

Liste des abréviations

CGDE	Cellule de Gestion des Données et Evaluation
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CPP	Comité de Protection des Personnes
CTx	B-CrossLaps
DPP4	Dipeptidylpeptidase-4
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
FSH	Hormone FolliculoStimulante
GIP	Glucose Insulinotropic Polypeptide
GIPR	Récepteur au Glucose Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
GLP-1R	Récepteur au Glucagon Like Peptide-1
GLP-2	Glucagon Like Peptide-2
IGF-1	Insuline-Like Growth Factor-1
LH	Hormone Lutéinisante
NFS	Numération Formule Sanguine
PYY	Polypeptide YY
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SHBG	Sex Hormon-Binding Globulin
TNB	Table Nationale de codage Biologique
VFA	Vertebral Fracture Assesment

Plan

INTRODUCTION

1. **Le système entéro-endocrine**
2. **Les incrétines**
3. **Le rôle des incrétines dans le remodelage osseux**
 - 3.1. La voie du GIP/GIPR dans la physiologie osseuse
 - 3.2. La voie du GLP-1/GLP-1R dans la physiologie osseuse

TRAVAUX DE RECHERCHE BIOLOGIQUE

1. **Introduction**
2. **Materials and methods**
 - 2.1. Animals
 - 2.2. Isolation and osteoclast generation from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
 - 2.3. X-ray microcomputed tomography
 - 2.4. Three-points bending test
 - 2.5. Bone histomorphometry
 - 2.6. Quantitative backscattered electron imaging (qBEI)
 - 2.7. Nanomechanical testing
 - 2.8. Fourier Transform Infrared Microscopy (FTIR)
 - 2.9. Statistical analysis
3. **Results**
4. **Discussion**
5. **Bibliography**

CONCEPTION DU PROJET CLINIQUE

1. **Etat des connaissances**
2. **Matériels et Méthode**
 - 2.1. Population étudiée
 - 2.2. Protocole
 - 2.3. Les effets indésirables attendus
 - 2.4. Analyse statistique
3. **L'évaluation du budget**

SOUSSION AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES

PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

L'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette, caractérisée par une densité osseuse basse et des altérations de la microarchitecture osseuse, responsable d'une fragilité osseuse et d'un risque de fractures non traumatiques.

C'est la maladie osseuse la plus fréquente, elle concerne 40% des femmes ménopausées et 15% des hommes après 50 ans. Elle est responsable de 160 000 hospitalisations par an en France (données de la Direction de la Recherche, des Etudes, de l'Evaluation et des Statistiques 2016).

L'ostéoporose est secondaire à une détérioration du remodelage osseux, phénomène physiologique permettant l'adaptation du tissu osseux aux variations des contraintes et aux modifications hormonales et métaboliques pendant toute la vie après l'acquisition du pic de masse osseuse (25-30ans).

Le remodelage osseux est influencé par de nombreux paramètres :

- facteurs mécaniques : pesanteur, activité physique en charge,
- facteurs locaux : système RANK/RANKL/Ostéoprotégérine (1), système Wnt/ β caténine (2), TGF β ,
- facteurs hormonaux : 1,25 (OH)₂ vitamine D, Parathormone (3), hormones sexuelles (4), hormones thyroïdiennes.

Les hormones du système entéro-endocrine pourraient également être impliquées dans le maintien de la résistance et de la qualité osseuse, puisque le remodelage osseux est en partie dépendant de la prise alimentaire (5,6).

1. Le système entéro-endocrine

Le système entéro-endocrine est constitué par différentes cellules situées dans la muqueuse intestinale et constitue l'organe endocrine le plus étendu. Les cellules entéroendocrines représentent 1% des cellules épithéliales du tractus intestinal et sécrètent différentes hormones en réponse à l'ingestion du bol alimentaire (7). Ces hormones peuvent agir localement ou à distance sur le système immunitaire, le système nerveux, le pancréas. Elles permettent la régulation de la satiété, de la motilité intestinale, de la digestion, de la réponse immunitaire.

Les cellules entérochromaffines sont les plus abondantes des cellules entéroendocrines et sont présentes sur l'ensemble du tractus gastro-intestinal. Elles synthétisent la sérotonine. Les cellules A de l'estomac produisent la ghréline. Les cellules I localisées dans le duodénum sécrètent la cholécystokinine. Les cellules D concentrées principalement dans le duodénum sécrètent la somatostatine. Les cellules gastriques G synthétisent la gastrine. Les cellules jéjunales N sécrètent la neurotensine. Les cellules M situées dans l'intestin grêle produisent la motiline. Les cellules S situées dans le duodénum et le jéjunum sécrètent la sécrétine. Les cellules P situées dans l'estomac fabriquent la leptine. Les cellules L situées dans l'intestin grêle et le colon produisent le polypeptide YY, le Glucagon-Like-Peptide 1 (GLP-1), le Glucagon-Like-Peptide 2 (GLP-2). Les cellules K produisent le Glucose Insulinotropic dependant Polypeptide (GIP) et la Xénine (8) (Tableau 1).

Type cellulaire	Hormone sécrétée	Localisation
Cellule A	Ghréline	Estomac
Cellule P	Leptine	Estomac
Cellule G	Gastrine	Estomac
Cellule D	Somatostatine	Estomac, duodénum
Cellule entérochromaffine	Sérotonine	Estomac, intestin grêle, colon
Cellule S	Sécrétine	Duodénum
Cellule I	Cholécystokinine	Duodénum
Cellule K	GIP, Xénine	Duodénum
Cellule L	GLP-1, GLP-2, PYY	Iléon, colon
Cellule M	Motiline	Intestin grêle
Cellule N	Neurotensine	Intestin grêle, colon

Tableau 1 : cellules enteroendocrines

Parmi ces hormones, la leptine est celle dont l'influence sur le remodelage osseux a été la plus étudiée. La leptine est une adipokine essentiellement produite par le tissu adipeux (9), dont le principal rôle est la régulation du métabolisme énergétique. Les modèles murins ob/ob et db/db qui ont une mutation avec perte de fonction du gène de la leptine ou du gène du récepteur de la leptine respectivement ont une masse osseuse élevée (10).

Les données scientifiques actuelles démontrent également l'influence du GIP, du GLP-1 et du GLP-2 sur le remodelage osseux. Leurs sécrétions après prise alimentaire pourraient expliquer les variations de concentration des marqueurs du remodelage osseux avec un repas (5).

2. Les incrétines

Les incrétines sont un groupe d'hormones constitué du GIP et du GLP-1. Elles ont pour principale fonction de potentialiser la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas en réponse à l'augmentation de la glycémie après la prise alimentaire (11,12). Une fois dans la circulation sanguine, les incrétines sont rapidement dégradées par une peptidase, la dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4). La DPP-4 est une protéase qui clive spécifiquement les dipeptides de la partie N-terminale des protéines qui contiennent une alanine ou une proline en position 2 (13).

Dans le diabète de type 2, l'effet potentialisateur des incrétines sur la sécrétion d'insuline est diminué (14).

Le gène du GIP se situe sur le chromosome 17(15). Le GIP actif comprend 42 acides aminés et est produit à partir d'un précurseur le proGIP par clivage enzymatique par une prohormone convertase 1/3 (16). Il agit via son récepteur le GIP-R. Le GIP-R appartient à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le gène humain du récepteur du GIP comporte 14 exons et est présent sur le chromosome 19 (17).

Le GLP-1 est le résultat du clivage du proglucagon par une prohormone convertase. Dans les cellules intestinales L deux formes de GLP-1 sont produites, le GLP-1_{7-36NH₂} et le GLP-1₇₋₃₇(18). La forme majoritaire est le GLP-1_{7-36NH₂}. Le GLP-1 se fixe à son récepteur le GLP-1R pour exercer son activité. Le GLP-1R appartient également à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Son gène comporte 14 exons et se situe sur le chromosome 6 (19).

Ces récepteurs, présents sur les cellules pancréatiques, ont également été retrouvés à la surface de différentes autres cellules expliquant les effets multiples de ces hormones. En effet à côté de leur rôle dans la régulation de la glycémie les incrétines agissent sur différents tissus : le tissu digestif, le système nerveux, le tissu musculaire, le tissu adipeux et le tissu osseux.

3. Le rôle des incrétines dans le remodelage osseux

3.1. La voie du GIP/GIPR dans la physiologie osseuse

Le récepteur du GIP (GIPR) a été retrouvé en RT-PCR et en immunohistochimie à la surface des différentes cellules osseuses (ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes) (20–22).

Les études cellulaires démontrent l'action directe du GIP sur les cellules osseuses. L'administration de GIP dans des cultures d'ostéoblastes entraîne une augmentation de la prolifération de ces cellules, une augmentation de leur production de TGF-beta, de phosphatase alcaline, de collagène de type 1 et une augmentation de l'activité de la lysyl oxydase, enzyme favorisant la maturité du collagène (21,23,24).

Deux modèles murins par invalidation soit du GIPR (GIPR KO) soit de la voie de synthèse du GIP (GIP-GFP-KI) ont pu être étudiés. Les souris GIPR KO présentent des altérations de la masse osseuse et du volume trabéculaire (25) associées à des modifications de l'épaisseur corticale, des constituants matriciels et de la résistance mécanique osseuse (26).

Les souris GIP-GFP-KI présentent également des altérations de la masse osseuse et du volume trabéculaire associées à une altération des propriétés biomécaniques de la matrice osseuse corticale (Résultats en cours de publication : confère chapitre 4).

L'injection d'analogues stables de GIP, chez des rats sains permet d'améliorer les propriétés de la matrice osseuse (27). De plus, l'utilisation de ces analogues a pu être réalisée dans des modèles pré-cliniques de fragilité osseuse. L'utilisation de ces analogues dans des modèles de souris diabétique de type 1 ou 2 s'est montrée bénéfique pour les constituants de la matrice osseuse ainsi que pour les microarchitectures trabéculaires et corticales et a contribué à améliorer la résistance osseuse (28,29).

Chez l'Homme, un polymorphisme du gène du récepteur au GIP, dû à la substitution d'une guanine par une cytosine en position rs 1800437, est associé à une diminution de l'activité du récepteur GIPR. Ce polymorphisme est associé à une diminution de la densité minérale osseuse au col fémoral et à la hanche et à une augmentation de l'incidence des fractures périphériques (30). Par ailleurs l'injection de GIP exogène, chez l'Homme se traduit par une diminution des marqueurs de résorption osseuse (31).

