

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

LABORATOIRE INSERM U658

THÈSE présentée par
Delphine MAUREL

soutenue le **24 Novembre 2011**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline : Biologie ostéoarticulaire, biomécanique et biomatériaux

**Consommation chronique d'alcool, exercice
physique et tissu osseux : modifications
densitométriques, architecturales,
biomécaniques et métaboliques chez le rat.**

THÈSE dirigée par :

Claude-Laurent BENHAMOU
Nathalie BOISSEAU

Professeur associé, INSERM /CHR Orléans
Professeur Université Blaise Pascal, Clermont-Fd

RAPPORTEURS :

Serge FERRARI
Georges CARLE

Professeur, Hôpital Universitaire de Genève
Directeur de Recherche, HDR, CNRS Nice

JURY

Claude-Laurent BENHAMOU
Nathalie BOISSEAU
Serge FERRARI
Georges CARLE
Françoise PEYRIN
Edith FILAIRE
Christelle JAFFRE

Professeur associé, INSERM /CHR Orléans
Professeur Université Blaise Pascal, Clermont-Fd
Professeur, Hôpital Universitaire de Genève
Directeur de Recherche, HDR, CNRS Nice
Directeur de Recherche INSERM, Université Lyon
Professeur, Université Orléans, Présidente du jury
Maître de conférences, Université d'Orléans, co-
encadrante

Remerciements

Ce travail a été mené au sein de l'unité Inserm U658 « Caractérisation du Tissu Osseux par Imagerie : Techniques et Applications », à Orléans, dirigé par le Docteur Claude-Laurent Benhamou. Ce projet a fait l'objet d'une bourse de thèse entièrement financée par la Région Centre.

Je remercie le **Dr Claude-Laurent Benhamou** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces trois années, et pour m'avoir obtenu un financement pour effectuer cette thèse. Je le remercie aussi de m'avoir permis de présenter mon travail dans de nombreux congrès, et pour m'avoir guidé dans le monde de l'ostéocyte.

Je remercie le **Pr Nathalie Boisseau**, ma directrice de thèse, pour son soutien, son aide, sa compréhension, et pour m'avoir guidée efficacement durant ces 3 ans.

Un grand merci au **Dr Christelle Jaffré**, mon encadrante de thèse, pour son aide concernant les expérimentations, les analyses, les articles, etc. Merci de m'avoir épaulée depuis le Master et m'avoir accompagnée durant tous mes oraux en congrès. Ce travail n'aurait pu se faire sans toi. Merci à toi pour les financements que tu as obtenu auprès de l'IREB et de l'Université d'Orléans, et qui ont permis d'assumer en grande partie les coûts de mes expérimentations.

Je tiens à remercier la **Région Centre** pour le financement de ce travail de thèse.

Merci à l'**IREB** pour son soutien financier, qui nous a permis de financer plusieurs expérimentations.

Je remercie l'**INSERM** et son personnel pour leur aide concernant le financement des expérimentations via la dotation annuelle et également Anne-Marie Hainaut pour son aide quant aux frais de missions et autres documents à remplir pour les déplacements en congrès.

Merci à l'**Ecole doctorale Sciences et Technologies d'Orléans** de m'avoir formée sur la communication scientifique, écrite et orale en français et en anglais grâce aux cours qu'elle met en place. Merci également de m'avoir permis de partir en congrès à San Diego, grâce à une aide financière conséquente.

Je remercie le **Dr Georges Carle**, Directeur de recherche au CNRS de Nice, et le **Pr Serge Ferrari** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie le **Dr Françoise Peyrin**, Directeur de recherche au laboratoire CREATIS (Unités INSERM U1044 et CNRS 5220) et le **Pr Edith Filaire**, d'avoir accepté de faire parti du jury de ma soutenance de doctorat.

Merci au chevalier **Dr Stéphane Pallu**, alias Stéfano, alias Aragorn, pour ton aide, tes conseils, tes expressions hors du commun. Tu es à la fois un bon chercheur et aussi quelqu'un sur qui on peut compter pour se confier, et également pour détendre l'atmosphère. Tu as créé la communauté de l'anneau au labo et ça nous a tous fait bien rigoler ! Merci aussi de m'avoir permis d'aller avec toi au Synchrotron. Je garderai un souvenir impérissable de nos parties de Risk.... Merci pour ton agréable compagnie en congrès.

Merci au **Dr Gaël Y Rochefort** pour son aide scientifique en microscopie, en biologie, pour tes cours de PCR pour les nuls, pour ton aide sur la relecture des articles, des abstracts, des demandes de bourses, et de ma thèse.

Je tiens à remercier les **Dr Hélène Beaupied** et **Dr Armelle Basillais** pour m'avoir expliqué les fonctionnements de la presse mécanique et du μ CT à mon arrivée au laboratoire en 2008. Merci de m'avoir encadré sur ces appareils et rendu autonome pour la suite de mon travail.

Merci au **Pr Chantal Pichon** d'avoir accepté de relire mon article sur l'ostéocyte avec attention, et pour nous avoir permis d'utiliser votre plateforme de microscopie au Centre de Biologie Moléculaire du CNRS d'Orléans.

Merci à **David Gosset**, ingénieur au CBM d'Orléans, responsable de la plateforme de microscopie du CBM, pour son aide en microscopie confocale et pour la reconstruction de mes images en 3D.

Je remercie le **Pr Rustem Uzbekov**, du département des microscopies de la faculté de médecine de Tours, pour ses images magnifiques en microscopie électronique en transmission, ainsi que pour la coloration de nos échantillons au bleu de toluidine.

Merci au **Dr Brigitte Arbeille** pour avoir accepté de collaborer avec notre laboratoire en partie sur mon travail, et pour nous avoir éclairé de votre savoir lors de réunions au sein de votre laboratoire.

Merci au **Pr Nick L Fazzalari**, pour m'avoir conseillé sur l'analyse de mes paramètres osseux, pour m'avoir relu et corrigé scientifiquement mes articles et pour avoir accepté de discuter avec moi sur les valeurs et la rigueur nécessaire à la Recherche scientifique. Merci de vous être mis à ma portée et d'avoir égaillé nos journées avec votre bonne humeur durant une année.

Je remercie **Isabelle Ingrand**, méthodologiste et biostatisticienne de l'Université de Poitiers, pour l'analyse des résultats de l'étude 1 et pour vos nombreuses explications par téléphone et par e-mail sur les plans expérimentaux en statistiques.

Je remercie le **Dr Claude Tallineau**, responsable médical de l'UM de biochimie générale et d'urgence à Poitiers, pour avoir réalisé gratuitement des dosages biologiques pour nous au sein de votre unité.

Je remercie le **Dr Patrick Michenet** et **Mr Jean-Claude Beaubois**, membres du laboratoire d'anatomie pathologique et cytogénétique du CHR d'Orléans, pour leur collaboration concernant la coloration des foies de mes animaux et **Mlle Charlotte Bouchy**, interne dans ce service, pour le temps qu'elle a passé avec nous à examiner nos lames.

Merci au **Dr Sophie Bréban**, qui ne l'était pas encore quand nous nous sommes connues au laboratoire, qui m'a épaulée et guidée en grande sœur dans la recherche comme à Palaf !! J'appréciais ta bonne humeur et ton dynamisme et tu m'as manqué après ton départ.

Merci au futur Dr **Arnaud Boudenot** alias Arnix, pour ton aide en informatix, en bureautix... Merci pour m'avoir donné ton avis sur mes posters, mes présentations orales, et pour nos discussions scientifiques. Merci aussi pour tes goûts musicaux proches des miens (Vive Edith Piaf et Goldman...) et pour me sentir moins seule en tant que Loir-et-Chérienne ! Vive Clénord.... !

Je remercie **Eric Dolléans** pour son aide pour disséquer mes nombreux animaux : tu manies le rasoir comme personne ...! Si au début tes kata dans le couloir m'impressionnaient, tu es rapidement devenu notre mascotte. Qui d'autre nous aurait rappelé qu'il est 12h02 et qu'il est

l'heure d'aller manger !! Ton doctorat en astrologie me fut grandement utile quand tu m'as prédit que 2011 était l'année de la Vierge et du Taureau !

Je remercie **Mlle Priscilla C. Aveline** pour m'avoir montré comment faire des immuno-marquages, pour avoir travaillé sur certains de mes marquages le week-end et pour ses muffins et ses carambars!

J'aimerais remercier tout particulièrement **Mr Philippe Moreau**, technicien de l'animalerie du laboratoire de neurosciences d'Orléans, pour m'avoir montré comment s'occuper des rats, et pour m'avoir expliqué comment fonctionne une animalerie conventionnelle. J'aimerais aussi le remercier pour sa gentillesse et pour nos conversations matinales durant deux ans.

Merci à **Mr Gérard Noyer**, responsable de l'atelier mécanique de la faculté des Sciences, et à son équipe, pour leur aide concernant la maintenance du tapis roulant.

Merci au **Dr Delphine Benaitreau**, post-doctorante au laboratoire, pour ses explications sur les dosages protéiques et glucidiques et pour ses recettes bio. Je pensais qu'il n'était pas possible d'être plus à fond dans la communauté de l'anneau que ne l'est Stéphane, mais tu m'as démontré le contraire ! Reine du casse-tête chinois, tu maîtrises le Rubik's cube et les aiguilles comme personne !

Zahrix, merci pour ton soutien au quotidien et pour tes paroles rassurantes. Je te souhaite du courage pour la suite, mais c'est l'année de la Vierge, ne l'oublie pas !

Merci au **Dr Eric Lespessailles** pour sa gentillesse au quotidien, pour ses conseils pour mes présentations orales et pour m'avoir financé certaines manips et congrès grâce à l'IPROS.

Un grand merci à **Farida** pour ses pâtisseries exquises, son thé à la menthe divin, sa gentillesse et pour nos discussions du midi, à **Domitelle**, pour sa pêche, et pour toutes les commandes qu'elle a réussi à me passer en France comme en Chine, à **Nathalie**, **Sabrina** (merci pour le rat, pour ta gentillesse et pour les réservations de billets à la dernière minute !), **Corine**, **Christelle L.**, **Béatrice**, pour leur gentillesse au quotidien. Grâce à vous je suis venue travailler au laboratoire avec le sourire durant trois ans. Merci au **Dr Sylvie Loiseau-Peres** pour avoir accepté de m'ausculter quand je ne tenais plus debout un soir d'hiver et pour m'avoir soigné efficacement contre la grippe A !

Merci aux collègues qui sont passés par le labo pendant ma thèse, et qui ont égayé notre quotidien : **Montasser**, le Mme Doubtfire du labo et pro de l'impro, **Amine**, la gentille **Mouna**, **Faika**, **Sakina** (merci pour les commandes de seringues), **Annamarija** (pour tes questions supra intelligentes qui nous ont forcé à se casser la tête pour y répondre), **Yessine**, et **Clotilde**.

Je remercie les élèves et étudiantes qui sont passées par le laboratoire, avec lesquelles j'ai eu le privilège de travailler et que j'ai pu encadrer : **Carine Tournier**, **Camille Viala**, et **Leila Khacef**.

Dans un dernier temps, j'aimerais remercier mes proches pour leur soutien. Tout d'abord **mes parents**, sans qui je ne serais pas arrivée jusque là. Merci pour m'avoir inculqué que dans la vie, on n'a rien sans effort et qu'il ne faut pas envier les autres, mais travailler pour arriver à nos objectifs. Merci pour votre amour et votre soutien financier durant toutes ces années. Je vous dédie ce travail.

Et enfin, merci à **Pat** pour sa compréhension et son soutien au quotidien.

Liste des publications et communications sur le sujet

Articles acceptés dans une revue internationale avec comité de lecture :

Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffré C. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health. Study in a rat model. European Journal of Applied Physiology (2011), 111(12):2931-40.

Maurel DB, Jaffré C, Rochefort GY, Aveline PC, Boisseau N, Uzbekov R, Gosset D, Pichon C, Fazzalari NL, Pallu S*, Benhamou CL*. Osteocyte apoptosis plays a key role in alcohol-induced osteoporosis. Bone, 2011; 49: 543–552.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL*, Jaffré C*. Alcohol and bone: Review of dose effects and mechanisms. Osteoporosis International (2011). Sous presse.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Cortical bone is more sensitive to alcohol dose effects than trabecular bone in the rat. Accepté dans Joint Bone Spine, Octobre 2011.

Articles soumis dans une revue internationale avec comité de lecture :

Maurel DB, Pallu S, Jaffré C, Fazzalari NL, Boisseau N, Uzbekov R, Benhamou CL, Rochefort GY. Bone steatosis and osteocyte apoptosis as mechanisms of alcohol-induced osteoporosis. Soumis dans Alcohol & Alcoholism, Octobre 2011.

Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL*, Jaffré C*. Regular exercise prevents alcohol induced osteoporosis and osteocyte apoptosis in rats. Soumis au Medicine and Science in Sports & Exercise, Septembre 2011.

Maurel DB, Uzbekov R, Aveline PC, Pallu S, Benhamou CL, Rochefort GY. Osteocyte primary cilium and centriole: mechanotransduction structures imaged by transmission electron microscopy. Soumis dans Microscopy and Microanalysis, Octobre 2011.

Pallu S, Rochefort GY, Jaffre C, Refregiers M, **Maurel DB**, Benaitreau D, Lespessailles E, Jamme F, Chappard C, Benhamou CL. Synchrotron ultraviolet microspectroscopy on rat cortical bone: characterization of the osteocyte and its environment. Soumis à PNAS, Octobre 2011.

Communications orales lors de congrès et symposium :

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Alcoolisme et exercice physique : effets d'une consommation chronique d'alcool sur le contenu minéral osseux, la masse osseuse, l'architecture osseuse et le métabolisme osseux chez le rat. Institut de Recherche Scientifique sur les Boissons (IREB), Paris, Décembre 2008.

Maurel DB, Boisseau N, Dolleens E, Benhamou CL, Jaffré C. Alcoholism and exercise: effects of chronic alcohol consumption on bone mineral content, density, bone micro architecture and bone remodelling in the rat. European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Helsinki, Finlande, Juin 2009.

> Travel Award.

Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Dolleens E, Benhamou CL, Jaffré C. Alcohol consumption: A risky behaviour for bone health. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA), Paris, Septembre 2010.

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Dolleens E, Jaffré C, Benhamou CL. Diminution de l'ostéof ormation dans l'ostéoporose d'origine alcoolique : rôle de l'ostéocyte dans un modèle murin. Société Française de Rhumatologie (SFR), Paris, Décembre 2010.

Maurel DB, Jaffré C, Fazzalari NL, Uzbekov R, Boisseau N, Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Bone loss in alcohol abuse is associated with osteocyte apoptosis, bone marrow and microvessels fat incorporation. European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Vienne, Autriche, Septembre 2011.

> Proceeding dans Alcohol and Alcoholism (2011), 46 (1): O5.3 p. i32.

Communications affichées lors de congrès et symposium :

Maurel DB, Rochefort GY, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Bone micro-architecture, mineral density and content in rats femurs after a period of chronic alcohol abuse. International Bone Densitometry Workshop (IBDW), Foggia, Italy, Juin 2008.

Maurel DB, Rochefort GY, Boisseau N, Lespessailles E, Benhamou CL, Jaffré C. Bone metabolism, micro-architecture and densitometric measurement in rat femur after chronic alcohol consumption. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Montreal, Septembre 2008.

> Proceeding dans JBMR 2008, M239-S432.

Maurel DB, Boisseau N, Dolleens E, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL, Jaffré C. Influence de différentes doses d'alcool sur le contenu, la densité minérale osseuse, et la microarchitecture osseuse chez le rat. Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Nice, Mars 2009.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Influence of endurance training on bone parameters in alcoholised rats. Pharmacologie, Physiologie et Thérapeutique (P2T), Marseille, Avril 2009.

Maurel DB, Boisseau N, Dolleens E, Benhamou CL, Jaffré C. Beneficial effects of physical activity on bone loss induced by chronic alcoholism. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA), Paris, Septembre 2010.

> Proceeding dans Alcoholism : Clinical and Experimental Research, Supplément Août 2010, Vol 34 (8).

Maurel DB, Jaffré C, Dolleens E, Boisseau N, Benhamou CL. Combined effects of exercise and alcohol on bone status in rats. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, Octobre 2010.

> Proceeding dans JBMR

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Dolleans E, Jaffré C, Benhamou CL. Impact of chronic alcohol consumption on the osteocytes and bone marrow adipocytes in a wistar rat model. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, Octobre 201

> Proceeding dans JBMR

Maurel DB, Jaffré C, Boisseau N, Benhamou CL. Exercise prevents the alcohol-induced bone loss in the rat. European Congress of Clinical and Economic aspects of Osteoporosis (ECCEO), Valence, Mars 2011.

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Jaffré C, Benhamou CL. Secondary alcohol-induced osteoporosis is linked to osteocyte apoptosis and bone fat excess. European Congress of Clinical and Economic aspects of Osteoporosis (ECCEO), Valence, Mars 2011.

Maurel DB, Jaffré C, Aveline PC, Boisseau N, Benhamou CL, Pallu S. L'ostéoporose d'origine alcoolique est liée à une augmentation de l'apoptose des ostéocytes chez le rat. Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Paris, Mai 2011.

Maurel DB, Pallu S, Jaffré C, Fazzalari NL, Uzbekov R, Rochefort GY, Benhamou CL. Bone steatosis and osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteoporosis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), San Diego, USA, Septembre 2011.

> Travel Award.

Sommaire

Remerciements	3
Liste des publications et communications sur le sujet	9
Sommaire	12
Liste des abréviations	17
Liste des figures	20
Liste des tableaux	22
Introduction	23
Revue de littérature	26
I. LE TISSU OSSEUX	27
A. Composition	27
1. Généralités.....	27
2. L'os compact ou cortical	28
3. L'os trabéculaire ou spongieux	29
B. Composition du tissu osseux	29
1. La matrice organique.....	29
2. La partie minérale.....	30
C. Les cellules osseuses	30
1. La lignée ostéoclastique	31
2. La lignée ostéoblastique	32
a) Les cellules bordantes	32
b) Les ostéoblastes.....	33
c) Les ostéocytes	34
• Morphologie	35
• Origine des ostéocytes.....	36
• Rôles de l'ostéocyte	37
D. Le remodelage osseux	39
1. Concept.....	39
2. Régulation du remodelage.....	40
a) Les facteurs systémiques	41
b) Les facteurs centraux.....	45
c) Les facteurs locaux	48
II. TECHNIQUES D'EVALUATION DU TISSU OSSEUX	55
A. Caractérisation quantitative de la masse et de la densité osseuses	55
1. Dual X-ray Absorptiométrie (DXA)	55
2. Tomographie quantitative périphérique (pQCT).....	56
B. Caractérisation structurale.....	56
1. L'histomorphométrie.....	57
2. Radiographie	58
3. Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	58
4. Micro tomographie à rayons X (μ CT)	59
5. Synchrotron	61
C. Caractérisation biomécanique	63
1. Ultrasons.....	63

2.	Tests de flexion	64
D.	Caractéristiques biochimiques.....	65
III.	PERTE OSSEUSE ET OSTEOPOROSE	68
A.	Ostéopénie physiologique	68
B.	Ostéoporose	70
1.	Définition	70
2.	Epidémiologie	70
3.	L'ostéoporose primitive	71
4.	Les ostéoporoses secondaires.....	71
IV.	ALCOOL ET PARAMETRES OSSEUX.....	73
A.	Métabolisme de l'alcool	73
1.	Métabolisme	73
2.	Effets potentiels des métabolites de l'alcool	74
3.	Polymorphisme génétique	75
4.	Interactions entre hormones gonadiques et métabolisme hépatique de l'alcool	76
5.	Système nerveux central.....	76
B.	Effets de l'alcool sur le métabolisme osseux : quelles doses pour quels effets ?	77
1.	Consommation modérée.....	77
a)	Densité minérale osseuse	77
b)	Remodelage osseux	78
2.	Consommation excessive	79
a)	Densité minérale osseuse	79
b)	Microarchitecture	80
c)	Remodelage osseux	80
d)	Résistance osseuse et fractures.....	81
e)	Abstinence	83
3.	Le binge drinking (intoxications alcooliques aiguës et répétées)	83
C.	Mécanismes d'action de l'alcool sur l'os	85
1.	Actions indirectes	85
a)	Composition corporelle	85
b)	Système nerveux central.....	86
c)	Leptine.....	87
d)	Vitamine D et PTH.....	88
e)	Calcitonine	89
f)	Stéroïdes sexuels	89
g)	Minéraux et Ions.....	89
2.	Effets directs de l'alcool sur l'os.....	90
a)	Ostéoblastes et ostéoclastes.....	90
b)	Ostéocytes	92
c)	Stress oxydatif.....	93
d)	Voie de signalisation Wnt	93
V.	EXERCICE PHYSIQUE ET OS.....	97
A.	Effets de l'exercice physique sur le métabolisme osseux	97
1.	CMO et DMO.....	97
2.	Microarchitecture	98
3.	Effets sur le remodelage osseux	99
4.	Effets du type de pratique.....	100
5.	Effets de l'âge, du statut menstruel et du sexe	101
6.	Effets de l'exercice sur la résistance osseuse	102
7.	Limites de l'exercice physique sur l'anabolisme osseux	103
B.	Mécanismes d'action de l'exercice physique sur l'os.....	104
1.	La théorie du mécanostat de Frost.....	104
2.	Relation muscle - os	105

3. Effet de l'exercice sur les hormones gonadotropes, somatotropes, corticotropes et sur les adipokines	105
a) Axe somatotrope	106
• La GH	106
• L'IGF-I	106
b) Axe gonadotrope chez l'homme	107
• La testostérone	107
c) Axe gonadotrope chez la femme	107
d) Axe corticotrope : le cortisol	108
e) Hormones calciotropes	108
• La vitamine D	109
• La PTH	109
• La calcitonine	109
f) Adipokines	110
• La leptine	110
• L'adiponectine	110
C. Consommation d'alcool chez les sportifs	111
1. Généralités	111
2. Effets sur l'os	112
Nos hypothèses et objectifs	114
I. Introduction	115
II. Développement des hypothèses et objectifs dans les différentes études	116
A. Etude 1	116
B. Etude 2	116
C. Etude 3	117
D. Etude 4	117
E. Etude 5	118
Matériels et méthodes	119
I. Les animaux	120
II. Le protocole d'alcoolisation	120
III. Protocole d'entraînement sur tapis roulant	122
IV. Mesures <i>in vivo</i>	124
A. Absorptiométrie biphotonique	124
1. Principe de l'absorptiométrie biphotonique	124
2. Mesure de la composition corporelle	125
3. Mesure de la DMO et du CMO	126
V. Mesures <i>ex vivo</i>	126
A. Les os	126
B. Le sang et les muscles	127
C. Mesure de la microarchitecture osseuse	127
D. Macroarchitecture	134
E. Mesures biomécaniques	135
F. Dosages hormonaux et métaboliques	138
G. Analyse cellulaire par microscopie	140
1. Microscopie en épifluorescence	141
2. Microscopie en fond clair de l'os cortical	143
3. Microscopie électronique en transmission	145
4. Microscopie confocale	146
VI. Statistiques	148

ETUDE 1 : EFFETS COMBINES D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE ET MODEREE D'ALCOOL ET DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LE METABOLISME OSSEUX CHEZ LE RAT	149
I. Introduction	150
II. Objectif étude 1	150
III. Méthodologie spécifique	150
IV. Résultats de l'étude 1	151
A. Apports hydriques et énergétiques	151
B. Densité osseuse et composition corporelle	152
1. Composition corporelle	152
2. Contenu minéral osseux et densité	152
C. Microarchitecture de l'os trabéculaire du fémur	153
D. Microarchitecture de l'os cortical du fémur	153
E. Propriétés biomécaniques du fémur	153
F. Remodelage osseux	154
V. Discussion	154
Article 1	156
ETUDE 2 : EFFETS DE 3 DIFFERENTES DOSES D'ALCOOL SUR LES PARAMETRES OSSEUX CHEZ LE RAT	167
I. Introduction	168
II. Objectif	168
III. Protocole spécifique	168
IV. Résultats	169
A. Consommations de boisson et de nourriture calculées sur les 4 derniers week-ends ..	169
B. Evolution du CMO, de la DMO et de la composition corporelle	171
Composition corporelle	172
CMO et DMO	172
C. Microarchitecture trabéculaire	172
D. Microarchitecture corticale	172
E. Caractéristiques biomécaniques du fémur	176
F. Marqueurs de formation, résorption osseuse et leptine	176
G. Corrélations	177
V. Discussion	178
Article 2	180
ETUDE 3 : EFFETS D'UNE FORTE ALCOOLISATION CHRONIQUE SUR L'OSTEOCYTE CHEZ LE RAT	189
I. Introduction	190
II. Objectif étude 3	190
III. Méthodologie spécifique	190
IV. Résultats	191
A. Coupes histologiques du foie	191
B. DMO, composition corporelle et dosages biochimiques	192
C. Microarchitecture trabéculaire et corticale	192
D. Biochimie	193
E. Immunomarquages avec les anticorps Caspase-3, CD44, ostéocalcine et collagène 1	194
F. Morphologie des lacunes ostéocytaires et gouttelettes lipidiques dans la moelle osseuse	195
G. Morphologie 2D des ostéocytes	197
H. Morphologie 3D des ostéocytes (microscopie confocale)	198
V. Discussion	199

Article 3	201
ETUDE 4 : RELATION ENTRE ADIPOSITE MEDULLAIRE, DMO ET APOPTOSE DES OSTEOCYTES.	212
I. Introduction	213
II. Objectif de l'étude 4	213
III. Méthodologie spécifique	213
IV. Résultats	213
V. Discussion	215
Article 4	218
ETUDE 5 : ANALYSE DES EFFETS COMBINES D'UN ENTRAINEMENT ET D'UNE CONSOMMATION EXCESSIVE D'ALCOOL SUR LE METABOLISME OSSEUX ET LES OSTEOCYTES CHEZ LE RAT.	246
I. Introduction	247
II. But de l'étude	247
III. Méthodologie spécifique	247
IV. Résultats	249
A. Consommation quotidienne : boisson et nourriture	249
B. Densité, contenu minéral osseux et composition corporelle	249
C. Paramètres de microarchitecture trabéculaire	251
D. Paramètres de macroarchitecture et microarchitecture corticale.....	252
E. Paramètres biomécaniques	252
F. Paramètres biochimiques.....	252
G. Apoptose des ostéocytes.....	255
H. Corrélations	255
V. Discussion	256
Article 5	257
Discussion	290
Conclusion et perspectives	296
Bibliographie	300
Annexe	338

Liste des abréviations

ADH	Alcool déshydrogénase
AETQ	Apport énergétique total quotidien
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ALP	Phosphatase alcaline
BFR	Bone formation rate
BMU	Unité de modelage osseux
BSAP	Phosphatase alcaline spécifique à l'os
BSP	Bone sialoprotein
BS/TV	Surface osseuse dans le volume de tissu osseux
BV/TV	Fraction volumique d'os trabéculaire
Ca	Calcium
CD44	Cluster de différenciation 44
CMO	Contenu minéral osseux
COL 1	Collagène 1
CSA	Cross-sectional area
CSF	Facteurs stimulant les colonies
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
CT	Calcitonine
Ct.Po	Porosité corticale
Ct.Th	Epaisseur de l'os cortical
CTx	Telopeptide C-terminal du collagène de type I
Cx 43	Connexine 43
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
DA	Degré d'anisotropie
DAPI	4,6 diamidino-2-phenylindole
DKK1	Dickkopf 1
DMO	Densité minérale osseuse
DMP1	Dentin matrix protein 1
DPD/DPYR	Deoxypyridinoline
DXA	Absorptiométrie biphotonique à rayons X
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceine
FSH	Hormone folliculo-stimulante

GH	Hormone de croissance
GnRH	Hormone déclenchant la gonadotropine
HDL	High-density lipoprotein
HES	Coloration hématoxyline/éosine/safran
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-adrénérquique
5-HT	5-hydroxytryptamine (sérotonine)
ICTP	Telopeptide carboxylé du collagène de type I
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1	Interleukine 1
IL-3	Interleukine 3
IL-6	Interleukine 6
IRM	Imagerie à résonance magnétique
KO	Animaux ayant un gène délété
LH	Hormone lutéinisante
MAR	Mineral apposition rate
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophage
MEOS	Microsomal ethanol-oxidizing system
MEPE	Phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire
MET	Niveau d'intensité métabolique équivalente
μ CT	Micro-tomographie à rayons X
MMP	Metalloprotéinases de la matrice
NanoCT	Nano-tomographie à rayons X
NaCl	Chlorure de sodium
NE	Norépinephrine
NO	Oxyde nitrique
NTx	Telopeptide N-terminal du collagène de type I
OC	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
OSF-1	Osteoblast stimulating factor-1
OSM	Oncostatine
OVX	Groupes d'animaux ovariectomisés
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PICP	Extension carboxylée du collagène de type I
PINP	Extension aminée du collagène de type I
Po.Dm	Diamètre des pores
Po.N	Nombre de pores

Po.Sp	Espace entre les pores
PoS/PoV	Surface des pores par rapport au volume des pores
pQCT	Tomographie quantitative périphérique
PTH	Parathormone
PYD/PYR	Pyridinoline
RANK	Récepteur activateur de NF- κ B
RANKL	Ligand du récepteur activateur de NF- κ B
ROI	Région d'intérêt
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SD	Ecart-type
SEM	Ecart standard à la moyenne
SHAM	Groupes d'animaux opérés et ouverts mais n'ayant pas subi d'ablation
SMI	Structure model index
SNC	Système nerveux central
SOST	Sclerostine
Tb.N	Nombre de travées osseuses
Tb.Sp	Espace entre les travées osseuses
Tb.Th	Epaisseur des travées osseuses
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Tph	Tryptophane hydroxylase
TRAP/TRACP	Phosphatase acide résistante au tartrate
Trp	Tryptophane
VIH	Virus d'immuno-déficience humaine
VMA	Vitesse maximale aérobie (équivalent de la VO ₂ max)
VOI	Volume d'intérêt

