kiel, D.P., Henschkowski, J., 2009. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 339, b3692.
- Bischoff-Ferrari, H.A., Dietrich, T., Orav, E.J., Hu, F.B., Zhang, Y., Karlson, E.W., Dawson-Hughes, B., 2004. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged > or =60 y. *The American journal of clinical nutrition* 80, 752-758.
- Bischoff-Ferrari, H.A., Willett, W.C., Orav, E.J., Lips, P., Meunier, P.J., Lyons, R.A., Flicker, L., Wark, J., Jackson, R.D., Cauley, J.A., Meyer, H.E., Pfeifer, M., Sanders, K.M., Stahelin, H.B., Theiler, R., Dawson-Hughes, B., 2012. A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *The New England journal of medicine* 367, 40-49.
- Bloomfield, S.A., 1997. Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Medicine and science in sports and exercise* 29, 197-206.
- Bogl, L.H., Latvala, A., Kaprio, J., Sovijarvi, O., Rissanen, A., Pietilainen, K.H., 2011. An investigation into the relationship between soft tissue body composition and bone mineral density in a young adult twin sample. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26, 79-87.
- Boirie, Y., 2009. Physiopathological mechanism of sarcopenia. *The journal of nutrition, health & aging* 13, 717-723.
- Boirie, Y., Morio, B., Caumon, E., Cano, N.J., 2014. Nutrition and protein energy homeostasis in elderly. *Mechanisms of ageing and development* 136-137, 76-84.
- Bonewald, L.F., Kiel, D.P., Clemens, T.L., Esser, K., Orwoll, E.S., O'Keefe, R.J., Fielding, R.A., 2013. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28, 1857-1865.
- Boonen, S., Lips, P., Bouillon, R., Bischoff-Ferrari, H.A., Vanderschueren, D., Haentjens, P., 2007. Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin d supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1415-1423.
- Bren-Mattison, Y., Hausburg, M., Olwin, B.B., 2011. Growth of limb muscle is dependent on skeletal-derived Indian hedgehog. *Developmental biology* 356, 486-495.
- Broholm, C., Mortensen, O.H., Nielsen, S., Akerstrom, T., Zankari, A., Dahl, B., Pedersen, B.K., 2008. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 586, 2195-2201.



- Brooks, N.E., Cadena, S.M., Vannier, E., Cloutier, G., Carambula, S., Myburgh, K.H., Roubenoff, R., Castaneda-Sceppa, C., 2010. Effects of resistance exercise combined with essential amino acid supplementation and energy deficit on markers of skeletal muscle atrophy and regeneration during bed rest and active recovery. *Muscle & nerve* 42, 927-935.
- Buehring, B., Binkley, N., 2013. Myostatin - the holy grail for muscle, bone, and fat? *Current osteoporosis reports* 11, 407-414.
- Bukhari, M., 2009. The National Osteoporosis Guideline Group's new guidelines: what is new? *Rheumatology (Oxford)* 48, 327-329.
- Burr, D.B., 1997. Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12, 1547-1551.
- Cairns, D.M., Lee, P.G., Uchimura, T., Seufert, C.R., Kwon, H., Zeng, L., 2010a. The role of muscle cells in regulating cartilage matrix production. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28, 529-536.
- Cairns, D.M., Uchimura, T., Kwon, H., Lee, P.G., Seufert, C.R., Matzkin, E., Zeng, L., 2010b. Muscle cells enhance resistance to pro-inflammatory cytokine-induced cartilage destruction. *Biochemical and biophysical research communications* 392, 22-28.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2004. *Biologie*, 2ème édition.
- Cao, J.J., 2011. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research* 6, 30.
- Cashman, K.D., 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *The British journal of nutrition* 87 Suppl 2, S169-177.
- Cassell, C., Benedict, M., Specker, B., 1996. Bone mineral density in elite 7- to 9-yr-old female gymnasts and swimmers. *Medicine and science in sports and exercise* 28, 1243-1246.
- Chan, M.E., Adler, B.J., Green, D.E., Rubin, C.T., 2012. Bone structure and B-cell populations, crippled by obesity, are partially rescued by brief daily exposure to low-magnitude mechanical signals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 4855-4863.
- Chan, X.C., McDermott, J.C., Siu, K.W., 2007. Identification of secreted proteins during skeletal muscle development. *Journal of proteome research* 6, 698-710.
- Chiu, C.S., Peekhaus, N., Weber, H., Adamski, S., Murray, E.M., Zhang, H.Z., Zhao, J.Z., Ernst, R., Lineberger, J., Huang, L., Hampton, R., Arnold, B.A., Vitelli, S., Hamuro, L., Wang, W.R., Wei, N., Dillon, G.M., Miao, J., Alves, S.E., Glantschnig, H., Wang, F., Wilkinson, H.A., 2013. Increased muscle force production and bone mineral density in ActRIIB-Fc-treated mature rodents. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68, 1181-1192.
- Cho, T.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17, 513-520.
- Ciani, C., Doty, S.B., Fritton, S.P., 2009. An effective histological staining process to visualize bone interstitial fluid space using confocal microscopy. *Bone* 44, 1015-1017.
- Clarke, M.S., Feedback, D.L., 1996. Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, 502-509.
- Clarke, M.S., Khakee, R., McNeil, P.L., 1993. Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *Journal of cell science* 106 ( Pt 1), 121-133.