3.2. La voie du GLP-1/GLP-1R dans la physiologie osseuse

La présence du récepteur du GLP-1 (GLP-1R) sur les cellules osseuses est controversée (32-36). En culture cellulaire, le GLP-1 n'a pas d'action directe sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (37). Chez les rongeurs, le GLP-1 entraînerait un effet osseux via son récepteur sur les cellules C thyroïdiennes responsable de la sécrétion de calcitonine (38).

Les souris avec une invalidation du récepteur au GLP-1 (GLP-1R KO) ont des altérations de la masse osseuse et des microarchitectures trabéculaires et corticales ainsi qu'une diminution de la résistance osseuse avec des altérations de la maturité du collagène (37,39).

L'administration d'un agoniste du GLP-1 dans des modèles pré-cliniques de fragilité osseuse entraîne des améliorations de la microarchitecture trabéculaire, des constituants matriciels et de la résistance osseuse (28,40).

Chez l'Homme l'administration de GLP-1 exogène n'entraîne pas de diminution du CTX (5).

L'utilisation en diabétologie d'agoniste du GLP-1 ne semble pas modifier le risque fracturaire (41,42).

TRAVAUX DE RECHERCHE BIOLOGIQUE

Au cours de mon internat, j'ai effectué des travaux de recherche biologique au sein du laboratoire Groupe d'Etude du Remodelage Osseux et bioMatériaux. Je rapporte ici l'article issu de mon travail de recherche.

1. Introduction

Bone is a living mineralized material, highly complex and constantly remodeled in mass and architecture to adapt and repair damages induced by growth, ageing and mechanical and metabolism stresses.

Bone constitutes the main calcium and phosphorus reservoir from the body. The calcium and phosphorus bone stock is used to maintain calcemia and phosphatemia and is accessible by bone remodeling, a spatio-temporal coupling between bone-resorbing cells, osteoclasts, and, bone-forming cells, osteoblasts. Bone remodeling is complex and tightly regulated by a network of local, hormonal and nervous factors that act on bone cells and results on modifications of bone quantity but also of bone quality, a term that, independently of bone mass, represents all factors that support bone strength.

A role for the enteroendocrine system in bone remodeling has been previously suggested with the evidence that the modulation of serum markers of bone resorption is mirrored with the profile of gut hormone release after a meal [1]. Enteroendocrine system includes approximately 12 enteroendocrine cell (EEC) types, discriminated by their main secretion products, widely distributed throughout the gastrointestinal tract [2]. EEC are restricted to the intestine epithelium where they constitute the largest endocrine organ in the human body [3]. Among all EECs, K-cells, located in the proximal small intestine [4] have been suspected to play an active role on bone remodeling after a meal and to modify bone quantity and quality [5, 6]. The main secretion product of K-cell is represented by glucose-dependent insulinotropic



polypeptide (GIP). GIP secretion is modulated by the presence of nutrients in the intestinal lumen [7]. Preclinical studies suggested a positive role of GIP on bone quality, however, conflicting results have been obtained regarding bone mass [8] [9, 10]. Recent evidences suggest also that other secretion products may be release from K-cells. Among them, xenin represents a suitable candidate. Xenin is structurally related to neurotensin [11] and induces its biological activity binding to neurotensin receptor [12]. Several roles of xenin has been described in the past three decades. It acts on intestinal peristalsis [13], induces gallbladder contraction [14], stimulates exocrine pancreas secretion [15], increases vascular permeability [16], decreases feed intake [17] and potentiates GIP-mediated insulin release [18]. As such, previous bone phenotype observed in GIP receptor-deficient mice might be solely due to lack of GIP signaling pathway as originally suspected or might reflect additional effects of GIP deficiency and action of xenin.

The aims of the present study were to decipher the role of K-cell and K-cell products in bone physiology. We studied the bone phenotype of GIP-DT mice, which consists in deletion of K-cells, GIP-GFP-KI mice, which consists in deficiency in GIP production and secretion, and xenin-injected swiss NIH mice. GIP and xenin seems to exhibit opposite effects on bone physiology.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male GIP-GFP KI (n=8) and GIP-DT (n=8) mice at 16 weeks of age were used in this study. GIP-GFP KI mice and GIP-DT were generated on a C57BL/6 background as described previously [19, 20]. Age and sex matched wild-type littermates (WT) were used as controls. 21-week-old NIH swiss male were obtained from Envigo (Wooley Road, Huntington, Alconbury PE28 4HS, UK). Male swiss mice were randomly allocated into two groups (n=6/group) that received Xenin (25nmol/kg) or saline vehicle (0.09% NaCl) once daily for 6 weeks. The animals were

maintained in a 12 h:12 h light:dark cycle and had free access to water and food. This protocol was approved by the respective Institutional animal care and use committees of the University of Kyoto (Kyoto, Japan), University of Washington (Saint-Louis, MO) and University of Ulster (Coleraine, UK).

2.2. Isolation and osteoclast generation from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs were isolated from 3 buffy coats obtained at the Etablissement Francais du Sang (Angers, France) as previously described [21]. Blood was diluted 1:1 in α -minimal essential medium (MEM) (Invitrogen, Paisley, UK), layered over Histopaque and centrifuged (700 x g) for 20 min. The interface layer was resuspended in MEM then centrifuged (600 x g) for a further 10 min after which the resultant cells were resuspended in media supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS, Invitrogen, Paisley, UK) and counted in a haemocytometer following lysis of red blood cells using a 5% (v/v) acetic acid solution. To assess the extent of osteoclast formation and activation, isolated human PBMCs were cultured either in 24-well plates or collagen-coated 24 well plates at a concentration of 2×10^6 PBMCs/ml in MEM containing 100 UI/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% FCS (osteoclast medium) [22]. After 2 h incubation, cultures were vigorously rinsed in medium to remove non-adherent cells, and then maintained in 1 ml MEM/FCS with 25 ng/ml recombinant human M-CSF, 100 ng/ml recombinant human sRANKL (added at day 7) and various concentrations of Xenin.

2.3. X-ray microcomputed tomography

MicroCT analysis was performed at the left tibia with a Skyscan 1172 microtomograph (Bruker-Skyscan, Kontich, Belgium) equipped with an X-ray tube working at 69 kV/100 μ A. The isotropic pixel size was fixed at 3.75 μ m, the rotation step at 0.25° and exposure was

performed with a 0.5-mm aluminum filter. Bone mass and microarchitecture of metaphyseal proximal tibia and distal femur were determined with CTan software (release 1.11.4.2). The Volume Of Interest (VOI) was located 0.5mm below the growth plate on a height of 2mm (534 sections). Trabecular bone volume (BV/TV3D, in %), trabecular thickness (Tb.Th3D, in μm), trabecular number (Tb.N, in $1/\mu\text{m}$), trabecular separation (Tb.Sp, in μm), trabecular pattern factor (Tb.Pf) and structure model index (SMI) were measured according to guidelines and nomenclature proposed by the American Society for Bone and Mineral Research [23]. Analysis of cortical microarchitecture was performed 3mm below the growth plate. External bone diameter (B.Dm in mm), marrow diameter (Ma.Dm in mm), cortical thickness (Ct.Th in μm), and cross-sectional moment of inertia (CSMI in mm^4) were measured with a lab-based routine made with ImageJ 1.45 s (NIH, Bethesda, MD) according to guidelines and nomenclature proposed by the American Society for Bone and Mineral Research [23].

2.4. Three-points bending test

Three-point bending experiments were performed on the right femurs. Before mechanical testing, bones were rehydrated in saline for 24 hours at room temperature as described elsewhere. Three-point bending strength was measured with a constant span length of 20 mm. The press head as well as the two support points were rounded to avoid shear load and cutting. Bones were positioned horizontally with the posterior surface facing upward, centered on the support and the pressing force was applied vertically to the midshaft of the bone. Each bone was tested with a loading speed of $2 \text{ mm}/\text{min}^{-1}$ until failure with a 500N load cell on an Instron 5942 device (Instron, Elancourt, France). The load-time curve obtained was converted into a load-displacement curve by the Bluehill 3 software (Instron). Ultimate load and ultimate displacement were respectively defined as the maximum load and maximum displacement recorded before breakdown of the bone. Stiffness was calculated as the slope of the elastic

deformation of the bone. The total absorbed energy was defined as the total area under the load-displacement curve and represented the total energy absorbed by the midshaft femur [24].

2.5. Bone histomorphometry

Tibias were embedded, undecalcified in poly (methylmethacrylate) (pMMA) at 4°C to preserve enzyme activities. Sections (4- μ m thickness) were performed on a heavy-duty microtome equipped with a 50° tungsten carbide knife. For each animal, several sections were stained for the osteoclastic tartrate resistant acid phosphatase (TRAcP). TRAcP identification is based on a histoenzymatic detection with a simultaneous azo-dye coupling method, bone being counterstained with phosphomolybdic aniline blue and was performed at an original magnification of $\times 200$ [25]. Only TRAcP-positive nucleated cells in contact with bone were counted as osteoclasts. The region of interest (ROI) was located in the secondary spongiosa 0.5 mm below the growth plate on a height of 2 mm. Standard bone histomorphometrical nomenclatures, symbol and units were used as described in the report of the American Society for Bone and Mineral Research [26].

2.6. Quantitative backscattered electron imaging (qBEI)

Quantitative backscattered electron imaging was employed on the femurs to determine the bone mineral density distribution (BMDD) as previously reported [27]. Polymethylmethacrylate blocks were polished to a 1- μ m finish with diamond particles, carbon-coated and observed with a scanning electron microscope (EVO LS10, Carl Zeiss Ltd., Nanterre, France) equipped with a five quadrants semi-conductor backscattered electron detector. The microscope was operated at 20 keV with a probe current of 250 pA and a working distance of 15 mm. The backscattered signal was calibrated using pure carbon ($Z = 6$, mean gray level = 25), pure aluminum ($Z =$

13, mean gray level = 225) and pure silicon (Z = 14, mean gray level = 253) standards (Micro-analysis Consultants Ltd., St. Ives, UK). For these contrast/ brightness settings, the BSE gray level histogram was converted into weight percentage of calcium. Eventual changes in brightness and contrast due to instrument instabilities were checked by monitoring the current probe and imaging the reference material (C, Al and Si) every 15 min. The cortical bone area was imaged at a 200× nominal magnification, corresponding to a pixel size of 0.5 µm per pixel. The region of interest corresponded to 2-mm centered in the midshaft femur (6 mm below the growth plate). The gray levels distribution of each image was analyzed with a lab-made routine using ImageJ. Three variables were obtained from the bone mineral density distribution: Ca_{peak} is the most frequently observed calcium concentration, Ca_{mean} is the average calcium concentration and Ca_{width} is the width of the histogram at half maximum of the peak.