Liste des figures

Figure 1 : Coupe d'un os long.....	27
Figure 2 : Histologie de l'os compact et de l'os spongieux.....	28
Figure 3 : Différentes cellules osseuses.....	30
Figure 4 : Différenciation des ostéoclastes.....	31
Figure 5 : Différenciation possible des cellules souches mésenchymateuses.....	33
Figure 6 : Localisation des ostéocytes.....	35
Figure 7 : Différenciation de la lignée ostéoblastique jusqu'à l'ostéocyte mature et marqueurs associés.....	37
Figure 8 : Communication entre les ostéocytes.....	38
Figure 9 : Le remodelage osseux.....	40
Figure 10 : Rôle de RANK et RANKL dans la différenciation de l'ostéoclaste.....	49
Figure 11 : Activation et inhibition de la voie de signalisation Wnt.....	50
Figure 12 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la voie Wnt en réponse à une charge mécanique.....	51
Figure 13 : Etapes de la différenciation des ostéoclastes et facteurs associés.....	52
Figure 14 : Images d'os obtenues par pQCT.....	56
Figure 15 : Images d'histomorphométrie d'os trabéculaire, cortical et de la moelle osseuse.	58
Figure 16 : Images obtenues par IRM.....	59
Figure 17 : Vue hiérarchisée des différentes structures osseuses que l'on peut imager avec un μ CT et un nanoCT.....	60
Figure 18 : Constitution des lignes de lumière au Synchrotron Soleil d'Orsay.....	62
Figure 19 : Schéma d'un test de flexion 3 points (A) et d'un test de flexion 4 points (B).....	64
Figure 20 : Marqueurs de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes.....	65
Figure 21 : Evolution de la masse osseuse avec l'âge.....	68
Figure 22 : Facteurs influençant le pic de masse osseuse.....	69
Figure 23 : Voies oxydatives du métabolisme de l'alcool.....	74
Figure 24 : Mécanismes responsables des effets directs et indirects de l'alcool sur l'os.....	95
Figure 25 : Concordance des âges au niveau du tissu osseux entre l'homme et le rat.....	120
Figure 26 : Schématisation de l'alcoolisation volontaire des animaux.....	121
Figure 27 : Tapis roulant à 10 couloirs utilisé pour le protocole d'entraînement des rats.....	123
Figure 28 : Appareil Discovery, Hologic.....	125
Figure 29 : Rat anesthésié pour l'examen d'absorptiométrie biphotonique <i>in vivo</i>	125
Figure 30 : Acquisitions de la DMO et du CMO du corps entier (A) et du fémur droit (B) par DXA.....	126
Figure 31 : Micro tomographe à rayons X Skyscan 1072 (Belgique).....	127
Figure 32 : Placement du fémur sur le porte échantillon pour l'acquisition avec le μ CT.....	128
Figure 33 : Reconstitution du balayage de l'échantillon par les rayons X lors de l'acquisition au μ CT.....	129
Figure 34 : Principe de la technique du μ CT : balayage de l'échantillon avec les rayons X puis reconstruction de la morphologie en 3D de l'échantillon.....	130
Figure 35 : Différentes étapes de la transformation de l'échantillon entre la phase d'acquisition, d'analyse et de reconstruction 3D.....	130
Figure 36 : Zone du fémur analysée pour évaluer la microarchitecture.....	131
Figure 37 : Région d'intérêt pour l'analyse de l'os trabéculaire (métaphyse du fémur).....	131
Figure 38 : Choix de la région d'intérêt pour l'analyse de l'os cortical (métaphyse du fémur).....	132
Figure 39 : Phase de seuillage qui déterminera le plein du vide sur les coupes 2D.....	132

Figure 40 : Visualisation 2D de l'os trabéculaire, avant la reconstruction 3D du volume d'intérêt.	133
Figure 41 : Visualisation 2D de l'os cortical avant la reconstruction 3D de cette zone. ...	134
Figure 42 : Mesure des diamètres internes et externes des os avec le logiciel Image J, et mesure de la hauteur du fémur avec un pied à coulisse.	134
Figure 43 : Schéma d'un test de flexion 3 points.	135
Figure 44 : Presse Instron Bluehill (A), positionnement du fémur sur la presse (B), et courbe charge/déplacement obtenue avec le test de flexion 3 points (C).	136
Figure 45 : Représentations des diamètres externes (A et B) et internes (a et b) servant à calculer les paramètres de résistance osseuse.	137
Figure 46 : Différentes étapes d'un dosage ELISA.	138
Figure 47 : Spectrophotomètre ELx 800.	139
Figure 48 : Longueurs d'onde correspondant aux couleurs dans le domaine du visible. ...	142
Figure 49 : Lames concaves utilisées pour la microscopie en épifluorescence et la microscopie confocale.	143
Figure 50 : Coupes de tibia colorées au bleu de Toluidine.	144
Figure 51 : Analyse de la taille des lacunes ostéocytaires sur des coupes colorées au bleu de Toluidine.	145
Figure 52 : Analyse de la taille des gouttelettes lipidiques dans la moelle sur des coupes colorées au bleu de Toluidine.	145
Figure 53 : Microtome Leica (Allemagne).	146
Figure 54 : Etapes de l'acquisition à l'obtention des images en microscopie confocale. ...	147
Figure 55 : Péliose hépathique (dilatation des veines sinusoides) observée sur des coupes de foies colorées avec de l'hématoxyline, de l'éosine et du safran (HES).	170
Figure 56 : Coupes histologiques du foie.	191
Figure 57 : Immunomarquages avec les anticorps caspase-3, ostéocalcine (OC), cluster de différenciation 44 (CD44) et collagène de type I (COL 1).	194
Figure 58 : Surfaces des lacunes ostéocytaires, nombre de lacunes vides dans l'os cortical (tibia) et nombre et surfaces des gouttelettes lipidiques dans la moelle.	196
Figure 59 : Images d'ostéocytes en 2D obtenues sur des coupes ultra-fines et imagées en microscopie électronique à transmission.	197
Figure 60 : Morphologie en 3D des ostéocytes obtenues en microscopie confocale après immuno-marquages avec du CD44 et de la caspase-3.	198
Figure 61 : Contenu lipidique de la moelle, des micro-vaisseaux et des ostéocytes sur des lames colorées au bleu de Toluidine, et immuno-marquages des ostéocytes avec de la caspase-3.	214
Figure 62 : Contenu lipidique dans les vaisseaux sanguins (A, B), et dans les ostéocytes (C, D, E, F) du groupe A35.	215
Figure 63 : Schéma récapitulatif des observations de l'étude 4.	217
Figure 64 : Apoptose des ostéocytes révélée par un immun marquage à la caspase-3.	255
Figure 65 : Régulation du remodelage osseux par les ostéocytes et influence de l'alcool et de l'exercice physique.	295
Figure 66 : Schéma de l'appareil permettant d'appliquer un mouvement de fluides aux cultures de cellules.	299

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des facteurs systémiques influençant l'os.....	45
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des facteurs centraux influençant l'os.....	48
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des facteurs locaux du tissu osseux.	54
Tableau 4 : Liste des lignes de lumière du Synchrotron Soleil d'Orsay.....	62
Tableau 5 : Marqueurs du remodelage osseux et leurs abréviations.	66
Tableau 6 : Marqueurs de différenciation entre ostéoblaste, ostéocyte jeune et ostéocyte mature.	67
Tableau 7 : Equivalence entre le nombre de verres ingérés, la concentration sanguine d'éthanol et les effets physiques observés.	92
Tableau 8 : Protocole d'entraînement sur tapis roulant pour l'étude 1.....	123
Tableau 9 : Protocole d'entraînement sur tapis roulant pour l'étude 5.....	123
Tableau 10 : Apports hydriques et énergétiques durant l'étude pour les 4 groupes.	151
Tableau 11 : Poids, densités osseuses et compositions corporelles à la fin du protocole..	152
Tableau 12 : Microarchitecture de l'os trabéculaire du fémur.....	153
Tableau 13 : Microarchitecture de l'os cortical du fémur.	153
Tableau 14 : Propriétés biomécaniques du fémur.....	154
Tableau 15 : Concentration des marqueurs du remodelage osseux.	154
Tableau 16 : Consommations de boisson et nourriture des animaux des quatre groupes..	169
Tableau 17 : Evolution du CMO, de la DMO et de la composition corporelle.	171
Tableau 18 : Paramètres de microarchitecture trabéculaire.	174
Tableau 19 : Paramètres de microarchitecture corticale.	175
Tableau 20 : Paramètres biomécaniques du fémur.	176
Tableau 21 : Concentrations des marqueurs du remodelage osseux et de la leptine.	176
Tableau 22 : Consommations de boisson et nourriture des quatre groupes.....	249
Tableau 23 : CMO, DMO et composition corporelle.	249
Tableau 24 : Paramètres de microarchitecture trabéculaire du fémur.	251
Tableau 25 : Paramètres de microarchitecture et de macroarchitecture corticale du fémur.	253
Tableau 26 : Paramètres biomécanique du fémur.....	254
Tableau 27 : Concentrations des marqueurs du remodelage osseux : ostéocalcine (OC), telopectides du collagène (NTx) et de la leptine.	254
Tableau 28 : Cibles à quantifier en réponse à un traitement alcoolisé combiné ou non à une activité physique.	298

Introduction

L'ostéoporose est caractérisée par une diminution de la densité minérale osseuse, une altération de la microarchitecture osseuse et par une augmentation du risque de fracture (Rachner *et al.* 2011). De nombreux organes tel que les ovaires, les intestins (Quarles 2008) et le cerveau (Bonnet *et al.* 2008) peuvent influencer sur la masse et la densité minérales osseuses au cours de la vie, et ainsi provoquer une ostéopénie, voir une ostéoporose. Chez l'homme, l'ostéoporose est moins fréquente que chez la femme mais elle existe néanmoins (Ebeling 1998). Les facteurs connus à ce jour engendrant l'ostéoporose masculine sont entre autres l'hypogonadisme, l'utilisation prolongée de corticoïdes et la consommation excessive d'alcool (Szulc et Delmas 2002).

La consommation d'alcool est élevée dans nos sociétés modernes, d'autant plus en France, où l'alcool est intégré à notre culture. Un million et demi de personnes dans notre pays sont dépendantes à l'alcool (Perney *et al.* 2008) et chaque année, 15 000 à 20 000 décès sont liés à l'alcool en France (Rey *et al.* 2010). Parmi ces décès, 8 personnes sur 10 sont des hommes. L'alcool a des effets néfastes sur de nombreux tissus, y compris au niveau du système osseux. En effet, une consommation élevée d'alcool entraîne une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) (Turner 2000) tandis qu'une DMO supérieure a été observée chez des femmes post-ménopausées ayant eu une faible consommation d'alcool au cours de leur vie (1 verre par jour) (Rapuri *et al.* 2000). Toutefois, les effets directs et indirects des concentrations et volumes d'alcool sur les paramètres osseux ne sont pas totalement élucidés.

D'autre part, si les effets d'une alcoolisation chronique ont été bien étudiés sur la microarchitecture trabéculaire, peu d'études ont été réalisées concernant l'os cortical. De la même manière, si l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes suite à un traitement alcoolique a été étudiée *in vivo* et *in vitro* (Turner 2000), les effets de l'alcool sur l'activité de l'ostéocyte ne sont pas très bien connus à ce jour (Wang *et al.* 2003).

Parmi les traitements recommandés aujourd'hui pour soigner l'ostéoporose, la prise de calcium, de vitamine D, de substances pharmacologiques (bisphosphonates, raloxifène, etc.) et la pratique d'une activité physique plusieurs fois par semaine (Schnatz *et al.* 2011) sont les plus courants.

L'exercice physique applique des contraintes sur le squelette, qui modifient la masse osseuse (Schoutens *et al.* 1989). En effet, il est maintenant connu que le squelette a la capacité de s'adapter aux charges mécaniques auxquelles il est soumis, afin d'allier à la fois

résistance et économie d'énergie (Bonewald 2007). Des activités physiques à impacts élevés augmentent la masse osseuse (Breban *et al.* 2011) tandis que des activités physiques portées, une immobilisation prolongée, ou l'hypogravité provoquent une diminution de la masse osseuse (Nichols and Rauh 2011).

Du fait du nombre élevé d'adultes et de jeunes adultes s'adonnant à une consommation régulière d'alcool (Perera *et al.* 2011; Slutske 2005), et des effets positifs reconnus de l'activité physique sur l'os, il nous semblait pertinent d'étudier les effets combinés d'une alcoolisation chronique et d'une activité physique afin de juger de l'effet « compensateur » potentiel de l'exercice physique sur le tissu osseux.

Ces réflexions introductives illustrent la complexité des relations impliquant l'alcool, le métabolisme osseux et l'activité physique. La revue de littérature qui suit, tend à faire le point sur ces différents aspects.

Revue de littérature

I. LE TISSU OSSEUX

A. Composition

1. Généralités

Le squelette humain adulte est constitué de 206 os (Tortora et Grabowski 1994). Les os assurent plusieurs fonctions : protection des organes vitaux, soutien des tissus mous et point d'attache des muscles squelettiques ; fonction mécanique permettant les déplacements du corps en servant de point de levier aux muscles ; homéostasie des minéraux (calcium, phosphore), formation des cellules sanguines (moelle) et réserve d'énergie grâce aux lipides qui se trouvent dans la moelle (Confavreux 2011).

D'un point de vue structural, les os longs sont constitués d'os cortical compact et d'os spongieux ou trabéculaire (Figure 1).

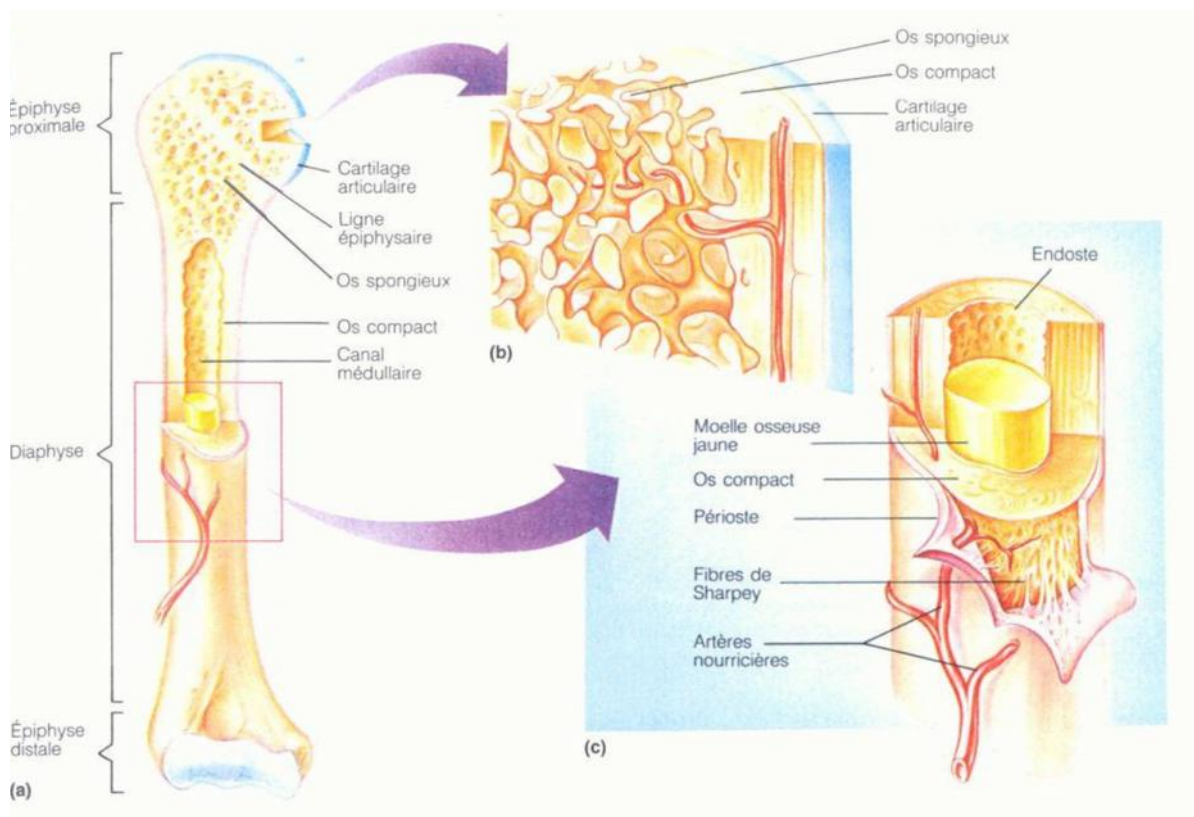


Figure 1 : Coupe d'un os long.

Les os longs sont composés de trois parties : épiphyse, métaphyse et diaphyse. A l'intérieur des épiphyses et de la métaphyse se trouvent de l'os spongieux et de l'os compact. Tiré de « Principes d'anatomie et de physiologie ». Tortora et Grabowski. Septième édition. De Boeck Université, 1994.

2. L'os compact ou cortical

L'os compact forme la couche externe de tous les os du squelette et la plus grande partie de la diaphyse des os longs. Il protège et soutient les os longs, et leur permet de résister à la pression du poids du corps (Tortora et Grabowski 1994). Chez l'adulte, il présente une structure annulaire concentrique. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques pénètrent dans l'os par les canaux de Volkmann. Ils sont reliés aux vaisseaux sanguins du canal médullaire et à ceux de Havers, qui sont parallèles à l'axe longitudinal de l'os. Ils sont entourés d'anneaux de matrice dure calcifiée. De minuscules canaux, les canalicules, irradiant dans toutes les directions et sont remplis de liquide extracellulaire. Ces canalicules contiennent de fins prolongements d'ostéocytes (Burger et Klein-Nulend 1999). Ils rattachent les lacunes les unes aux autres puis aux canaux de Havers. Il y a ainsi un minuscule réseau miniature de canaux complexes à l'intérieur de l'os. L'ostéon est l'ensemble formé par le canal de Havers, ses lamelles, ses lacunes, ses ostéocytes et ses canalicules (Figure 2). Les espaces qui se trouvent entre les ostéons renferment les lamelles interstitielles. Ce sont des fragments d'anciens ostéons détruits durant le remaniement osseux.

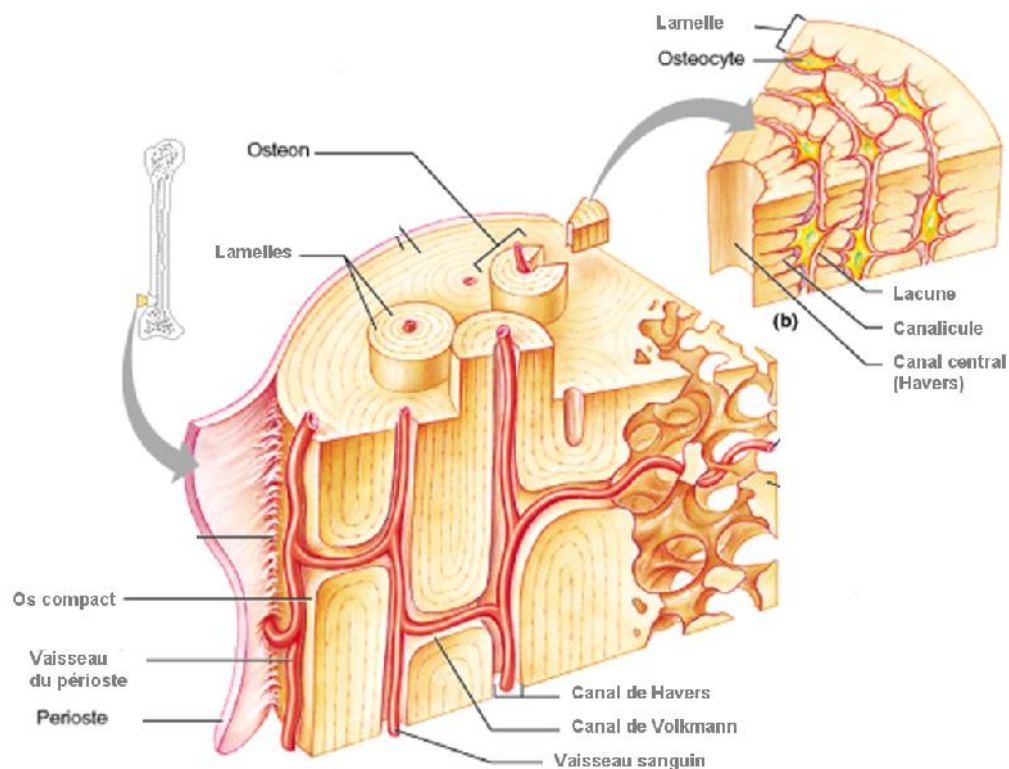


Figure 2 : Histologie de l'os compact et de l'os spongieux.

L'os compact est constitué de lamelles organisées autour des canaux de Havers. Ces ensembles s'appellent des ostéons. A l'intérieur des lamelles se trouvent des ostéocytes, reliés entre eux par des canalicules. Tiré de Principes d'anatomie et de physiologie ». Tortora et Grabowski. Deuxième édition. De Boeck Université. 1994.

3. L'os trabéculaire ou spongieux

L'os spongieux constitue la plus grande partie des os courts, plats et de forme irrégulière, ainsi que la plus grande partie des épiphyses des os longs. Contrairement à l'os compact, le tissu osseux spongieux présente une structure plus irrégulière. Il ne comporte pas de vrais ostéons mais est constitué de lamelles qui forment un treillis irrégulier de minces plaques d'os appelées travées osseuses (Tortora et Grabowski 1994). Ces travées sont orientées selon un réseau de plaques et de poutres ajustées de façon à répondre au mieux aux sollicitations mécaniques subies par l'os. Les travées participent à la résistance osseuse (Barak *et al.* 2010). Dans certains os (hanche, côtes, vertèbres), l'espace entre les travées osseuses est rempli de moelle rouge qui produit les cellules sanguines. A l'intérieur des travées osseuses se trouvent les ostéocytes qui résident dans des lacunes et les canalicules irradiant à partir de celles-ci. Les vaisseaux sanguins du périoste (enveloppe externe de l'os) pénètrent jusqu'à l'os spongieux, et les ostéocytes des travées sont alimentées directement par le sang qui circule à travers les cavités de moelle osseuse.

B. Composition du tissu osseux

L'os est composé d'une matrice organique et d'une partie minérale.

1. La matrice organique

La matrice extra-cellulaire de l'os représente environ 20% d'un os adulte chez les mammifères. Elle détermine l'organisation de l'os et lui confère ses propriétés d'élasticité et de flexibilité. Elle est composée de fibres de collagène de type I à 95%. Les 5% restant sont des protéines non collagéniques (Marks et Hermey 1996). Le collagène est une protéine structurale composée de 3 hélices. Cette triple hélice doit sa configuration à une chaîne de trois polypeptides dont la séquence d'acides aminés est une répétition de Gly-X-Y, avec un fort pourcentage de proline et d'hydroxyproline (Van der Rest et Garrone 1991). Les principales protéines non collagéniques se trouvant dans la matrice organique sont les protéoglycanes, les facteurs de croissance et les glycoprotéines, parmi lesquelles figurent l'ostéonectine, la fibronectine et l'ostéopontine (Robey 2002). Les protéoglycanes participent à l'organisation de la matrice et à la régulation de facteurs de croissance. Ils

sont présents durant les premières étapes de l'ostéogenèse. Les glycoprotéines sont produites à différents stades de la maturation ostéoblastique. Elles ont des fonctions très vastes allant du contrôle de la prolifération cellulaire, aux interactions cellules-matrice en passant par le contrôle du dépôt d'hydroxyapatite (Gokhale *et al.* 2001)

2. La partie minérale

La composition de l'os varie en fonction de l'âge, de la localisation anatomique, du régime alimentaire et de l'état de santé. En général, la partie minérale représente de 50 à 70% des os chez les adultes. Contrairement à d'autres tissus conjonctifs, la matrice du tissu osseux renferme une quantité importante de sels minéraux, notamment une forme cristallisée de phosphate de calcium $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, appelée hydroxyapatite, et un peu de carbonate de calcium (CaCO_3) (Tortora et Grabowski 1994). De petites quantités d'hydroxyde de magnésium, de fluorure et de sulfate s'y trouvent également. Les cristaux se trouvant dans l'os sont très petits et de fait plus solubles que les cristaux observés en géologie, ce qui permet à l'os de servir de réservoir pour les ions calcium, phosphate et magnésium. Lorsque les sels minéraux se déposent sur la trame des fibres de collagènes de la matrice, la cristallisation s'effectue et le tissu osseux durcit. C'est le processus de calcification, ou de minéralisation. L'association des sels cristallisés et du collagène engendre la dureté, une des caractéristiques de l'os (Landis 1995)

C. Les cellules osseuses

Il existe quatre types de cellules dans le tissu osseux, provenant de différentes lignées cellulaires (Figure 3) (Marks et Odgren 2002).

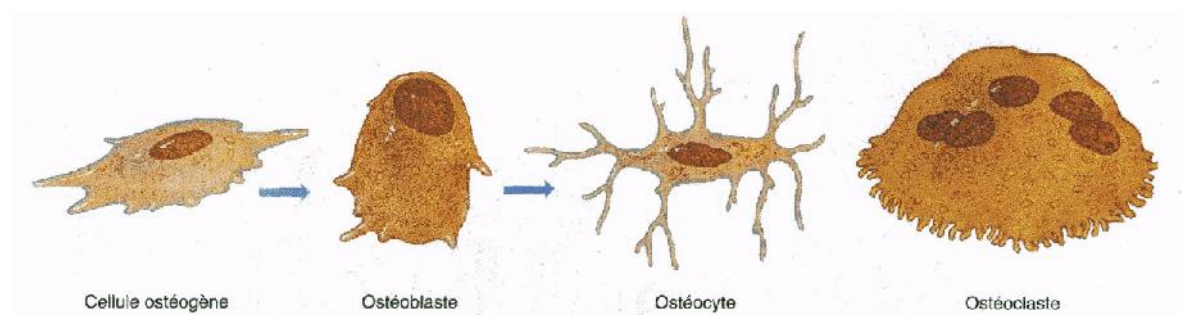


Figure 3 : Différentes cellules osseuses.

Les cellules ostéogènes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont originaires de la même lignée (cellules souches mésenchymateuses). Les ostéoclastes proviennent des cellules souches hématopoïétiques. Tiré de « Principes d'anatomie et de physiologie ». Tortora et Grabowski. Deuxième édition. De Boeck Université, 1994.

1. La lignée ostéoclastique

L'ostéoclaste est une cellule géante d'environ 100 µm de diamètre, multinucléé et disposée à la surface de la matrice minéralisée. Elle provient des cellules hématopoïétiques de la lignée des monocytes-macrophages (Chambers 2010). Les étapes de différenciation précoces sont communes avec les macrophages sauf aux dernières étapes de différenciation. La différenciation est caractérisée par l'expression séquentielle de différents gènes (Figure 4).

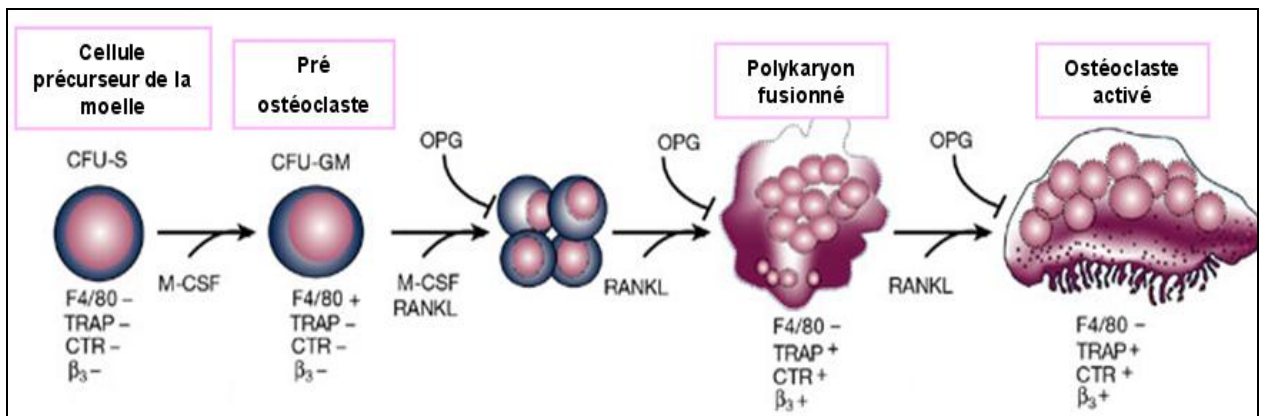


Figure 4 : Différenciation des ostéoclastes.

Les précurseurs des ostéoclastes se trouvent dans la moelle osseuse (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Ces précurseurs se différencient en pré-ostéoclastes puis en ostéoclastes sous l'influence de RANKL.

Tiré de Boyle (Boyle *et al.* 2003).

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance sont connus pour affecter la différenciation et la maturation de l'ostéoclaste, et le rôle central du complexe RANK-RANKL-OPG a été confirmé (Chambers 2000). Après avoir proliféré dans la moelle osseuse, les pré-ostéoclastes mononucléés sont guidés dans la moelle jusqu'à la surface de l'os par des mécanismes encore mal connus. Les précurseurs sont guidés près des sites ayant besoin d'être résorbés. Ensuite, les précurseurs mononucléés fusionnent en ostéoclastes multinucléés. Ces cellules ont une structure particulière et la partie de l'ostéoclaste qui est en contact avec la matrice possède une membrane plasmique dite « en brosse » (Marks et Odgren 2002). La seule fonction de l'ostéoclaste connue à l'heure actuelle est la résorption de l'os minéralisé, de la dentine et du cartilage calcifié. L'ostéoclaste se fixe sur la matrice osseuse grâce à ses récepteurs d'adhésion. L'ostéoclaste exprime au moins quatre intégrines, qui se fixent sur les protéines de la matrice extracellulaire comme la vitronectine, le collagène, l'ostéopontine et la sialoprotéine (Nesbitt *et al.* 1993). Grâce à sa bordure « en brosse », la surface de l'ostéoclaste en contact avec la

matrice osseuse est augmentée. L'ostéoclaste dissout les cristaux d'hydroxyapatite en sécrétant des protons H^+ qui diminuent le pH (Baron *et al.* 1985). Après dissolution de la phase minérale, la matrice organique est dégradée par des protéinases et des métalloprotéinases de la matrice (MMP), laissant place à une lacune de résorption contenant des produits de dégradation osseuse (fragments de collagène). La résorption osseuse est une étape obligatoire pour la maturation normale d'un squelette, incluant par exemple la croissance osseuse et le remodelage osseux qui permet la réparation des os et leur adaptation à l'environnement (Väänänen et Zhao 2002).

L'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique, en alternant des phases migratoires le long de la surface osseuse et des phases de résorption active qui créent des lacunes de résorption. Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse. Après un certain nombre de cycles, l'ostéoclaste entre en apoptose et disparaît (Kanehisa et Heersche 1988; Väänänen et Zhao 2002).

2. La lignée ostéoblastique

On peut définir trois types de cellules issues des mêmes cellules précurseurs, et ayant des fonctions différentes.

a) Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes quiescents qui se sont progressivement aplatis. Elles bordent toutes les surfaces osseuses qui ne sont pas en phase de remodelage. Ces cellules sont reliées entre elles (Miller *et al.* 1989) et aux ostéocytes par des « gap junctions », permettant aux cellules à la surface et en profondeur de communiquer afin de coordonner leurs actions. Il a été montré que les cellules bordantes nettoient les restes de matrice dans les cavités de résorption après que les ostéoclastes aient fini de dégrader la matrice osseuse, et que la formation osseuse ne se fait pas dans les cavités de résorption si les cellules bordantes ne les ont pas « nettoyées » au préalable (Everts *et al.* 2002). Cette action se fait à l'aide de métalloprotéinases et de protéases.

b) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules de 20 à 30 μm de diamètre qui possèdent un seul noyau de grande taille. Ils sont disposés en rangées à la surface du tissu ostéoïde qu'ils fabriquent. Les ostéoblastes proviennent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Caplan 1991), pouvant se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondroblastes, myoblastes et fibroblastes (Friedenstein 1990) (Figure 5).