- Coenen Schimke, J.M., Ljungqvist, O.H., Sarkar, G., Conover, C.A., Nair, K.S., 1999. A quantitative PCR measurement of messenger RNA expression of IGF-I, IGF-II and IGFBP-5 in human skeletal muscle. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 9, 179-186.
- Conference report, n.a.l., 1993. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *The American journal of medicine* 94, 646-650.
- Cooke, R., 2004. The sliding filament model: 1972-2004. *The Journal of general physiology* 123, 643-656.
- Cowin, S.C., 2007. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *Journal of biomechanics* 40 Suppl 1, S105-109.
- Coxam, V., Davicco, M.J., Demigné, C., 2008. Nutrition et métabolisme osseux., in: Lavoisier, T.D. (Ed.), *Aliments fonctionnels*. Roberfroid M, Coxam V & Delzenne N., 2ème ed, pp. 729-798.
- Cruz-Jentoft, A.J., Landi, F., Schneider, S.M., Zuniga, C., Arai, H., Boirie, Y., Chen, L.K., Fielding, R.A., Martin, F.C., Michel, J.P., Sieber, C., Stout, J.R., Studenski, S.A., Vellas, B., Woo, J., Zamboni, M., Cederholm, T., 2014. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age and ageing*.





- Dallas, S.L., Prideaux, M., Bonewald, L.F., 2013. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews* 34, 658-690.
- Dardevet, D., Savary-Auzeloux, I., Remond, D., Mosoni, L., Marzetti, E., Buford, T.W., Bernabei, R., Dionne, I.J., Manini, T.M., Buehring, B., Kirchner, E., Calabrese, L., Clark, B.C., Fonseca, H.M., Delbono, O., Taylor, J.R., Aubertin-Leheudre, M., Barbat-Artigas, S., Pion, C.H., Thornell, L.E., Gustafsson, T., Cederholm, T., Ulfhake, B., 2012. Commentaries on Viewpoint: Muscle atrophy is not always sarcopenia. *J Appl Physiol* 113, 680-684.
- De Ceuninck, F., Fradin, A., Pastoureau, P., 2013. Bearing arms against osteoarthritis and sarcopenia: when cartilage and skeletal muscle find common interest in talking together. *Drug discovery today*.
- Deutz, N.E., Bauer, J.M., Barazzoni, R., Biolo, G., Boirie, Y., Bony-Westphal, A., Cederholm, T., Cruz-Jentoft, A., Krznaric, Z., Nair, K.S., Singer, P., Teta, D., Tipton, K., Calder, P.C., 2014. Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr*.
- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., van der Heide, D., Landewe, R., Lacey, D., Richards, W.G., Schett, G., 2007. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine* 13, 156-163.
- Dickinson, M.H., Farley, C.T., Full, R.J., Koehl, M.A., Kram, R., Lehman, S., 2000. How animals move: an integrative view. *Science* 288, 100-106.
- Doty, S.B., 2004. Space flight and bone formation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 35, 951-961.
- Droppert, P.M., 1993. A review of muscle atrophy in microgravity and during prolonged bed rest. *Journal of the British Interplanetary Society* 46, 83-86.
- Duncan, C.S., Blimkie, C.J., Cowell, C.T., Burke, S.T., Briody, J.N., Howman-Giles, R., 2002. Bone mineral density in adolescent female athletes: relationship to exercise type and muscle strength. *Medicine and science in sports and exercise* 34, 286-294.
- Edgerton, V.R., Zhou, M.Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., Harris, B., Saltin, B., Gollnick, P.D., Roy, R.R., et al., 1995. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol* 78, 1733-1739.
- Egan, E., Reilly, T., Giacomoni, M., Redmond, L., Turner, C., 2006. Bone mineral density among female sports participants. *Bone* 38, 227-233.
- Elis, S., Wu, Y., Courtland, H.W., Sun, H., Rosen, C.J., Adamo, M.L., Yakar, S., 2011. Increased serum IGF-1 levels protect the musculoskeletal system but are associated with elevated oxidative stress markers and increased mortality independent of tissue igf1 gene expression. *Aging cell* 10, 547-550.
- Elkasrawy, M., Fulzele, S., Bowser, M., Wenger, K., Hamrick, M., 2011. Myostatin (GDF-8) inhibits chondrogenesis and chondrocyte proliferation in vitro by suppressing Sox-9 expression. *Growth Factors* 29, 253-262.
- Elkasrawy, M., Immel, D., Wen, X., Liu, X., Liang, L.F., Hamrick, M.W., 2012. Immunolocalization of myostatin (GDF-8) following musculoskeletal injury and the effects of exogenous myostatin on muscle and bone healing. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 60, 22-30.
- Emslander, H.C., Sinaki, M., Muhs, J.M., Chao, E.Y., Wahner, H.W., Bryant, S.C., Riggs, B.L., Eastell, R., 1998. Bone mass and muscle strength in female college athletes (runners and swimmers). *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 73, 1151-1160.
- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W.H., Miki, T., Bottaro, D.P., Kraus, M.H., Aaronson, S.A., 1999. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 274, 19465-19472.
- Ferrando, A.A., Lane, H.W., Stuart, C.A., Davis-Street, J., Wolfe, R.R., 1996. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *The American journal of physiology* 270, E627-633.
- Ferrando, A.A., Stuart, C.A., Brunder, D.G., Hillman, G.R., 1995. Magnetic resonance imaging quantitation of changes in muscle volume during 7 days of strict bed rest. *Aviation, space, and environmental medicine* 66, 976-981.