2.7. Nanomechanical testing

As nanoindentation assesses volume of material at a length scale less than that of individual microstructural features in bone, this technique avoids confounding factors such as bone microarchitecture and porosity that affect tissue properties at larger length scales. Tests were performed on the same sample and same location as qBEI measurements. Briefly, femurs were rehydrated for 24h in saline prior to nanoindentation testing. Eight indents were positioned in cortical bone with a NHT-TTX system (CSM, Peseux, Switzerland) equipped with a Berkowitch diamond probe. The indents were made up to a depth of 900 nm with a loading/ unloading rate of 40 mN/min. At maximum load, a holding period of 15 seconds was applied to avoid creeping of the bone material. Maximum load, indentation modulus, hardness and dissipated energy were determined according to Oliver and Pharr.

2.8. Fourier Transform Infrared Microscopy (FTIR)

Sections of 4 μm thickness were cut dry on a heavy-duty microtome equipped with a tungsten carbide knife (Leica Polycut S) and sandwiched between BaF₂ optical windows. Spectral analysis was performed using a Bruker Vertex 70 spectrometer (Bruker optics, Ettlingen, Germany) interfaced with a Bruker Hyperion 3000 infrared microscope equipped with a standard single element Mercury Cadmium Telluride (MCT) detector. Infrared spectra were recorded at a resolution of 4 cm^{-1} , with an average of 32 scans in transmission mode in the same location as qBEI and nanoindentation. Background spectral images were collected under identical conditions from the same BaF₂ windows at the beginning and end of each experiment to ensure instrument stability. For FTIRM analysis, 12 spectra were acquired between double calcein labels and analyzed with the Opus Software (release 6.5, Bruker) as reported in details previously [28]. The evaluated parameters were (i):

-mineral-to-matrix ratio, calculated as the ratio of integrated areas of the phosphate ν_1 , ν_3 band at 900–1200 cm^{-1} and the amide I band located at 1585–1725 cm^{-1} [29]; (ii)

-mineral maturity, which reflects the apatite size and perfection, calculated as the ratio of the relative intensity of subbands at 1020 and 1030 cm^{-1} of the phosphate band [30]; (iii)

-carbonate-to-phosphate ratio, that corresponds to the carbonate substitution in the bone mineral, calculated as the ratio between the ν_2 carbonate band, located at 820 cm^{-1} and 890 cm^{-1} and the phosphate ν_1 , ν_3 band; and (iv)

-collagen maturity, determined as the relative ratio of pyridinium trivalent (Pyr, mature collagen) to dehydrodihydroxylysinoxynorleucine divalent (deH-DHLNL, new collagen) collagen cross-links using their respective subbands located at 1660 cm^{-1} and 1690 cm^{-1} of the Amide I peak [29]

Then bone sections were demineralized with EDTA during 7 days. EDTA solution was changed every 72 hours. Demineralized sections were sandwiched between BaF₂ optical windows.

Spectral analysis was performed in the same locations as performed with mineralized sections due to overimposition of images with double calcein labels taken prior to demineralization. The evaluated parameters were (i):

-collagen integrity, determined as the area ratio of the 1338cm^{-1} over the Amide 2 region [28];

(ii)

-collagen glycation, investigated as the intensity ratio of the 1032cm^{-1} over the Amide 1 region [28]; and (iii)

-proteoglycan content, calculated as the area ration between subband located at 1064cm^{-1} and Amide 1.

2.9. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Non-parametric Mann-Whitney U-test was used to compare the differences between the groups using the GraphPad Prism statistical software (release 5.01, La Jolla, USA). Differences at $p < 0.05$ were significant.

3. Results

GIP-DT mice do not exhibit major alterations of bone tissue

First, bone strength was assessed at the organ level by three-point bending. Interestingly, GIP-DT mice did not exhibit any alteration of bone strength as compared with WT littermates (Table 1).

Furthermore, no modifications of either the trabecular or cortical microarchitectures were evidenced (Figure 1).

	GIP-DT	WT	P
Maximum Load (N)	16.14	15.96	0.61
Ultimate Displacement (mm)	0.95	0.97	0.78
Stiffness (N/mm)	80.38	73.55	0.28
Work to fracture (N.mm)	8.99	8.36	0.45

Table 1 : three-point bending parameters of GIP-DT mice

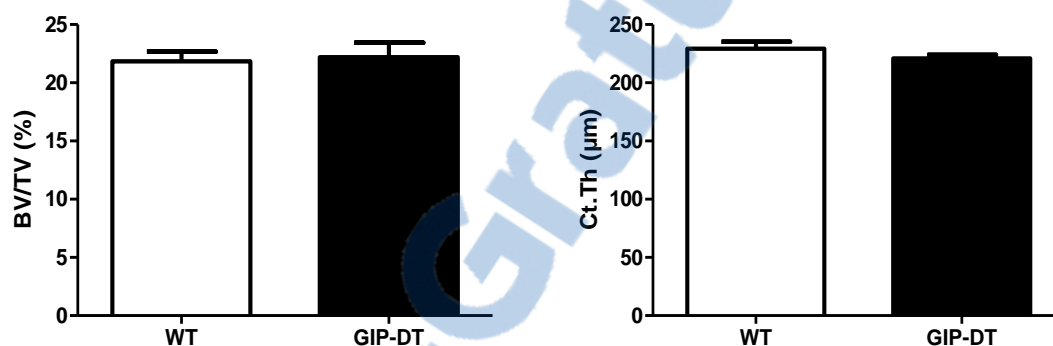


Figure 1 : microcomputed tomography results of GIP-DT mice

At the cellular level, both bone formation and bone resorption parameters were similar with those of WT littermates.

The intrinsic bone matrix properties were assessed by nanoindentation. At the tissue level, GIP-DT had no significant alterations of mechanical properties (Table 2), tissue bone mineral density, mineral-to-matrix ratio or mineral maturity (Figure 2).

However, a significant 25% augmentation in collagen maturity and an 18% diminution in collagen integrity with no modification in collagen glycation were observed (Figure 3).

	GIP-DT	WT	P
Indentation modulus (GPa)	9.98	10.17	0.86
Hardness (MPa)	458.77	473.72	1.00
Maximum load (mN)	8.47	8.66	0.95
Dissipated energy	2126.63	2186.69	1.00

Table 2 : nanoindentation parameters of GIP-DT-mice

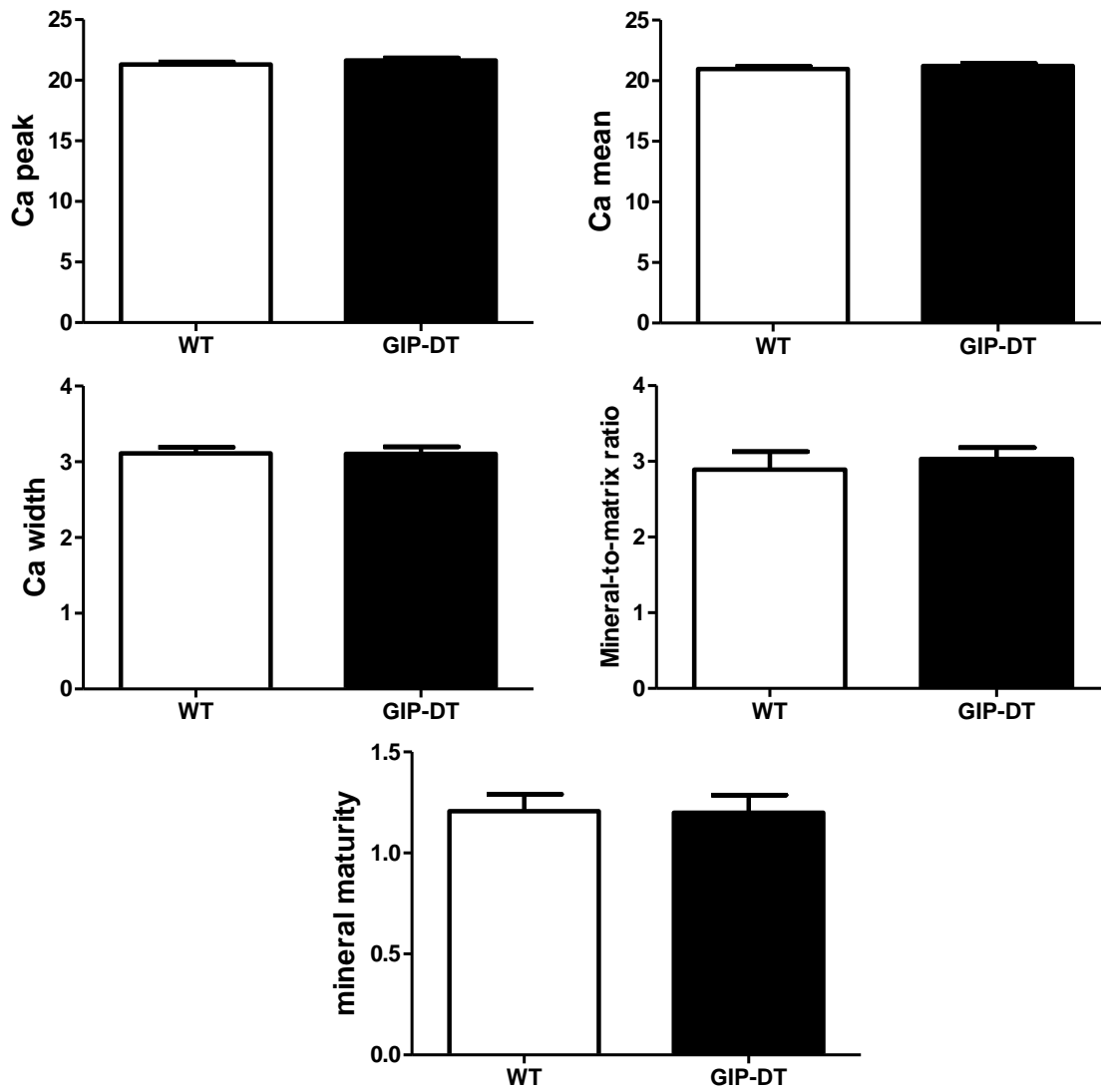


Figure 2 : mineral phase of GIP-DT mice. qBEI and FTIR results.