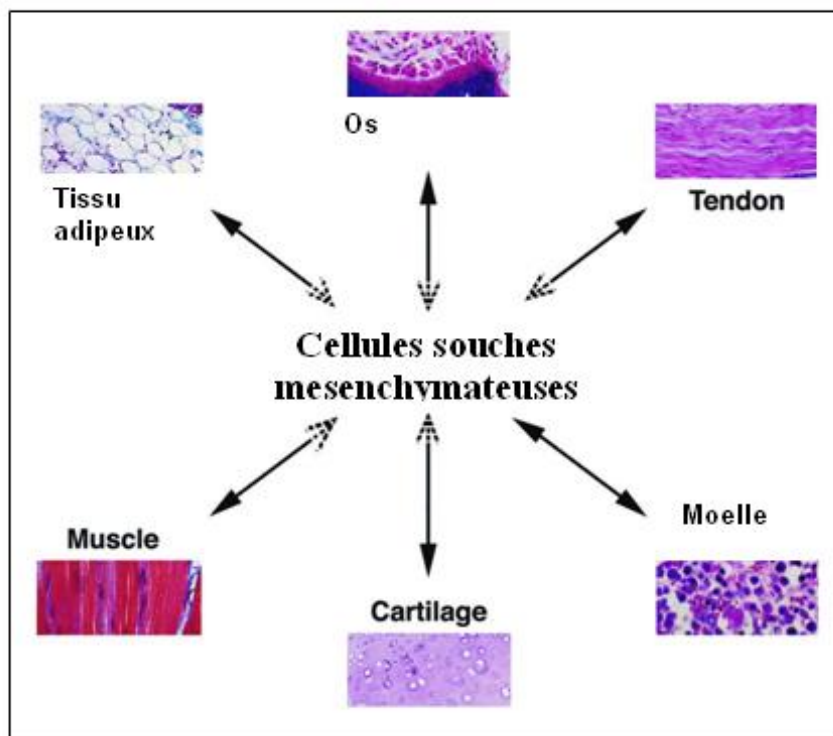


Figure 5 : Différenciation possible des cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires : adipocytes, ostéoblastes, myocytes, chondrocytes, etc. Tiré de Chen et Tuan (Chen et Tuan 2008).

La maturation différentielle des CSM est caractérisée par l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Un des facteurs de transcription connu concernant la transformation des CSM en ostéoblastes est Cbfa1/Runx2 (Banerjee *et al.* 1997; Ducky *et al.* 1997). L'ostéogenèse est caractérisée par la prolifération de cellules ostéoprogénitrices, qui, après arrêt de la multiplication cellulaire se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation osseuse. Plusieurs marqueurs sont exprimés de façon séquentielle au cours de la différenciation ostéoblastique (Rocheffort *et al.* 2010). La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de gènes

ostéoblastiques précoces (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine) ou tardifs (bone sialoprotein, ostéocalcine) (Rochefort *et al.* 2010).

La fonction principale de l'ostéoblaste est de synthétiser et de minéraliser la matrice osseuse au cours de la croissance du squelette, de renouveler la matrice osseuse chez l'adulte et d'effectuer la réparation osseuse tout au long de la vie (Mundy 1996). La matrice osseuse est composée majoritairement de collagène de type I, mais les ostéoblastes synthétisent également un grand nombre de protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine), des molécules d'adhésion qui interagissent avec les intégrines, des protéoglycanes et des facteurs de croissance.

Premièrement, les ostéoblastes sécrètent la matrice organique (ou matrice ostéoïde) structurée par les fibres de collagènes (Marks et Odgren 2002). Ensuite les ostéoblastes matures contrôlent la minéralisation de la matrice ostéoïde par des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes jouent aussi un rôle dans la différenciation des ostéoclastes via la molécule RANKL (Martin et Ng 1994; Udagawa *et al.* 1999).

c) Les ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes dans le tissu osseux chez les mammifères. Elles représentent 95% de toutes les cellules du tissu osseux, soit 20 000 à 80 000 cellules/mm³ selon les espèces (Rochefort *et al.* 2010). Chez l'être humain, on estime à 25 ans la durée de vie des ostéocytes. Le rôle des ostéocytes est resté inconnu pendant très longtemps mais ces quinze dernières années, nombre de publications ont essayé de faire la lumière sur cette cellule (Bonewald 2007; Burger *et al.* 1995; Ferretti *et al.* 1999). L'ostéocyte est une cellule qui est isolée dans la matrice osseuse, tandis que les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules bordantes sont à la surface de l'os (Figure 6).

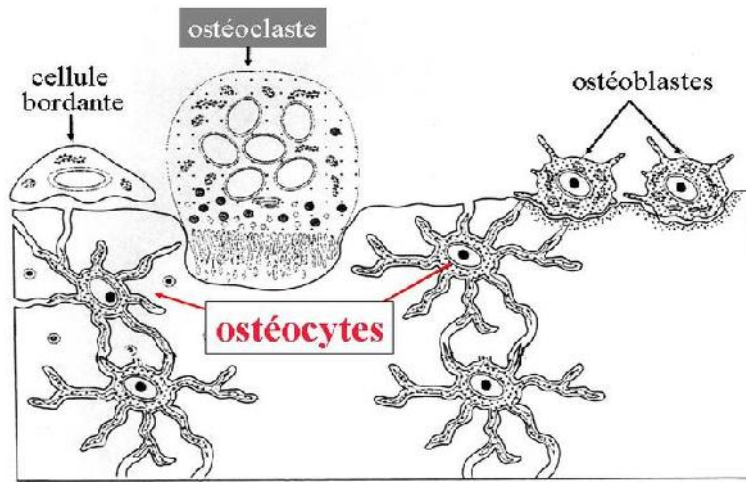


Figure 6 : Localisation des ostéocytes.

Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes sont à la surface de l'os, tandis que les ostéocytes sont emmurés dans la matrice osseuse. Les ostéocytes sont reliés entre eux et aux cellules en surface grâce à des prolongements cytoplasmiques. Tiré des enseignements d'histologie pour les PCEM1 et PCEM2 du Dr Serge Nataf, Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon.

- **Morphologie**

L'ostéocyte a une morphologie comparable à un neurone, avec des extensions cytoplasmiques qui s'échappent du corps cellulaire appelées « dendrites », contenus dans des canaux de la matrice osseuse appelés canalicules. L'ostéocyte a une forme fusiforme dans les os longs et est plus arrondi dans les os non porteurs comme la calvaria (Vatsa *et al.* 2008a). Il est situé dans une cavité appelée « lacune » et s'est fait emprisonner dans la matrice osseuse. Les ostéocytes communiquent entre eux et avec les cellules à la surface de l'os grâce aux dendrites. Les dendrites et le corps cellulaire de l'ostéocyte sont baignés dans du liquide interstitiel (Klein-Nulend *et al.* 2005) et il est estimé que cette surface d'échanges est 400 fois supérieure au système des canaux de Havers et de Volkmann (Bronner 1992). L'ensemble lacunes et canalicules forme un réseau permettant une interconnection et une communication de l'ensemble des ostéocytes d'un os : c'est le réseau lacuno-canaliculaire. Chez l'homme, l'ostéocyte mesure approximativement 10µm de large par 20µm de long (Rocheffort *et al.* 2010).

- **Origine des ostéocytes**

Les ostéoblastes sont impliqués dans la minéralisation de la matrice osseuse. A la fin d'une phase de prolifération, l'ostéoblaste a trois possibilités : i) synthétiser une matrice organique qui va se minéraliser puis être emmuré dans la matrice et devenir un ostéocyte, ii) entrer en quiescence et devenir une cellule bordante ou iii) mourir par apoptose (mort cellulaire programmée) (Boyce *et al.* 2002; Parfitt 1990). Un ostéocyte est un vieil ostéoblaste emmuré dans la matrice osseuse qu'il a lui-même produite (Dallas et Bonewald 2010). Pendant le processus « d'enterrement », le futur ostéocyte garde des contacts avec les ostéoblastes environnants, grâce à ses extensions cytoplasmiques (les dendrites). Il est estimé qu'environ 10 à 20% des ostéoblastes se différencient en ostéocytes (Aubin et Turksen 1996). Les mécanismes régulant les processus de transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte sont à ce jour mal connus. Les ostéocytes pourraient stimuler la différenciation des ostéoblastes et la formation d'ostéocytes en exprimant le facteur OSF-1 (osteoblast-stimulating factor-1) (Imai *et al.* 1998; Tezuka *et al.* 1990). La cellule va connaître une modification de sa morphologie (appareil de Golgi étendu, nombreux ribosomes, réticulum endoplasmique très développé) accompagné de la modification de l'expression des marqueurs membranaire, cytoplasmique et nucléaire (Dallas et Bonewald 2010) en fonction du stade de maturation de l'ostéocyte (Figure 7). Par exemple, la différenciation ostéocytaire s'accompagne d'une réduction de la phosphatase alcaline, de la sialoprotéine, de l'ostéocalcine, du collagène de type I et de Runx2 (Rochefort *et al.* 2010). L'ostéopontine et l'intégrine $\beta 3$ sont maintenues tandis que le CD44 est exprimé plus fortement dans les ostéocytes. De nouveaux marqueurs apparaissent tels que la DMP1 et MEPE (Rochefort *et al.* 2010). Une fois que la matrice ostéoïde est minéralisée, la structure de l'ostéocyte change à nouveau : la taille du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi vont diminuer dans l'ostéocyte par rapport à l'ostéoblaste car la synthèse des protéines est plus faible dans l'ostéocyte.

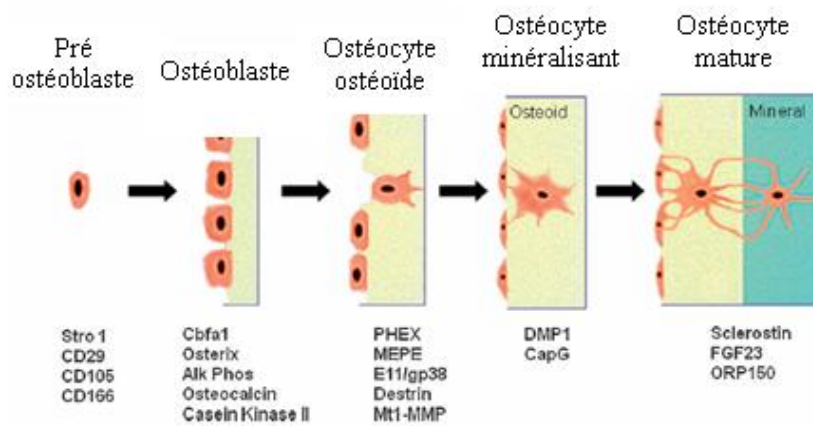


Figure 7 : Différenciation de la lignée ostéoblastique jusqu'à l'ostéocyte mature et marqueurs associés. Différents marqueurs sont exprimés par les cellules de la lignée ostéoblastique lors des étapes de différenciation. Par exemple la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine sont exprimés par l'ostéoblaste tandis que la sclérostine est exprimée par l'ostéocyte mature. Tiré de Bonewald, JBMR 2011.

• Rôles de l'ostéocyte

L'ostéocyte a longtemps été regardé comme une cellule inutile, à la fin de sa vie et emmuré dans l'os. Aujourd'hui, elle est perçue comme la cellule étant au centre et à l'initiation du processus de remodelage osseux. Les ostéocytes forment un réseau interconnecté grâce à leurs canalicules et sont capables de détecter les variations de pressions et de charges mécaniques (Klein-Nulend *et al.* 2005). En revanche, la question de savoir si c'est le corps cellulaire et/ou les canalicules qui permettent de détecter les variations de pressions fait toujours débat. Néanmoins, les variations mécaniques stimulent les ostéocytes, qui émettent des signaux vers les cellules à la surface de l'os (Bonewald 2006; Rochefort *et al.* 2010). Les stimulations mécaniques et la charge physique ont un rôle anabolique sur la masse osseuse (Nicolella *et al.* 2006). A l'opposé, l'os est capable de s'adapter à son environnement en cas de décharge (d'alitement prolongé par exemple) (Bloomfield 2010; Sievanen 2010) et de diminuer sa masse dans le but d'économiser de l'énergie. Il a été montré que les paramètres influençant la balance entre formation et résorption sont la fréquence, l'intensité et la durée du stimulus mécanique (Rubin and Lanyon 1984; Turner *et al.* 1994). Des modèles mécaniques ont montré *in vitro* que l'ostéocyte est capable de répondre à un stimulus mécanique en modulant l'expression et la sécrétion de plusieurs molécules telles que l'ostéocalcine, la sclérostine, l'oxyde nitrique et les enzymes de synthèse des prostaglandines (Kawata and Mikuni-Takagaki 1998; Klein-Nulend *et al.* 1997; Klein-Nulend *et al.* 1995; Robling *et al.* 2008). Or dans l'os, l'oxyde nitrique inhibe la résorption et favorise la formation osseuse, tout comme les prostaglandines (Bonewald 2011).

Suite à la perception d'un message mécanique et sa conversion en message chimique, les ostéocytes pourraient propager ce message selon deux voies non exclusives : premièrement par la diffusion de molécules produites (NO) et deuxièmement par une méthode de transmission locale via des « gap junctions » (Rochefort *et al.* 2010) (Figure 8). Ces jonctions forment une connexion entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes formant un syncytium fonctionnel. Ces jonctions sont formées par des connexines et la connexine 43 (Cx43) est la principale connexine présente dans l'os. Ces jonctions permettent le passage de molécules comme les prostaglandines (Siller-Jackson *et al.* 2008).

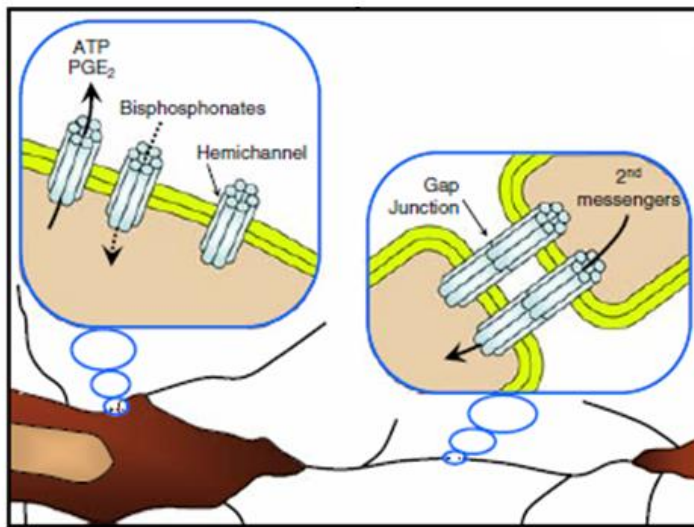


Figure 8 : Communication entre les ostéocytes.

Des semi-canaux composés de connexines laissent passer les prostaglandines (PGE_2) entre les cytoplasmes des ostéocytes et le compartiment extra-cellulaire. Deux semi-canaux provenant d'ostéocytes proches peuvent aussi se rencontrer pour former une « gap jonction » et échanger des informations. D'après Rochefort *et al.* (Rochefort *et al.* 2010).

Les ostéocytes ne sont pas seulement importants durant leur vie : leur apoptose a également un impact physiologique primordial (Seeman 2006). L'apoptose des ostéocytes est perçue par les cellules en surface et un message est envoyé aux cellules ostéoprogénitrices. La nature de ce message n'est pas connue, mais ce message est un signal d'initiation du remodelage osseux (Verborgt *et al.* 2000). L'apoptose ostéocytaire peut entraîner la résorption osseuse (Al-Dujaili *et al.* 2011), sans passer par l'étape impliquant les cellules bordantes (voir chapitre ci-dessous remodelage osseux). De plus, les ostéocytes sont capables d'entraîner la formation osseuse sans étape préalable de résorption, ce qui pourrait être le cas après des fractures ou durant la croissance osseuse (Ma *et al.* 2001; Silvestrini *et al.* 2008). Des études menées sur des modèles animaux ont montré que la modulation de la charge mécanique ainsi que l'ovariectomie entraînent une augmentation de l'apoptose des ostéocytes (Tomkinson *et al.* 1998). Leur « sacrifice » permet de protéger l'intégrité et la résistance du squelette (Seeman 2006).

D. Le remodelage osseux

1. Concept

Le métabolisme du tissu osseux ne cesse jamais. Ce dernier est remanié continuellement et sa matrice est remodelée le long des lignes de stress mécanique. Même à l'âge adulte, le tissu osseux ancien est détruit et remplacé par du nouveau tissu osseux. Ce remaniement permet également de remplacer les tissus lésés ou usés (Eriksen 2010). Le remodelage osseux permet la constitution d'un squelette adapté à la croissance, permet également la conservation de ses propriétés mécaniques, la capacité d'adaptation aux contraintes, ainsi que la réparation des fractures et la mise à disposition du calcium stocké dans les os. Le remodelage osseux a lieu dans une structure appelée BMU (Basal Multicellular Unit) (Parfitt 1994). Cette unité multi cellulaire de base regroupe le travail des ostéoclastes, des ostéoblastes, dont l'action couplée constitue la base du concept de remodelage osseux, mais également des ostéocytes et des cellules bordantes (Figure 9).

Le remodelage osseux est un processus cyclique par lequel quelques zones de la structure osseuse sont résorbées et remplacées par de l'os nouveau (Raggatt et Partridge 2010) (Figure 9). D'un point de vue temporel, la surface à résorber est préparée par les cellules bordantes, qui digèrent la fine couche de matrice non minéralisée sur laquelle elles reposent, afin d'exposer la partie minéralisée de la matrice pour la résorption (Everts *et al.* 2002). Ensuite, les ostéoclastes viennent résorber cette matrice minéralisée. Vient ensuite une phase d'inversion (Figure 9) où des cellules (cellules bordantes et des macrophages), viennent compléter le processus de résorption en nettoyant les cavités de résorption (Everts *et al.* 2002; Raggatt et Partridge 2010). Suite à cette phase, certains ostéoblastes vont former de l'os nouveau, puis devenir des ostéocytes, qui vont rester pris au piège dans la matrice, tandis que d'autres ostéoblastes vont rester à la surface de la zone remodelée, devenir quiescent et constituer les cellules bordantes (Boyce *et al.* 2002). Il y a un délais considérable entre la phase de résorption, qui prend des semaines, et la phase de formation, qui nécessite des mois (Dunlop *et al.* 2009).

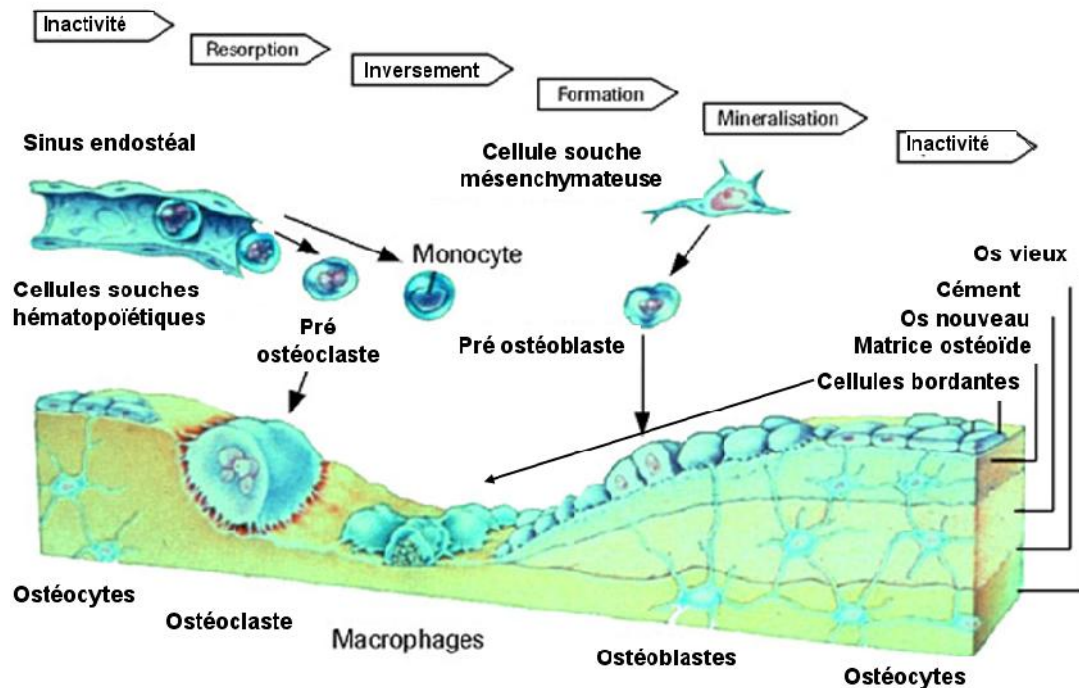


Figure 9 : Le remodelage osseux.

Le remodelage osseux consiste en différentes phases synchronisées : les ostéoclastes résorbent la matrice osseuse, puis les cellules bordantes nettoient les produits de la dégradation osseuse et envoient un signal aux ostéoblastes qui vont ensuite former de l'os nouveau. Les ostéoblastes peuvent ensuite devenir des cellules bordantes ou des ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse.

L'activité d'une BMU se résume en une quantité définie d'os résorbé et d'os formé. Celle-ci peut être équilibrée (formation = résorption), positive (formation > résorption) ou négative (formation < résorption).

2. Régulation du remodelage

Le mécanisme cellulaire de renouvellement du tissu osseux est soumis à l'influence de facteurs exogènes et endogènes, capables de modifier la prolifération, la différenciation et l'activité des différentes cellules osseuses. Les contraintes mécaniques font parties de ces facteurs, ainsi que diverses hormones (hormone de croissance, hormones sexuelles, parathormone, calcitonine) (Raggatt et Partridge 2010).

a) Les facteurs systémiques

Les facteurs systémiques interviennent dans la régulation de l'homéostasie de certains ions. C'est le cas des hormones calciotropes : PTH, vitamine D et calcitonine.

- la parathormone (PTH) : est une hormone hypercalcémiant qui est synthétisée par les glandes parathyroïdes (Aleksyniene et Hvid 2004) dans le but de maintenir un taux suffisant de calcium dans le sang. Elle est sécrétée en cas d'hypocalcémie. La PTH agit directement sur l'os pour promouvoir le relargage du calcium (Hodsman *et al.* 2002) et sur les tubules rénaux pour augmenter la réabsorption de calcium. Dans l'os, la PTH active indirectement la maturation et l'activité des ostéoclastes, par stimulation de l'expression du facteur de différenciation RANKL, sur la surface des ostéoblastes (Yasuda *et al.* 1998). Quand RANKL se lie à son récepteur RANK sur les pré-ostéoclastes, ces précurseurs se différencient en ostéoclastes matures, en présence de M-CSF (macrophage-colony stimulating factor). Les ostéoclastes résorbent ensuite la matrice et libèrent du calcium. Il n'est pas certain que la PTH agisse directement sur RANKL. L'interaction entre RANKL et son récepteur pré-ostéoclastique pourrait être médiée par l'ostéoprotégérine (OPG) (Silvestrini *et al.* 2008), car il a été montré que celle-ci module la communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. Paradoxalement, quand la PTH est administrée par intermittence, elle active la formation osseuse et augmente la quantité d'os trabéculaire (Borba et Manas 2010; Drake *et al.* 2011).

- la vitamine D : est fabriquée dans la peau sous l'action du soleil (Norman 2002). Elle est biologiquement inerte et doit subir deux hydroxylations successives dans le foie et les reins pour devenir biologiquement active, sous la forme 1,25-dihydroxyvitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Reichel *et al.* 1989). Le principal effet de la vitamine D est de maintenir la concentration sérique de calcium à un taux normal (Christakos 2002). Elle effectue ce contrôle en augmentant l'efficacité de l'absorption intestinale de calcium (Amling *et al.* 1999; Yoshizawa *et al.* 1997) et en recrutant des cellules souches osseuses hématopoïétiques qui vont se transformer en ostéoclastes matures (Christakos 2002), et mobiliser le calcium contenu dans les os pour le libérer dans le sang. L'activité des ostéoclastes est régulée de façon indirecte par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ car les ostéoclastes n'ont pas de récepteurs à la vitamine D. Cette régulation va se faire grâce à l'action des cellules ostéoprogénitrices, des précurseurs ostéoblastiques et des ostéoblastes matures (Christakos

2002). Ceux-ci vont produire une variété d'hormones et de cytokines auxquels les ostéoclastes sont sensibles. Les ostéoblastes matures possèdent également des récepteurs nucléaires pour la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Celle-ci augmente l'expression de la phosphatase alcaline, de l'ostéopontine et de l'ostéocalcine (Price et Baukol 1980; Prince et Butler 1987), ainsi que de nombreuses cytokines. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ favorise aussi la minéralisation de la matrice ostéoïde produite par les ostéoblastes en maintenant les concentrations extracellulaires de calcium et de phosphore à un taux normal (DeLuca 1988). De ce fait de l'hydroxyapatite de calcium est déposé dans la matrice osseuse. La production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par les reins est étroitement régulée par la concentration sérique de calcium, à travers les actions de la PTH et du phosphore.

- la calcitonine (CT) : est un peptide composé de 32 acides aminés qui est sécrété principalement par les cellules C de la thyroïde (Galson et Goldring 2002). Sa sécrétion est régulée par la concentration sanguine en calcium. Sa principale action biologique est l'inhibition de la résorption par les ostéoclastes (Deftos et First 1981). L'augmentation de la CT entraîne un rétrécissement des ostéoclastes, qui diminuent leur activité de résorption. Les ostéoclastes ont des récepteurs pour la CT sur leurs parois. La CT peut réguler et être régulée par d'autres hormones calciotropes. Certaines études reportent un effet ambigu de la CT sur les ostéocytes et les ostéoblastes.

D'autres hormones ont une action sur le tissu osseux :

- les stéroïdes : il y a trois catégories d'hormones stéroïdes : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, et les stéroïdes sexuels (oestrogènes, androgènes, progestérone). Les stéroïdes sexuels sont synthétisés en réponse à des signaux envoyés par le cerveau. Les stéroïdes ont un rôle important sur le métabolisme osseux (Bilezikian *et al.* 2002). Ils régulent l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes et renforcent le couplage entre ces cellules par des facteurs paracrines. La principale fonction des stéroïdes sexuels au niveau de l'os est de maintenir un métabolisme osseux constant et de permettre l'établissement du pic de masse osseuse (Bilezikian *et al.* 2002) afin de prévenir la perte de masse osseuse. Les glucocorticoïdes sont utilisés comme traitement dans diverses pathologies (Yang *et al.* 2011).

* les glucocorticoïdes : le cortisol est un glucocorticoïde sécrété par les glandes surrénales (Kream et Lukert 2002). A dose physiologique, il est essentiel pour la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes et des ostéoclastes et module

l'effet d'autres hormones et médiateurs du fonctionnement cellulaire (Kream et Lukert 2002). A dose supra physiologique, il inhibe la formation osseuse (Kim 2010) en inhibant la prolifération des ostéoprogéniteurs, le renouvellement et le fonctionnement des ostéoblastes, et en augmentant l'apoptose des ostéoblastes. *In vitro*, les glucocorticoïdes peuvent stimuler ou inhiber la formation osseuse, selon la maturation du modèle utilisé (Chavassieux *et al.* 1993; Madsen *et al.* 2011).

* les stéroïdes sexuels : les stéroïdes sexuels influencent pratiquement tous les aspects de l'os, du développement au remodelage en passant par la croissance (Clarke et Khosla 2010a; Venken *et al.* 2008). Ils contribuent au dimorphisme sexuel du squelette, à la fermeture des épiphyses (Wiren et Orwoll 2002), à la détermination du pic de masse osseuse, au maintien de l'homéostasie durant la reproduction et à l'âge adulte, et à la conservation de la masse osseuse et de l'architecture. Des récepteurs aux oestrogènes sont présents à la surface des ostéoblastes, des cellules bordantes, et à un niveau plus faibles sur les ostéocytes (Kusec *et al.* 1998). La diminution d'oestrogènes et d'androgènes est accompagnée d'une perte de masse osseuse (Clarke et Khosla 2010a). Les oestrogènes et les androgènes diminuent la résorption osseuse en agissant directement sur les ostéoclastes (Hofbauer *et al.* 1999; Oursler *et al.* 1991; Pacifici *et al.* 1993). Les androgènes régulent également la production de facteurs produits par les ostéoblastes et par les cellules stromales (Vanderschueren et Bouillon 1995; Wiren et Orwoll 2002). Le rôle de la progestérone est moins bien connu, mais un déficit en progestérone fait décroître la masse osseuse tandis que la supplémentation en progestérone accroît la masse osseuse chez ces patientes (Prior *et al.* 1994; Prior *et al.* 1990). La déficience en stéroïdes sexuels est l'une des causes principale d'ostéoporose, nous le détaillons plus loin.

- l'hormone de croissance (GH) : la GH est sécrétée par la glande pituitaire, sous l'influence de peptides provenant de l'hypothalamus (Rosen 2002). La GH a des effets directs et indirects sur l'os, dépendants de l'âge et de la maturité du squelette (Rosen 2002). Indirectement, la GH peut augmenter la DMO via ses effets sur les muscles et le transport de calcium par l'intestin (Rosen 2002). La GH peut également directement stimuler le remodelage osseux (Kann 2004) et augmenter la croissance endochondrale à travers ses actions sur l'ostéoblaste. La GH est essentielle pour la croissance et la maintenance de la masse osseuse (Rosen 2002).

- la leptine : la leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes dont la concentration sanguine est corrélée avec la masse grasse (Considine 2001). Les récepteurs de la leptine sont exprimés par les ostéoblastes et par les chondrocytes mais également au niveau des neurones hypothalamiques (Elefteriou et Karsenty 2004). La leptine augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Cornish *et al.* 2002), la croissance des chondrocytes et régule également le développement des ostéoclastes via des changements dans la production de RANK, RANKL et OPG (Reid 2010). Outre cet effet direct sur les cellules osseuses menant à l'augmentation de la masse osseuse chez les individus obèses, la leptine peut également affecter le tissu osseux via une action sur le système nerveux central. L'injection de leptine entraîne une diminution de la masse osseuse via une augmentation de la résorption et une formation plus faible (Ducy *et al.* 2000; Elefteriou *et al.* 2005). Cela semble être médié par les récepteurs β -adrénergiques situés à la surface des ostéoblastes.

- l'adiponectine : c'est une adipokine très importante, qui circule dans des concentrations supérieures aux autres adipokines. L'adiponectine est une protéine de 28 kD. Elle régule l'homéostasie énergétique, les métabolismes lipidiques et glucidiques et certaines voies inflammatoires (Ouchi et Walsh 2007). Il y a quelques données existantes et contradictoires concernant les effets de l'adiponectine sur l'os : celle-ci augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, et inhibe l'ostéoclastogenèse *in vitro*, mais elle n'augmente pas la masse osseuse *in vivo* (Reid 2010). Des récepteurs de l'adiponectine (AdipoR1 et AdipoR2) ont été identifiés sur les ostéoblastes et les ostéoclastes et il semble que les effets indirects (modulation de la sensibilité à l'insuline, et fixation du facteur de croissance) soient plus puissants que les effets directs (Reid 2010).