- Ferretti, J.L., Capozza, R.F., Cointry, G.R., Garcia, S.L., Plotkin, H., Alvarez Filgueira, M.L., Zanchetta, J.R., 1998. Gender-related differences in the relationship between densitometric values of whole-body bone mineral content and lean body mass in humans between 2 and 87 years of age. *Bone* 22, 683-690.
- Ferron, M., McKee, M.D., Levine, R.L., Ducy, P., Karsenty, G., 2012. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone* 50, 568-575.
- Fitts, R.H., Riley, D.R., Widrick, J.J., 2001. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *The Journal of experimental biology* 204, 3201-3208.
- Fraix, M., 2012. Role of the musculoskeletal system and the prevention of falls. *The Journal of the American Osteopathic Association* 112, 17-21.
- Friedman, J.M., Halaas, J.L., 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.



- Frost, H.M., 1987. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The Anatomical record* 219, 1-9.
- Frost, H.M., 2003. Bone's mechanostat: a 2003 update. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 275, 1081-1101.
- Frost, H.M., Schonau, E., 2000. The "muscle-bone unit" in children and adolescents: a 2000 overview. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 13, 571-590.
- Fujimura, K., Bessho, K., Okubo, Y., Kusumoto, K., Segami, N., Iizuka, T., 2002. The effect of fibroblast growth factor-2 on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat muscle. *Archives of oral biology* 47, 577-584.
- Funaba, M., Ogawa, K., Abe, M., 2001. Expression and localization of activin receptors during endochondral bone development. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 144, 63-71.
- Garcia, L.A., King, K.K., Ferrini, M.G., Norris, K.C., Artaza, J.N., 2011. 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 152, 2976-2986.
- Giannesini, B., Vilmen, C., Amthor, H., Bernard, M., Bendahan, D., 2013. Lack of myostatin impairs mechanical performance and ATP cost of contraction in exercising mouse gastrocnemius muscle in vivo. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 305, E33-40.
- Go, S.W., Cha, Y.H., Lee, J.A., Park, H.S., 2013. Association between Sarcopenia, Bone Density, and Health-Related Quality of Life in Korean Men. *Korean journal of family medicine* 34, 281-288.
- Gomez, C., David, V., Peet, N.M., Vico, L., Chenu, C., Malaval, L., Skerry, T.M., 2007. Absence of mechanical loading in utero influences bone mass and architecture but not innervation in MyoD-Myf5-deficient mice. *Journal of anatomy* 210, 259-271.
- Govoni, K.E., Wergedal, J.E., Florin, L., Angel, P., Baylink, D.J., Mohan, S., 2007. Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type I $\alpha$ 2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology* 148, 5706-5715.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., et al., 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264, 965-968.
- Gryson, C., Walrand, S., Giraudet, C., Rousset, P., Migne, C., Bonhomme, C., Le Ruyet, P., Boirie, Y., 2013. "Fast proteins" with a unique essential amino acid content as an optimal nutrition in the elderly: Growing evidence. *Clin Nutr.*
- Hamrick, M.W., 2003. Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 272, 388-391.
- Hamrick, M.W., 2012. The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk. *BoneKEY reports* 1, 60.
- Hamrick, M.W., McNeil, P.L., Patterson, S.L., 2010. Role of muscle-derived growth factors in bone formation. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 10, 64-70.
- Hamrick, M.W., Shi, X., Zhang, W., Pennington, C., Thakore, H., Haque, M., Kang, B., Isales, C.M., Fulzele, S., Wenger, K.H., 2007. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone* 40, 1544-1553.
- Harry, L.E., Sandison, A., Pearse, M.F., Paleolog, E.M., Nanchahal, J., 2009. Comparison of the vascularity of fasciocutaneous tissue and muscle for coverage of open tibial fractures. *Plastic and reconstructive surgery* 124, 1211-1219.
- Heaney, R.P., 2003. Long-latency deficiency disease: insights from calcium and vitamin D. *The American journal of clinical nutrition* 78, 912-919.
- Heinonen, A., Oja, P., Kannus, P., Sievanen, H., Haapasalo, H., Manttari, A., Vuori, I., 1995. Bone mineral density in female athletes representing sports with different loading characteristics of the skeleton. *Bone* 17, 197-203.
- Heinonen, A., Oja, P., Kannus, P., Sievanen, H., Manttari, A., Vuori, I., 1993. Bone mineral density of female athletes in different sports. *Bone and mineral* 23, 1-14.
- Henningesen, J., Rigbolt, K.T., Blagoev, B., Pedersen, B.K., Kratchmarova, I., 2010. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9, 2482-2496.
- Hoeflich, A., Gotz, W., Lichanska, A.M., Bielohuby, M., Tonshoff, B., Kiepe, D., 2007. Effects of insulin-like growth factor binding proteins in bone -- a matter of cell and site. *Archives of physiology and biochemistry* 113, 142-153.
- Holecki, M., Wiecek, A., 2010. Relationship between body fat mass and bone metabolism. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej* 120, 361-367.



- Hopwood, B., Tsykin, A., Findlay, D.M., Fazzalari, N.L., 2007. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis research & therapy* 9, R100.
- Houston, D.K., Nicklas, B.J., Ding, J., Harris, T.B., Tylavsky, F.A., Newman, A.B., Lee, J.S., Sahyoun, N.R., Visser, M., Kritchevsky, S.B., 2008. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *The American journal of clinical nutrition* 87, 150-155.