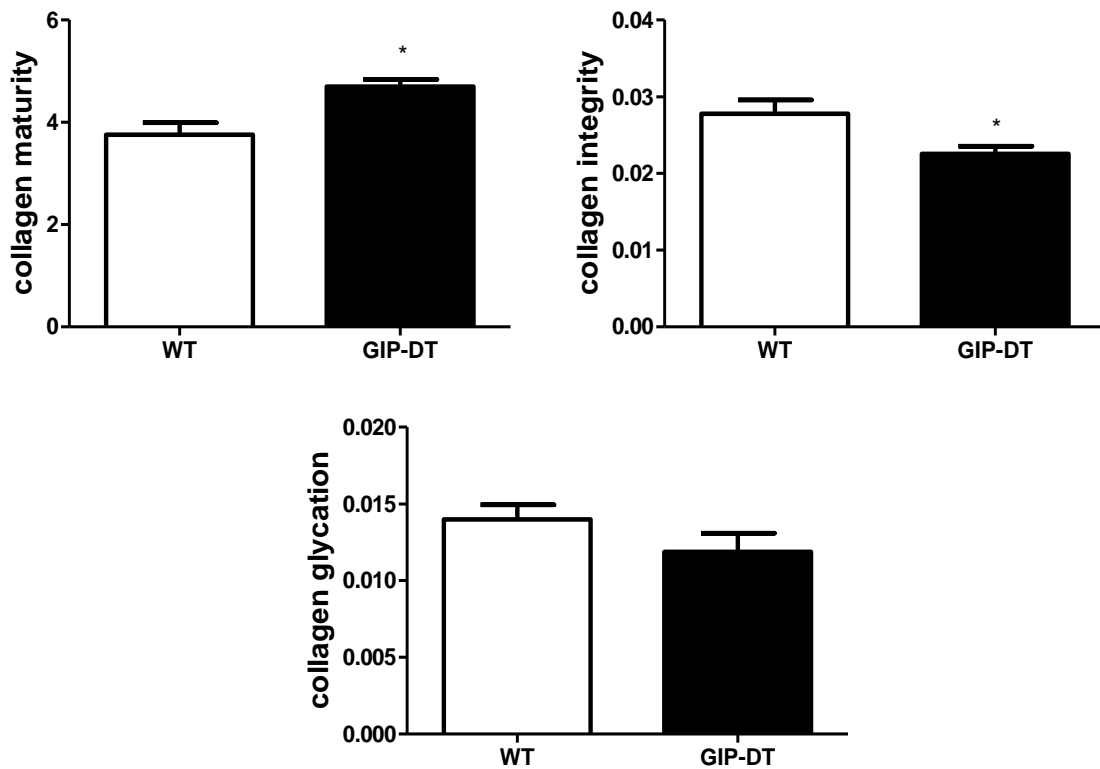


Figure 3 : organic matrix of GIP-DT mice. FTIR results.

GIP-GFP-KI mice and mice injected with Xenin presented alteration of mechanical properties

Decreased ultimate load and stiffness were observed in GIP-GFP-KI and xenin-injected mice as compared to respective controls (Table 3). These decreases were only significant in xenin-injected mice.

	GIP-GFP-KI	WT	p	Xenin	Saline	p
Maximum Load (N)	14.87	15.85	0.16	16.92	18.44	0.03
Ultimate Displacement (mm)	1.17	0.95	0.53	0.586	0.642	0.59
Stiffness (N/mm)	67.99	75.15	0.07	71.37	83.57	<0.01
Work to fracture (N.mm)	9.44	9.53	0.94	6.83	6.98	0.94

Table 3 : three-point bending results for GIP-GFP-KI mice and mice injected with Xenin

GIP deficiency and Xenin injections led to identical alterations in trabecular microarchitecture

In GIP-GFP-KI, BV/TV was reduced significantly by 28% ($p < 0.001$) with a significant 23% decrease in trabecular numbers ($p < 0.001$), a 11% increase in trabecular separation ($p = 0.007$) and no alteration in trabecular thickness.

In xenin-injected mice, BV/TV was reduced significantly by 13% ($p = 0.05$) as compared with mice injected with saline. Trabecular number was significantly decreased by 18% ($p = 0.05$) and trabecular separation was significantly increased by 15% ($p = 0.03$). No alteration of trabecular thickness was observed (Figure 4).

Cortical microarchitecture was not affected in both mice models.

The number of osteoclasts was significantly 26% higher in GIP-GFP-KI mice compared to WT littermates whereas bone formation parameters were identical between these two groups.

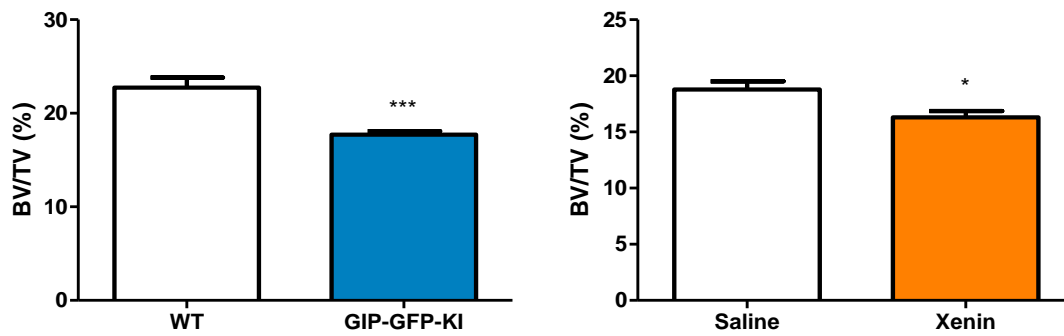


Figure 4 : microcomputed tomography results of GIP-GFP-KI mice and mice injected-xenin

GIP deficiency and Xenin injections led to modifications in bone quality

GIP-GFP-KI animals exhibited a significant reduction in bone strength at the tissue level as evidenced by significant lower value for the maximum load (-17%, $p=0.038$). Xenin injections increased significantly maximum load (+17%, $p=0.02$) and indentation modulus (+15%, $p=0.02$) (Table 4).

	GIP-GFP-KI	WT	P	Xenin	Saline	P
Indentation modulus (GPa)	12.28	12.86	0.62	13.91	12.09	0.02
Hardness (MPa)	548.83	606.62	0.17	698.95	571.17	0.07
Maximum load (mN)	9.71	11.60	0.038	12.15	10.37	0.02
Dissipated energy	2738.11	3006.16	0.46	2723.8	2556.43	0.23

Table 4 : nanoindentation parameters of GIP-GFP-KI mice and injected-Xenin mice

Tissue bone mineral densities, mineral-to-matrix ratio at site of bone formation and mineral maturity were similar in all studied groups of mice (Figure 5).

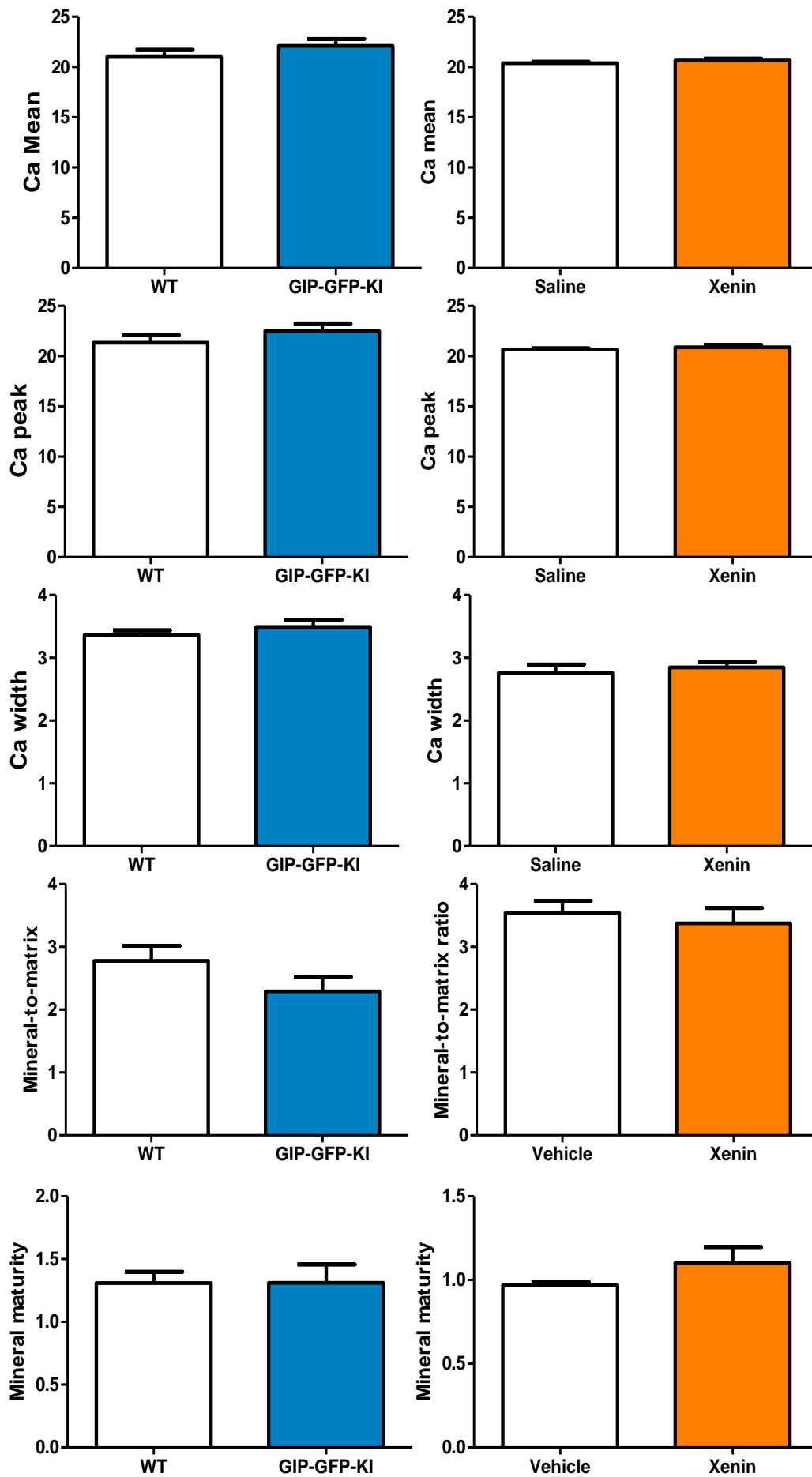


Figure 5 : mineral phase of GIP-GFP-KI mice and injected-xenin mice. qBEI and FTIR

On the other hand, GIP-GFP-KI animals presented with a significant 20% decrease in collagen maturity ($p=0,018$), 25% decrease in collagen integrity ($p=0,014$) and 38% increase in collagen glycation. Xenin-injected mice exhibited a significant 37% decrease in collagen maturity ($p<0,01$) and a 22% increase in collagen glycation ($p=0,06$). Collagen integrity was not affected by Xenin injections (Figure 6). Proteoglycan contents were not affected in both mice model.