- les hormones thyroïdiennes : les hormones thyroïdiennes entraînent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Ishida *et al.* 1995) à dose physiologique. Une déficience ou un excès entraîne des troubles du développement squelettique, indiquant l'importance de ces hormones à des doses normales (Stern 2002). Les hormones thyroïdiennes amplifient le renouvellement osseux dans des études cliniques, des modèles *in vivo* et *in vitro*. Au-delà des doses physiologiques, ces hormones ont un effet catabolique sur l'os (Stern 2002).

Facteurs	Origines	Rôles	Références
PTH	Glandes parathyroïdes	Augmentation concentration calcium, stimulation RANKL sur ostéoblastes, augmentation maturation et activité ostéoclastes	<i>Hodsmen et al. 2002, Aleksyniene et Hvid 2004, Yasuda et al. 1998</i>
Vitamine D	Peau	Maintien concentration calcium, augmentation absorption intestinale calcium, augmentation transformation cellules souches en ostéoclastes matures	<i>Norman 2002, Christakos 2002</i>
CT	Cellules C thyroïde	Inhibe résorption par rétrécissement des ostéoclastes	<i>Galson et Goldring 2002, Deftos et First 1981</i>
Séroïdes sexuels	Gonades, surrénales	Oestrogènes et androgènes diminuent la résorption osseuse, influencent développement, remodelage et croissance osseuse	<i>Hofbauer et al 1999, Clarke et Khosla 2010</i>
Glucocorticoïdes	Surrénales	Cortisol : différenciation, fonctionnement des ostéoblastes et ostéoclastes	<i>Kream et Lukert 2002</i>
GH	Glande pituitaire	Maintenance masse osseuse et croissance, stimule remodelage osseux par action sur ostéoblastes	<i>Rosen 2002, Kann 2004</i>
Leptine	Adipocytes	Augmentation prolifération et différenciation ostéoblastes, croissance chondrocytes, régulation développement ostéoclastes via changement RANK/RANKL/OPG, diminution masse osseuse par SNC	<i>Cornish et al 2002, Reid 2010, Ducky et al 2000, Elefteriou et al 2005</i>
Adiponectine	Adipocytes	Augmentation prolifération et différenciation ostéoblastes, inhibition ostéoclastogénèse, régulation homéostasie énergétique	<i>Reid 2010, Ouchi et Walsh 2007</i>
Hormones thyroïdiennes	Thyroïde	Prolifération et différenciation des ostéoblastes	<i>Ishida et al 1995</i>

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des facteurs systémiques influençant l'os

b) Les facteurs centraux

Un nombre croissant d'études suggère que des signaux nerveux jouent un rôle important dans la régulation du remodelage osseux. Ces substances comprennent des neuropeptides des systèmes sensoriel, sympathique et glutaminergique ainsi que des neuromédiateurs (glutamate, sérotonine) (Bonnet *et al.* 2008; Confavreux 2011; Takarada-Iemata *et al.* 2011).

- α -calcitonin gene-related peptide (CGRP) : est un neuropeptide sensoriel dont la fonction dans l'os est bien connue. Son gène Calca est exprimé par les cellules des systèmes nerveux central et périphérique (Elefteriou 2005). Des récepteurs au CGRP sont exprimés à la surface des ostéoblastes et sa fixation provoque une augmentation d'AMP cyclique, de calcium et de potassium, ce qui provoque une hyperpolarisation de la cellule et un changement de sa morphologie et de sa fonction (Elefteriou 2005). Le neuropeptide CGRP

stimule la prolifération des ostéoblastes, la synthèse de facteurs de croissance et de cytokines, la synthèse du collagène et la formation osseuse (Elefteriou 2005). Il provoque aussi la prolifération des colonies osseuses provenant des cellules stromales de la moelle. Enfin, le CGRP pourrait aussi fonctionner comme un facteur autocrine car il est également exprimé par les ostéoblastes (Drissi *et al.* 1997; Imai et Matsusue 2002). Le CGRP est un inhibiteur puissant de la résorption osseuse. Cet effet a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Lerner 2002).

- Vasointestinal peptide P (VIP) : est un facteur neuromodulateur et neurotrophique prenant part à la croissance neuronale, à la différenciation, à la survie et à la synthèse des transmetteurs (Muller *et al.* 1995). Le VIP pourrait avoir un rôle important dans le contrôle local de la formation des ostéoclastes car la destruction des nerfs exprimant le VIP induit une augmentation de 50% des surfaces recouvertes par les ostéoclastes dans la calvaria et la mandibule (Hill and Elde 1991). De plus, le VIP peut se fixer sur les ostéoclastes et inhiber l'ostéoclastogenèse induite par la 1,25(OH)₂-vitamine D3. *In vitro*, il affecte les protéines de la matrice osseuse non collagénique (ostéocalcine, ostéonectine, ostéopontine) et donc la formation osseuse (Lerner 2002).

- Substance P (SP) : est un autre neuropeptide très exprimé dans des petits neurones sensoriels qui innervent l'os (Liu *et al.* 2007). Une étude menée avec de la capsaïne a montré que les neurones sensibles à cette molécule contribuent à la maintenance de l'intégrité de l'os trabéculaire. Les rats traités à la capsaïne montrent une perte de masse osseuse, avec diminution de la formation et augmentation de la résorption, associée à une destruction des neurones sensitifs positifs à la SP et au CGRP (Offley *et al.* 2005). Il a été montré que la substance P augmente la différenciation des ostéoblastes, la formation des colonies osseuses et la production d'AMP cyclique par les ostéoblastes (Jones *et al.* 2004).

- récepteurs β -adrénergiques : le récepteur β 2AR est le principal récepteur adrénergique fonctionnel à être exprimé par les ostéoblastes (Bonnet *et al.* 2008). Il appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Bonnet *et al.* 2008). L'activation des récepteurs β AR couplés aux protéines G active l'adénylyl cyclase, qui augmente les niveaux intracellulaires d'AMPc (Bonnet *et al.* 2008). L'augmentation d'AMPc active la protéine kinase A, qui peut phosphoryler une multitude de cibles protéiques, comme les facteurs de transcription, les kinases et les récepteurs membranaires. L'efficacité de ce système a déjà été démontrée sur les ostéoblastes (Elefteriou 2005) : l'activation du récepteur β 2AR diminue la formation

osseuse par les ostéoblastes. La stimulation du récepteur β 2AR modifie également l'expression de RANKL chez les ostéoblastes, stimulant indirectement la différenciation des ostéoclastes (Elefteriou *et al.* 2005).

- Neuropeptide Y (NPY) : est l'un des neuropeptides les plus répandus, avec une forte expression dans l'hypothalamus (Driessler et Baldock 2010). Un modèle de souris KO pour le récepteur Y2 (récepteur du NPY), a montré une augmentation généralisée de l'activité des ostéoblastes dans l'os trabéculaire et cortical, sans modification de la résorption osseuse (Baldock *et al.* 2002). De plus, des souris KO pour le ligand NPY ont montré un phénotype d'anabolisme de l'os, similaire à celui observé chez les souris KO pour le récepteur Y2, et non accompagné d'un changement de poids (Baldock *et al.* 2009).

- Neuromedine U (NMU) : est un neuropeptide exprimé dans les neurones de l'hypothalamus et dans l'intestin grêle, et dont l'activité est régulée par l'activation du système sympathique (Brighton *et al.* 2004; Driessler et Baldock 2010). Il a été montré que NMU régule également la masse osseuse. En effet, les souris KO pour le NMU présentent une augmentation de la formation et de la masse osseuse, due à des facteurs centraux, liés à l'hypothalamus (Driessler and Baldock 2010; Sato *et al.* 2007). Le NMU et ses récepteurs ne sont pas détectables dans l'os et l'activité des ostéoblastes *in vitro* n'est pas modifiée par un traitement par le NMU (Driessler et Baldock 2010).

- la sérotonine : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes expriment des récepteurs de la sérotonine (Elefteriou 2005; Westbroek *et al.* 2001). Une étude menée *in vitro* sur des ostéocytes et des ostéoblastes stimulés mécaniquement tend à montrer que le récepteur à la sérotonine 5-HT serait impliqué dans la détection des charges mécaniques (Westbroek *et al.* 2001). Des études montrent également un rôle de la sérotonine dans la régulation de la formation osseuse (Ducy et Karsenty 2010) et dans le processus de réparation osseuse, ainsi que dans la régulation de l'ostéoclastogenèse.

- le glutamate : le glutamate est un neurotransmetteur majeur dans le système nerveux central. Les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes ont la structure moléculaire nécessaire pour la réponse au glutamate (Hinoi *et al.* 2004; Mason 2004). Les ostéoblastes contiennent des vésicules remplies de glutamate et expriment des transporteurs et des récepteurs pour le glutamate (Patton *et al.* 1998). Le rôle fonctionnel du glutamate a été montré *in vitro* sur des modèles cellulaires mais son fonctionnement *in vivo* n'est toujours pas très bien élucidé (Skerry 2008).

- la dopamine : des souris déficientes en transporteur dopaminergique (DAT) expriment une faible masse osseuse, ce qui suggère que la dopamine est impliquée dans la régulation de la masse osseuse (Bliziotis *et al.* 2000). Cependant, il n'y a pas encore de données sur l'expression protéique du transporteur DAT sur les ostéoblastes ou plutôt dans le micro-environnement osseux.

Facteurs	Localisations	Rôles	Références
CGRP	Surface des ostéoblastes	Stimulation prolifération ostéoblastes, synthèse collagène, formation osseuse, inhibiteur puissant de la résorption osseuse	<i>Elefteriou 2005, Lerner 2002</i>
VIP	Ostéoclastes, nerfs	Inhibition ostéoclastogénèse, affecte formation osseuse <i>in vitro</i>	<i>Hill et Elde 1991, Lerner 2002</i>
SP	Neurones sensoriels dans l'os	Augmentation différenciation ostéoblastes, formation colonies osseuses	<i>Liu et al 2007, Jones et al 2004</i>
Récepteurs β -adrénergiques	Ostéoblastes	Diminution formation osseuse par les ostéoblastes, modification expression RANKL et stimulation différenciation des ostéoclastes	<i>Bonnet et al 2008, Elefteriou et al 2005</i>
NPY	Hypothalamus	Diminution de l'activité des ostéoblastes	<i>Driessler et Baldock 2010, Baldock et al 2002</i>
NMU	Hypothalamus et intestin grêle	Diminution de la masse osseuse dû facteurs centraux	<i>Driessler et Baldock 2010, Sato et al 2007</i>
Sérotonine	Ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes	Détection charge mécanique, régulation formation osseuse, réparation osseuse, régulation ostéoclastogénèse	<i>Elefteriou 2005, Westbroek et al 2001, Ducy et Karsenty 2010</i>
Glutamate	Ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes	<i>In vitro</i> : Différenciation et fonction des ostéoblastes et ostéoclastes	<i>Skerry 2008</i>
Dopamine	SNC	Régulation de la masse osseuse (augmentation)	<i>Bliziotis et al 2000</i>

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des facteurs centraux influençant l'os

c) Les facteurs locaux

- Le système RANK/RANKL/OPG : Le ligand de RANK (RANKL) est une protéine qui est présente sur la membrane des ostéoblastes ainsi que dans le thymus (Trouvin et Goeb 2010), les poumons et dans beaucoup d'autres tissus. Le RANK (récepteur activateur de NF- κ B) est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) (Boyce et Xing 2008). Elle est présente dans les ostéoclastes matures, dans les précurseurs ostéoclastiques et dans quelques cellules cancéreuses (Boyce et Xing 2008). Le RANK est le récepteur du RANKL. Quand le RANKL se lie au RANK, des signaux de différenciation sont envoyés aux précurseurs des ostéoclastes, ce qui détermine ensuite la magnitude et le degré d'ostéoclastogénèse (Trouvin et Goeb 2010)

(Figure 10). L'ostéoprotégérine (OPG) a été découverte en même temps que RANKL car elle est un récepteur leurre du RANKL (Boyce et Xing 2008). L'OPG est exprimée par les ostéoblastes, comme le RANKL (Ostrowski 2010). Cette protéine va séquestrer le RANKL, inhiber l'interaction RANK-RANKL et de ce fait inhiber l'ostéoclastogenèse en se liant étroitement au RANKL via sa fonction CRD (domaine riche en cystéine terminale N) (Ostrowski 2010). Il a récemment été montré que l'OPG n'a pas uniquement une fonction de leurre. La majorité des molécules RANKL synthétisées par les ostéoblastes dans l'appareil de Golgi ne sont pas transportées vers la surface mais sont stockées dans les lysosomes ou dans l'appareil de Golgi (Ostrowski 2010). En effet, seulement une petite partie des RANKL fabriquées sont transportées directement de l'appareil de Golgi à la surface. Quand ces RANKL qui sont à la surface de la cellule se lient à des récepteurs RANK, les autres molécules RANKL stockées dans les lysosomes traversent la cellule jusqu'à la surface osseuse (Ostrowski 2010). Il apparaît que l'OPG joue un rôle dans le transport de RANKL des lysosomes jusqu'à la surface des ostéoblastes (Aoki *et al.* 2010; Ostrowski 2010). L'expression de l'OPG est régulée dans l'ostéoblaste par une variété de cytokines, d'hormones, de facteurs de croissance (Trouvin et Goeb 2010), et également par les complexes Wnt/ β -caténine et Jagged1/Notch1 (Boyce et Xing 2008).

De nombreux autres facteurs locaux jouent un rôle important dans la régulation de la différenciation, de la fonction des cellules osseuses et dans le couplage résorption/formation. Ces facteurs pourraient également être des intermédiaires locaux issus de l'action de certaines hormones systémiques ou du système nerveux.

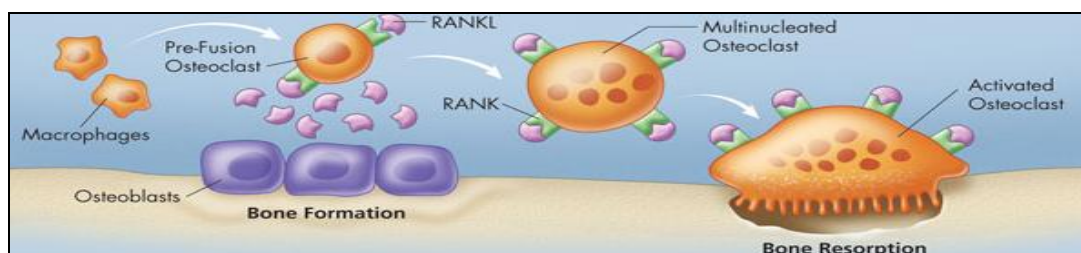


Figure 10 : Rôle de RANK et RANKL dans la différenciation de l'ostéoclaste.

La formation du complexe RANK/RANKL est primordiale dans la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures. RANKL est synthétisé par les ostéoblastes et vient se fixer sur son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes. D'après Robert G Josse, Professeur de médecine, Université de Toronto. Rapport de conférence du Meeting annuel de la CGS 2009 (Symposium Satellite).

- La voie Wnt/ β -caténine : La voie Wnt/ β -caténine est reconnue actuellement comme une importante voie de régulation de la masse osseuse et du fonctionnement des cellules osseuses (Bonewald et Johnson 2008). Elle est activée quand une molécule Wnt vient se fixer sur son récepteur Lrp5 ou Lrp6 (Bonewald et Johnson 2008) (Figure 11). Il a été montré qu'elle régule la fonction des cellules osseuses : différenciation, prolifération et apoptose (Bonewald and Johnson 2008; Westendorf *et al.* 2004) et qu'elle est requise pour

que la formation osseuse se déroule normalement dans les ostéoblastes différenciés (Glass *et al.* 2005). Elle est également nécessaire à l'augmentation de la formation osseuse en réponse à une surcharge mécanique (Robinson *et al.* 2006).

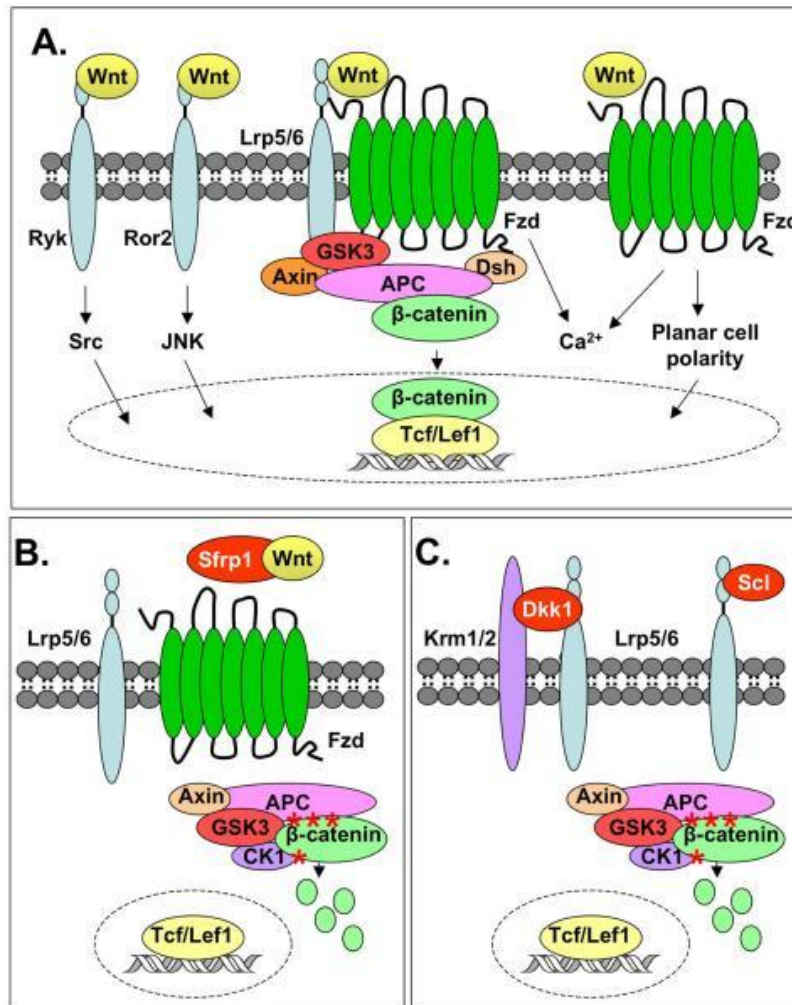


Figure 11 : Activation et inhibition de la voie de signalisation Wnt.

(A) La voie canonique est stimulée quand la molécule Wnt vient se fixer sur le récepteur Frizzled associé au co-récepteur spécifique Lrp5/6. Ceci déclenche une série de réactions (activation de Dishevelled Dsh, inhibition de la glycogène synthase kinase GSK, de l'axine et de l'APC). Le niveau de β-caténine cytoplasmique augmente et de la β-caténine migre dans le noyau où elle s'associe avec le facteur de la cellule T (Tcf) pour réguler l'expression des gènes. Des voies annexes ne faisant pas intervenir la β-caténine et la GSK ont été identifiées. (B) Les protéines liées à la sécrétion de frizzled (Sfrps) sont antagonistes de la voie canonique Wnt et se lient aux ligands afin d'empêcher leur association avec les récepteurs de Fzd. (C) Dickkopf-1 (DKK1) supprime la voie Wnt en formant un complexe avec les récepteurs Lrp5/6 et Kremen 1/2. La sclérostine se fixe aussi sur les récepteurs Lrp5/6 et est antagoniste de la voie Wnt. D'après Hoepfner et al. (Hoepfner et al. 2009).

- Le Dickkopf-1 (DKK1) : Le DKK1 est un inhibiteur de la voie Wnt (Kawano et Kypta 2003) (Figure 11). Il régule la suppression de la différenciation ostéoblastique induite par les glucocorticoïdes (Ohnaka *et al.* 2005), et est associé à l'apoptose des cellules osseuses dans différents modèles de nécrose et d'arthrose (Ko *et al.* 2010).

- La sclérostine (SOST) : La sclérostine est un régulateur négatif de la formation osseuse. Elle se lie aux récepteurs Lrp5/6 et inhibe la voie Wnt (Papapoulos 2011). Ses mécanismes

d'action ne sont pas élucidés à ce jour mais on sait qu'elle est exprimée dans les ostéocytes et les chondrocytes (Moester *et al.* 2010). De plus, son expression est modifiée par la charge mécanique (Moester *et al.* 2010) (Figure 12).

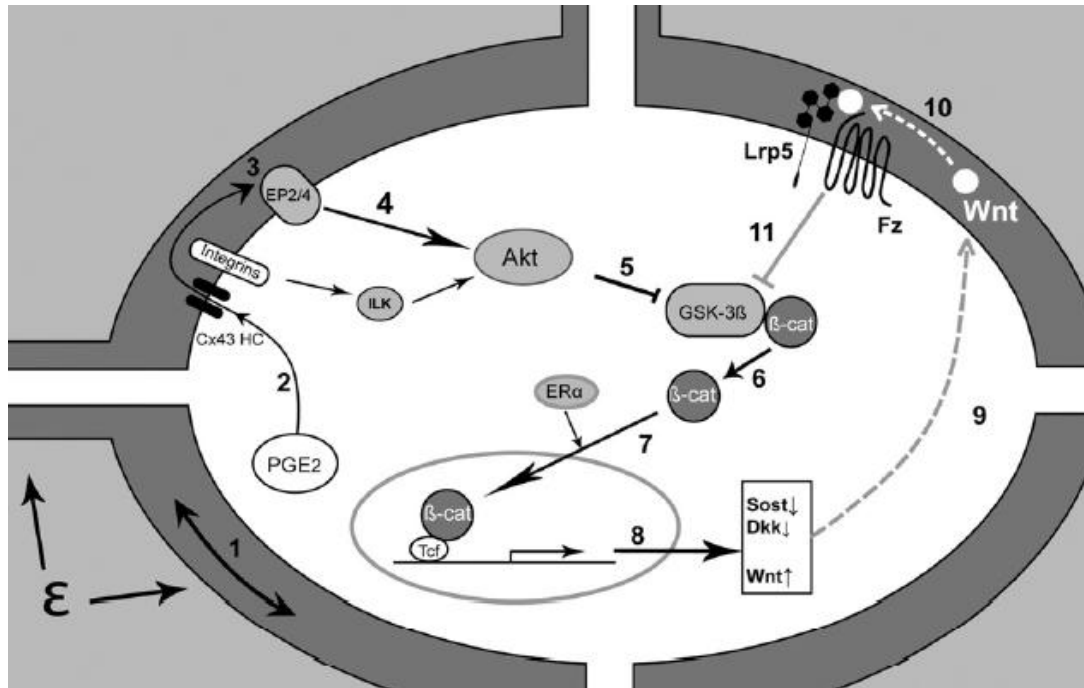


Figure 12 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la voie Wnt en réponse à une charge mécanique. Déclenchement et amplification de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéocytes en réponse à une charge mécanique. (1) Activation d'une réponse intracellulaire comme l'expression de la PGE2, (2) la PGE2 est sécrétée au travers de canaux (de type Connexine 43), (3) accumulation de β -caténine dans la cellule. (4) En conséquence, SOST et DKK1 sont inhibés et l'expression de Wnt est augmentée. D'après Bonewald (Bonewald et Johnson 2008).

- Les Colony Stimulating Factors (CSF) : Les CSF sont des glycoprotéines caractérisées par l'habilité à stimuler *in vitro* la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Hofstetter et Gillespie 2002). Il y a quatre CSF identifiées : l'interleukine 3 (IL-3), le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Hofstetter et Gillespie 2002). Il a été montré que ces 4 facteurs de croissance peuvent stimuler la prolifération des progéniteurs ostéoclastiques *in vitro* en réponse à la 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ et en présence d'ostéoblastes (Takahashi *et al.* 1991). Cependant, c'est surtout le M-CSF qui joue un rôle important dans la différenciation, la prolifération et la survie des ostéoclastes (Suda *et al.* 1999) (Figure 13). Le M-CSF augmente aussi l'activité de résorption des ostéoclastes matures (Hodge *et al.* 2011).

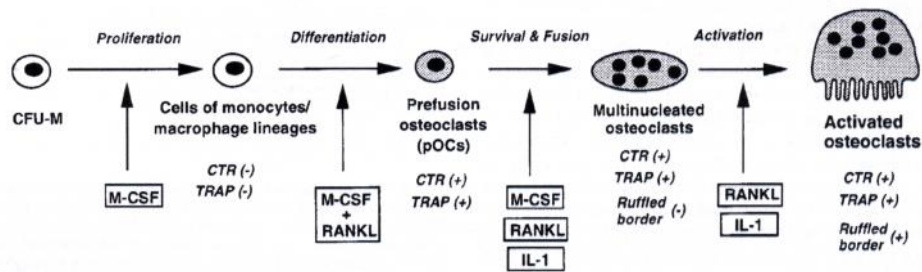


Figure 13 : Etapes de la différenciation des ostéoclastes et facteurs associés.

Le M-CSF agit sur la prolifération des cellules souches CFU-M, cellules de la lignée des macrophages. Il agit conjointement avec le RANKL pour favoriser la prolifération des cellules en pré-ostéoclastes. Ensuite, le M-CSF, le RANKL et l'IL-1 agissent sur la maturation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes multinucléés. Enfin, le RANKL et l'IL-1 activent les ostéoclastes multinucléés en ostéoclastes matures. D'après Suda *et al.* (Suda *et al.* 1999).

- Le Transforming Growth Factor β (TGF- β) : TGF- β 1 est le facteur de croissance le plus abondant dans l'os. Il a une fonction durant l'embryogenèse et dans l'organisme adulte. Il régule la prolifération cellulaire, la différenciation, la motilité et l'apoptose (Kanaan et Kanaan 2006). Le TGF- β 1 influence le développement normal du squelette en jouant un rôle critique dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes ou en ostéoblastes (Kosmacheva *et al.* 2008). Chez l'adulte, le TGF- β 1 influence le maintien de la masse osseuse en contrôlant la différenciation des ostéoblastes, la formation de la matrice et la minéralisation. Le TGF- β 1 inhibe l'expression du Runx2 et de l'ostéocalcine sur une lignée murine ostéoblastique (MC3T3-E1) (Kwok *et al.* 2009; Sowa *et al.* 2004). Il interagit avec de nombreuses voies de signalisation comme les prostaglandines, et la voie Wnt/ β -caténine (Zhou 2011).

- Le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) : est un membre de la famille des cytokines inflammatoires principalement produite par les macrophages et les ostéoblastes (Nanes 2003). Le TNF- α est un agent catabolique de l'os qui stimule l'ostéoclastogenèse (Nanes 2003) et simultanément inhibe la fonction ostéoblastique (Nanes 2003). Le TNF- α a un rôle central dans la physiopathologie osseuse. Il est nécessaire pour la stimulation de l'ostéoclastogenèse conjointement avec RANKL (Horowitz et Lorenzo 2002). Le TNF- α supprime également le recrutement des ostéoblastes à partir des cellules ostéoprogénitrices, inhibe les protéines matricielles (collagène I, ostéocalcine, phosphatase alcaline) et stimule l'expression des gènes qui amplifient l'ostéoclastogenèse (TRAP, calcitonine, vitronectine). Le TNF- α peut aussi affecter le métabolisme osseux en induisant une résistance à la 1,25-dihydroxivitamine D₃ (Nanes 2003).

- Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) : est une protéine synthétisée principalement par le foie (Courtland *et al.* 2011; Yamaguchi *et al.* 2006) et est un régulateur majeur du fonctionnement des ostéoblastes et des ostéoclastes (Bikle et Wang 2011). L'IGF-1 avec la

GH activent les ostéoclastes *in vivo*. *In vitro*, la GH et l'IGF-1 pourraient modifier directement l'activité et la fonction des ostéoclastes (Ueland 2005). Un effet indirect sur la résorption osseuse est également possible par des médiateurs paracrines comme les cytokines. Le ratio OPG/RANKL exprimé par les ostéoblastes pourrait déterminer l'effet de la GH et de l'IGF-1, mais cela reste hypothétique (Ueland 2005).

- Interleukine 1 (IL-1) : est une cytokine pléiotrope : elle induit l'expression d'une large variété de molécules pro-inflammatoires et de cytokines hématopoïétiques (Kwan Tat *et al.* 2004). Comme TNF- α , IL-1 initie une cascade de régulation dont le but est l'activation de NF- κ B et de JNK. L'activation de NF- κ B est impliquée dans la survie des ostéoclastes (Kwan Tat *et al.* 2004).

- Interleukine 6 (IL-6) : est une cytokine produite par les ostéoblastes et les cellules stromales, qui a de nombreuses cellules cibles : hépatocytes, neurones et cellules osseuses (Kwan Tat *et al.* 2004). Dans l'os, l'IL-6 avec l'OSM sont connus pour stimuler la différenciation des progéniteurs mésenchymateux dans la voie ostéoblastique et seraient aussi des agents anti-apoptotiques pour les ostéoblastes (Kwan Tat *et al.* 2004). En revanche, la principale action de l'IL-6 sur l'os est la régulation de l'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse via un mécanisme indirect, en augmentant les interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. En effet, l'IL-6 stimule la production ostéoblastique d'effecteurs qui activent les ostéoclastes, dont RANKL. Les effets de l'IL-6 sont interconnectés à ceux de l'IL-1, du TNF et de la PTHrp (Kwan Tat *et al.* 2004).

Facteurs	Localisations	Rôles	Références
RANK/RANKL/ OPG	RANKL : membrane des ostéoblastes, thymus, poumons RANK : ostéoclastes matures, précurseurs ostéoclastiques OPG : ostéoblastes	RANK/RANKL : ostéoclastogénèse OPG : inhibition de l'ostéoclastogénèse	<i>Trouvin et Goeb 2010,</i> <i>Ostrowski 2010</i>
Voie Wnt/ β - caténine	Ostéocytes	Régulation de la masse osseuse, différenciation, prolifération et apoptose des cellules osseuses, requise pour formation osseuse normale	<i>Bonewald et Johnson</i> <i>2008, Westendorf et al</i> <i>2004, Glass et al 2005</i>
DKK1	Membrane ostéocytes	Inhibiteur voie Wnt	<i>Kawano et Kypta 2003</i>
SOST	Ostéocytes, chondrocytes	Régulateur négatif de la formation osseuse : inhibe la voie Wnt	<i>Papapoulos 2011,</i> <i>Moesler et al 2010</i>
M-CSF	Ostéoblastes, cellules stromales	Différenciation, prolifération et survie des ostéoclastes, augmente l'activité de résorption	<i>Hofstetter et Gillespie</i> <i>2002, Takahashi et al</i> <i>1991, Suda et al 1999,</i> <i>Hodge et al 2011</i>

TGF- β 1		Différenciation des CSM en chondrocytes ou ostéoblastes, maintien masse osseuse à travers contrôle différenciation ostéoblastes, formation matrice et minéralisation	<i>Kosmacheva et al 2008</i>
TNF- α	Macrophages, ostéoblastes	Stimule l'ostéoclastogenèse avec RANKL, inhibe la fonction ostéoblastique, supprime recrutement ostéoblastes à partir cellules ostéoprogénitrices	<i>Nanes 2003, Horowitz et Lorenzo 2002</i>
IGF-I	Toutes les cellules du foie, ostéoblastes	Avec GH, activent ostéoclastes, régulateur majeur fonctionnement ostéoblastes et ostéoclastes	<i>Courtland et al 2011, Ueland 2005, Bikle et Wang 2011</i>
IL-1		Induit cascade de régulation qui active NF- κ B (survie des ostéoclastes)	<i>Kwan Tat et al 2004</i>
IL-6	Ostéoblastes, cellules stromales	Avec OSM : stimule différenciation des CSM dans la voie ostéoblastique, régulation ostéoclastogenèse et résorption (stimulation RANKL)	<i>Kwan Tat et al 2004</i>

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des facteurs locaux du tissu osseux.