- Houston, M.E., Froese, E.A., Valeriote, S.P., Green, H.J., Ranney, D.A., 1983. Muscle performance, morphology and metabolic capacity during strength training and detraining: a one leg model. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 51, 25-35.
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., Li, Y.P., 2007. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 3068-3092.
- Huang, Z., Chen, X., Chen, D., 2011. Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular signalling* 23, 1441-1446.
- Hunt, J.R., Johnson, L.K., Fariba Roughead, Z.K., 2009. Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. *The American journal of clinical nutrition* 89, 1357-1365.
- Huxley, A.F., 1975. The origin of force in skeletal muscle. *Ciba Foundation symposium*, 271-290.
- Huxley, A.F., Niedergerke, R., 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173, 971-973.
- Huxley, H., Hanson, J., 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973-976.
- Jackowski, S.A., Lanovaz, J.L., Van Oort, C., Baxter-Jones, A.D., 2013. Does lean tissue mass accrual during adolescence influence bone structural strength at the proximal femur in young adulthood? *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*.
- Jahn, K., Lara-Castillo, N., Brotto, L., Mo, C.L., Johnson, M.L., Brotto, M., Bonewald, L.F., 2012. Skeletal muscle secreted factors prevent glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis through activation of beta-catenin. *European cells & materials* 24, 197-209; discussion 209-110.
- Javaheri, B., Stern, A., Lara, N., Dallas, M., Zhao, H., Liu, Y., Bonewald, L.F., Johnson, M.L., 2013. Deletion of a single beta-catenin allele in osteocytes abolishes the bone anabolic response to loading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*.
- Joseph, C., Kenny, A.M., Taxel, P., Lorenzo, J.A., Duque, G., Kuchel, G.A., 2005. Role of endocrine-immune dysregulation in osteoporosis, sarcopenia, frailty and fracture risk. *Molecular aspects of medicine* 26, 181-201.
- Judex, S., Carlson, K.J., 2009. Is bone's response to mechanical signals dominated by gravitational loading? *Medicine and science in sports and exercise* 41, 2037-2043.
- Judex, S., Rubin, C.T., 2010. Is bone formation induced by high-frequency mechanical signals modulated by muscle activity? *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 10, 3-11.
- Juffer, P., Jaspers, R.T., Lips, P., Bakker, A.D., Klein-Nulend, J., 2012. Expression of muscle anabolic and metabolic factors in mechanically loaded MLO-Y4 osteocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302, E389-395.
- Kaji, H., 2013. Linkage between muscle and bone: common catabolic signals resulting in osteoporosis and sarcopenia. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16, 272-277.
- Kamel, M.A., Picconi, J.L., Lara-Castillo, N., Johnson, M.L., 2010. Activation of beta-catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE2: Implications for the study of mechanosensation in bone. *Bone* 47, 872-881.
- Kanis, J.A., 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 4, 368-381.
- Kanis, J.A., McCloskey, E.V., Johansson, H., Oden, A., Melton, L.J., 3rd, Khaltayev, N., 2008. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone* 42, 467-475.
- Kanis, J.A., Melton, L.J., 3rd, Christiansen, C., Johnston, C.C., Khaltayev, N., 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9, 1137-1141.
- Karasik, D., 2011. How pleiotropic genetics of the musculoskeletal system can inform genomics and phenomics of aging. *Age (Dordr)* 33, 49-62.
- Karpe, F., 2013. Insulin resistance by adiponectin deficiency: is the action in skeletal muscle? *Diabetes* 62, 701-702.



- Karpe, F., Dickmann, J.R., Frayn, K.N., 2011. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 60, 2441-2449.
- Karsenty, G., Oury, F., 2012. Biology without walls: the novel endocrinology of bone. *Annual review of physiology* 74, 87-105.
- Kaufman, H., Reznick, A., Stein, H., Barak, M., Maor, G., 2008. The biological basis of the bone-muscle inter-relationship in the algorithm of fracture healing. *Orthopedics* 31, 751.
- Kitase, Y., Barragan, L., Qing, H., Kondoh, S., Jiang, J.X., Johnson, M.L., Bonewald, L.F., 2010. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the beta-catenin and PKA pathways. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 2657-2668.
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R.G., Bakker, A.D., 2012a. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *European cells & materials* 24, 278-291.
- Klein-Nulend, J., Bakker, A.D., Bacabac, R.G., Vatsa, A., Weinbaum, S., 2012b. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone*.
- Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C.M., Ajubi, N.E., Frangos, J.A., Nijweide, P.J., Burger, E.H., 1995. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 441-445.
- Klibanski, A., Adams-Campbell, L., Bassford, T., Blair, S.N., Boden, S.D., Dickersin, K., Gifford, D.R., Glasse, L., Goldring, S.R., Hruska, K., Johnson, S.R., McCauley, L.K., Russell, W.E., 2001. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *The Journal of the American Medical Association* 285, 785-795.
- Krasnoff, J., Painter, P., 1999. The physiological consequences of bed rest and inactivity. *Advances in renal replacement therapy* 6, 124-132.