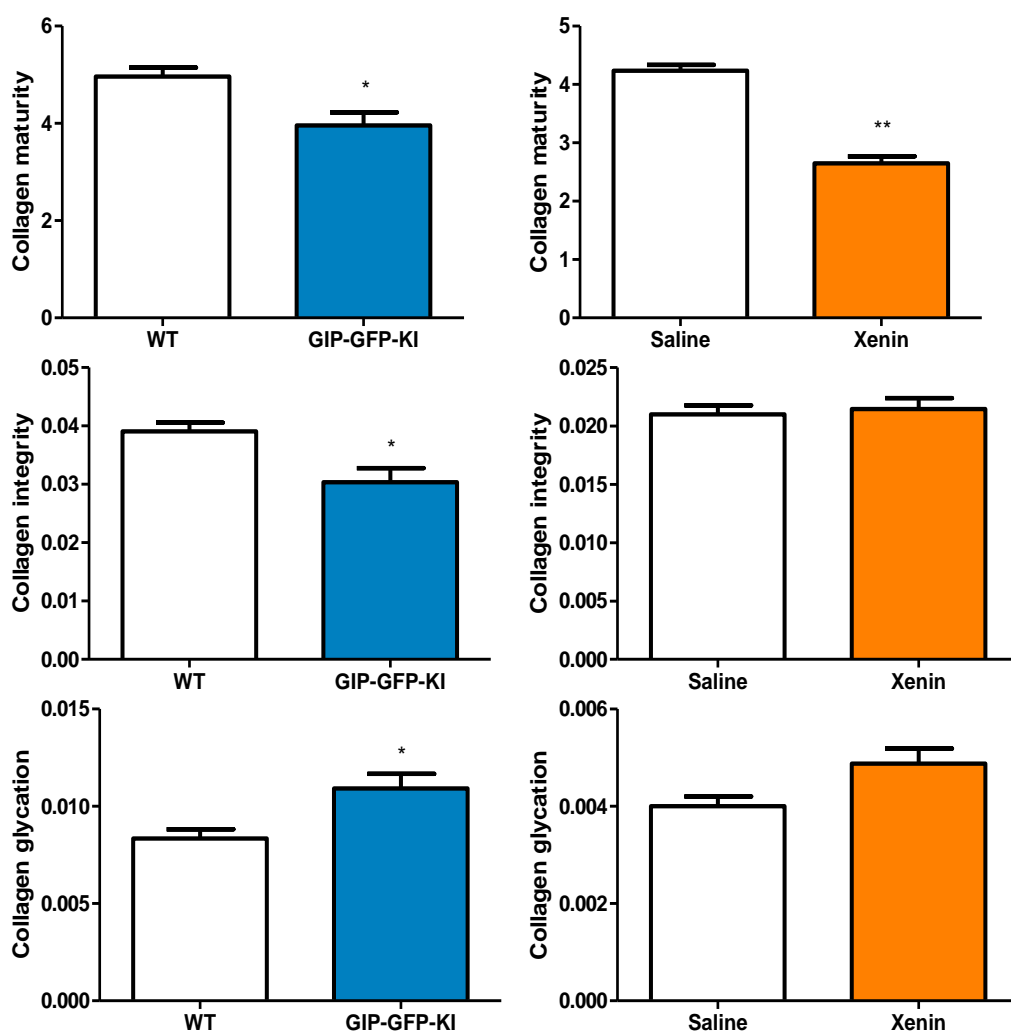


Figure 6 : organic matrix of GIP-DT mice. FTIR results.

Xenin did not act on osteoclastogenesis

Osteoclasts culture was not modified by Xenin Addition (Figure 7)

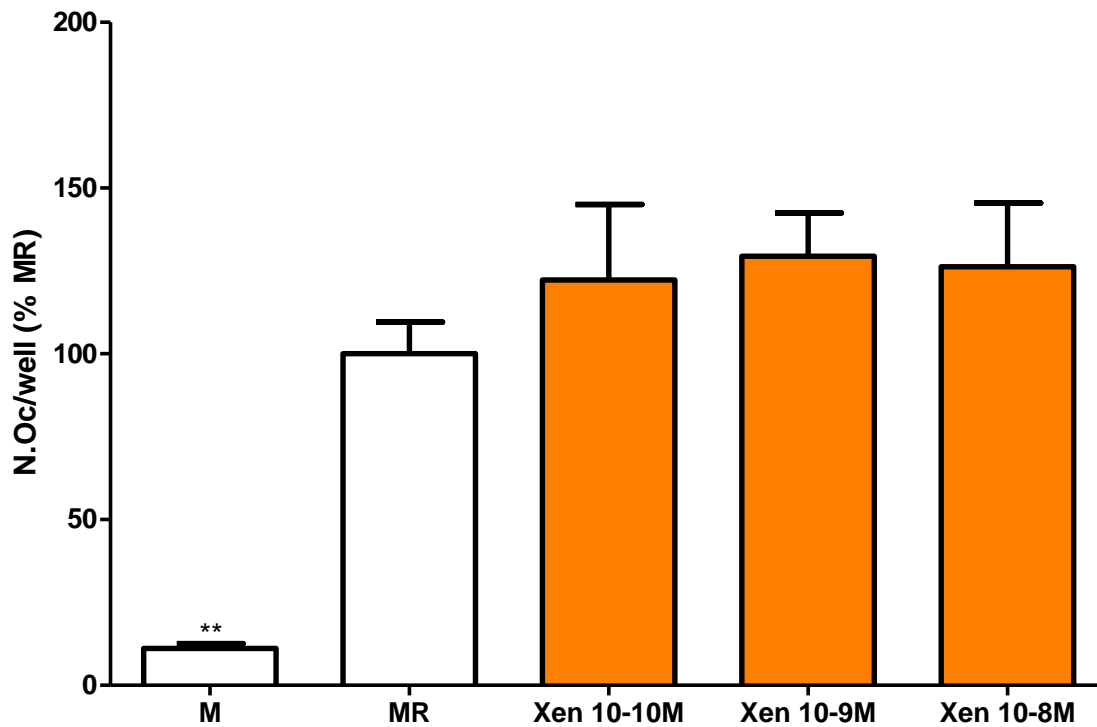


Figure 7 : osteoclast presursor were cultured in the presence of M-CSF (M), MCSF + RANKL (MR) or M-CSF + RANKL + Xenine.

4. Discussion

Bone remodeling is a complex process subjected to regulation from various molecules. The concept of control bone microarchitecture and quality by the gastro-intestinal tract has emerged in the last decade. In the present study, the role of GIP and Xenin both secreted by K-cells, in controlling bone microarchitecture and quality, was investigated.

At the organ level, we evidenced an opposite role of GIP and Xenin. Indeed, GIP deficiency led to the identical phenotype of animals injected with Xenin: decreased BV/TV associated with a decrease in trabecular number and an increase in trabecular separation. These opposite roles could explain the bone phenotype observed in GIP-DT mice where ablation of K-cells led to no secretion of either GIP and xenin. Furthermore, this study suggests also that the major site of action of GIP and xenin on bone microarchitecture is trabecular bone.

Three-point bending, performed on the midshaft femur revealed alterations of mechanical properties in mice injected with Xenin and in GIP-GFP-KI but none in GIP-DT mice. These deteriorations were only significant in mice injected with Xenin. It was close to significance with GIP-GFP-KI, probably due to a lack of power. In the light of no alteration of cortical microarchitecture, these modifications of bone strength support modifications of bone quality. Indeed, GIP-GFP-KI presented with a decrease in maximum load and hardness whereas mice injected with Xenin exhibited an increase in maximum load. Interestingly, GIP-DT did not exhibit any alteration. Owing to the nanocomposite composition of bone matrix any of the collagen or mineral phase could be involved in these modifications in intrinsic material properties. No alteration of mineral content, distribution or maturity was observed in the three mice models.

On the other hand, modifications of the organic matrix were observed in these three mice models as compared to their respective controls. For instance, GIP-deficient animals and xenin-injected mice presented with a decrease in collagen maturity and an increase in collagen glycation. Moreover GIP-deficient animals had a decrease in collagen integrity.

In the GIP-DT mice model, an increase in collagen maturity and a decrease in collagen integrity were observed and could not completely explained by the opposite action of GIP and Xenin. Recent evidences suggest that in opposition to the dogma that an enteroendocrine cell produce

one or two secretory products, K-cells might secrete other factors such as cholecystokinin, secretin, somatostatin, peptide YY that might play a role in bone remodeling [31].

At the organ level, we evidenced the opposite role between GIP and Xenin. To the best of our knowledge it is the first study trying to decipher the role of Xenin in bone physiology. As confirmed by cultured cells, Xenin did not act directly on osteoclast. Xenin seems to exert its biological activity binding Neurotensin Receptors (NTS1R) [12]. Indeed, the anorexigenic effect of Xenin is abolished in NTS1R deficient mice [32]. To date Neurotensin Receptors were not found at the surface of osteoclast or osteoblast. Maybe, Xenin acts on bone remodeling using neural pathways. Indeed, its anorexigenic effect seems to be mediated by central nervous system [17, 33, 34]. Intracerebroventricular and intrahypothalamic injection of xenin decreases food intake. Intraperitoneal injections of xenin increases the number of Fos-immunoreactive cells in several hypothalamic nuclei. This central action of xenin is also confirmed in lipid metabolism [35].

GIP-GFP-KI mice had an augmentation in collagen glycation which could be explained by hypoinsulinism of these animals [36]. The resulting hyperglycemia could produce non-enzymatic reticulation and alter biomechanical properties of matrix [37].

In GIP-GFP-KI and in GIP-DT mice there was a significant decrease in collagen integrity. In type 1 diabetes mice model, a decreased collagen integrity was reported [38]. The addition of exogenous GIP increases collagen integrity without modifying hypoinsulinism suggesting that GIP can act on this parameter independently of insulin [8].

Through this study, we have demonstrated an opposite role of GIP and Xenin at the organ level. At the tissue level, the influence of K cells on bone remodeling requires further investigations.