RESUME :

L'os est un tissu vivant, composé d'une matrice minéralisée et de cellules qui agissent de façon organisée et synchronisée afin d'adapter la masse et la géométrie osseuse aux contraintes subies par le squelette. Les ostéoclastes détruisent la matrice osseuse ancienne puis les ostéoblastes viennent déposer de l'os nouveau, ceci sous le contrôle des ostéocytes. La synchronisation de la différenciation et de l'activité des cellules se fait grâce à des hormones (PTH, stéroïdes sexuels, leptine), des facteurs centraux (récepteurs β -adrénergiques) et à des facteurs locaux (RANK/RANKL/OPG, voie Wnt, IGF-1, IL-6).

II. TECHNIQUES D'EVALUATION DU TISSU OSSEUX

L'évaluation du statut osseux est nécessaire pour prédire les risques de fractures et caractériser certaines pathologies. Elle permet également de mesurer l'efficacité de différents médicaments ou d'observer la dégradation du tissu osseux suite à certains facteurs environnementaux dont la consommation d'alcool. Les principaux paramètres du tissu osseux analysés sont la densité minérale osseuse, la structure du tissu osseux (microarchitecture) et la résistance de l'os (propriétés biomécaniques). Nous discuterons dans ce chapitre des différentes techniques disponibles actuellement et utilisées pour analyser l'évolution de ces variables sur des modèles animaux utilisés dans la recherche sur l'ostéoporose.

A. Caractérisation quantitative de la masse et de la densité osseuses

1. Dual X-ray Absorptiométrie (DXA)

La DXA a été développée chez l'homme et a rapidement été adaptée à l'animal grâce à des logiciels haute résolution. La DXA est la méthode la plus couramment utilisée chez l'animal pour mesurer le contenu minéral osseux (CMO) et la densité minérale osseuse (DMO : contenu rapporté à la surface) (Bonnet *et al.* 2005a; Lespessailles *et al.* 2009; Nishiguchi *et al.* 2000; Nyquist *et al.* 2002). Elle est également l'outil qui permet actuellement de diagnostiquer le risque fracturaire chez la femme et est utilisée pour évaluer l'efficacité des traitements anti-ostéoporotiques (El Maghraoui et Roux 2008). La précision des mesures de DXA dépend du positionnement de l'animal et de l'habileté de l'opérateur à définir une même région en utilisant des points de repères anatomiques, lorsqu'il s'agit d'analyser une région précise du squelette. La DXA est un examen rapide (3-4 min pour un corps entier de rat), précis et reproductible sur n'importe quel type d'os *in vivo* ou *ex vivo* lorsque l'os est immergé dans du liquide physiologique pour mimer les tissus mous (Nagy *et al.* 2001). Les coefficients de variation sont d'environ 0.6% à 2.2%. Le CMO et le poids de cendre sont très corrélés, que ce soit *in vivo* ou après excision ($r^2 > 0.99$) (Nagy *et al.* 2001). La DXA est suffisamment précise pour détecter des

modifications de DMO et de CMO au niveau du fémur (col fémoral, diaphyse fémorale) et des vertèbres (Jiang *et al.* 1997).

2. Tomographie quantitative périphérique (pQCT)

La pQCT permet de déterminer la DMO et la distribution osseuse en trois dimensions sur différents sites osseux (Faulkner *et al.* 1991). Cette technique délivre une quantité assez élevée de radiations comparée à de la QCT conventionnelle (Faulkner *et al.* 1991). Un nouvel appareil, qui permet d'étudier l'os trabéculaire, est disponible (Xtreme CT, Scanco, Suisse). Cette nouvelle technique irradie moins que la CT et ressemble à la μ CT utilisée chez l'animal en recherche (Krug *et al.* 2010). En revanche, elle permet seulement d'étudier les sites osseux périphériques chez l'homme et ne permet pas dès lors d'étudier les vertèbres lombaires ou le fémur proximal, principaux sites de fractures ostéoporotiques. Chez l'animal la pQCT permet de déterminer une mesure de DMO trabéculaire ou corticale volumique.

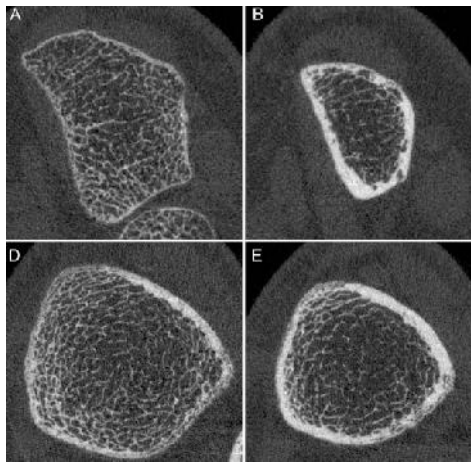


Figure 14 : Images d'os obtenues par pQCT.
D'après Krug *et al.* (Krug *et al.* 2010).

B. Caractérisation structurale

Le tissu trabéculaire a principalement été étudié car il est très présent aux sites fracturaires. Pourtant, une récente étude de Zebaze a montré que 80% des fractures se produisent à d'autres sites osseux que les vertèbres, sites où l'os cortical est prédominant (Zebaze *et al.* 2010). La méthode de référence pour analyser l'os trabéculaire était l'histomorphométrie jusqu'à récemment (Bouxsein *et al.* 2010). Plus récemment, des

méthodes applicables *in vivo* comme la tomographie à rayons X ont été utilisées. L'avantage de ces techniques est une évaluation directe de certains paramètres (nombre et épaisseur des travées osseuses) et une évaluation en 3D de la connectivité des travées, qui ne repose pas sur l'assumption que le tissu osseux est constitué uniquement de plaques (Bouxsein *et al.* 2010).

1. L'histomorphométrie

L'histomorphométrie nécessite chez l'homme d'effectuer une biopsie osseuse, généralement effectuée au niveau de la crête iliaque. Dans le modèle animal, elle nécessite le sacrifice de l'animal. Le tissu osseux est prélevé, coupé (diaphyse, métaphyse) et inclus dans une résine (Bonnet *et al.* 2006; Sampson *et al.* 1997). Le prélèvement osseux est ensuite coupé en coupes de quelques microns d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Les coupes sont colorées avec un colorant adapté en fonction de ce que l'on souhaite observer (Iwaniec *et al.* 2008). Les paramètres du réseau trabéculaire analysés sont ceux définis par Parfitt (Parfitt *et al.* 1987) : nombre et épaisseur des travées osseuses, espacement entre les travées (Figure 15). Elle permet également d'évaluer les paramètres liés au remodelage osseux statique ou dynamique tels que l'épaisseur du tissu ostéoïde (O.Th), la surface érodée (ES/BS), la surface occupée par les ostéoblastes (Ob.S/BS) ou les ostéoclastes (Oc.S/BS), la surface de minéralisation (MS/BS), le taux d'apposition minérale (MAR) et le taux de formation osseuse (BFR/BS) (Kulak et Dempster 2010). L'histomorphométrie est une méthode qui présente l'inconvénient d'être en 2D. La reconstruction 3D est délicate car les coupes sont non jointives et les paramètres d'épaisseur et de nombres de travées partent du principe que le tissu présente une certaine structure particulière. Cependant l'histomorphométrie reste très utilisée pour l'étude des paramètres dynamiques (BFR, MAR) ainsi que pour déterminer le nombre d'ostéoclastes et le volume d'ostéoïde dans le tissu étudié.

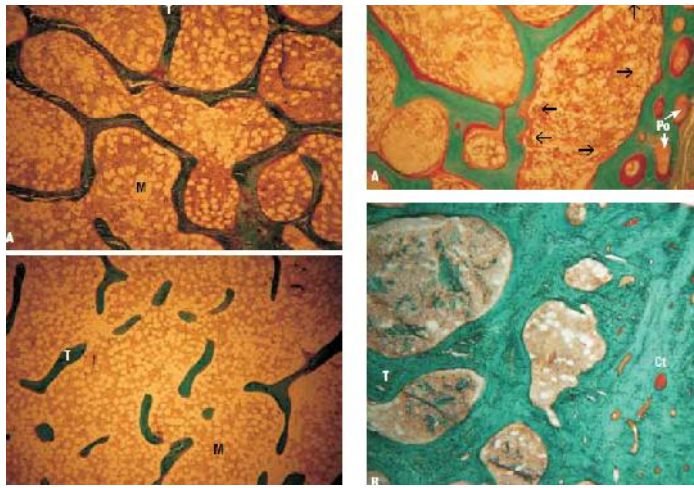


Figure 15 : Images d'histomorphométrie d'os trabéculaire, cortical et de la moelle osseuse.

D'après Kulak et Dempster (Kulak et Dempster 2010). Les travées osseuses apparaissent en bleu sur les images de gauche et la moelle en rose et blanc. Sur l'image en bas à droite, l'os cortical puis trabéculaire apparaît en bleu.

2. Radiographie

La radiographie conventionnelle est une projection de rayons X sur un écran fluorescent ou un film radiographique spécial, de résolution spatiale jusqu'à 40 μm . Elle permet d'avoir un bon contraste du tissu, est très facilement accessible et peut refléter la microarchitecture (Apostol *et al.* 2006; Guggenbuhl *et al.* 2006). Cependant, l'os trabéculaire et l'os cortical sont superposés et apparaît seulement la texture de l'os trabéculaire plutôt que sa vraie architecture 3D. De bonnes corrélations ont été observées entre des paramètres de texture 2D et des mesures d'architecture en 3D, grâce à des techniques d'analyse de texture (Bauer et Link 2009). Cette méthode permet de discriminer des patients avec ou sans fractures ostéoporotiques et procure des informations complémentaires à la DMO (analyse fractale) afin de mieux prédire le risque fracturaire (Benhamou *et al.* 2001).

3. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Cette technique émergente permet d'obtenir des images haute résolution de l'os trabéculaire et cortical *in vivo* (résolution proche du diamètre d'une travée osseuse). Avec l'avancée de la technologie, la correction des mouvements et le temps d'acquisition des images peuvent être améliorés. L'IRM est une technique non ionisante qui procure des

images 3D très intéressantes des structures du corps et peut donc être utilisée en clinique (Bauer et Link 2009). Le principe est d'utiliser les protons présents en grande quantité dans notre organisme pour visualiser les organes. En IRM conventionnelle, le tissu osseux engendre un signal faible et apparaît en foncé, à cause de la faible quantité de protons et à une durée de relaxation très rapide, comme la plupart des tissus solides. Les images d'IRM nécessitent un post traitement afin de pouvoir discriminer le signal du tissu osseux de celui très important renvoyé par la moelle osseuse. Des informations sur la structure, la topologie, l'orientation des travées osseuses, l'épaisseur et la porosité corticale peuvent être extraite de ce post traitement des images (Goldenstein *et al.* 2009; Krug *et al.* 2010) (Figure 16). Cette technique est intéressante pour l'étude des interactions entre muscle et os, et pour l'étude des métastases et des tumeurs osseuses (Schmidt *et al.* 2007). Cependant, le rapport signal sur bruit, la difficulté de seuillage et le coût de l'appareil en font une technique peu utilisée chez le petit animal.



Figure 16 : Images obtenues par IRM.
D'après Krug *et al.* (Krug *et al.* 2010).

4. Micro tomographie à rayons X (μ CT)

La μ CT a été la première technique non invasive utilisée pour révéler la vraie architecture de l'os trabéculaire (Bauer et Link 2009). Elle a été utilisée par de nombreux chercheurs pour étudier l'os trabéculaire à différents sites osseux, en relation avec les propriétés mécaniques. Elle a été validée chez le petit animal (Lima *et al.* 2008) et elle est devenue la technique de référence pour mesurer la microarchitecture chez les petits

animaux *ex vivo* (Schmidt *et al.* 2007). Elle sert même de technique de référence pour valider d'autres techniques plus récentes (Bouxsein *et al.* 2010). Le principe est l'acquisition de données (basées sur l'atténuation des rayons X) sous plusieurs angles différents afin de reconstruire un volume 3D qui caractérise la distribution spatiale de la densité de l'os (Bouxsein *et al.* 2010). Les appareils de μ CT actuels permettent d'avoir une taille de voxel de quelques micromètres, ce qui est suffisant pour étudier des structures comme la taille des travées osseuses chez la souris. Cette technique est très reproductible et précise, et offre l'avantage de pouvoir étudier des volumes d'intérêt supérieurs à ceux étudiés en histomorphométrie. Elle est également plus rapide car il n'y a pas besoin de décalcifier les échantillons. De plus, c'est une technique non destructive, qui permet d'utiliser les pièces osseuses pour d'autres analyses par la suite (Bouxsein *et al.* 2010). La nanoCT permet d'imager des structures encore plus petite, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (Figure 17).

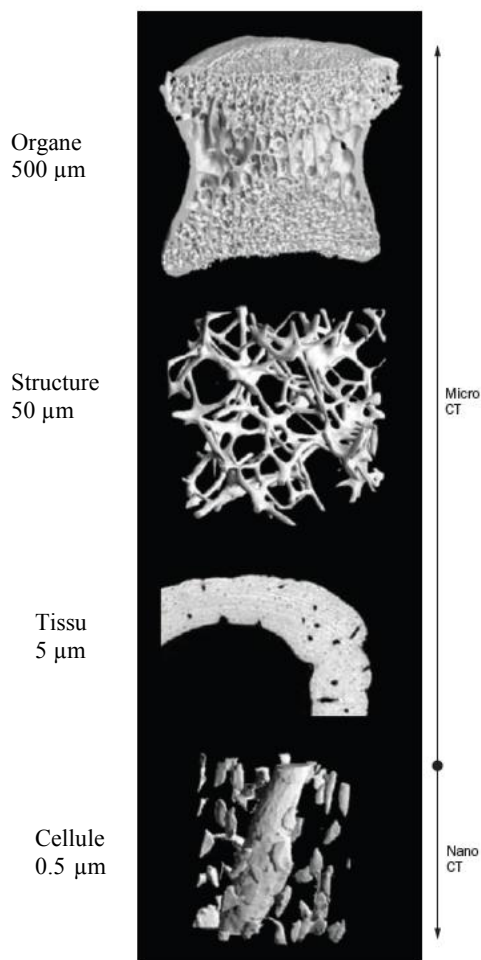


Figure 17 : Vue hiérarchisée des différentes structures osseuses que l'on peut imager avec un μ CT et un nanoCT.
D'après Muller (Muller 2009).

5. Synchrotron

Le rayonnement synchrotron est composé d'électrons de très haute énergie qui sont soumis à l'action d'un champ magnétique, pour courber leur trajectoire (Peyrin 2009). Ils perdent alors de leur énergie libérée sous la forme d'un rayonnement lumineux. Cette lumière est 10000 fois plus intense que la lumière solaire et est émise de l'infrarouge aux rayons X en passant par les ultraviolets (Peyrin 2009). Elle est tellement intense qu'elle pénètre la matière vivante en profondeur. Les photons émis viennent frapper l'échantillon et permettent d'étudier sa géométrie en surface, en volume et ses propriétés.

Principe de fonctionnement du synchrotron :

Un faisceau d'électrons fin comme un cheveu est émis par un canon à électron et accéléré dans un accélérateur linéaire de 16 m de long (le linac). Les électrons atteignent la vitesse de la lumière et sont ensuite dirigés vers un deuxième accélérateur circulaire appelé booster. Les électrons sont ensuite injectés dans l'anneau de stockage (354 mètres de périmètre à Orsay) et tournent pendant plusieurs heures. Dans l'anneau de stockage, des dispositifs magnétiques dévient la trajectoire des électrons ou les font osciller (dipôles et onduleurs). Ces derniers perdent de l'énergie sous forme de lumière. Le rayonnement est capté à différents endroits de l'anneau et est guidé vers des sorties : les lignes de lumière (Figure 18).

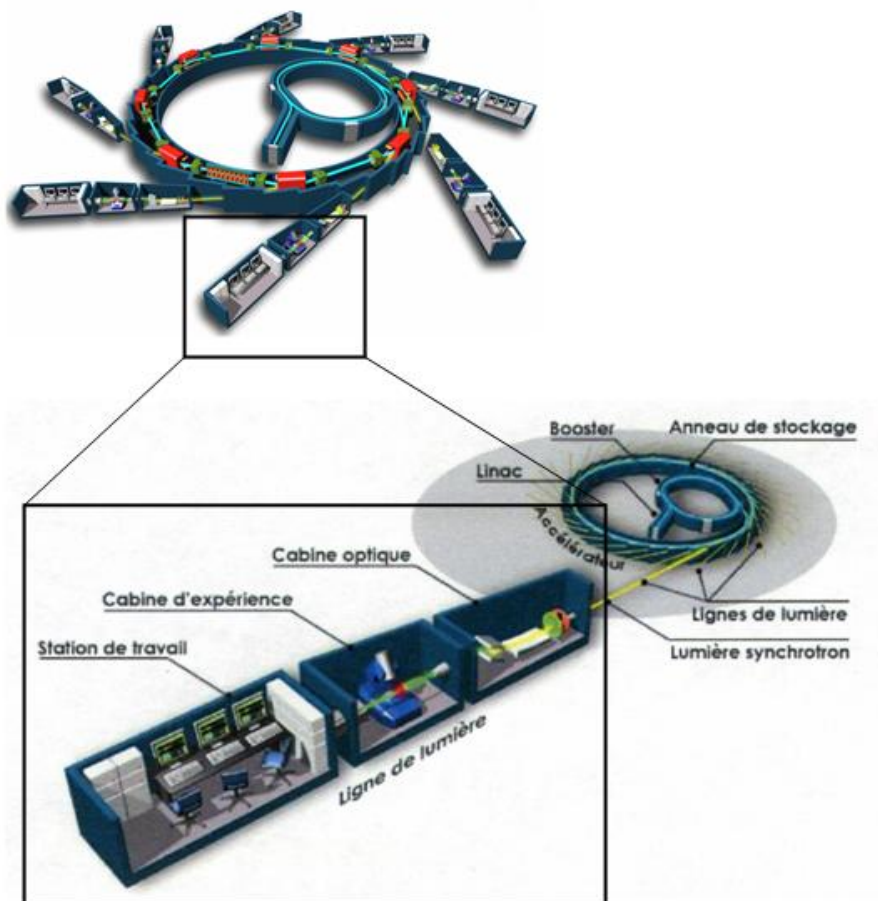


Figure 18 : Constitution des lignes de lumière au Synchrotron Soleil d'Orsay.

Tiré du site Internet du Synchrotron Soleil (<http://www.synchrotron-soleil.fr>).

Liste des lignes de lumière du Synchrotron SOLEIL d'Orsay (Tableau 4) :

Domaine d'énergie	Liste des lignes de lumière
Infrarouge	<u>AILES</u> , <u>SMIS</u>
VUV / UV / Visible	<u>ANTARES</u> , <u>CASSIOPEE</u> , <u>DESIRS</u> , <u>DISCO</u> , <u>METROLOGY</u> , <u>PLÉIADES</u>
X mous <1,5KeV	<u>ANTARES</u> , <u>CASSIOPEE</u> , <u>DEIMOS</u> , <u>METROLOGY</u> , <u>SEXTANTS</u> , <u>PLÉIADES</u> , <u>TEMPO</u>
X tendres 1 à 10KeV	<u>D2AM*</u> , <u>DEIMOS</u> , <u>FIP*</u> , <u>GALAXIES</u> , <u>LUCIA</u> , <u>ODE</u> , <u>SIRIUS</u> , <u>SIXS</u>
X durs >8KeV	<u>CRISTAL</u> , <u>D2AM*</u> , <u>DIFFABS</u> , <u>FAME*</u> , <u>FIP*</u> , <u>GALAXIES</u> , <u>IF*</u> , <u>PSICHÉ</u> , <u>MARS</u> , <u>METROLOGY</u> , <u>NANOSCOPIUM</u> , <u>ODE</u> , <u>PROXIMA 1</u> , <u>PROXIMA 2</u> , <u>SAMBA</u> , <u>SIRIUS</u> , <u>SIXS</u> , <u>SWING</u>

Tableau 4 : Liste des lignes de lumière du Synchrotron Soleil d'Orsay.

*Lignes en collaboration avec le CRG (Collaborating Research Group) de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble.

DISCO est une ligne de lumière couvrant le domaine VUV jusqu'au visible. Elle est consacrée aux biospectroscopies pouvant s'appliquer à la biochimie, à la chimie et à la biologie cellulaire. Son domaine spectral est optimisé entre 60 et 700 nm avec la conservation de la polarisation naturelle de la lumière (Miron *et al.* 2005).

La ligne LUCIA (Ligne Utilisée pour la Caractérisation par Imagerie et Absorption) est dédiée à des expériences de micro-absorption X (μ XAS) et de micro-fluorescence (μ XRF) dans le domaine des rayons X dits "tendres" (0.8-8 keV). Elle permet d'appliquer ces deux techniques non destructives à la mesure d'échantillons hétérogènes, de réaliser des cartographies élémentaires à l'échelle du spot de photons, et de décrire l'environnement local autour de ces éléments.

SMIS est une des deux lignes de spectroscopie infrarouge de SOLEIL. La spécificité de cette ligne de lumière est de fournir une source de haute brillance dans la région spectrale 1-100 microns, avec une optimisation de la détection dans la région 2.5-100 microns. Cette source est couplée à un microscope infrarouge (Dumas *et al.* 2007).

L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'améliorer le rapport signal/bruit de l'image tout en réduisant le temps d'acquisition par rapport à un micro-CT (Peyrin 2009). Il existe seulement 47 grands instruments dans le monde, ce qui en fait un outil très intéressant pour la recherche mais dont l'accès est limité.

C. Caractérisation biomécanique

1. Ultrasons

Les ultrasons ont été récemment introduits comme technique non invasive d'évaluation du statut osseux dans l'ostéoporose chez l'homme. Cette technique ne nécessite pas l'utilisation d'un rayonnement ionisant. La fréquence d'atténuation des ultrasons (broadband ultrasound attenuation, BUA) peut être évaluée au calcaneum et la vitesse du son (speed of sound, SOS) peut être estimée au calcaneum et à la rotule. Les ultrasons peuvent être utilisés pour mesurer différents déterminants de la résistance osseuse (Faulkner *et al.* 1991). L'élasticité osseuse est liée au SOS et plusieurs études *in vitro* ont observé une association entre la densité et le BUA (Brebant *et al.* 2010). Cette technique est prometteuse en clinique car elle coûte peu chère et n'est pas irradiante. Elle commence à être validée pour l'appréhension du risque de fractures ostéoporotiques (Albanese *et al.* 2011; Barkmann *et al.* 2010). Cependant, les ultrasons sont peu utilisés chez l'animal (Mehta *et al.* 2001).

2. Tests de flexion

La fragilité osseuse augmente avec la diminution de masse osseuse. Cependant, la qualité du tissu osseux a aussi une importance et relève à la fois de facteurs propres au matériau (ses propriétés mécaniques) et de la structure osseuse dans son ensemble (Beaupied *et al.* 2007). Il existe différentes méthodes expérimentales biomécaniques : essais de torsion, de traction, de compression et de flexion. Ces tests permettent de déterminer les paramètres extrinsèques des os (force à la rupture, déplacement à la rupture, rigidité) et les paramètres intrinsèques qui prennent en compte la géométrie des os (contrainte à la rupture, déformation à la rupture) (Beaupied *et al.* 2007). Les essais biomécaniques expérimentaux peuvent être effectués de deux manières différentes : de façon uniforme ou cyclique. Les essais uniformes sont réalisés en appliquant une contrainte sur l'os jusqu'à ce qu'il rompe. L'étude cyclique (charge-décharge) va permettre d'étudier les fractures de fatigue. Les essais de compression sont souvent utilisés car ils correspondent à des contraintes subies *in vivo* (au niveau des vertèbres par exemple). Les essais de flexion sont préférentiellement utilisés pour analyser la résistance mécanique des os des petits animaux, comme les rongeurs car il est difficile d'effectuer des tests de compression et de traction. Lors d'essais en flexion, l'os subit simultanément des forces de compression et de traction. Les tests de flexion peuvent être de différents types : flexion trois points, flexion quatre points et flexion type poutre-console (Turner et Burr 1993). Le principe consiste à placer l'os sur deux supports et à appliquer une force inverse au milieu de ces supports. Les supports sont placés perpendiculairement à l'axe horizontal et l'actionneur est dirigé vers le bas, perpendiculairement à l'axe horizontal et au milieu des supports du bas (Figure 19). L'os est alors chargé jusqu'à la fracture.

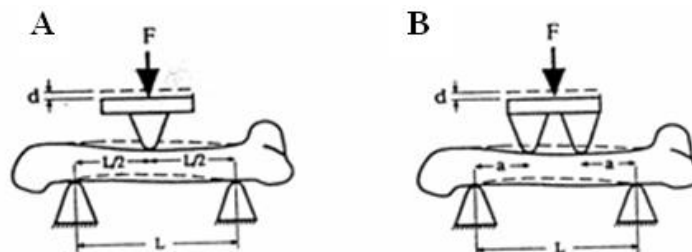


Figure 19 : Schéma d'un test de flexion 3 points (A) et d'un test de flexion 4 points (B).

La force de flexion (F) peut être appliquée sur les os de rongeurs de différentes manières selon l'appareil. D'après Turner et Burr (Turner et Burr 1993).

L'avantage de ce type d'essais est que les échantillons n'ont pas besoin de préparation préalable aux essais, et le type de conservation de l'échantillon n'a pas ou peu d'incidence sur les paramètres biomécaniques de l'os chez le rat (Beaupied *et al.* 2006). En outre, le calcul des propriétés intrinsèques induit une source d'erreur car il prend pour

principe que la géométrie de l'os est parfaitement cylindrique ou elliptique. Cependant, ces essais mécaniques sont régulièrement utilisés chez le rongeur (Bonnet *et al.* 2005; Lespessailles *et al.* 2009).

D. Caractéristiques biochimiques

La maintenance du remodelage osseux est dépendante de la résorption et de la formation osseuse, réalisée principalement par les ostéoclastes et les ostéoblastes, respectivement (Sorensen *et al.* 2007). Différents marqueurs permettent d'étudier le remodelage osseux (Figure 20). Les marqueurs relargués par la matrice osseuse pendant la résorption par les ostéoclastes sont CTX-I (C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen), NTX (N-terminal telopeptide of type I collagen), DPYR/DPD (deoxypyridinolines), PYD (pyridinolines), ICTP (C-terminal telopeptide of type I collagen) et l'hydroxyproline (Sorensen *et al.* 2007). La cathepsine K et TRAP5b (tartrate-resistant acid phosphatase 5b) sont sécrétés par les ostéoclastes eux-mêmes et reflètent donc le nombre d'ostéoclastes et peuvent apporter des informations sur l'activité de la résorption osseuse (Sorensen *et al.* 2007).

L'ostéocalcine et le BSAP (bone-specific alkaline phosphatase) sont sécrétés par les ostéoblastes et sont des indicateurs indirects de la formation osseuse. Il reflètent plutôt la différenciation des ostéoblastes (Sorensen *et al.* 2007). Les fragments de PINP et PICP (N- and C-terminal propeptides of type I collagen) sont libérés durant l'incorporation du collagène dans la matrice osseuse par les ostéoblastes matures et reflètent plus directement la formation osseuse (Sorensen *et al.* 2007).

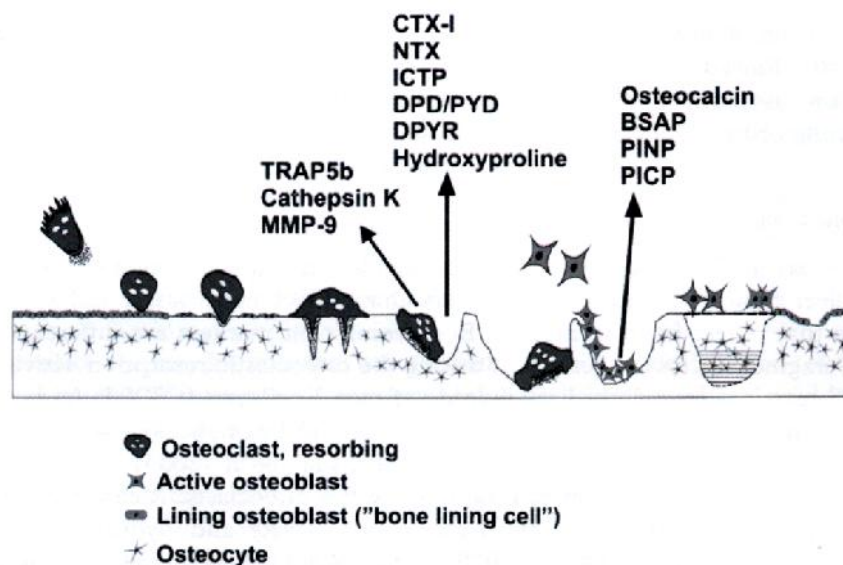


Figure 20 : Marqueurs de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes.
D'après Sorensen *et al.* (Sorensen *et al.* 2007).

Ces marqueurs sont étudiés *in vivo* chez des patients ou dans des modèles animaux afin de voir l'évolution du remodelage osseux suite à une pathologie ou à un traitement (Maimoun et Sultan 2011) (Tableau 5).

Marqueurs de la formation osseuse	Abréviation	Dosage
Ostéocalcine	OC	Sérum
Phosphatase Alcaline totale	t-ALP	Sérum
Phosphatase alcaline spécifique de l'os	B-ALP	Sérum
Extension aminée du collagène de type I	PINP	Sérum
Extension carboxylée du collagène de type I	PICP	Sérum
Marqueurs de la résorption osseuse	Abréviation	Dosage
Pyridinoline	PYD/PYR	Urine
Deoxypyridinoline	DPD/DPYR	Urine
Telopeptide carboxylé du collagène de type I	ICTP	Sérum
Telopeptide C du collagène de type I	CTX	Urine/Sérum
Telopeptide N du collagène de type I	NTX	Urine/Sérum
Phosphatase acide résistante au tartrate	TRAP/TRACP	Sérum

Tableau 5 : Marqueurs du remodelage osseux et leurs abréviations.