- Krustrup, P., Hansen, P.R., Andersen, L.J., Jakobsen, M.D., Sundstrup, E., Randers, M.B., Christiansen, L., Helge, E.W., Pedersen, M.T., Sogaard, P., Junge, A., Dvorak, J., Aagaard, P., Bangsbo, J., 2010. Long-term musculoskeletal and cardiac health effects of recreational football and running for premenopausal women. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 20 Suppl 1, 58-71.
- Lang, T.F., Leblanc, A.D., Evans, H.J., Lu, Y., 2006. Adaptation of the proximal femur to skeletal reloading after long-duration spaceflight. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21, 1224-1230.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 49831-49840.
- Lean, J.M., Mackay, A.G., Chow, J.W., Chambers, T.J., 1996. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *The American journal of physiology* 270, E937-945.
- LeBlanc, A., Schneider, V., Shackelford, L., West, S., Oganov, V., Bakulin, A., Voronin, L., 2000. Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 1, 157-160.
- Lebrasseur, N.K., Achenbach, S.J., Melton, L.J., 3rd, Amin, S., Khosla, S., 2012. Skeletal muscle mass is associated with bone geometry and microstructure and serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels in adult women and men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27, 2159-2169.
- Lee, A.M., Sawyer, R.K., Moore, A.J., Morris, H.A., O'Loughlin, P.D., Anderson, P.H., 2013. Adequate dietary vitamin D and calcium are both required to reduce bone turnover and increased bone mineral volume. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
- Lee, K., Jessop, H., Suswillo, R., Zaman, G., Lanyon, L., 2003. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature* 424, 389.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G., 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
- Li, P., Ma, Y.C., Shen, H.L., Han, H., Wang, J., Cheng, H.J., Wang, C.F., Xia, Y.Y., 2012. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells. *Cell biology international* 36, 229-236.
- Liang, H., Pun, S., Wronski, T.J., 1999. Bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats. *Endocrinology* 140, 5780-5788.
- Liu, R., Schindeler, A., Little, D.G., 2010. The potential role of muscle in bone repair. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 10, 71-76.
- Liu, Y., Sweeney, G., 2014. Adiponectin action in skeletal muscle. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 28, 33-41.





- Lloyd, S.A., Lang, C.H., Zhang, Y., Paul, E.M., Laufenberg, L.J., Lewis, G.S., Donahue, H.J., 2013. Interdependence of muscle atrophy and bone loss induced by mechanical unloading. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*.
- Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Marcucio, R.S., 2007. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25, 51-61.
- Lu, H.F., Mai, Z.H., Xu, Y., Wang, W., Ai, H., 2012. Mechanical loading induced expression of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Chinese medical journal* 125, 4093-4097.
- Ma, H.T., Griffith, J.F., Xu, L., Leung, P.C., 2013. The functional muscle-bone unit in subjects of varying BMD. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*.
- Macias, B.R., Swift, J.M., Nilsson, M.I., Hogan, H.A., Bouse, S.D., Bloomfield, S.A., 2012. Simulated resistance training, but not alendronate, increases cortical bone formation and suppresses sclerostin during disuse. *J Appl Physiol* (1985) 112, 918-925.
- MacNaughton, R.B., Cole, J.M., Dalrymple, R.W., Braddy, S.J., Brigg, D.E.G., Lukie, T.D., 2002. First steps on land: arthropod trackways in Cambrian-Ordovician eolian sandstone, southeastern Ontario, Canada. *Geology* 30, 391-394.
- Malaval, L., Aubin, J.E., 2001. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* Suppl 36, 63-70.
- Mangano, K.M., Sahni, S., Kerstetter, J.E., 2014. Dietary protein is beneficial to bone health under conditions of adequate calcium intake: an update on clinical research. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 17, 69-74.
- Marieb, E.N., 1999. *Anatomie et physiologie humaines, traduction de la quatrième édition américaine, de Boeck ed.*
- Mayr, W., Bijak, M., Girsch, W., Hofer, C., Lanmuller, H., Rafolt, D., Rakos, M., Sauermaun, S., Schmutterer, C., Schnetz, G., Unger, E., Freilinger, G., 1999. MYOSTIM-FES to prevent muscle atrophy in microgravity and bed rest: preliminary report. *Artificial organs* 23, 428-431.
- McCarthy, E.F., 2011. Perspective: skeletal complications of space flight. *Skeletal radiology* 40, 661-663.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- Meck, J.V., Dreyer, S.A., Warren, L.E., 2009. Long-duration head-down bed rest: project overview, vital signs, and fluid balance. *Aviation, space, and environmental medicine* 80, A1-8.
- Migliaccio, S., Greco, E.A., Fornari, R., Donini, L.M., Lenzi, A., 2011. Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy* 4, 273-282.
- Miyakoshi, N., Richman, C., Kasukawa, Y., Linkhart, T.A., Baylink, D.J., Mohan, S., 2001. Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *The Journal of clinical investigation* 107, 73-81.
- Mo, C., Romero-Suarez, S., Bonewald, L., Johnson, M., Brotto, M., 2012. Prostaglandin E2: from clinical applications to its potential role in bone- muscle crosstalk and myogenic differentiation. *Recent patents on biotechnology* 6, 223-229.
- Montgomery, E., Pennington, C., Isales, C.M., Hamrick, M.W., 2005. Muscle-bone interactions in dystrophin-deficient and myostatin-deficient mice. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 286, 814-822.
- Morgan, J.L., Zwart, S.R., Heer, M., Ploutz-Snyder, R., Ericson, K., Smith, S.M., 2012. Bone Metabolism and Nutritional Status during 30-day Head-Down Tilt Bed Rest. *J Appl Physiol*.