5. Bibliography

1. Henriksen DB, A.P., Bjarnason NH, Vilsbøll T, Hartmann B, Henriksen EE, Byrjalsen I, Krarup T, Holst JJ, Christiansen C, *Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(12): p. 2180-2189.
2. Furness, J.B., et al., *The gut as a sensory organ*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(12): p. 729-40.
3. Sternini, C., L. Anselmi, and E. Rozengurt, *Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2008. **15**(1): p. 73-8.
4. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 153-65.
5. Torekov, S.S., et al., *A functional amino acid substitution in the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) gene is associated with lower bone mineral density and increased fracture risk*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(4): p. E729-33.
6. Nissen, A., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide inhibits bone resorption in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(11): p. E2325-9.
7. Creutzfeldt, W., *The incretin concept today*. Diabetologia, 1979. **16**(2): p. 75-85.
8. Mansur, S., et al., *Stable incretin mimetics counter rapid deterioration of bone quality in type 1 diabetes mellitus*. J cell Physiol, 2015. **in press**.
9. Xie, D., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover*. Bone, 2005. **37**(6): p. 759-69.
10. Gaudin-Audrain, C., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor deficiency leads to modifications of trabecular bone volume and quality in mice*. Bone, 2013. **53**(1): p. 221-30.
11. Araki, K., et al., *Isolation and structure of a new active peptide xenopsin on rat stomach strip and some biogenic amines in the skin of Xenopus laevis*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1975. **23**(12): p. 3132-40.
12. Clemens, A., et al., *Relaxant effect of xenin on rat ileum is mediated by apamin-sensitive neurotensin-type receptors*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. G190-6.
13. Feurle, G.E., et al., *Neurokinetic and myokinetic effects of the peptide xenin on the motility of the small and large intestine of guinea pig*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(2): p. 654-61.
14. Kamiyama, Y., et al., *The peptide hormone xenin induces gallbladder contractions in conscious dogs*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(3): p. 233-40.
15. Feurle, G.E., et al., *Xenopsin stimulates exocrine pancreatic secretion in the dog*. Experientia, 1982. **38**(6): p. 679-80.
16. Nustede, R., et al., *On the effect of xenin and xenin fragments on exocrine pancreas secretion in vivo*. Regul Pept, 1999. **81**(1-3): p. 61-6.
17. Cline, M.A., W. Nandar, and J.O. Rogers, *Xenin reduces feed intake by activating the ventromedial hypothalamus and influences gastrointestinal transit rate in chicks*. Behav Brain Res, 2007. **179**(1): p. 28-32.
18. Wice, B.M., et al., *Xenin-25 potentiates glucose-dependent insulinotropic polypeptide action via a novel cholinergic relay mechanism*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 19842-53.

19. Suzuki, K., et al., *Transcriptional regulatory factor X6 (Rfx6) increases gastric inhibitory polypeptide (GIP) expression in enteroendocrine K-cells and is involved in GIP hypersecretion in high fat diet-induced obesity.* J Biol Chem, 2013. **288**(3): p. 1929-38.
20. Althage, M.C., et al., *Targeted ablation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-producing cells in transgenic mice reduces obesity and insulin resistance induced by a high fat diet.* J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18365-76.
21. Mabileau, G. and A. Sabokbar, *Interleukin-32 promotes osteoclast differentiation but not osteoclast activation.* PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4173.
22. Mabileau, G., D. Chappard, and A. Sabokbar, *Role of the A20-TRAF6 axis in lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis.* J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3242-9.
23. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(7): p. 1468-86.
24. McNamara, L.M., et al., *Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing.* Bone, 2006. **39**(2): p. 392-400.
25. Chappard, D., C. Alexandre, and G. Riffat, *Histochemical identification of osteoclasts. Review of current methods and reappraisal of a simple procedure for routine diagnosis on undecalcified human iliac bone biopsies.* Basic Appl Histochem, 1983. **27**(2): p. 75-85.
26. Dempster, D.W., et al., *Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.* J Bone Miner Res, 2013. **28**(1): p. 2-17.
27. Roschger, P., et al., *Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies.* Bone, 1998. **23**(4): p. 319-26.
28. Mieczkowska, A., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) directly affects collagen fibril diameter and collagen cross-linking in osteoblast cultures.* Bone, 2015. **74C**: p. 29-36.
29. Paschalis, E.P., et al., *Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone.* J Bone Miner Res, 2001. **16**(10): p. 1821-8.
30. Paschalis, E.P., et al., *FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone.* Calcif Tissue Int, 1996. **59**(6): p. 480-7.
31. Habib, A.M., et al., *Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry.* Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3054-65.
32. Kim, E.R. and T.M. Mizuno, *Role of neurotensin receptor 1 in the regulation of food intake by neuromedins and neuromedin-related peptides.* Neurosci Lett, 2010. **468**(1): p. 64-7.
33. Cooke, J.H., et al., *Peripheral and central administration of xenin and neurotensin suppress food intake in rodents.* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(6): p. 1135-43.
34. Leckstrom, A., et al., *Xenin, a gastrointestinal peptide, regulates feeding independent of the melanocortin signaling pathway.* Diabetes, 2009. **58**(1): p. 87-94.
35. Bhavya, S., P.S. Lew, and T.M. Mizuno, *Central action of xenin affects the expression of lipid metabolism-related genes and proteins in mouse white adipose tissue.* Neuropeptides, 2017. **63**: p. 67-73.
36. Nasteska, D., et al., *Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions.* Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2332-43.
37. Vashishth, D., *The role of the collagen matrix in skeletal fragility.* Curr Osteoporos Rep, 2007. **5**(2): p. 62-6.
38. Mieczkowska, A., et al., *Alteration of the bone tissue material properties in type 1 diabetes mellitus: A Fourier transform infrared microspectroscopy study.* Bone, 2015. **76**: p. 31-39.

CONCEPTION DU PROJET CLINIQUE

1. Etat des connaissances

Chez l'Homme, le rôle des incrétines a été étudié dans la physiologie du diabète. Nous ne connaissons pas leur effet sur le tissu osseux. Leur concentration chez le sujet sain est également inconnue.

La concentration sérique des incrétines est basse à jeun et augmente rapidement après l'alimentation. Cette augmentation est brève, les incrétines étant rapidement dégradées par la DPP-4. Le dosage de ces hormones est ainsi complexe. Avant toute étude portant sur l'effet des incrétines sur le remodelage osseux chez l'Homme, il est nécessaire d'estimer les concentrations physiologiques d'incrétines chez le sujet sain.

J'ai rédigé et soumis au Comité de Protection des Personnes (CPP) du CHU d'Angers un protocole pour une étude visant à estimer les concentrations physiologiques des incrétines chez le sujet sain (objectif primaire de l'étude).

Les objectifs secondaires de l'étude seront :

- de corrélérer les concentrations d'incrétines et les valeurs de densité minérale osseuse
- d'analyser en parallèle l'évolution des concentrations plasmatiques d'incrétines, des marqueurs du remodelage osseux et des marqueurs du métabolisme phospho-calciques en fonction de la prise alimentaire.

2. Matériels et Méthode

2.1. Population étudiée

Cette étude portera sur des sujets sains. Les sujets seront recrutés au Centre de Recherche Clinique du CHU d'Angers, coordonné par le Pr Marc-Antoine CUSTAUD et dans le service de rhumatologie parmi les patients hospitalisés ou se présentant en consultation pour des pathologies mécaniques n'interférant pas avec le remodelage osseux. Le Pr Marc-Antoine

Rapport-gratuit.com
LE NUMÉRO 1 MONDIAL DES MÉMOIRES

CUSTAUD a préalablement constitué une cohorte de sujets sains volontaires pour participer à la Recherche Clinique.

Les sujets éligibles seront contactés directement. La lettre d'information leur sera remise. Après un délai de réflexion, s'ils acceptent de participer à l'étude, la visite d'inclusion sera organisée.

Lors de la visite d'inclusion (V0), si le sujet remplit les critères de sélection de l'étude, son consentement est recueilli par l'investigateur après un entretien. Le formulaire de consentement éclairé est signé au moins en 2 exemplaires par les différentes parties.

Les critères d'inclusion sont : hommes et femmes âgés de 30 à 70 ans en mesure de donner leur consentement.

Les critères de non inclusion sont : ostéoporose densitométrique et/ou fracturaire connue, tabagisme actif ou sevré depuis moins d'un an, consommation de plus de 2 verres d'alcool par jour, diabète type 1 et 2 connue, obésité ($IMC > 30\text{kg/m}^2$), insuffisance cardiaque ($> NYHA III$) connue, cirrhose connue, insuffisance rénale (clairance créatininémie $< 30\text{ ml/minute}$) connue, pathologie tumorale, inflammatoire, ou infectieuse active, l'exérèse d'une portion d'intestin, un antécédent de chirurgie bariatrique, la grossesse, l'allaitement, greffe d'organe solide ou de moelle osseuse, prise dans l'année qui précède d'un traitement modifiant le remodelage osseux (bisphosphonates, raloxifène, traitement hormonal de la ménopause, denosumab, tériparatide, corticothérapie per os ou intra-veineuse pendant plus de 3 mois consécutifs, hormonothérapie dans le traitement de la ménopause, du cancer du sein ou de la prostate). Les critères de non inclusion permettent d'exclure les patients présentant une pathologie ou un état de santé influençant le remodelage osseux. Ils permettent également d'exclure les patients pouvant avoir un trouble de la sécrétion des incrétones comme l'exérèse d'une portion d'intestin et la chirurgie bariatrique.

Les critères d'exclusion sont : la découverte d'un diabète ou d'une insuffisance rénale de stade sévère (clairance MDRD de la créatinine < 30mL/min) sur le bilan sanguin prélevé à l'inclusion, la découverte d'une ostéoporose densitométrique (T-score < 2,5 au site lombaire ou fémoral) et/ou fracturaire (découverte d'au moins une fracture vertébrale sur la Vertebral Fracture Assesment) sur l'ostéodensitométrie réalisée le jour de l'inclusion ainsi que la découverte d'une grossesse en cours grâce au test urinaire réalisé chez les femmes en âge de procréer.

Le nombre de sujets nécessaires pour cette étude n'est pas calculable car nous ne connaissons pas, à l'heure actuelle, la variabilité inter-individuelle des concentrations d'incrétines chez des sujets sains. Le nombre de sujets à inclure a été estimé à 120 en se référant aux études ayant permis de valider les normes de la concentration des marqueurs du remodelage osseux. 15 sujets de sexe féminin et 15 sujets de sexe masculin sont à inclure par tranche de 10 ans de 30 à 70 ans (30-40 ans ; 40-50 ans ; 50-60 ans ; 60-70 ans).

2.2. Protocole

Chaque sujet se prêtant à cette étude passera une matinée au CHU d'Angers (V1). Il se rendra par ses propres moyens au Centre de Recherche Clinique du CHU d'Angers. Il devra être à jeun depuis minuit la veille. Seule la prise d'eau est autorisée entre minuit et l'inclusion dans le protocole de recherche. Un médecin investigateur évaluera les apports calciques du sujet par un Calcitest Minute d'Angers (Figure 1) (43).