D'après Maïmoun et Sultan (Maimoun et Sultan 2011).

L'avantage du dosage de ces marqueurs est l'obtention rapide de résultats à partir de sang ou d'urine, et la possibilité d'évaluer de manière dynamique l'évolution du remodelage osseux.

Les marqueurs les plus couramment utilisés en clinique sont TRAP, ostéocalcine, CTX, PYR et ALP, pour évaluer les effets de différents traitements de l'ostéoporose (zolédrone, alendronate) (Sorensen *et al.* 2007). Les marqueurs les plus utilisés chez le rat sont l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, les CTX et NTX.

Il existe d'autres marqueurs, notamment de la différenciation de la lignée ostéoblastique, qui peuvent être évalués *in vivo* ou *in vitro* afin d'observer les changements de différenciation entre ostéoblaste et ostéocyte, différenciation qui peut également affecter le remodelage osseux (Tableau 6).

Biomarkers	Osteoblast	Young osteocyte	Mature osteocyte
Alkaline phosphatase	++	-	-
Bone sialoprotein	++	+/-	+/-
Osteocalcin	++	+/-	+/-
Collagen type I	++	+/-	+/-
Runx2	++	-	-
Osteopontin	++	++	++
$\beta 3$ integrin	++	++	++
E11/gp38 antigen	+/-	++	-
CD44	+/-	++	++
Sclerostin	-	+/-	++
DMP1	-	++	+/-
MEPE	-	++	++

Tableau 6 : Marqueurs de différenciation entre ostéoblaste, ostéocyte jeune et ostéocyte mature.
D'après Rochefort *et al.* (Rochefort *et al.* 2010).

RESUME :

Il existe de nombreuses techniques d'évaluation du tissu osseux, au regard de la qualité et de la quantité de celui-ci. Ces techniques permettent d'évaluer la masse osseuse, la densité (DXA, pQCT), la microarchitecture de l'os trabéculaire et cortical (μ CT, IRM), la texture (radiographie), la structure dynamique de la minéralisation (histomorphométrie), et permettent d'étudier jusqu'aux acides aminés et aux éléments constituant les cellules (synchrotron). Les tests de flexions permettent d'évaluer la résistance osseuse et l'analyse de marqueurs biochimiques rend compte de l'état du remodelage osseux à un instant donné. Toutes ces méthodologies permettent une compréhension des pathologies à des échelles microscopique et cellulaire et aident également à intégrer l'efficacité des traitements pharmacologiques.

III. PERTE OSSEUSE ET OSTEOPOROSE

A. Ostéopénie physiologique

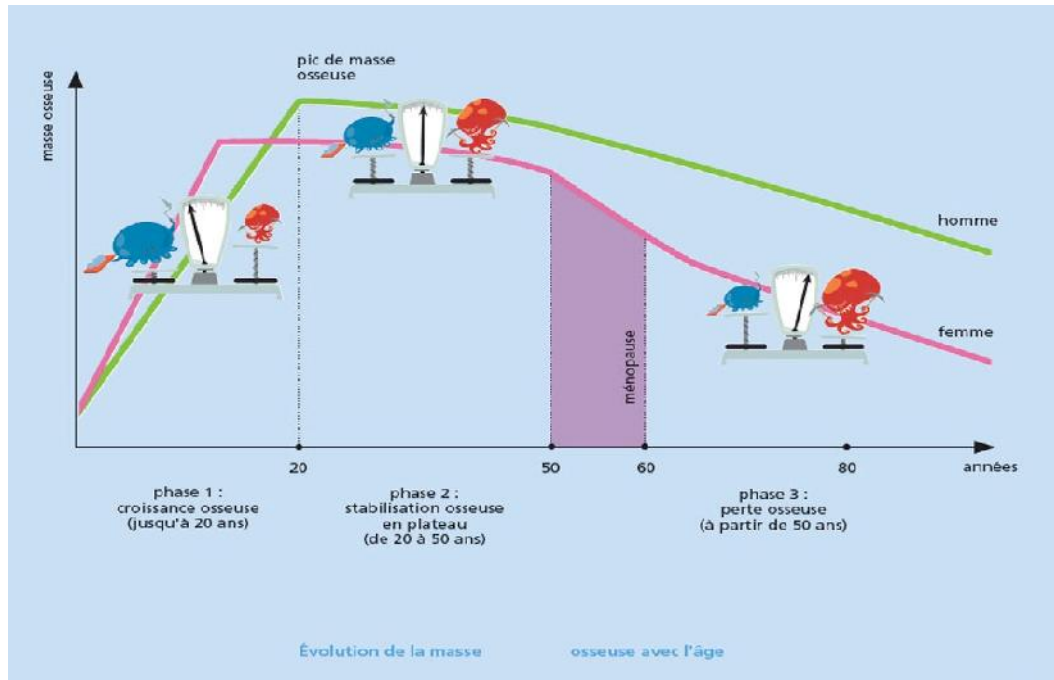


Figure 21 : Evolution de la masse osseuse avec l'âge.

D'après Ostéoporose, guide à l'usage des patients et de leur entourage, Editions médicales Bash, 2007.

La masse osseuse évolue au cours de la vie (Figure 21). On sait que l'acquisition de masse osseuse se fait essentiellement dans la deuxième décennie, et peut continuer dans la troisième décennie (Clarke et Khosla 2010a; Holroyd *et al.* 2011). Durant cette période survient le maximum de croissance en longueur des os, mais aussi l'augmentation la plus importante de la densité osseuse. La densité osseuse est variable d'un sujet à l'autre et peut varier de 10% par rapport à la valeur moyenne. Les facteurs qui influencent ce capital osseux sont les facteurs génétiques, hormonaux, la teneur en calcium de l'alimentation et l'activité physique (Sampson 2002) (Figure 22).

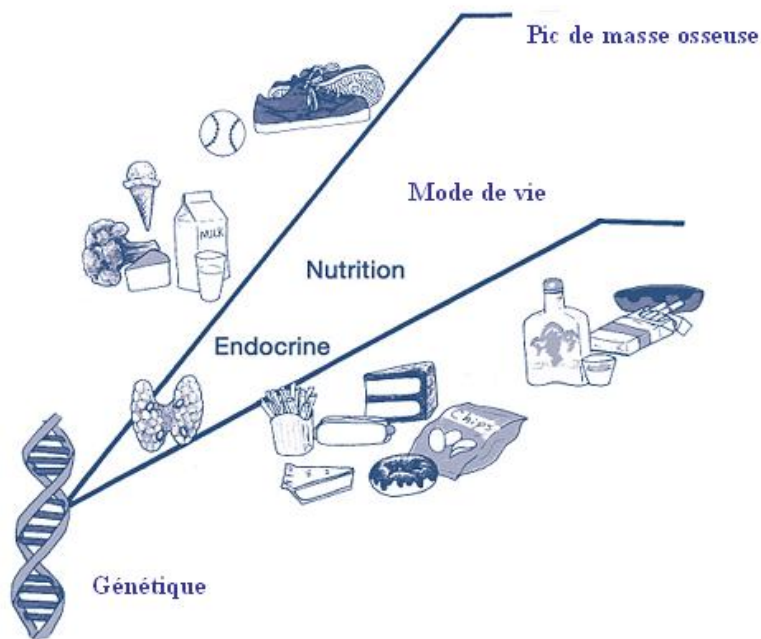


Figure 22 : Facteurs influençant le pic de masse osseuse.
D'après Sampson (Sampson 2002).

Après l'atteinte du pic de masse osseuse, la masse osseuse stagne ou décroît très peu. Vers 50 ans, il y a une accélération de la perte de masse osseuse dans les deux sexes, mais celle-ci est davantage accentuée chez la femme suite à la ménopause, en raison de la diminution des oestrogènes (Clarke et Khosla 2010b). Cette perte osseuse est due à une balance négative entre formation et résorption (Clarke et Khosla 2010b). La perte osseuse est observée sur l'os cortical et sur l'os trabéculaire, mais les mécanismes sont un peu différents. Dans l'os cortical, l'apposition périostée continue tandis que la résorption endostée est accélérée, notamment chez la femme après la ménopause (Zebaze *et al.* 2010). Cela conduit à une diminution de l'épaisseur corticale, et à une augmentation de la taille extérieure des os (Russo *et al.* 2006). La porosité corticale augmente également chez les deux sexes à partir de 40 ans (Augat et Schorlemmer 2006; Bousson *et al.* 2001; Cooper *et al.* 2007). Dans l'os trabéculaire, les ostéoblastes forment moins de matrice osseuse à chaque cycle de formation, tandis que les ostéoclastes continuent à creuser normalement des lacunes de résorption. De plus, il y a une augmentation de la fréquence d'activation du remodelage lors de la ménopause (Clarke et Khosla 2010b), entraînant une augmentation du nombre d'ostéoclastes le long des travées (Attlan *et al.* 2005). On estime qu'une femme perd 30% de sa masse osseuse entre 20 ans et 80 ans. Cette perte osseuse physiologique est appelée ostéopénie.

B. Ostéoporose

1. Définition

L'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette, caractérisée par une baisse de densité osseuse et des altérations de la microarchitecture trabéculaire osseuse, conduisant à une fragilité osseuse exagérée et donc à un risque élevé de fracture (Nutti *et al.* 2009).

L'ostéoporose est définie par l'analyse de la densité minérale osseuse par absorptiométrie radiologique à double énergie et calcul du T-score (Mauck et Clarke 2006). Le T-score représente le nombre d'écart-type par rapport à la densité minérale osseuse moyenne de la population de référence à l'âge du pic de masse osseuse (adulte jeune) (Mauck et Clarke 2006). Un sujet ayant un T-score situé entre -1 et -2,5 déviation standard est dit ostéopénique, et un sujet ayant un T-score inférieur à -2,5 est dit ostéoporotique (Wylie 2010). Dans cette conception, l'ostéoporose est une maladie augmentant le risque de fracture. Le risque de fracture est élevé, mais la fracture n'est qu'une complication de la maladie.

2. Epidémiologie

Les fractures ostéoporotiques sont une source majeure de mortalité chez les personnes âgées et sont également un problème économique pour nos sociétés (Mauck et Clarke 2006). De plus, le nombre de fractures ostéoporotiques va très certainement s'accroître en raison de l'augmentation de l'espérance de vie de la population. En Europe, les épidémiologistes prédisent que les personnes de plus de 80 ans, chez lesquels l'incidence de fractures ostéoporotiques est la plus élevée, vont très certainement passer de 13 millions à 44 millions en 2050 (Curran *et al.* 2010). En France, pratiquement une personne sur 3 aura plus de 60 ans en 2030, alors qu'elles n'étaient qu'une personne sur cinq en 2000.

La densité minérale osseuse diminue au cours du vieillissement. Les femmes ont plus de fractures ostéoporotiques que les hommes (10.7/1000 personnes/an versus 5.7/1000 personnes/an), mais la mortalité est plus élevée chez les hommes que chez les femmes suite à une fracture (Baudoin *et al.* 1996). En France, l'incidence de la fracture de la hanche augmente avec l'âge : 40/10000 personnes/an chez les femmes âgées entre 50 et 80 ans, et

150/10000 personnes/an chez les femmes âgées de plus de 80 ans (Baudoin *et al.* 1996). Dans une autre étude faite en 2001, les incidences de fractures de la hanche n'étaient pas différentes entre hommes et femmes entre 45 et 65 ans, mais il y avait deux fois plus de fractures chez les femmes après 66 ans (Maravic *et al.* 2005). Les fractures des vertèbres sont sous-estimées car il est estimé qu'environ une femme sur trois seulement vient se faire soigner. Dans une étude réalisée chez des femmes âgées de plus de 75 ans, 22% des femmes avaient au moins une fracture vertébrale (Cooper *et al.* 1992). Concernant les autres fractures, des études ont quantifié 35000 cas par an de fractures du poignet en France chez les femmes âgées de plus de 50 ans, et plus de 33000 cas de fractures des membres supérieurs chez des adultes de plus de 45 ans en 2001 (Maravic *et al.* 2005).

3. L'ostéoporose primitive

L'ostéoporose primitive (post-ménopausique) est la forme la plus fréquente d'ostéoporose (Glaser et Kaplan 1997). L'ostéoporose primitive peut cependant être rencontrée avant la ménopause, dans la période péri-ménopausique. Elle fait référence à la privation oestrogénique en tant que facteur étiologique, en raison de la diminution de l'activité ovarienne à la ménopause. Cela se traduit par une perte de tissu osseux, notamment sur l'os trabéculaire (Mulvihill *et al.* 2008; Sornay-Rendu *et al.* 2009). Ainsi, chez la femme, l'acquisition du pic de masse osseuse et la perte de masse osseuse liée à la ménopause sont deux facteurs déterminants du risque fracturaire, après 50 ans (Bonjour *et al.* 2009). Cependant, certains travaux ont montré l'importance des facteurs environnementaux comme la pratique d'une activité physique régulière ou le type d'activité professionnelle (Rasky *et al.* 1996).

4. Les ostéoporoses secondaires

Il y a de nombreux mécanismes menant à une ostéoporose secondaire (Glaser et Kaplan 1997). Celle-ci est caractérisée par une faible masse osseuse avec des altérations de la microarchitecture osseuse menant à un risque de fracture élevé, en présence d'une pathologie déjà existante ou d'un traitement médical. Le diagnostic est difficile car les causes sont diverses et cette pathologie peut atteindre à la fois des femmes pré-ménopausées et des hommes (Attlan *et al.* 2005). Les principales causes d'ostéoporose secondaire sont un excès de glucocorticoïdes, l'hyperparathyroïdie, la grossesse, un diabète

de type I, une déficience de GH, des pathologies gastro-intestinales, le VIH et certains traitements interagissant avec l'absorption ou l'action de la vitamine D, du calcium, et du phosphate (Hofbauer *et al.* 2010). A cela il faut rajouter l'anorexie mentale, l'aménorrhée due à la pratique du sport de haut niveau, l'immobilisation, la thalassémie, la dépression, etc.

L'ostéoporose masculine est plus rare que l'ostéoporose féminine (Kaufman et Goemaere 2008), probablement en raison de la plus faible espérance de vie, de la taille plus importante des os, et de la préservation de l'architecture trabéculaire après 50 ans. En revanche, la mortalité est plus élevée chez l'homme que chez la femme dans les mois qui suivent une fracture du fémur (Kaufman et Goemaere 2008). Chez l'homme, les pathologies les plus impliquées dans l'ostéoporose secondaire sont l'hypercorticisme, l'hypogonadisme, les maladies hépato-digestives et l'intoxication alcool-tabagique (Seeman 1997).

RESUME :

La masse osseuse évolue au cours de la vie : elle augmente progressivement jusque vers 30 ans, puis stagne jusqu'à 50-55 ans. Après 50-55 ans, la masse osseuse commence à décroître lentement chez les hommes, et plus rapidement chez les femmes, en raison de la chute d'oestrogènes accompagnant la ménopause. Le capital osseux peut être maximisé avant 30 ans en ayant une bonne hygiène de vie (consommation de calcium, exercice physique). Cependant, certaines personnes partent avec un capital de départ inférieur à d'autres. La diminution de la masse osseuse peut devenir pathologique, si elle est trop importante et engendrer une ostéoporose, pathologie caractérisée par une densité minérale osseuse très inférieure à la moyenne et à une augmentation du risque de fractures. Les causes de l'ostéoporose peuvent être la chute des oestrogènes (ostéoporose primitive), mais aussi l'hypogonadisme, l'excès de corticoïdes et également l'abus d'alcool.

IV. ALCOOL ET PARAMETRES OSSEUX

L'alcool est connu pour favoriser les accidents de la route, augmenter les risques de violence subie et engendrée (McCambridge *et al.* 2011). Les effets de l'alcool sont à la fois psychiques et physiologiques. L'alcool engendre une augmentation de la dépression, l'isolement, des problèmes familiaux et professionnels (Miller *et al.* 2000). Au niveau physiologique, les effets de l'alcool sont surtout connus au niveau du foie (Gyamfi et Wan 2010; Lieber 1993).

Malheureusement, l'alcool touche beaucoup d'autres tissus, comme le tissu musculaire (Preedy *et al.* 1999), et le tissu osseux (Turner 2000).

A. Métabolisme de l'alcool

1. Métabolisme

Les effets de l'alcool sur les différents tissus dépendent de sa concentration sanguine et de la durée de celle-ci avant élimination. Après ingestion, l'alcool est facilement absorbé par diffusion passive à travers les parois de l'estomac (20%), les parois du duodénum et de l'intestin grêle (80%) (Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010). L'élimination de l'éthanol absorbé se fait principalement à travers le métabolisme (95-98%), tandis que des petites fractions de la dose ingérée sont excrétées telles quelles par l'expiration (0.7%), la sueur (0.1%) et l'urine (0.3%) (Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010).

Chez un individu adulte non alcoolique, la majeure partie de la métabolisation de l'éthanol se produit dans le foie, grâce à l'oxydation de l'éthanol par les enzymes alcool déshydrogénase (ADH), aldéhyde déshydrogénase (ALDH), le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) et la catalase (Figure 23). Chez les personnes qui consomment de l'alcool de façon modérée, l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par l'ADH dans le cytosol des hépatocytes. Après quelques verres, cette enzyme est saturée. L'acétaldéhyde est ensuite oxydé en acétate par l'ALDH dans les mitochondries (Figure 23). La forme activée de l'acétate, l'acétyl CoA, est métabolisée, produisant des corps cétoniques, des acides aminés, des acides gras et des stéroïdes (Agarwal 2001). Suite au cycle de Krebs, du CO₂ et de l'eau sont formés, représentant les produits finaux de l'oxydation de l'éthanol. Chez les consommateurs réguliers d'alcool, une deuxième voie est utilisée : le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS). Ce système fonctionne dans le réticulum

endoplasmique lisse des hépatocytes et aide le corps à se débarrasser des produits toxiques grâce au cytochrome P450, qui convertit l'alcool en acétaldéhyde (Guo et Ren 2010; Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010). Une troisième voie du métabolisme de l'éthanol est la catalase, qui oxyde 2% de l'éthanol en acétaldéhyde, en présence de peroxyde d'hydrogène, dans les peroxysomes (corps cellulaires).

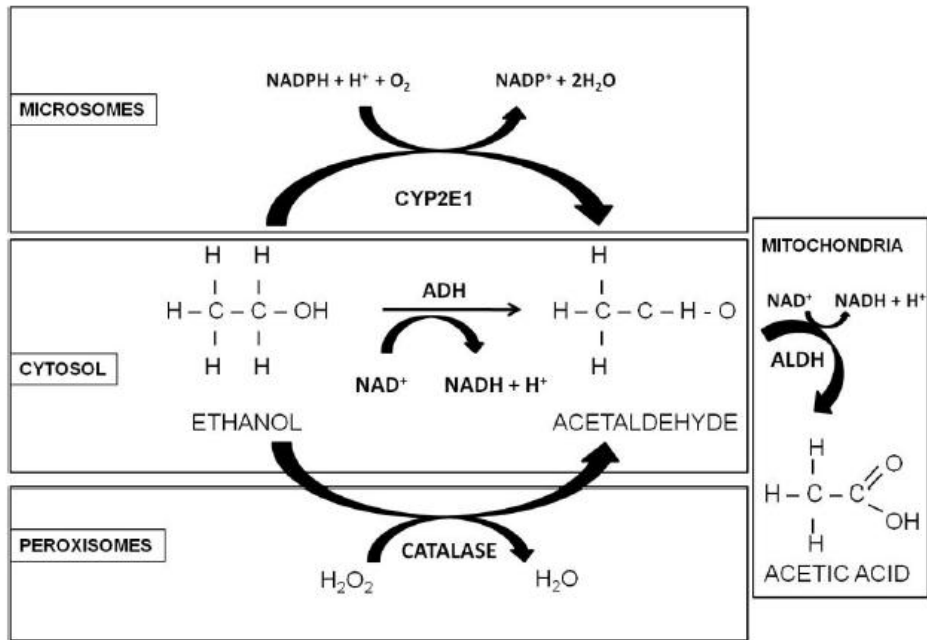


Figure 23 : Voies oxydatives du métabolisme de l'alcool.

D'après Manzo-Avalos et Saavedra-Molina (Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010).

2. Effets potentiels des métabolites de l'alcool

L'acétaldéhyde est un métabolite qui induit des effets toxiques, pharmacologiques et comportementaux. Bien que le foie soit le principal site d'oxydation de l'alcool, d'autres organes comme le cœur, le pancréas, le système digestif et le cerveau peuvent aussi participer au métabolisme de l'éthanol pour former de l'acétaldéhyde (Guo et Ren 2010). L'acétaldéhyde engendre des dysfonctions mitochondriales et peut aussi réagir avec des groupes amine, hydroxyl, sulfhydryl et interférer ou modifier la structure et la fonction de macromolécules dans le corps comme des protéines et des enzymes (Guo et Ren 2010). L'acétaldéhyde joue un rôle dans la cardiomyopathie chez les sujets alcooliques et dans la dépendance à l'alcool (Guo et Ren 2010; Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010). L'acétate produit s'échappe du foie par la voie sanguine et est métabolisé en CO_2 dans le cœur, les muscles squelettiques et les cellules du cerveau (Agarwal 2001). Il augmente le débit sanguin dans le foie et déprime le système nerveux central (Manzo-Avalos et Saavedra-Molina 2010).

3. Polymorphisme génétique

Il a été montré qu'il existe des différences génétiques dans la métabolisation de l'alcool entre différents groupes ethniques. Des études ont identifié plusieurs différences sur des gènes codant pour des enzymes liées au métabolisme de l'alcool (Guo et Ren 2010). L'ADH2, l'ADH3 et l'ALDH2 ont vraisemblablement un rôle important dans les différences génétiques liées au métabolisme de l'alcool et à sa consommation excessive (Takeuchi et al. 2011). Une déficience dans l'expression ou l'activité de l'ALDH2 est responsable de la coloration rouge du visage et de symptômes vasomoteurs suivant une ingestion d'alcool (Guo et Ren 2010). De plus, une déficience dans l'activité enzymatique de l'ALDH2 inhibe la formation d'acétate via l'acétaldéhyde (Kiyoshi et al. 2009). La prévalence de l'allèle ALDH2*1 est associée avec l'alcoolisme tandis qu'une déficience en ALDH2 due à une mutation sur le gène actif ALDH2*1 altère de manière significative la concentration sanguine d'acétaldéhyde et modifie la vulnérabilité envers l'alcoolisme (Ren 2007). De plus, les individus portant l'allèle ADH2*2 montrent une facilité à la métabolisation de l'alcool en raison d'une activité enzymatique plus élevée comparés à des populations ayant l'allèle ADH2*1 (Guo et Ren 2010).

Des recherches ont rapporté que la fréquence des gènes ADH2*2 et ALDH2*2 est plus faible chez les africains, les européens et les aborigènes australiens que chez les asiatiques (incluant les chinois, les japonais et les coréens). L'allèle ALDH2*2 encode une sous-unité inactive de l'ALDH2 et l'ALDH2 ne fonctionne plus quand elle comprend une sous-unité inactive. Ceci explique pourquoi les asiatiques ne peuvent pas boire de grandes quantités d'alcool comparés aux caucasiens (Guo et Ren 2010). D'autres études ont montré que les personnes qui portent l'allèle ALDH2*2 sont très sensibles à de faibles doses d'alcool. Une accumulation d'acétaldéhyde dans le sang chez ces personnes produit des effets inconfortables comme une augmentation de la température de la peau, une baisse de la pression artérielle, des nausées, etc. (Quertemont et Didone 2006).

4. Interactions entre hormones gonadiques et métabolisme hépatique de l'alcool

Il a été démontré que les femmes sont plus enclines à développer des maladies liées à l'alcool que les hommes (maladies du foie, cardiovasculaires et dommages au cerveau), bien qu'elles consomment généralement moins d'alcool et sont moins souvent des grosses consommatrices (Sato et al. 2001). Les différences de sensibilité entre femmes et hommes peuvent être dues à plusieurs facteurs : la pharmacocinétique de l'alcool, qui induit une concentration d'éthanol dans le sang supérieure chez la femme après ingestion, la différence du taux d'élimination, la différence du métabolisme de l'éthanol dans le foie, et bien sûr le rôle des hormones gonadiques (Sato et al. 2001). Il existe très peu d'études sur les interactions entre hormones gonadiques et métabolisme hépatique de l'alcool. Il a été montré que les androgènes suppriment l'activité de l'ADH dans le foie, ce qui est probablement un mécanisme expliquant les plus faibles taux d'élimination de l'alcool chez les femmes comparées aux hommes (Sato et al. 2001). Après castration, les taux d'élimination de l'alcool augmentent chez le rat mâle.

5. Système nerveux central

L'alcool modifie le fonctionnement normal de la plupart des systèmes endocriniens. L'axe hypothalamo-hypophyso-adrénergique (HPA) est stimulé, ce qui résulte en une augmentation de l'hormone adénocorticotrope et des glucocorticoïdes, proportionnelle à la dose ingérée. Cette augmentation est supérieure chez la femme par rapport à l'homme, et est observée avec des consommations aigue et chronique d'alcool (Ronis et al. 2007). L'axe HPA a un rôle important dans la dépendance et l'abstinence vis-à-vis de l'alcool. L'abus d'alcool a des effets négatifs sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez l'homme et la femme, entraînant des dysfonctionnements sexuels (Emanuele et Emanuele 1997) et bouleversant la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) (Ronis et al. 2007).

B. Effets de l'alcool sur le métabolisme osseux : quelles doses pour quels effets ?

1. Consommation modérée

a) Densité minérale osseuse

L'alcool peut avoir des effets opposés sur l'os, si l'on ne prend pas garde de séparer les effets d'une consommation modérée des effets d'une consommation excessive. Certaines revues de la littérature relatent une amélioration surprenante de la masse osseuse grâce à l'alcool (Feskanich *et al.* 1999; Jugdaohsingh *et al.* 2006; Orwoll *et al.* 1996). Dans ces études, si nous étudions de près les volumes d'alcool consommés par les sujets, on s'aperçoit que les consommations d'alcool sont modérées (75g d'alcool ou plus par semaines dans l'étude de Feskanich *et al.*, et environ 5000 verres durant une vie chez des femmes âgées d'environ 74 ans dans l'étude de Orwoll *et al.*). La définition d'un verre standard diffère selon les pays, mais la dose moyenne d'éthanol est comprise très souvent entre 8g et 12g par verre (Jugdaohsingh *et al.* 2006). Des études récentes ont rapporté des effets positifs sur le tissu osseux pour de faibles consommations d'alcool. Par exemple, le groupe de Ilich *et al.* a trouvé que 8 g d'alcool par jour, principalement du vin, était corrélé positivement à la DMO des vertèbres lombaires et du corps entier chez des femmes post-ménopausées (Ilich *et al.* 2002). Dans l'étude de Ganry *et al.*, des femmes post-ménopausées qui buvaient de 11 à 29 g d'alcool par jour avaient des valeurs de DMO supérieures à des femmes non consommatrices d'alcool au niveau du trochanter, tandis que des consommations de 1-10 g/jour, ou supérieures ou égales à 30 g/jour n'augmentaient pas la DMO (Ganry *et al.* 2000). Ces données suggèrent qu'une consommation modérée d'alcool (1-3 verres par jour) chez des femmes âgées est associée à une augmentation de la DMO à différents sites osseux tandis que des consommations élevées d'alcool peuvent être néfastes pour le tissu osseux. Des observations similaires ont été faites chez des femmes pré-ménopausées (Pedrera-Zamorano *et al.* 2009), chez des jumelles homozygotes (Williams *et al.* 2005), chez des hommes (Tucker *et al.* 2009) ainsi que chez de jeunes soldats (Venkat *et al.* 2009). Cependant, il semble que les différents breuvages alcoolisés n'aient pas tous le même effet sur l'os. Plus de 2 verres de bière ou de vin augmentent la DMO chez des femmes pré-ménopausées, post-ménopausées et chez des hommes tandis que plus de 2 verres de liqueurs par jour diminuent la DMO chez l'homme (Pedrera-

Zamorano *et al.* 2009; Tucker *et al.* 2009). Cette différence pourrait être due aux autres constituants présents dans le vin et la bière comme le silicone ou les polyphénols (Jugdaohsingh *et al.* 2006).

Des résultats semblables ont été rapportés chez l'animal. Yamamoto *et al.* ont étudié les effets de différentes doses d'éthanol chez des rates âgées de 4 semaines (Yamamoto *et al.* 1997). Ils ont comparé un modèle d'alcoolisation modérée (5% d'éthanol dans de l'eau disponible 2 heures par jour pendant 163 jours), à un modèle d'alcoolisation excessive (5% d'éthanol à volonté pendant 163 jours). Le groupe modéré avait une DMO et des propriétés mécaniques supérieures au groupe contrôle, tandis que le groupe buvant à volonté n'avait pas de modifications des propriétés mécaniques et de la DMO comparées au groupe contrôle (Yamamoto *et al.* 1997).

b) Remodelage osseux

L'augmentation de la DMO suivant une faible alcoolisation pourrait être expliquée par un remodelage osseux ralenti. Une diminution des concentrations en ostéocalcine et en NTx a été observée chez des patients alcooliques (Rapuri *et al.* 2000; Sripanyakorn *et al.* 2009). Très peu d'études ont analysé l'évolution des marqueurs du remodelage osseux pendant une alcoolisation modérée, car la plupart ont analysé les marqueurs du remodelage chez des patients alcooliques et la consommation d'alcool était étudiée durant toute la vie. De plus, il a été rapporté que les marqueurs du remodelage ont une grande variabilité intra- et inter-individuelle, et sont sensibles aux niveaux des hormones sexuelles, à l'alimentation, et varient selon l'heure de la journée et la saison (Jugdaohsingh *et al.* 2006).

Fanti *et al.* ont montré un effet positif d'une faible consommation d'alcool (2.5% de l'alimentation) sur le remodelage osseux chez des rates ovariectomisées (Fanti *et al.* 1997). La résorption osseuse était diminuée sans changement de la formation osseuse chez les femelles OVX tandis qu'il n'y avait pas de changement chez les rates SHAM.

2. Consommation excessive

a) Densité minérale osseuse

Chez l'homme, il a été montré qu'une consommation d'alcool excessive pendant de nombreuses années diminue le CMO et la DMO (Turner 2000). La diminution de la DMO a été observée à différents sites osseux : poignet, colonne, crête iliaque, trochanter (Alvisa-Negrin *et al.* 2009; Diamond *et al.* 1989). En revanche, la sévérité de l'alcoolisation varie selon les différentes études. Des études ont rapporté que trois à quatre verres d'alcool par jour étaient délétères pour la DMO chez l'homme, mais les effets variaient selon le type d'alcool (Hoidrup *et al.* 1999; Tucker *et al.* 2009). La quantité d'alcool ingérée ainsi que la durée d'alcoolisation sont corrélées avec le degré de perte osseuse (Gonzalez-Calvin *et al.* 1993). Une étude récente de Malik *et al.* a montré une diminution de la DMO au niveau des vertèbres lombaires et du fémur proximal chez les hommes, mais pas chez les femmes sous activité ovarienne (Malik *et al.* 2009). Différents effets de l'alcool sur le tissu osseux en fonction du sexe et des différences hormonales ont été rapportés également dans l'étude de Hannan *et al.* (Hannan *et al.* 2000).