- Muir, J., Judex, S., Qin, Y.X., Rubin, C., 2011. Postural instability caused by extended bed rest is alleviated by brief daily exposure to low magnitude mechanical signals. *Gait & posture* 33, 429-435.
- Nakamura, K., Kurokawa, T., Aoyama, I., Hanada, K., Tamura, M., Kawaguchi, H., 1998. Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in ovariectomised rats. *International orthopaedics* 22, 49-54.
- Nakamura, Y., Tensho, K., Nakaya, H., Nawata, M., Okabe, T., Wakitani, S., 2005. Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice. *Bone* 36, 399-407.
- Naot, D., Cornish, J., 2014. Cytokines and Hormones That Contribute to the Positive Association between Fat and Bone. *Frontiers in endocrinology* 5, 70.
- Nieves, J.W., 2013. Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24, 771-786.
- Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., Ikemoto, M., Kano, M., Kominami, E., Nonaka, I., Ogawa, T., Adams, G.R., Baldwin, K.M., Yasui, N., Kishi, K., Takeda, S., 2004. Skeletal muscle gene expression



- in space-flown rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 522-524.
- Oden, A., McCloskey, E.V., Johansson, H., Kanis, J.A., 2012. Assessing the Impact of Osteoporosis on the Burden of Hip Fractures. *Calcified tissue international*.
- Oh, H., Chun, C.H., Chun, J.S., 2012. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis and rheumatism* 64, 2568-2578.
- Ohlsson, C., Mohan, S., Sjogren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.O., Svensson, J., 2009. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine reviews* 30, 494-535.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., Karsenty, G., 2011. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796-809.
- Park, J.H., Park, K.H., Cho, S., Choi, Y.S., Seo, S.K., Lee, B.S., Park, H.S., 2013. Concomitant increase in muscle strength and bone mineral density with decreasing IL-6 levels after combination therapy with alendronate and calcitriol in postmenopausal women. *Menopause* 20, 747-753.
- Payne, K.A., Meszaros, L.B., Phillippi, J.A., Huard, J., 2010. Effect of phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinases 1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on osteogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Tissue engineering. Part A* 16, 3647-3655.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews* 88, 1379-1406.
- Pedersen, B.K., Febbraio, M.A., 2012. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* 8, 457-465.
- Perel, E., Killinger, D.W., 1979. The interconversion and aromatization of androgens by human adipose tissue. *Journal of steroid biochemistry* 10, 623-627.
- Puel, C., Coxam, V., Davicco, M.J., 2007. [Mediterranean diet and osteoporosis prevention]. *Medecine sciences : M/S* 23, 756-760.
- Quinn, L.S., Anderson, B.G., Strait-Bodey, L., Stroud, A.M., Argiles, J.M., 2009. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296, E191-202.
- Raab-Cullen, D.M., Thiede, M.A., Petersen, D.N., Kimmel, D.B., Recker, R.R., 1994. Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcified tissue international* 55, 473-478.
- Rajaram, S., Baylink, D.J., Mohan, S., 1997. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine reviews* 18, 801-831.
- Rauch, F., Bailey, D.A., Baxter-Jones, A., Mirwald, R., Faulkner, R., 2004. The 'muscle-bone unit' during the pubertal growth spurt. *Bone* 34, 771-775.
- Rikkonen, T., Sirola, J., Salovaara, K., Tuppurainen, M., Jurvelin, J.S., Honkanen, R., Kroger, H., 2012. Muscle strength and body composition are clinical indicators of osteoporosis. *Calcified tissue international* 91, 131-138.
- Rittweger, J., 2008. Ten years muscle-bone hypothesis: what have we learned so far?--almost a festschrift. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8, 174-178.
- Rittweger, J., Frost, H.M., Schiessl, H., Ohshima, H., Alkner, B., Tesch, P., Felsenberg, D., 2005. Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone* 36, 1019-1029.
- Robling, A.G., 2009. Is bone's response to mechanical signals dominated by muscle forces? *Medicine and science in sports and exercise* 41, 2044-2049.
- Romero-Suarez, S., Mo, C., Lara, N., Jaehn, K., Johnson, M., Bonewald, L., Brotto, M., 2011. The b-catenin activating factor, Wnt3a, stimulates skeletal myogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, <http://www.asbmr.org/Meetings/AnnualMeeting/AbstractDetail.aspx?aid=66f3feb-fef0-4024-88f8-9ab20bd63ba1>.
- Sambandam, Y., Blanchard, J.J., Daughtridge, G., Kolb, R.J., Shanmugarajan, S., Pandravad, S.N., Bateman, T.A., Reddy, S.V., 2010. Microarray profile of gene expression during osteoclast differentiation in modelled microgravity. *Journal of cellular biochemistry* 111, 1179-1187.
- Santos, A., Bakker, A.D., Zandieh-Doulabi, B., Semeins, C.M., Klein-Nulend, J., 2009. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 1280-1287.
- Sawakami, K., Robling, A.G., Ai, M., Pitner, N.D., Liu, D., Warden, S.J., Li, J., Maye, P., Rowe, D.W., Duncan, R.L., Warman, M.L., Turner, C.H., 2006. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *The Journal of biological chemistry* 281, 23698-23711.