Nom :			
Prénom :			
Date de Naissance :			
Date de consultation :			
Type de fracture :			
Nature de l'aliment	Nombre de fois par jours	Contenu en calcium (mg)	Total (mg)
Lait de vache (1 verre de 100 mL)		x 120	=
(1 bol de 300 mL)		x 360	=
Fromage à pâte molle * (1 portion de 30 g)		x 150	=
Fromage à pâte dure ** (1 portion de 30 g)		x 270	=
Yaourt (125 g)		x 180	=
Fromage blanc *** (125 g)		x 200	=
Petits suisses		x 100	=
Eaux minérales riches en calcium**** (500 mL)		x 250	=
Autres apports moyens		+ 350	= 350
Total journalier (mg)			=
<p>* camembert, brie ...</p> <p>** Gruyère, Emmental ...</p> <p>*** Tenir compte des fromages blancs enrichis en calcium</p> <p>**** Contrex, Courmayeur, Hépar, St Antonin, Talians</p>			

Figure 1 : Calcitest Minute d'Angers

L'infirmier(e) de recherche clinique effectuera une mesure de la masse et de la taille ainsi qu'une mesure du périmètre abdominal à l'aide d'un mètre ruban à mi-distance entre le bord costal inférieur et l'épine iliaque antéro-supérieure sur la ligne médioaxillaire.

Pour les femmes incluses, un test de grossesse urinaire sera réalisé afin de s'assurer de leur éligibilité.

L'infirmier(e) de recherche clinique effectuera un premier prélèvement sanguin, comprenant 13 tubes soit 73,5mL de sang, pour les dosages suivants : électrophorèse des protéines sériques, créatininémie, ASAT, ALAT, gamma-GT, phosphatases alcalines totales, calcémie, phosphatémie, albuminémie, pré-albuminémie, glycémie, NFS, plaquettes, HbA1c, CTx sériques, phosphatases alcalines osseuses, PTH, 25(OH) vitamine D, testostérone totale et biodisponible GIP, GLP-1, GLP-2, Xénine, Insuline, IGF-1, glucagon, calcitonine, amyline, leptine, adiponectine, sclérostine, ghréline, FGF 23, cortisolémie, œstradiol, LH, FSH, SHBG, triglycérides, cholestérol total, HDL cholestérol, LDL cholestérol.

Chaque sujet prendra un petit-déjeuner standardisé en 15 minutes afin de stimuler la sécrétion des incrétines comprenant : une brique de jus d'orange de 25cL, un pain individuel, une plaquette de beurre, un paquet de deux biscuits secs.

Une heure après le petit-déjeuner, l'infirmier(e) de recherche clinique effectuera un second prélèvement sanguin, comprenant 8 tubes soit 44,5mL de sang, pour les dosages suivants : CTx sériques, phosphatases alcalines osseuses, GIP, GLP-1, GLP-2, insuline, IGF-1, glucagon, calcitonine, amyline, leptine, adiponectine, sclérostine, ghréline, FGF23, cortisolémie, oestradiol, LH, FSH, SHBG, xénine.

Chaque sujet sera conduit en fin de matinée, par l'aide-soignant(e), dans le service de rhumatologie du CHU d'Angers pour passer une ostéodensitométrie (appareil HOLOGIC modèle discovery S/N 84255) avec mesure de la densité minérale osseuse (g/cm²) au rachis lombaire,

au col fémoral et à la hanche totale et passage d'une Vertebral fracture Assesment (VFA) afin de dépister des fractures vertébrales (Tableau 2).

Lieu	Actions	V0	V1
Centre de Recherche Clinique	Vérification des critères d'inclusion puis signature du consentement éclairé en double exemplaire	X	
	Test urinaire de grossesse		X
	Inscription sur le fichier Volontaires Recherches Biomédicales par le médecin investigateur signant le consentement		X
	Evaluation des apports calciques par le calcitest minute d'Angers		X
	Mesure de la masse et de la taille		X
	Prélèvement sanguin		X
	Prise d'un petit déjeuner standard (T0min)		X
	Prélèvement sanguin (T60min)		X
Service de Rhumatologie	Ostéodensitométrie + VFA		X

Tableau 2 : parcours du sujet se prêtant au protocole de recherche INCREMOS

Le dosage des incrétines se fera par la Pr HOLST à l'Université de Copenhague comme décrite précédemment (44). En résumé, le prélèvement est effectué avec des tubes contenant un inhibiteur de la DPP-4 afin d'éviter la dégradation des incrétines dans le tube (*BD™ P800 Blood Collection System*). Les incrétines sont dosées après extraction plasmatique avec de l'éthanol à 70% par dosage radio-immunologique en utilisant des anticorps spécifiques de la région C-terminale du GLP-1 et du GIP respectivement.

Les dosages habituellement faits au laboratoire d'analyses biologiques du CHU d'Angers seront réalisés au sein du laboratoire. Il s'agit de : l'électrophorèse des protéines sériques, créatininémie, ASAT, ALAT, gamma-GT, phosphatases alcalines totales, calcémie, phosphatémie, albuminémie, pré-albuminémie, glycémie, NFS, plaquettes, HbA1c, CTx sériques, phosphatases alcalines osseuses, Béta-HCG, PTH, 25(OH) vitamine D, testostérone totale et biodisponible, Insuline, IGF1, calcitonine, cortisolémie, œstradiol, LH, FSH, SHBG, triglycérides, cholestérol total, HDL cholestérol, LDL cholestérol.

Les dosages non réalisés sur le CHU d'Angers seront réalisés au laboratoire GEROM à l'Université d'Angers en utilisant des plaques ELISA achetées auprès de *R&D Systems* et *Merck Millipore* et *Phoenix Pharmaceuticals*. Il s'agit du glucagon, du FGF23, de l'amyline, de la sclérostine, de la ghréline, leptine, adiponectine et de la xénine.

L'ensemble des données seront saisies dans le cahier de recueil de données généré avec le logiciel EpiData. Le cahier de recueil de données a été conçu par Jean-Marie Chrétien, responsable de la cellule de gestion des données et évaluation (CGDE) du CHU d'Angers.

2.3. Les effets indésirables attendus

Les effets indésirables attendus sont ceux d'un prélèvement sanguin :

- Ecchymose au point de ponction veineuse
- Douleur au point de ponction veineuse
- Hémorragie au point de ponction veineuse
- Allergie cutanée au pansement ou au sparadrap après la ponction
- Malaise vagal/lipothymie.

Afin de les éviter, les prélèvements sanguins seront effectués par un(e) infirmier(e) diplômé(e) d'Etat qualifié(e) en recherche clinique dans des locaux dédiés à la recherche clinique.

En cas de survenue d'une hémorragie au point de ponction, une compresse stérile sera appliquée sur le point de ponction par l'infirmier(e) diplômé d'Etat en exerçant une compression jusqu'à ce que l'hémostase soit obtenue. En cas de survenue d'un malaise vagal/lipothymie, le sujet sera allongé à plat avec les membres inférieurs surélevés.

2.4. Analyse statistique

Les analyses statistiques seront réalisées avec le logiciel SPSS (V.15.0.1, SPSS Inc., IBM Corporation). Pour les variables quantitatives, les résultats seront exprimés en moyenne et écart-type. Le test de corrélation de Pearson permettra de rechercher une corrélation entre la valeur de la densité minérale osseuse et la concentration des incrétones.

3. L'évaluation du budget

L'essentiel du budget de l'étude est consacré aux dosages biologiques. Il a été calculé selon les modalités de l'article L162-14-1 du Code de la Sécurité Sociale. Le tarif appliqué pour un dosage biologique résulte de la multiplication de la valeur de la lettre clé (B) et du coefficient affecté à ce dosage. Le coefficient affecté à chaque dosage se trouve dans la Table Nationale de codage de Biologie (TNB). Dans cette étude le coût des dosages biologiques est évalué à 162€ par patient.

Le tarif de l'ostéodensitométrie par méthode biphotonique est de 39,96€.

Le coût du petit-déjeuner pris par chaque sujet est de 1,65€.

Chaque sujet recevra 30€ d'indemnisation destinés à couvrir les frais de transport et à compenser la matinée passée sur le CHU d'Angers et le fait d'avoir deux prélèvements sanguins successifs de 73,5mL (13 tubes) et 44,5mL (8 tubes) respectivement.

Le projet est financé en totalité.

SOUSSION AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES

Le protocole a été déposé au Comité de Protection de Personnes CPP.

Le recrutement débutera donc en Novembre 2017. La période d'inclusion est de 2 ans et la durée de l'étude de 3 ans.

PERSPECTIVES

Ce travail clinique réalisé chez les sujets sains est la première étape à l'analyse ultérieure de l'effet des incrétines sur le remodelage osseux en situation d'ostéoporose primitive et secondaires.

Rapport-Gratuit.com

BIBLIOGRAPHIE

1. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci*. 31 mars 1998;95(7):3597-602.
2. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell*. 16 nov 2001;107(4):513-23.
3. Alsina M, Guise TA, Roodman GD. Cytokine regulation of bone cell differentiation. *Vitam Horm*. 1996;52:63-98.
4. Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. Bone Loss and Bone Size after Menopause. *N Engl J Med*. juillet 2003;349(4):327-34.
5. Henriksen DB, Alexandersen P, Bjarnason NH, Vilsbøll T, Hartmann B, Henriksen EEG, et al. Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. déc 2003;18(12):2180-9.
6. Li F, Mühlbauer RC. Food fractionation is a powerful tool to increase bone mass in growing rats and to decrease bone loss in aged rats: modulation of the effect by dietary phosphate. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. août 1999;14(8):1457-65.
7. Harrison E, Lal S, McLaughlin JT. Enteroendocrine cells in gastrointestinal pathophysiology. *Curr Opin Pharmacol*. déc 2013;13(6):941-5.
8. Furness JB, Rivera LR, Cho H-J, Bravo DM, Callaghan B. The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(12):729-40.
9. Margetic S. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Publ Online* 13 Novemb 2002 Doi101038sjjo0802142 [Internet]. 13 nov 2002 [cité 10 août 2017];26(11).