Chez le rat, les effets de l'alcool sur la DMO ont été étudiés dans les deux sexes, à différents âges et en fonction de différentes doses d'alcool. Par exemple, un moindre gain de DMO a été observé chez des rates âgées de 4 semaines en début d'étude, après 6 semaines d'alcoolisation (alcool représentant 35% de l'apport calorique journalier) (Sampson *et al.* 1996). Le pic de masse osseuse était plus faible dans l'os trabéculaire et cortical chez les rates alcoolisées. Une plus faible DMO au niveau du corps entier a été observée chez des rats de 10 semaines après 6 semaines d'alcoolisation (15% de l'énergie apportée par l'éthanol) (Nyquist *et al.* 1999). Il a également été observé que la limitation du gain de DMO était plus importante chez les femelles que chez les mâles (36% de l'apport calorique journalier pendant 6 semaines) (Nishiguchi *et al.* 2000).

b) Microarchitecture

La microarchitecture est un paramètre important dans la résistance osseuse, la qualité du tissu osseux et la résistance osseuse (Ammann et Rizzoli 2003). Cependant elle est difficile à évaluer chez l'homme. Des études dans les années 1980 rapportent une diminution du volume et de l'épaisseur de l'os trabéculaire chez l'homme, après biopsie de l'os iliaque (Chappard *et al.* 1991; De Vernejoul *et al.* 1983; Schnitzler et Solomon 1984).

Une diminution de l'épaisseur corticale et du volume trabéculaire a été décrite chez des rats suite à un traitement alcoolique (36% des calories) (Sampson 1998b; Sampson *et al.* 1997). Sakurama a observé une atrophie de l'os, un amincissement des travées et de l'os cortical ainsi qu'une augmentation de la porosité corticale chez des souris alcoolisées (16% d'éthanol durant 472 jours) (Sakurama 1998). Une diminution du nombre, de l'épaisseur des travées, de la densité des connections a été rapportée chez le rat, ainsi qu'une diminution de la masse d'os trabéculaire BV/TV (Maddalozzo *et al.* 2009; Trevisiol *et al.* 2007). D'autres études ont observées une diminution de la section corticale et du volume de l'os cortical, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur corticale, ce qui dénote une altération de ce compartiment osseux (Broulik *et al.* 2010; Nishiguchi *et al.* 2000). Il semble d'après certaines études que la perte (ou le moindre gain) d'os due à l'alcool soit plus important dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical (Chakkalakal *et al.* 2001; Wezeman *et al.* 2003).

c) Remodelage osseux

La plupart des études rapportent un découplage entre formation osseuse et résorption chez les patients alcooliques : la formation est très souvent diminuée et la résorption augmentée chez les patients alcooliques comparés à des patients contrôles (Alvisa-Negrin *et al.* 2009; Gonzalez-Calvin *et al.* 1993; Nyquist *et al.* 1996). Il a été montré chez l'homme que la diminution de la formation osseuse serait due à une inhibition de la prolifération et de l'activité des ostéoblastes (Diamond *et al.* 1989; Sampson 1998a). La concentration des marqueurs osseux peut varier suivant l'âge des patients (Bikle 1993), le type de consommation (aigu versus chronique) (Sripanyakorn *et al.* 2009) et aussi suivant l'abstinence avant la prise de sang (Laitinen *et al.* 1992). D'autres paramètres peuvent

également faire varier les concentrations des marqueurs du remodelage osseux chez les patients alcooliques, comme le tabagisme, les déficiences éventuelles en vitamine D, calcium et PTH, et l'état du foie (pancréatite, cirrhose).

En accord avec les études chez l'homme, des études chez l'animal ont également observé une diminution de la formation osseuse à la suite d'un traitement alcoolisé (Broulik *et al.* 2010; Dyer *et al.* 1998). Seule une étude de Sampson *et al.* n'a pas observé de différence d'ostéocalcine entre des rates contrôles et des jeunes rates de 4 semaines (liquide nutritif contenant 35% de l'AETQ provenant de l'alcool, ingéré pendant 2 à 8 semaines), malgré la diminution de la DMO et du pic de masse osseuse (Sampson *et al.* 1996). Les effets inhibiteurs de l'alcool sur la formation osseuse semblent être dépendants de la dose, tout comme les effets de l'alcool sur la résorption osseuse (Turner *et al.* 2001). Dans l'étude de Turner *et al.*, le taux de formation osseuse (BFR) diminue au fur et à mesure que la dose d'alcool augmente, tandis que le nombre d'ostéoclastes diminue avec la plus faible dose d'alcool mais ne diffère plus du groupe contrôle quand les doses augmentent. Ces données confirment qu'une faible consommation d'alcool peut réduire le remodelage osseux tandis que des consommations excessives produisent un découplage du remodelage osseux avec une réduction de la formation et un excès de résorption (Broulik *et al.* 2010; Dai *et al.* 2000).

d) Résistance osseuse et fractures

Tandis qu'une faible consommation d'alcool n'est pas associée à une augmentation du risque de fracture (Hoidrup *et al.* 1999), une consommation supérieure à 3 verres par jour ou supérieure à 27 boissons par semaine chez l'homme et la femme constitue un risque majeur de fracture (Berg *et al.* 2008; Hoidrup *et al.* 1999). Il a été démontré que les fractures sont quatre fois plus fréquentes chez les patients alcooliques que chez des contrôles du même âge (Kanis *et al.* 2009; Turner 2000). La faible masse osseuse observée fréquemment chez les patients alcooliques est associée à l'augmentation du risque de fracture (Turner 2000). Indépendamment des altérations osseuses, l'alcoolisme crée des conditions qui favorisent les accidents et les chutes (Lucas 1987). Par exemple, une étude a montré un risque de chute plus élevé chez des consommateurs d'alcool (plus de 14 boissons par semaine) comparé à des non buveurs (Cawthon *et al.* 2006). Comme souligné par Turner (Turner 2000), les dossiers hospitaliers ne précisent pas toujours les causes des fractures (traumatiques versus non traumatiques). Cela permettrait de savoir si

l'augmentation du nombre de fractures chez les patients alcooliques est due à une plus faible DMO ou à un nombre plus fréquent de chutes (Turner 2000). Les gros consommateurs d'alcool (100 à 460 g/jour) ont souvent des traumatismes du squelette et des fractures vertébrales en dépit d'une DMO lombaire normale. De plus, ces patients sont rarement au courant de fractures vertébrales antérieures (Peris *et al.* 1995). Cela est confirmé par Gonzalez-Reimers *et al.* qui observent des fractures de côtes plus fréquentes chez des sujets alcooliques comparés à des sujets sains (Gonzalez-Reimers *et al.* 2005). Les fractures de côtes n'étaient pas corrélées aux valeurs de DMO, en revanche, une association des fractures de côtes avec l'hygiène de vie des patients (tabagisme, habitudes alimentaires irrégulières) a été observée. Ceci a été confirmé par Santori *et al.* (Santori *et al.* 2008). De ce fait, les habitudes de vie et les traumatismes pourraient contribuer à l'incidence fracturaire chez les sujets alcooliques et cela indépendamment de la DMO. De plus, l'alcool augmente le temps de réparation des fractures (Nyquist *et al.* 1997) et augmente le risque de complications (Chakkalakal 2005).

Chez l'animal, une diminution de la force maximale requise pour casser l'os a été observée chez des rats et des rates nourris avec de l'alcool (8%) durant 4 et 6 semaines (Peng *et al.* 1988). Les auteurs ont aussi rapporté une corrélation inverse entre la force nécessaire pour casser l'os et la dose d'éthanol ingérée. La rigidité osseuse, la force et l'énergie absorbée jusqu'à fracture étaient significativement plus faibles chez des rates de 4 semaines (35% des calories provenant de l'éthanol pendant 6 semaines) comparées à des animaux contrôles ayant consommé autant de calories, dans l'étude de Hogan *et al.* (Hogan *et al.* 1997). Dans cette étude, la surface corticale n'était pas différente entre les rates alcoolisées et les rates contrôles, suggérant que l'alcool diminue la résistance osseuse en modifiant la qualité du tissu osseux.

Chakkalakal *et al.* ont étudié l'effet-dose de l'éthanol sur la réparation osseuse dans un modèle de rat. Ils ont observé une moins bonne réparation osseuse chez des rats alcoolisés à une dose de 36% (calories dérivées de l'éthanol) comparé à des rats contrôles : l'os réparé était 24% moins résistant et les cendres étaient 14% moins denses (Chakkalakal *et al.* 2005). En revanche, les paramètres étaient normaux chez les rats ayant consommé une dose d'alcool de 26% (calories dérivées de l'éthanol). De nombreuses études ont montré que l'alcool inhibe la formation osseuse sur des sites de réparations fracturaires (Brown *et al.* 2002; Trevisiol *et al.* 2007).

e) Abstinence

Alvisa-Negrin *et al.* ont comparé 77 patients alcooliques (204 g d'alcool par jour en moyenne pendant 28 ans) à des travailleurs sains (contrôles). L'abstinence des patients alcooliques durant 6 mois était associée à une augmentation de la masse osseuse à différents sites osseux (bras, bassin), et à une amélioration des concentrations d'ostéocalcine et de vitamine D (Alvisa-Negrin *et al.* 2009). Les abstinents avaient une masse osseuse augmentée, en comparaison avec les non abstinents qui continuaient à boire et par la même, à perdre de l'os. Une augmentation rapide de l'ostéocalcine a été observée par Pepersack *et al.* après 2 semaines d'abstinence chez des sujets alcooliques (Pepersack *et al.* 1992). Cependant, il est difficile d'analyser les effets de l'abstinence car celle-ci s'accompagne souvent par des changements d'autres facteurs pouvant influencer la masse osseuse comme l'activité physique et de meilleures habitudes alimentaires. Malgré les preuves que l'abstinence augmente la masse osseuse et les concentrations des marqueurs de formation osseuse chez les gros consommateurs, le remodelage osseux peut être toujours perturbé même 5 ans après l'arrêt de la prise d'alcool (Nyquist *et al.* 1996).

Chez l'animal, une abstinence de 90 jours suivant un traitement alcoolique entraîne une augmentation de la DMO chez des rats adolescents, avec des paramètres de résistance mécaniques qui redeviennent normaux (Wezeman *et al.* 1999). Des résultats similaires ont été démontrés par d'autres équipes (Sampson and Spears 1999; Sibonga *et al.* 2007), confirmant la réversibilité de certaines altérations osseuses dues à l'alcool.

3. Le binge drinking (intoxications alcooliques aiguës et répétées)

La consommation d'alcool a augmenté ces dernières années chez les adolescents et les jeunes adultes (Miller *et al.* 2007; Schoberl *et al.* 2008; Slutske 2005). Elle se traduit par l'apparition d'un nouveau mode d'alcoolisation chez les jeunes : le binge drinking (intoxications alcooliques aiguës et répétées en français). Une consommation alcoolique est qualifiée de binge drinking lorsque cinq boissons ou plus sont ingérées à la suite par un homme – et quatre boissons ou plus à la suite par une femme (Miller *et al.* 2007). Ces pratiques sont responsables de nombreuses hospitalisations parmi les adolescents, victimes

d'intoxications alcooliques aiguës. Selon une étude faite à l'hôpital de Leipzig, les patients victimes d'intoxications alcooliques aiguës ont augmenté de 171% entre 1998 et 2003. Sur un total de 173 patients, 62 étaient inconscients, 2 étaient dans le coma et 3 ont dû être ventilés (Schoberl *et al.* 2008). Le binge drinking est aussi pratiqué par les adultes mais il est souvent masqué dans les questionnaires sur la consommation alcoolique. Une étude nationale américaine qui a utilisé des sondages téléphoniques a rapporté que quand les épisodes de binge drinking sont inclus à la consommation quotidienne d'alcool, le pourcentage d'adultes gros consommateurs d'alcool augmente de 19% à 42%, selon la méthode utilisée pour calculer le nombre de boisson par binge (Stahre *et al.* 2006). Dans une étude de Wosje et Kalkwarf, la faible consommation d'alcool était bénéfique pour l'os chez l'homme et la femme, mais pas le binge drinking (Wosje et Kalkwarf 2007). Le binge drinking n'était pas associé à la DMO chez l'homme ni chez la femme. Compte tenu de la nouveauté de cette pratique chez les adolescents, et du manque de données chez les adultes, les effets du binge drinking sur le squelette humain ne sont pas encore connus à ce jour.

Des études récentes se sont penchées sur les effets du binge drinking chez l'animal. Dans une première étude, Sampson *et al.* ont observé que le binge drinking (5% d'alcool par gavage pendant 6 semaines) augmentait la longueur, le poids et la densité des os chez des rates de 4 semaines lorsque l'alcool était administré 2 jours consécutifs par semaine, mais aucun changement n'a été observé quand les rates étaient gavées 5 jours consécutifs par semaine (Sampson *et al.* 1999). Un modèle de binge a été développé par Callaci *et al.* avec des injections intra-péritonéales. Des doses de 20% d'alcool volume/volume (3 g/kg, 1 fois par jour) ont été administrées 4 jours consécutifs par semaine pendant 1, 2 ou 3 semaines (Callaci *et al.* 2004). Aucun effet n'a été observé après 1 et 2 semaines de traitement. En revanche, après 3 semaines, les DMO du fémur distal et de la colonne étaient significativement réduites, ainsi que la résistance à la compression des vertèbres (Callaci *et al.* 2004). Le rapport BV/TV était diminué et l'espace inter travées augmenté. De plus, les concentrations sériques de deoxypyridinoline, marqueur de la résorption, étaient augmentées comparées aux contrôles (+205%). Ces résultats suggèrent que le binge drinking peut affecter l'intégrité du squelette chez le rat après plusieurs cycles (3 semaines), en augmentant la résorption osseuse.

Un autre modèle de binge drinking a été testé par Callaci *et al.* Ils ont administré de l'alcool (3 g/kg, i.p.) pendant 3 jours consécutifs par semaine, durant 1 ou 4 semaines chez des rats adultes. Aucune perte osseuse n'a été constatée après 1 semaine, mais après 4 cycles de binge drinking, une diminution de 23% de la DMO de l'os trabéculaire et 17% de la résistance à la compression vertébrale ont été observées comparées aux valeurs des

animaux contrôles (Callaci *et al.* 2009). L'expression des gènes relatifs aux marqueurs de la formation osseuse (ostéocalcine et phosphatase alcaline) était significativement diminuée après un épisode aigu de binge drinking (Callaci *et al.* 2009). Lauing *et al.* ont étudié les effets de 30 jours d'abstinence sans alcool après des épisodes de binge chez des rats adolescents. La DMO de l'os trabéculaire du tibia était diminuée de 25% après des traitements de binge drinking chronique et aigu et la DMO de l'os trabéculaire des vertèbres était réduite de 15% après un traitement de binge drinking chronique (Lauing *et al.* 2008). La résistance à la compression des vertèbres était significativement diminuée de 31% après des épisodes de binge drinking et les concentrations sériques d'ostéocalcine étaient diminuées après un traitement aigu de binge drinking. Après une période d'abstinence, les valeurs de DMO du tibia sont revenues à la normale mais la DMO des vertèbres est restée 15% en dessous des valeurs des contrôles.

Ces résultats montrent que le binge drinking possède à la fois des effets délétères à court terme et à long terme sur le squelette des rongeurs. Les adolescents qui adoptent de tels comportements pourraient avoir un plus faible pic de densité osseuse et augmenter le risque plus tard d'avoir une pathologie osseuse (Lauing *et al.* 2008).

C. Mécanismes d'action de l'alcool sur l'os

L'alcool diminue le CMO et la DMO à la fois dans l'os trabéculaire et dans l'os cortical, principalement en raison d'un ralentissement de la formation osseuse (Sampson 1998; Sampson *et al.* 1998). L'alcoolisme est une cause majeure d'ostéoporose secondaire chez l'homme (Audran *et al.* 2004; Seeman 1997), et augmente le risque de fracture. Les mécanismes d'action de l'éthanol sur l'os ne sont pas très bien connus. Toutefois, les chercheurs pensent que l'éthanol agit à la fois de façon directe et indirecte sur le tissu osseux (Maddalozzo *et al.* 2009).

1. Actions indirectes

a) Composition corporelle

La masse grasse et la masse maigre sont toutes deux diminuées chez les sujets alcooliques (Gonzalez-Reimers *et al.* 2008; Maddalozzo *et al.* 2009), probablement en

raison de la restriction calorique observée dans la pathologie alcoolique (Maddalozzo *et al.* 2009). La masse grasse et la masse maigre sont corrélées à la DMO (Khosla *et al.* 1996; Pluijm *et al.* 2001), bien que leur contribution à la DMO soit différente chez l'homme et chez la femme (Visser *et al.* 1998). Les muscles jouent un rôle dans la stimulation mécanique des os en réponse à un exercice (Robling 2009), tandis que la relation de la masse grasse et du tissu osseux est médiée par des hormones sécrétées par les adipocytes (leptine) (Reid 2008).

b) Système nerveux central

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), est un neurotransmetteur dans le système nerveux central. Elle est majoritairement présente dans l'organisme en qualité d'hormone locale (intestins). Elle joue donc un double rôle d'hormone et de neuromédiateur du système nerveux central. La sérotonine est générée à partir de la conversion du L-tryptophane par la tryptophane hydroxylase (Tph) (Yadav et Karsenty 2009). Il a été montré récemment que la leptine induit une signalisation dans les neurones sérotoninergiques du tronc cérébral pour réguler la masse osseuse, l'appétit et la dépense énergétique (Yadav et Karsenty 2009). Il semblerait également que le récepteur Lrp5 agisse sur les cellules intestinales afin de contrôler la formation osseuse, via la synthèse de sérotonine (Yadav et Ducy 2010). Plusieurs études ont montré un rôle de l'alcool sur la régulation de la voie sérotoninergique, notamment en lien avec le stress lié à la dépendance et à l'abstinence (Ballenger *et al.* 1979; Nesic et Duka 2008). De plus, il a été observé une modification des concentrations de sérotonine et de tryptophane (Trp) suite à des consommations d'alcool aiguës ou chroniques (Badawy 2002). Aucune étude à notre connaissance n'a été menée sur la régulation de la sérotonine en lien avec les effets de l'alcool sur le tissu osseux, mais la voie sérotoninergique pourrait être liée aux modifications de masse osseuse suite à une ingestion d'alcool.

Il a également été montré que la voie adrénérergique peut réguler la masse osseuse. En effet, la leptine peut agir sur des neurones de l'hypothalamus qui stimulent ensuite des fibres nerveuses relâchant de la norepinephrine (NE). La NE se lie aux récepteurs adrénérergiques exprimés sur les ostéoblastes, inhibant leur activité de formation osseuse (Bonnet *et al.* 2008). De plus, la stimulation des neurones β -adrénérergiques engendre la production de RANKL par les ostéoblastes. Il a été rapporté que la consommation chronique d'alcool altère le système beta-adrénérergique chez le rat (Khanna *et al.* 2007; Utkan *et al.* 2001). Il semblerait que les récepteurs beta-adrénérergiques jouent un rôle dans les symptômes

aversifs liés à l'arrêt de l'alcool, puisque ceux-ci sont bloqués par des antagonistes des récepteurs beta-adrénergiques comme le propranolol (Gilpin et Koob 2010). La NE serait également impliquée dans le comportement lié à la prise d'alcool (Gilpin et Koob 2010). A ce jour et à notre connaissance, il n'y a pas d'étude sur les effets de l'alcool sur le tissu osseux qui ait également étudié le système beta-adrénergique mais au vue de la littérature existante, cette voie pourrait médier les effets de l'alcool sur le tissu osseux.

c) Leptine

La leptine, protéine connue pour réguler l'appétit, diminue la masse osseuse via le système nerveux central (Bonnet *et al.* 2005b). Le récepteur de cette hormone est richement exprimé au niveau des neurones hypothalamiques et la liaison de la leptine à ce récepteur active une voie de signalisation majeure dans l'hypothalamus, entraînant une augmentation de la dépense énergétique et une diminution de la prise alimentaire menant à une perte de poids (Eleftheriou et Karsenty 2004). La liaison de la leptine à son récepteur sur les neurones localisés dans l'hypothalamus active le système nerveux sympathique. Ce dernier transmet un signal anti-ostéogénique via la noradrénaline aux ostéoblastes exprimant le récepteur adrénergique beta 2 (Eleftheriou et Karsenty 2004). Le mécanisme prépondérant de l'inhibition de la formation osseuse par la leptine *in vivo* est central (Bonnet *et al.* 2008; Eleftheriou et Karsenty 2004). La leptine a également des effets anaboliques sur l'os en périphérie en favorisant la différenciation des cellules souches vers la lignée ostéoblastique (Cirmanova *et al.* 2008; Thomas *et al.* 1999). La consommation excessive d'alcool diminue les concentrations de leptine chez l'homme et chez l'animal (Maddalozzo *et al.* 2009; Otaka *et al.* 2007), diminue l'ostéoblastogenèse et augmente l'adipogenèse simultanément dans la moelle osseuse, modifiant la balance entre ostéogenèse et adipogenèse (Chen *et al.* 2010; Wang *et al.* 2003). En accord avec cela, une augmentation du marqueur de l'adipogenèse PPARgamma et une diminution de l'ostéocalcine ont été observé *in vitro* sur des cellules souches clonées provenant de la moelle osseuse chez des souris et sur des cellules souches mésenchymateuses humaines cultivées avec de l'éthanol (Cui *et al.* 2006; Ronis *et al.* 2011; Wezeman and Gong 2004).

d) Vitamine D et PTH

Certaines concentrations d'hormones sont modifiées chez les alcooliques, ce qui pourrait interférer avec le métabolisme osseux. Par exemple, une insuffisance en vitamine D (Alvisa-Negrin *et al.* 2009; Malik *et al.* 2009; Schnitzler *et al.* 2010) et des faibles taux de PTH (Lindholm *et al.* 1991) ont été observés dans quelques études mais pas dans d'autres (Laitinen *et al.* 1992; Sripanyakorn *et al.* 2009). Des injections de PTH chez des rats soumis à un traitement alcoolique ont engendré une augmentation de la formation osseuse, sans modification de l'adiposité médullaire (Howe *et al.* 2011). Chez les alcooliques sévères, l'augmentation de l'excrétion de calcium dans les urines pourrait être liée à ces changements hormonaux et à une modification du remodelage osseux. Etant donné que la résorption osseuse est une source de calcium, elle pourrait être augmentée pour pallier aux déficiences en calcium. En effet, plusieurs études ont observé une augmentation de l'excrétion de calcium dans l'urine chez les sujets alcooliques sévères (Gonzalez-Calvin *et al.* 1993). La parathormone est nécessaire pour que la vitamine D soit efficace et la vitamine D a un effet positif sur l'activité et la différenciation des ostéoblastes (Atkins *et al.* 2007). La consommation chronique d'alcool peut diminuer la concentration sérique de vitamine D, résultant en une malabsorption du calcium par l'intestin, diminuant ainsi les taux de calcium sériques (Griffiths *et al.* 1993). En revanche, il a été montré chez l'homme que les effets de l'alcool sur le remodelage osseux ne sont pas dépendants de la concentration en PTH (Sripanyakorn *et al.* 2009).

Les effets de l'alcool sur la vitamine D peuvent être liés à des causes indirectes comme la malnutrition, qui est souvent associée à l'alcoolisme chronique, ou à une exposition plus faible aux rayons du soleil, qui est la principale cause de déficience en vitamine D (Malik *et al.* 2009). Des lésions du tissu hépatique pourraient aussi expliquer la déficience en vitamine D, ce qui pourrait avoir un impact sur le tissu osseux, avec d'autres carences hormonales (Rico 1990). Par exemple, dans le cas d'une déficience hépato-cellulaire, l'hydroxylation de la 25 vitamine D est altérée, et cette altération pourrait aggraver les effets de l'insuffisance en vitamine D.

e) Calcitonine

Une consommation modérée d'alcool pourrait augmenter la calcitonine, hormone qui inhibe la résorption (Vantighem *et al.* 2007) (Figure 24). Cela pourrait en partie expliquer les effets bénéfiques d'une consommation modérée d'alcool observées auparavant chez les femmes (Griffiths *et al.* 1993). Cependant, certaines études n'ont pas observé de variations des concentrations de calcitonine avec l'alcool (Sripanyakorn *et al.* 2009). Il semble que la calcitonine ne soit pas modifiée par une consommation chronique d'alcool, mais par une consommation aigue (Sampson *et al.* 1998).

f) Stéroïdes sexuels

Certaines études ont rapporté une diminution de la testostérone chez des sujets alcooliques (Diamond *et al.* 1989; Maneesh *et al.* 2006; Tentler *et al.* 1997) mais ce n'est pas le cas pour toutes (Baran *et al.* 1980). Les études n'ont pas montré de diminution des oestrogènes avec l'alcool (Purohit 2000), mais une diminution de l'oestradiol a été rapportée chez la femme (Dorgan *et al.* 1994) et chez la rate (Shankar *et al.* 2006). De plus, il est connu que de faibles niveaux d'oestradiol sont associés à une perte osseuse, via l'augmentation de RANKL (Ronis *et al.* 2007). Une augmentation de l'oestrogène a été observée suite à de faibles consommations d'alcool chez la femme, ce qui pourrait la protéger de la perte osseuse (Chen *et al.* 2009; Jugdaohsingh *et al.* 2006).

g) Minéraux et Ions

D'autres facteurs pouvant contribuer à la perte osseuse sont les faibles concentrations sériques en magnésium et phosphate observées chez les gros consommateurs d'alcool (Griffiths *et al.* 1993; Turner 2000). En revanche, les changements de calcium, magnésium et phosphate ne sont pas régulièrement observés dans toutes les études (Broulik *et al.* 2010; Sampson *et al.* 1996). La diminution de magnésium pourrait modifier les taux de PTH ou diminuer la réponse de l'os à la PTH (Schnitzler *et al.* 2010).

De nombreux facteurs de comorbidité sont associés à l'alcoolisme, comme le statut nutritionnel, le tabagisme, l'absence d'activité physique, l'utilisation de drogues, diverses

pathologies hépatiques, qui peuvent influencer le métabolisme et entraîner des déficiences en vitamines et minéraux (Chakkalakal 2005). Les alcooliques ont également fréquemment des apports insuffisants en divers vitamines et minéraux (Hernandez *et al.* 1991).

2. Effets directs de l'alcool sur l'os

L'alcool pourrait également avoir des effets directs sur l'os (Malik *et al.* 2009; Sampson *et al.* 1996; Turner 2000) (Figure 24). En effet, plusieurs études ont observé des effets délétères de l'alcool sur la formation osseuse et la DMO en l'absence de changements de concentrations des hormones anaboliques et calciotropes (Maddalozzo *et al.* 2009; Sampson *et al.* 1998).

a) Ostéoblastes et ostéoclastes

Sun *et al.* (Sun *et al.* 2007) ont montré que l'éthanol peut inhiber la prolifération et la fonction des ostéoblastes. Cette inhibition est accrue lorsque les ostéoblastes sont cultivés avec restriction de sérum.

La suppression des compétences ostéogéniques des cellules dérivées de la moelle peut se produire à différentes étapes : prolifération et différenciation des cellules souches, progression de la lignée ostéoblastique jusqu'à maturation, fonction de l'ostéoblaste mature, différenciation terminale en ostéocytes ou apoptose des ostéoblastes (Chakkalakal 2005). Giuliani *et al.* (Giuliani *et al.* 1999) ont rapporté que dans des cultures de cellules prélevées dans la moelle osseuse de patients alcooliques, l'alcool et l'acétaldéhyde induisent une suppression du recrutement des cellules dévouées à la lignée ostéoblastique, ce qui n'est pas observé chez des individus sains du même âge. Il a également été rapporté sur des cellules souches de moelle clonées que l'éthanol diminue l'ostéogenèse et augmente l'adipogenèse (Cui *et al.* 2006; Wang *et al.* 2003). Une relation inverse entre l'ostéogenèse et l'adipogenèse a été observée sur des cultures de cellules stromales de rat (Beresford *et al.* 1992). L'altération de la différenciation ostéogénique des CSM a été confirmée par Gong et Wezeman (Gong et Wezeman 2004). Ces résultats permettent de mieux comprendre la diminution de la formation osseuse due à l'alcool. Une diminution de la capacité des CSM à se différencier a été également observée chez des patients ayant une nécrose de la tête fémorale induite par l'alcoolisme (Suh *et al.* 2005). Les CSM ont un

temps de différenciation plus long que chez des patients sains, mais la capacité à se différencier en adipocytes n'est pas plus élevée que chez les contrôles.

Une autre étude a montré sur une lignée d'ostéoblastes provenant d'ostéosarcomes que l'éthanol diminue la minéralisation à une dose de 10 mM tandis que la minéralisation est complètement inhibée à une dose de 100 mM (Vignesh *et al.* 2006). A des doses plus élevées (200 et 300 mM), le nombre de cellules était significativement diminué. Cependant, ces doses sont des doses létales pour l'homme (Tableau 7). L'éthanol aurait donc des effets inhibiteurs sur la prolifération, la minéralisation et la différenciation même à dose faible, quand la durée du traitement est prolongée. Dans un dernier temps, une étude de Torricelli *et al.* (Torricelli *et al.* 2007) a montré sur des ostéoblastes prélevés sur des rats exposés à des vapeurs d'alcool de façon intermittente pendant 7 semaines que la prolifération des ostéoblastes était plus affectée par l'éthanol qu'elle ne l'est par la chute d'oestrogènes pendant la ménopause.

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux effets de l'alcool sur la résorption *in vitro* (Cheung *et al.* 1995). Dans cette étude, des ostéoclastes prélevés sur des poussins avant l'éclosion ont été cultivés avec différents pourcentages d'éthanol. La résorption par les ostéoclastes était plus élevée sous l'influence de l'éthanol, et ce, même à des concentrations rencontrées chez des buveurs occasionnels (Cheung *et al.* 1995). Cette étude a montré que l'éthanol peut avoir des effets directs sur les ostéoclastes, ce qui coïncide avec les observations faites chez l'homme (Bikle *et al.* 1993; Diez *et al.* 1994). L'augmentation de l'ostéoclastogenèse due à l'alcool pourrait être médiée par des cytokines. Une augmentation de l'expression de l'IL-6 et de RANKL a été observée chez des souris soumises à un traitement alcoolisé (Chakkalakal 2005; Dai *et al.* 2000).

L'éthanol semble avoir un effet direct sur les ostéoclastes et les ostéoblastes. Malheureusement et comme le souligne Turner (Turner 2000), il n'y a pas de modèles *in vitro* permettant d'évaluer les effets de l'éthanol sur le couplage entre formation et résorption osseuse.