- Schaefer, I., Norton, R.A., Scheu, S., Maraun, M., 2010. Arthropod colonization of land--linking molecules and fossils in oribatid mites (Acari, Oribatida). *Molecular phylogenetics and evolution* 57, 113-121.



- Schiaffino, S., Mammucari, C., 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle* 1, 4.
- Scotece, M., Conde, J., Abella, V., Lopez, V., Pino, J., Lago, F., Gomez-Reino, J.J., Gualillo, O., 2014. Bone metabolism and adipokines: are there perspectives for bone diseases drug discovery? *Expert opinion on drug discovery* 9, 945-957.
- Seabra, A., Marques, E., Brito, J., Krstrup, P., Abreu, S., Oliveira, J., Rego, C., Mota, J., Rebelo, A., 2012. Muscle strength and soccer practice as major determinants of bone mineral density in adolescents. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 79, 403-408.
- Selim, A.A., Abdelmagid, S.M., Kanaan, R.A., Smock, S.L., Owen, T.A., Popoff, S.N., Safadi, F.F., 2003. Anti-osteostatin antibody inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 13, 265-275.
- Semenov, M., Tamai, K., He, X., 2005. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 280, 26770-26775.
- Sharir, A., Stern, T., Rot, C., Shahar, R., Zelzer, E., 2011. Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. *Development* 138, 3247-3259.
- Sharma, A.R., Jagga, S., Lee, S.S., Nam, J.S., 2013. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *International journal of molecular sciences* 14, 19805-19830.
- Sheng, M.H., Wergedal, J.E., Mohan, S., Lau, K.H., 2008. Osteostatin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and activity. *FEBS letters* 582, 1451-1458.
- Sheng, M.H., Zhou, X.D., Bonewald, L.F., Baylink, D.J., Lau, K.H., 2013. Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone* 52, 133-144.
- Sims, N.A., Johnson, R.W., 2012. Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors* 30, 76-87.
- Sjoblom, S., Suuronen, J., Rikkinen, T., Honkanen, R., Kroger, H., Sirola, J., 2013. Relationship between postmenopausal osteoporosis and the components of clinical sarcopenia. *Maturitas* 75, 175-180.
- Smith, S.M., Heer, M.A., Shackelford, L.C., Sibonga, J.D., Ploutz-Snyder, L., Zwart, S.R., 2012. Benefits for bone from resistance exercise and nutrition in long-duration spaceflight: Evidence from biochemistry and densitometry. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27, 1896-1906.
- Sondag, G.R., Salihoglu, S., Lababidi, S.L., Crowder, D.C., Moussa, F.M., Abdelmagid, S.M., Safadi, F.F., 2013. Osteostatin Induces Transdifferentiation of C2C12 Myoblasts into Osteoblasts. *Journal of cellular physiology*.
- Spector, E.R., Smith, S.M., Sibonga, J.D., 2009. Skeletal effects of long-duration head-down bed rest. *Aviation, space, and environmental medicine* 80, A23-28.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13, 2072-2086.
- Steelman, C.A., Recknor, J.C., Nettleton, D., Reecy, J.M., 2006. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 580-582.
- Stuempfle, K.J., Drury, D.G., 2007. The Physiological Consequences of Bed Rest. *JEPonline* 10, 32-41.
- Sunters, A., Armstrong, V.J., Zaman, G., Kypta, R.M., Kawano, Y., Lanyon, L.E., Price, J.S., 2010. Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor alpha-mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to Ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor-independent activation of beta-catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* 285, 8743-8758.
- Szulc, P., Blaizot, S., Boutroy, S., Vilayphiou, N., Boonen, S., Chapurlat, R., 2013. Impaired bone microarchitecture at the distal radius in older men with low muscle mass and grip strength: the STRAMBO study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28, 169-178.
- Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T.A., Losi, J.M., Azimi, N., Hanover, J.A., Bamford, R.N., Waldmann, T.A., 1997. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14444-14449.
- Tagliaferri, C., Salles, J., Landrier, J.F., Giraudet, C., Patrac, V., Lebecque, P., Davicco, M.J., Chanet, A., Pouyet, C., Dhaussy, A., Huertas, A., Boirie, Y., Wittrant, Y., Coxam, V., Walrand, S., 2014. Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *European journal of nutrition*.



- Tahimic, C.G., Wang, Y., Bikle, D.D., 2013. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Frontiers in endocrinology* 4, 6.
- Tamma, R., Colaïanni, G., Camerino, C., Di Benedetto, A., Greco, G., Strippoli, M., Vergari, R., Grano, A., Mancini, L., Mori, G., Colucci, S., Grano, M., Zallone, A., 2009. Microgravity during spaceflight directly affects in vitro osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2549-2554.
- Tanaka, H., Swensen, T., 1998. Impact of resistance training on endurance performance. A new form of cross-training? *Sports Med* 25, 191-200.
- Tanaka, K., Inoue, Y., Hendy, G.N., Canaff, L., Katagiri, T., Kitazawa, R., Komori, T., Sugimoto, T., Seino, S., Kaji, H., 2012a. Interaction of Tmem119 and the bone morphogenetic protein pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells. *Bone* 51, 158-167.
- Tanaka, K., Matsumoto, E., Higashimaki, Y., Katagiri, T., Sugimoto, T., Seino, S., Kaji, H., 2012b. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *The Journal of biological chemistry* 287, 11616-11628.
- Tanaka, K., Matsumoto, E., Higashimaki, Y., Sugimoto, T., Seino, S., Kaji, H., 2012c. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. *Biochemical and biophysical research communications* 418, 134-139.