<http://www.nature.com/ijo/journal/v26/n11/full/0802142a.html?foxtrotcallback=true>

10. Chen XX, Yang T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *J Bone Miner Metab.* sept 2015;33(5):474-85.
11. Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia.* févr 1979;16(2):75-85.
12. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* mars 2006;3(3):153-65.
13. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem.* 15 juin 1993;214(3):829-35.
14. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* janv 1986;29(1):46-52.
15. Inagaki N, Seino Y, Takeda J, Yano H, Yamada Y, Bell GI, et al. Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene. *Mol Endocrinol Baltim Md.* juin 1989;3(6):1014-21.
16. Ugleholdt R, Poulsen M-LH, Holst PJ, Irminger J-C, Orskov C, Pedersen J, et al. Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *J Biol Chem.* 21 avr 2006;281(16):11050-7.
17. Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P, et al. Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes.* oct 1995;44(10):1202-8.
18. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.* avr 1994;43(4):535-9.

19. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 sept 1992;89(18):8641-5.
20. Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, et al. Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. *Endocrinology*. mars 2000;141(3):1228-35.
21. Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects. *Mol Cell Endocrinol*. 25 mai 2001;177(1-2):35-41.
22. Zhong Q, Itokawa T, Sridhar S, Ding K-H, Xie D, Kang B, et al. Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. févr 2007;292(2):E543-548.
23. Zhong Q, Ding K-H, Mulloy AL, Bollag RJ, Isaacs CM. Glucose-dependent insulinotropic peptide stimulates proliferation and TGF-beta release from MG-63 cells. *Peptides*. avr 2003;24(4):611-6.
24. Mieczkowska A, Bouvard B, Chappard D, Mabileau G. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) directly affects collagen fibril diameter and collagen cross-linking in osteoblast cultures. *Bone*. mai 2015;74:29-36.
25. Gaudin-Audrain C, Irwin N, Mansur S, Flatt PR, Thorens B, Baslé M, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor deficiency leads to modifications of trabecular bone volume and quality in mice. *Bone*. mars 2013;53(1):221-30.
26. Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, Chappard D, Mabileau G. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor deletion leads to reduced bone strength and quality. *Bone*. oct 2013;56(2):337-42.

27. Mabileau G, Mieczkowska A, Irwin N, Simon Y, Audran M, Flatt PR, et al. Beneficial effects of a N-terminally modified GIP agonist on tissue-level bone material properties. *Bone*. juin 2014;63:61-8.
28. Mansur SA, Mieczkowska A, Bouvard B, Flatt PR, Chappard D, Irwin N, et al. Stable Incretin Mimetics Counter Rapid Deterioration of Bone Quality in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Cell Physiol*. déc 2015;230(12):3009-18.
29. Mansur SA, Mieczkowska A, Flatt PR, Bouvard B, Chappard D, Irwin N, et al. A new stable GIP-Oxyntomodulin hybrid peptide improved bone strength both at the organ and tissue levels in genetically-inherited type 2 diabetes mellitus. *Bone*. juin 2016;87:102-13.
30. Torekov SS, Harsløf T, Rejnmark L, Eiken P, Jensen JB, Herman AP, et al. A functional amino acid substitution in the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) gene is associated with lower bone mineral density and increased fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab*. avr 2014;99(4):E729-733.
31. Nissen A, Christensen M, Knop FK, Vilsbøll T, Holst JJ, Hartmann B. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide inhibits bone resorption in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. nov 2014;99(11):E2325-2329.
32. Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJM, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*. 29 juill 2011;11:12.
33. Nuche-Berenguer B, Portal-Núñez S, Moreno P, González N, Acitores A, López-Herradón A, et al. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol*. nov 2010;225(2):585-92.
34. Kim J-Y, Lee S-K, Jo K-J, Song D-Y, Lim D-M, Park K-Y, et al. Exendin-4 increases bone mineral density in type 2 diabetic OLETF rats potentially through the down-regulation of SOST/sclerostin in osteocytes. *Life Sci*. 21 mars 2013;92(10):533-40.

35. Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, et al. GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology*. janv 2013;154(1):127-39.
36. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kastrup P, et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology*. avr 2014;155(4):1280-90.
37. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology*. févr 2008;149(2):574-9.
38. Madsen LW, Knauf JA, Gotfredsen C, Pilling A, Sjögren I, Andersen S, et al. GLP-1 receptor agonists and the thyroid: C-cell effects in mice are mediated via the GLP-1 receptor and not associated with RET activation. *Endocrinology*. mars 2012;153(3):1538-47.
39. Mabileau G, Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, Chappard D. Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *J Endocrinol*. oct 2013;219(1):59-68.
40. Ma X, Meng J, Jia M, Bi L, Zhou Y, Wang Y, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. juill 2013;28(7):1641-52.
41. Mabileau G, Mieczkowska A, Chappard D. Use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Diabetes*. mai 2014;6(3):260-6.
42. Luo G, Liu H, Lu H. Glucagon-like peptide-1(GLP-1) receptor agonists: potential to reduce fracture risk in diabetic patients? *Br J Clin Pharmacol*. janv 2016;81(1):78-88.

43. Levasseur R. Calcitest Minute d'Angers. Panorama du médecin. numéro spécial Nutrition et os. 2010;
44. Kelstrup L, Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Holst JJ, Damm P. Incretin and glucagon levels in adult offspring exposed to maternal diabetes in pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. mai 2015;100(5):1967-75.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Calcitest Minute d'Angers30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : cellules enteroendocrines	3
Tableau 2 : parcours du sujet se prêtant au protocole de recherche INCREMOS.....	32

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. Le système entéro-endocrine	2
2. Les incréтины	4
3. Le rôle des incréтины dans le remodelage osseux	5
3.1. La voie du GIP/GIPR dans la physiologie osseuse.....	5
3.2. La voie du GLP-1/GLP-1R dans la physiologie osseuse.....	6
TRAVAUX DE RECHERCHE BIOLOGIQUE	7
1. Introduction	7
2. Materials and methods	8
2.1. Animals	8
2.2. Isolation and osteoclast generation from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).....	9
2.3. X-ray microcomputed tomography	9
2.4. Three-points bending test	10
2.5. Bone histomorphometry.....	11
2.6. Quantitative backscattered electron imaging (qBEI)	11
2.7. Nanomechanical testing	12
2.8. Fourier Transform Infrared Microscopy (FTIR)	13
2.9. Statistical analysis	14
3. Results	14
4. Discussion	22
5. Bibliography	25
CONCEPTION DU PROJET CLINIQUE	27
1. Etat des connaissances	27
2. Matériels et Méthode	27
2.1. Population étudiée	27
2.2. Protocole	29
2.3. Les effets indésirables attendus	33
2.4. Analyse statistique	34
3. L'évaluation du budget	34
SOUSSION AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	35
PERSPECTIVES	35
BIBLIOGRAPHIE	36
LISTE DES FIGURES	42
LISTE DES TABLEAUX	43
TABLE DES MATIERES	44

Rapport-Gratuit.com

Incrétines et remodelage osseux, des données pre-cliniques à la conception d'un projet clinique

RÉSUMÉ

L'ostéoporose est la maladie osseuse la plus fréquente, responsable de 160000 hospitalisations par an en France. Elle correspond à une diminution de la résistance osseuse avec augmentation du risque de fracture. Elle résulte de la détérioration du remodelage osseux, phénomène physiologique sous le contrôle de nombreux facteurs : facteurs mécaniques, locaux et hormonaux, parmi lesquels les incrétones. Les incrétones sont des hormones intestinales dont la principale fonction est de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse à l'ingestion du bol alimentaire. A l'heure actuelle, deux incrétones sont connues, le GIP (Glucose Insulinotropic Polypeptide) et le GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1). A côté de leur effet métabolique, les incrétones pourraient avoir une action sur le remodelage osseux.

Pour élucider le rôle du GIP, nous avons étudié la résistance et la qualité osseuse, en microtomographie, en flexion 3-points, en nanoindentation, en FTIR et en qBEI, de 3 modèles murins : GIP-DT n'ayant pas de cellule K (cellule productrice de GIP), GIP-GFP-KI ne produisant pas de GIP et un troisième modèle consistant en l'injection de Xénine (2^{ème} hormone produite par les cellules K). A l'échelle de l'organe, sur l'os trabéculaire, le GIP et la Xénine avaient des effets opposés. Les souris GIP-GFP-KI avait une diminution du volume trabéculaire comme les souris injectés avec de la Xénine.

A l'échelle du tissu, le GIP et la Xénine modifiaient la qualité osseuse entraînant des modifications de la résistance de la matrice. Le GIP augmentait significativement la maturité du collagène, l'intégrité du collagène et la glycation du collagène. La xénine diminuait significativement la maturité du collagène uniquement.

Devant ces résultats précliniques, afin d'étudier le rôle des incrétones dans le remodelage osseux chez l'Homme, nous avons construit un projet de recherche clinique afin d'estimer dans un premier temps les concentrations physiologiques des incrétones chez les sujets sains à jeun et après un repas standardisé. L'objectif ensuite étant de déterminer leur rôle éventuel dans l'altération du remodelage osseux chez les sujets ostéoporotiques.

Mots-clés : Incréteine, GIP, GLP-1, remodelage osseux, ostéoporose

Incretin and bone remodeling from preclinical results to the design of a clinical project

ABSTRACT

Osteoporosis is the most common bone disease, responsible for 160000 hospitalizations per year in France. It corresponds to a decrease of bone strength resulting in an increased fracture risk. It results from the deterioration of bone remodeling, a physiological phenomenon under the control of many factors: mechanical, local and hormonal factors such as incretins. Incretins are intestinal hormones whose main function is to potentiate insulin secretion in response to ingestion of the food. At present, two incretins are known, GIP (Glucose Insulinotropic Polypeptide) and GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1). In addition to their metabolic effect, incretin may influence bone remodeling. To decipher the role of GIP, we studied the bone strength and bone quality in microtomography, 3-point bending, nanoindentation, FTIR and qBEI, of 3 murine models: GIP-DT which does not have K cell (GIP-producing cell), GIP-GFP-KI which does not produce GIP, and a third model with Xenin-injected mice (the second hormone produced by K cells). At the organ level, on trabecular bone, GIP and Xenin have opposite effects. GIP-GFP-KI mice have a decrease in trabecular volume as Xenin-injected mice.

At the tissue level, GIP and Xenin modify bone quality leading to changes in matrix resistance. GIP significantly increases collagen maturity, collagen integrity, and collagen glycation. Xenin significantly decreases collagen maturity only.

In view of these preclinical results, to evaluate the role of incretins in human bone remodeling, we designed a clinical study to measure incretin concentrations in healthy subjects before and after a meal. The objective is to study later the role of incretins in human osteoporosis.

Keywords : Incretin, GIP, GLP-1, bone remodeling, osteoporosis