- Tappenden, P., Campbell, F., Rawdin, A., Wong, R., Kalita, N., 2012. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of home-based, nurse-led health promotion for older people: a systematic review. *Health Technol Assess* 16, 1-72.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., Ikeda, K., 2007. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell metabolism* 5, 464-475.
- Terracciano, C., Celi, M., Lecce, D., Baldi, J., Rastelli, E., Lena, E., Massa, R., Tarantino, U., 2013. Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24, 1095-1100.
- Tinetti, M.E., 2003. Clinical practice. Preventing falls in elderly persons. *The New England journal of medicine* 348, 42-49.
- Trappe, S., Costill, D., Gallagher, P., Creer, A., Peters, J.R., Evans, H., Riley, D.A., Fitts, R.H., 2009. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* 106, 1159-1168.
- Trappe, T., 2009. Influence of aging and long-term unloading on the structure and function of human skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 34, 459-464.
- Trayhurn, P., Drevon, C.A., Eckel, J., 2011. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Archives of physiology and biochemistry* 117, 47-56.
- Turner, C.H., 1998. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* 23, 399-407.
- Utvag, S.E., Grundnes, O., Rindal, D.B., Reikeras, O., 2003. Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *Journal of orthopaedic trauma* 17, 430-435.
- Valdes, J.A., Flores, S., Fuentes, E.N., Osorio-Fuentealba, C., Jaimovich, E., Molina, A., 2013. IGF-1 induces IP3-dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *Journal of cellular physiology* 228, 1452-1463.
- van Bezooijen, R.L., Svensson, J.P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., Quax, P.H., Vrieling, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., Lowik, C.W., 2007. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 19-28.
- van Driel, M., Koedam, M., Buurman, C.J., Roelse, M., Weyts, F., Chiba, H., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A., van Leeuwen, J.P., 2006. Evidence that both 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 24-hydroxylated D3 enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *Journal of cellular biochemistry* 99, 922-935.
- Vandenburgh, H., Chromiak, J., Shansky, J., Del Tatto, M., Lemaire, J., 1999. Space travel directly induces skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1031-1038.
- Visvanathan, R., Macintosh, C., Callary, M., Penhall, R., Horowitz, M., Chapman, I., 2003. The nutritional status of 250 older Australian recipients of domiciliary care services and its association with outcomes at 12 months. *Journal of the American Geriatrics Society* 51, 1007-1011.
- Volkman, D., Baluska, F., 2006. Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma* 229, 143-148.





- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J., 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.
- Walrand, S., Guillet, C., Salles, J., Cano, N., Boirie, Y., 2011. Physiopathological mechanism of sarcopenia. *Clinics in geriatric medicine* 27, 365-385.
- Wang, H., Wan, Y., Tam, K.F., Ling, S., Bai, Y., Deng, Y., Liu, Y., Zhang, H., Cheung, W.H., Qin, L., Cheng, J.C., Leung, K.S., Li, Y., 2012. Resistive vibration exercise retards bone loss in weight-bearing skeletons during 60 days bed rest. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23, 2169-2178.
- Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., Wittrant, Y., 2009. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends in molecular medicine* 15, 468-477.
- Weigert, C., Hennige, A.M., Brodbeck, K., Haring, H.U., Schleicher, E.D., 2005. Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 289, E251-257.
- Welch, A.A., 2014. Nutritional influences on age-related skeletal muscle loss. *The Proceedings of the Nutrition Society* 73, 16-33.
- Wicherts, I.S., van Schoor, N.M., Boeke, A.J., Visser, M., Deeg, D.J., Smit, J., Knol, D.L., Lips, P., 2007. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 2058-2065.
- Widrick, J.J., Knuth, S.T., Norenberg, K.M., Romatowski, J.G., Bain, J.L., Riley, D.A., Karhanek, M., Trappe, S.W., Trappe, T.A., Costill, D.L., Fitts, R.H., 1999. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *The Journal of physiology* 516 ( Pt 3), 915-930.
- Winkler, D.G., Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B.R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M.E., Latham, J.A., 2003. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal* 22, 6267-6276.
- Woo, S.L., Kuei, S.C., Amiel, D., Gomez, M.A., Hayes, W.C., White, F.C., Akeson, W.H., 1981. The effect of prolonged physical training on the properties of long bone: a study of Wolff's Law. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 63, 780-787.
- Wronski, T.J., Morey-Holton, E.R., Doty, S.B., Maese, A.C., Walsh, C.C., 1987. Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. *The American journal of physiology* 252, R252-255.
- Yang, W., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, N., Zhu, D., 2006. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer research* 66, 1320-1326.
- Zacks, S.I., Sheff, M.F., 1982. Periosteal and metaplastic bone formation in mouse minced muscle regeneration. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46, 405-412.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhu, J., Li, Y., Shen, W., Qiao, C., Ambrosio, F., Lavasani, M., Nozaki, M., Branca, M.F., Huard, J., 2007. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *The Journal of biological chemistry* 282, 25852-25863.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., Lee, S.J., 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296, 1486-1488.
- Zuloaga, R., Fuentes, E.N., Molina, A., Valdes, J.A., 2013. The cAMP response element binding protein (CREB) is activated by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and regulates myostatin gene expression in skeletal myoblast. *Biochemical and biophysical research communications* 440, 258-264.