Nombre de verres	Dose d'éthanol g/kg	Concentrations d'éthanol dans le sang			Effets cliniques
		mmol/L	mg/dL	g/L (‰)	
	0,25	4-10	20-50	0,2-0,5	Diminution de la motricité
	0,51	10-20	50-100	0,5-1	Coordination affectée
	0,76	20-30	100-150	1-1,5	Difficulté pour marcher
	1,01	30-50	150-250	1,5-2,5	Léthargie
	1,90	60	300	3	Coma
	2,28	80	400	4	Insuffisance respiratoire

Tableau 7 : Equivalence entre le nombre de verres ingérés, la concentration sanguine d'éthanol et les effets physiques observés.

Il faut noter que ces valeurs sont moyennées, étant donné la grande variabilité physiologique entre les individus concernant la concentration d'alcool dans le sang et les effets physiques observés selon la dose consommée.

b) Ostéocytes

Les quelques équipes qui se sont penchées sur les effets de l'alcool sur l'ostéocyte ont observé des modifications de morphologie et du nombre de cellules apoptotiques (Lorenz et Janicke-Lorenz 1983; Wang *et al.* 2003). Chez des rats traités pendant 10 mois avec de l'éthanol (5 à 20%), les vésicules sont augmentées dans les ostéocytes et une cytolysse de la cellule et de ses organites a été observée en MET (Lorenz et Janicke-Lorenz 1983). Wang *et al.* ont observé des dépôts de triglycérides dans les ostéocytes chez le lapin après un traitement alcoolique (10 mL/kg/jour pendant 1 à 6 mois). Les ostéocytes deviennent

pyknotiques et le nombre de lacunes vides augmente sous l'effet de l'alcool (Wang *et al.* 2003).

c) Stress oxydatif

Les produits issus du métabolisme de l'oxygène (espèces réactives oxygénées, ROS en anglais) sont considérés comme étant responsables du vieillissement et de certaines pathologies (Banfi *et al.* 2008; Syed and Ng 2010). Les ROS (peroxide d'hydrogène, anion superoxide et radical hydroxyle) ont un effet délétère sur les lipides membranaires, certaines protéines (récepteurs et enzymes) et les acides nucléiques (Silvain et Chagneau-Derrode 2006). Les taux sériques d'enzymes antioxydantes et d'oxyde nitrique (NO) ont été mesurés chez des patientes ostéoporotiques: la glutathion reductase est diminuée, tandis que l'oxyde nitrique est plus abondant chez les femmes post-ménopausées ostéoporotiques comparées aux non ostéoporotiques (Sendur *et al.* 2009). Une augmentation de l'oxyde nitrique et une diminution des enzymes du système antioxydant (glutathion reductase et glutathion peroxydase) ont également été observées chez des patients alcooliques (Maneesh *et al.* 2006).

Chen *et al.* ont rapporté que l'éthanol induit l'expression et l'activité de Nox (enzyme NADPH oxidase), augmentant la production de radicaux libres dans les ostéoblastes et l'expression de RANKL, facteur favorisant l'ostéoclastogenèse (Chen *et al.* 2008).

Il a été montré que le stress oxydatif induit par l'éthanol accélère l'activation des voies responsables de la sénescence dans l'ostéoblaste (Chen *et al.* 2009) tandis que l'administration d'un antioxydant (N-acétylcystéine) est capable de bloquer la perte osseuse due à l'alcool chez des rates après la période de lactation (Chen *et al.* 2010). Dans cette étude, la perte osseuse induite par le stress oxydatif semble être médiée par la voie Wnt.

De plus, un lien entre la concentration d'oxyde nitrique et l'apoptose des ostéocytes a été rapporté (Tan *et al.* 2008).

d) Voie de signalisation Wnt

La voie Wnt est un régulateur important de la différenciation cellulaire dans plusieurs types de cellules, y compris les ostéoblastes (Quarto *et al.* 2010). Cette voie de signalisation est active lorsque la molécule Wnt se fixe à un co-receptor complexe, Lrp5 ou

Lrp6 (Bonewald et Johnson 2008). La beta-caténine a la capacité d'être accumulée dans le cytoplasme et de transloquer dans le noyau afin de modifier la transcription d'un gène. De cette façon, cette molécule peut réguler un nombre de gènes important dans la différenciation, la prolifération, l'apoptose et l'activité des cellules osseuses (Bonewald et Johnson 2008). Des données récentes identifient la voie Wnt/beta-caténine comme un régulateur de la biologie des ostéocytes, lié à la capacité de l'os à s'adapter aux charges mécaniques (Bonewald et Johnson 2008).

Chen *et al.* ont observé une diminution de la DMO chez des rates après lactation et soumises à un traitement alcoolisé (12g/kg/jour). Dans le même temps la majeure partie des composants de la voie Wnt étaient sous exprimés, l'ostéoblastogenèse était supprimée et l'adipogenèse accrue (Chen *et al.* 2010). Toutes ces actions de l'éthanol étaient bloquées quand un antioxydant était administré, suggérant que les effets de l'éthanol sur l'os pourraient être médiés par la suppression de la voie Wnt, via une stimulation du stress oxydatif (Chen *et al.* 2010). Une telle hypothèse semble cohérente avec les résultats de Callaci *et al.* (Callaci *et al.* 2009).

Schéma récapitulatif des effets de l'alcool sur le métabolisme :

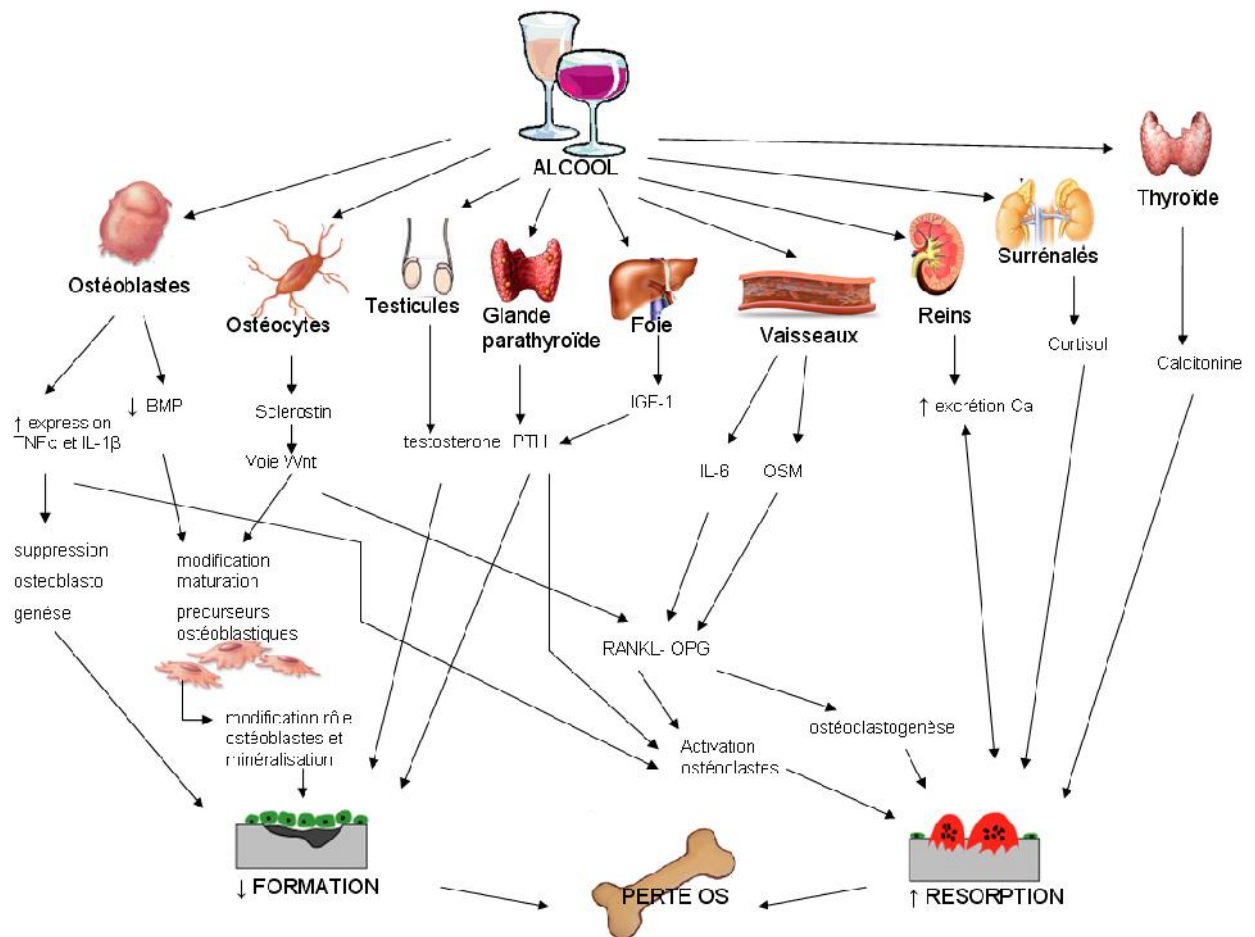


Figure 24 : Mécanismes responsables des effets directs et indirects de l'alcool sur l'os.

D'après Maurel DB, article accepté dans Osteoporosis International (Revue de littérature, Annexe 1).

RESUME :

La consommation d'alcool peut avoir un effet bénéfique sur la densité minérale osseuse, si elle est modérée (1-2 verres par jour). Au-delà de 2 verres par jour, les effets de l'alcool sur l'os dépendent du sexe, du statut hormonal et du type d'alcool. En revanche, dans le cas d'une consommation chronique abusive (10-20 verres par jour), l'alcool engendre une diminution de la densité minérale osseuse et une augmentation du risque de fractures chez l'homme, signes d'une ostéoporose secondaire. Cette diminution de densité est due à une diminution de l'épaisseur des travées osseuses, ainsi qu'à une diminution de l'épaisseur corticale. Le remodelage osseux est modifié par l'alcool et la balance entre résorption et formation est modifiée en faveur de la résorption osseuse. Il semble que l'alcool ait des effets directs sur les cellules osseuses, mais également des effets indirects sur l'os via la composition corporelle et la leptine.

V. EXERCICE PHYSIQUE ET OS

A. Effets de l'exercice physique sur le métabolisme osseux

1. CMO et DMO

Les études concernant les effets de l'activité physique sur le système osseux abondent. Nombreux sont les chercheurs qui ont comparé la DMO des sportifs et des non sportifs afin d'essayer de comprendre comment la masse osseuse peut être influencée et maximisée. Les enfants sportifs atteignent un pic de masse osseuse supérieur aux enfants non sportifs (Valimaki *et al.* 1994). Les enfants les plus actifs ont également un CMO supérieur comparés aux moins actifs (Bailey *et al.* 1999). Il a été montré à de nombreuses reprises que les sportifs ont une DMO supérieure aux non sportifs du même âge (Alfredson *et al.* 1997; Andreoli *et al.* 2001; Calbet *et al.* 1999). De plus, Delvaux *et al.* (Delvaux *et al.* 2001), Kontulainen *et al.* (Kontulainen *et al.* 2001) et Nordström *et al.* (Nordstrom *et al.* 2006) ont montré un effet positif de l'activité physique à long terme sur la masse osseuse ainsi que sur la DMO, même après diminution de la quantité des entraînements. Dans l'étude de Nordström *et al.* (Nordstrom *et al.* 2006), une diminution de la DMO a été observée dans les 3 années qui ont suivies l'arrêt de l'entraînement intensif, chez d'anciens hockeyeurs et joueurs de badminton. Toutefois, le bénéfice de cette activité physique passée permettait aux sujets entraînés de conserver un capital osseux supérieur à des individus contrôles non actifs au niveau du fémur et de l'humérus et ce, même 5 ans après l'arrêt de la pratique intensive de leur activité.

Certaines activités professionnelles requièrent une dépense énergétique supérieure comparées à d'autres, et génèrent également une charge mécanique sur l'os. D'après la classification créée par Ainsworth *et al.* (Ainsworth *et al.* 1993; Ainsworth *et al.* 2000), la dépense énergétique (évaluée en niveau d'intensité métabolique équivalente ou MET) liée à des professions comme chauffeur-livreur ou agent en bâtiment équivaut à celle d'une personne faisant un jogging (6-7 MET) ; tandis qu'un pompier a une dépense énergétique comparable à des activités comme la boxe ou le roller (11-12 MET). Il a été rapporté que même l'activité physique liée à la profession peut avoir un effet bénéfique sur la densité de la colonne (Sinaki *et al.* 1998) tandis que des professions où l'on est assis toute la journée peuvent entraîner une plus faible DMO (Weiss *et al.* 1998). En revanche, ces effets ont été mis en évidence chez des individus se nourrissant normalement. Une étude a observé que la

malnutrition modifie les effets ostéogéniques de différents métiers sur l'os chez des femmes indiennes pré-ménopausées (Shatrugna *et al.* 2008).

Dans une étude menée chez des rats mâles Sprague-Dawley, la longueur, le poids et le volume du tibia et du fémur étaient significativement supérieurs dans le groupe exercice (roue d'exercice) comparés au groupe contrôle (Newhall *et al.* 1991). Les DMO des rats du groupe exercice étaient également significativement supérieures à celles des rats du groupe contrôle. Yeh *et al.* (Yeh *et al.* 1993) ont observé une augmentation significative du contenu minéral osseux dans le tibia et la fibula, ainsi qu'une augmentation de la densité minérale osseuse au niveau des vertèbres pour le groupe exercice (tapis roulant) chez des rates âgées de 14 mois après 9 semaines d'entraînement (5 fois/sem, 1 h/jour). Après 16 semaines d'entraînement, les courbes représentant les gains de CMO et de DMO au niveau du tibia et de la fibula pour le groupe exercice étaient respectivement neuf et cinq fois supérieures aux valeurs du groupe contrôle. Notomi *et al.* (Notomi *et al.* 2001) se sont focalisés sur les effets de l'exercice physique volontaire (grimper à une tour de 2 m de haut) chez des rats Sprague-Dawley âgés de 10 semaines. En l'espace de 4 semaines, la formation d'os trabéculaire, le volume osseux, l'épaisseur d'os trabéculaire des vertèbres lombaires et du tibia, et la DMO du tibia ont augmentés chez les groupes exercice. Après 8 semaines, l'augmentation du CMO et de la DMO dans le tibia et le fémur était significative dans les groupes exercice par rapport aux trois autres groupes (sédentaires et baseline). En revanche, ce n'était pas significatif au niveau des vertèbres lombaires.

2. Microarchitecture

Une étude a récemment analysé la microarchitecture du tibia grâce à des images faites par IRM (imagerie à résonance magnétique) puis reconstruites avec un logiciel permettant d'obtenir des données volumétriques. Dans cette étude, des gymnastes d'environ 20 ans avaient une quantité d'os trabéculaire (BV/TV) et un nombre de travées (Tb.N) supérieurs à des jeunes femmes sédentaires du même âge (Modlesky *et al.* 2008). L'espace entre les travées (Tb.Sp) était inférieur chez les gymnastes comparées aux contrôles.

Chez le rat en croissance (4 semaines), un entraînement sur tapis roulant de 10 semaines a entraîné une augmentation de la quantité d'os trabéculaire (BV/TV), de l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) et du nombre de travées osseuses (Tb.N) au niveau de la métaphyse du fémur, comparé à des rats sédentaires du même âge (Joo *et al.* 2003). La

surface et la largeur d'os cortical étaient également améliorées. Des résultats similaires ont été rapportés chez des rates également en croissance (32 jours) suite à 8 semaines d'entraînement sous forme d'impacts. Les rats étaient lâchés de 45 cm de haut, 10 fois par jours (Welch *et al.* 2008). La fraction d'os trabéculaire BV/TV était augmentée due à une amélioration de l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th). L'épaisseur corticale était également supérieure comparée au groupe contrôle, due à une diminution de la circonférence endostéale. L'entraînement en résistance (sauts verticaux avec des vestes lestées) permet également d'engendrer une augmentation des paramètres de microarchitecture trabéculaire (BV/TV, Tb.Th) chez des rats adultes (6 mois) (Swift *et al.* 2010).

3. Effets sur le remodelage osseux

Les effets de l'exercice sur le remodelage osseux varient selon la durée, l'intensité, et le type d'exercice, mais également selon la population (athlètes, sédentaires, personnes âgées) (Maimoun et Sultan 2011). L'horaire du prélèvement de sang et le choix des marqueurs biochimiques sont également à prendre en compte (Maimoun et Sultan 2011). Des valeurs élevées d'ostéocalcine ont été observées chez des jeunes sportifs pratiquant une activité générant des contraintes mécaniques importantes (haltérophilie, volley-ball) (Karlsson *et al.* 1995; Maimoun and Sultan 2011). D'autres études ont rapporté que tout le processus de remodelage osseux est accéléré chez les jeunes sportifs (Hetland *et al.* 1993). Cela a été observé chez des athlètes (Hetland *et al.* 1993), des joueurs de football (Karlsson *et al.* 2003), des décathloniens (Maimoun *et al.* 2008) et des judoka (Prouteau *et al.* 2006). Cependant, deux études ont rapporté de faibles concentrations de marqueurs du remodelage chez des athlètes femmes versus femmes sédentaires (Brahm *et al.* 1997; Ryan and Elahi 1998). Cela pourrait être dû au sexe et au statut hormonal (présence ou non de menstruations) (Zanker et Swaine 1998). Chez des jeunes sédentaires, 5 à 8 semaines d'entraînement en endurance améliore le remodelage osseux en faveur de la formation, tandis qu'un entraînement en anaérobie ou en résistance entraîne une accélération du remodelage osseux (Maimoun et Sultan 2011). Les effets sont plus disparates chez des individus âgés (Maimoun et Sultan 2011). Il semble qu'un entraînement aigu n'ait pas d'effet à court terme sur les marqueurs du remodelage osseux chez des sportifs et chez des sujets sédentaires, âgés ou non (Maimoun et Sultan 2011).

Chez l'animal, il semble que des entraînements en résistance et en endurance augmentent la formation osseuse et les surfaces de minéralisation (Iwamoto *et al.* 2004;

Swift *et al.* 2010). Cependant, comme chez l'homme, les données varient (Hagihara *et al.* 2005). Les effets dépendent du type d'exercice, du site osseux (Notomi *et al.* 2002; Notomi *et al.* 2001), des animaux, de la durée et de l'intensité des sessions (Yingling *et al.* 2001).

4. Effets du type de pratique

Toutes les activités physiques n'ont pas le même impact sur le capital osseux. Chez l'homme, Andreoli *et al.* (Andreoli *et al.* 2001) ont comparé la DMO de judoka, de karatéka et de poloïstes (water-polo) : les judoka et les karatéka avaient une DMO supérieure aux poloïstes. Cela est dû aux impacts et à la charge supportée par le squelette lors de l'activité.

En effet, comme le précise Wolff (Wolff 1892), les os ont la capacité de s'adapter à la charge à laquelle ils sont soumis. Si la charge augmente, l'os va devenir plus solide pour résister à la nouvelle charge à laquelle il est dorénavant soumis. En revanche, si la charge diminue, l'os va devenir plus fragile. Ginty *et al.* (Ginty *et al.* 2005) ont étudié les contenus minéraux osseux de sportifs âgés de 16 à 18 ans en fonction du nombre d'impacts au sol présents dans leurs activités respectives : le contenu minéral osseux est plus important chez les sportifs pratiquant une activité à impacts (tennis, jogging, rugby, etc...). Ceci est confirmé par l'étude de Nurmi-Lawton *et al.* (Nurmi-Lawton *et al.* 2004) chez de jeunes gymnastes âgées de 8 à 17 ans : celles-ci avaient en moyenne, selon les différentes régions du corps, un contenu minéral osseux supérieur de 24 à 51% et une DMO supérieure de 13 à 28% par rapport à des filles non sportives du même âge. Ces résultats sont la preuve que le nombre d'impacts associés à l'activité physique a une importance considérable sur l'adaptation osseuse qui découle de la pratique.

La pratique régulière d'une activité physique où l'on porte son propre poids génère une amélioration du CMO et de la DMO. L'amélioration de ces paramètres osseux confère aux os une plus grande résistance mécanique, notamment pour le fémur (Uusi-Rasi *et al.* 1998). De plus, le nombre et l'intensité des impacts dans un sport permettent de prédire les changements au niveau de la géométrie osseuse puisque celle-ci s'adapte à l'exercice (Vainionpaa *et al.* 2007; Wolff 1892).

Chez le rat, l'escalade verticale d'une tour permet d'améliorer le CMO et la DMO au niveau du tibia et du fémur, mais pas au niveau des vertèbres lombaires (Notomi *et al.* 2001). L'exercice sur tapis roulant horizontal permet d'augmenter significativement le

CMO et la DMO du tibia, et la DMO au niveau vertébral (Yeh *et al.* 1993). Dans un dernier temps, l'exercice sur une roue permet d'améliorer le CMO et la DMO au niveau tibial et fémoral (Newhall *et al.* 1991). Des études comparatives ont été réalisées avec plusieurs activités différentes. Notomi *et al.* (Notomi *et al.* 2000), ont étudié les os de rats âgés de 4 semaines, sédentaires ou pratiquant différentes activités : courses et sauts. Après 4 semaines, les rats du groupe saut montraient une augmentation de la masse et de la résistance des vertèbres lombaires et du fémur, ainsi qu'une augmentation de la taille de la section de ces os. En revanche, il n'y avait pas de changements pour les rats sédentaires et pour ceux du groupe course. Huang *et al.* (Huang *et al.* 2003) ont comparé les os de rats Wistar, âgés de 7 semaines. Les rats ont été partagés en 3 groupes : sédentaires, course et natation. Les rats ont été entraînés 5 fois par semaine pendant 8 semaines. Après ces 8 semaines, les DMO des tibias des rats du groupe course étaient supérieures à celles des rats du groupe natation. De plus, les propriétés mécaniques (énergie maximale jusqu'à rupture) des tibias et des fémurs des groupes course et natation étaient meilleures que celles du groupe sédentaire. En revanche, dans l'étude de Bourrin *et al.* (Bourrin *et al.* 1992), un entraînement en « natation » durant une période de 5 semaines a induit une perte osseuse au niveau des vertèbres lombaires et du fémur chez des rates âgées de 5 semaines. La charge mécanique est donc un facteur important dans l'effet ostéogénique que peut induire un exercice physique (Bourrin *et al.* 1992).

5. Effets de l'âge, du statut menstruel et du sexe

Dans une étude de Jacobson *et al.* (Jacobson *et al.* 1984), des femmes sportives, âgées de 40 à 55 ans avaient un CMO supérieur à leurs collègues non sportives du même âge au niveau des vertèbres lombaires. De la même manière, Van Langendonck *et al.* (Van Langendonck *et al.* 2003) ont montré des effets osseux bénéfiques suite à la pratique de sports à impacts chez des hommes âgés de 40 ans. Enfin, Vainionpää *et al.* (Vainionpää *et al.* 2007) ont observé un gain au niveau de la circonférence des os, de la résistance des os et de l'épaisseur de l'os cortical chez des femmes âgées de 35 à 40 ans pratiquant une activité physique depuis 12 mois.

Cependant, le statut menstruel et hormonal de la femme peut être modifié par l'exercice chronique quand la dépense énergétique excède de beaucoup les apports nutritionnels (Marcus *et al.* 1985; Williams *et al.* 2001). Il a été montré que le statut menstruel a une influence majeure sur la réponse ostéogénique induite par l'exercice (Guadalupe-Grau *et al.* 2009).

Dans les études de Newhall *et al.* (Newhall *et al.* 1991); Yeh *et al.* (Yeh *et al.* 1993) et Notomi *et al.* (Notomi *et al.* 2001) chez le rat et la rate, les animaux étaient âgés respectivement de 6 semaines, 14 mois et 10 semaines. Dans ces trois études, il a été observé une amélioration du contenu minéral osseux et de la densité minérale osseuse au niveau de certains sites osseux. Il semble que l'exercice physique ait un effet ostéogénique sur le CMO et de la DMO quel que soit l'âge ou le sexe de l'animal.

6. Effets de l'exercice sur la résistance osseuse

Par consensus et surtout chez l'homme, les mesures de DMO sont utilisés afin d'estimer la résistance osseuse et servent d'indicateur principal quant à la détermination du risque de fracture (Melton *et al.* 1993). Les scientifiques travaillant sur « exercice et fractures ostéoporotiques » recommandent aux patients de pratiquer une activité physique avec beaucoup d'impacts au moins deux fois par semaines (Kemmler et Stengel 2011). Cependant il n'y a pas de protocole bien défini. Une étude de Marques EA *et al.* (Marques *et al.* 2011) consistant à entraîner des femmes âgées de 60 à 95 ans deux fois par semaine en résistance, a montré une amélioration de la condition physique, de la force musculaire, de la posture et de la DMO au col fémoral. Une seconde étude a permis de montrer qu'un entraînement en résistance trois fois par semaine permettait d'augmenter la DMO au col fémoral, mais pas au radius, preuve que l'exercice a un effet sur les os porteurs (Hamilton *et al.* 2010; Heinonen *et al.* 1996).

Chez le rat, les techniques de flexion 3 points permettent de tester la résistance de l'os jusqu'à rupture. Dans l'étude de Swift JM *et al.* (Swift *et al.* 2010), des entraînements avec des charges moyennes ou élevées chez des rats mâles adultes ont permis tous les deux d'augmenter la résistance du col fémoral de 30 et 37% comparés à des rats sédentaires. Un entraînement sur tapis roulant durant 10 semaines a également permis d'améliorer la charge maximale supportée par le fémur et la raideur chez de jeunes rats en croissance comparés à des rats contrôles (Joo *et al.* 2003).

7. Limites de l'exercice physique sur l'anabolisme osseux

Si l'exercice a des effets positifs sur la maximisation du tissu osseux, il y a cependant des limites. A titre d'exemple, la pratique intense d'activités physiques augmente le risque de se faire des entorses et des fractures (Maffulli *et al.* 2011a; Newman et Newberg 2010). Dans les sports à impacts, le risque de mauvais alignement des os après fracture existe au niveau des articulations et les anciens athlètes peuvent développer de l'arthrose après une blessure (Baker 1998; Maffulli *et al.* 2011a). Chez l'athlète jeune, les blessures dues au sport peuvent créer des retards de croissance sur un membre, notamment lorsque le cartilage de conjugaison est touché (Maffulli *et al.* 2011b).

Un phénomène appelé triade de l'athlète est aussi présent chez certaines sportives. Ce phénomène comprend les troubles de l'alimentation, associés à des dysfonctions hormonales et à une faible DMO (Pollock *et al.* 2010). Cette triade de l'athlète est observée chez les sportives pratiquant une activité où la faible masse grasse est importante, comme dans l'athlétisme et la danse (Doyle-Lucas *et al.* 2010; Nichols *et al.* 2006; Rauh *et al.* 2010; Russell et Misra 2010; Warren et Chua 2008). La balance énergétique négative quotidienne entraîne une modification hormonale, qui à terme mène à une perte de masse osseuse (Russell et Misra 2010) et peut conduire à une ostéopénie (Warren et Perlroth 2001).

Des pathologies spécifiques peuvent apparaître avec la pratique de certains sports à long terme, comme la dégénération des disques inter-vertébraux chez les athlètes, la spondylose (arthrose de la colonne vertébrale) chez les gymnastes, les lutteurs et les plongeurs (Bono 2004).

Cependant, compte tenu des faibles pourcentages de blessures graves comparés aux effets bénéfiques de la pratique d'une activité physique, celle-ci est encouragée chez l'ensemble de la population, des enfants jusqu'aux personnes âgées (Maffulli *et al.* 2011b; Olszynski *et al.* 2004; Rizzoli *et al.* 2009; Sinaki *et al.* 2010).

B. Mécanismes d'action de l'exercice physique sur l'os

1. La théorie du mécanostat de Frost

Si Wolff a lié la résistance osseuse aux fonctions mécaniques auxquels les os sont soumis (Wolff 1892), Frost a été le premier à émettre une théorie détaillée sur la façon dont les os porteurs s'adaptent pour maintenir leur propriétés mécaniques en réponse aux modifications de l'environnement mécanique (Frost 1987). Frost a suggéré l'existence d'un mécanisme de régulation dans l'os, capable de sentir les changements de charges mécaniques placées sur l'os et de modifier la masse osseuse en conséquence afin de mieux l'adapter aux nouvelles contraintes mécaniques. Frost a émis le postulat que plusieurs seuils mécaniques contrôlent si de l'os doit être ajouté ou retiré du squelette. Frost a suggéré qu'en dessous d'un certain seuil, l'os est résorbé afin de se débarrasser de l'excès de masse. En revanche, au-dessus d'un certain seuil quand l'os est exposé à des charges mécaniques plus importantes que les charges habituelles, il y a apposition d'os sur les structures existantes afin d'augmenter la résistance osseuse (Frost 1987; Hughes et Petit 2010). Comme dans tout système de contrôle de l'homéostasie, la théorie du mécanostat repose sur différents composants, incluant un stimulus, un mécanisme de détection capable de détecter le stimulus et un mécanisme effecteur capable de ramener le système à l'homéostasie.

Selon Frost, le stimulus de l'adaptation fonctionnelle de l'os était l'amplitude de la contrainte. Depuis, de nombreuses études ont montré que d'autres mécanismes jouent un rôle dans l'adaptation fonctionnelle de l'os, comme la fréquence des contraintes mécaniques (Marcus 2002), le temps de repos entre chaque cycle de charge et la distribution des contraintes à travers la structure osseuse (Skerry 2006).

Les effecteurs de cette théorie du mécanostat seraient les ostéoblastes et les ostéoclastes, selon deux processus décrits par Frost : le modelage et le remodelage. Le modelage est l'action indépendante des ostéoblastes et des ostéoclastes sur les surfaces osseuses où de l'os nouveau est formé sur certaines surfaces et de l'os ancien est enlevé d'autres surfaces. Le modelage affecte la taille et la forme des os. Le remodelage est un processus localisé, qui est caractérisé par l'action couplée des ostéoclastes et des ostéoblastes, dans lequel les ostéoclastes résorbent de l'os et où par la suite, les ostéoblastes forment de l'os puis le minéralisent (Hattner *et al.* 1965; Hughes et Petit 2010). Le modelage et le remodelage sont tous les deux responsables de la modification des propriétés mécanique des os, de leur

structure et de leur résistance aux charges. Pourtant, il reste des confusions par rapport aux différents rôles de ces effecteurs dans des conditions comme la surcharge ou la moindre charge (Hughes et Petit 2010).

Le mécanisme « sensitif » du mécanostat serait l'ostéocyte (Tatsumi *et al.* 2007). En effet, plusieurs études ont observé une modification des ostéocytes suite à une augmentation de charge (Keila *et al.* 2001; Robling *et al.* 2008; Turner et Robling 2004), menant à une augmentation du recrutement des ostéoblastes, et à une augmentation de la formation osseuse (via une diminution de la sclérostine et une augmentation de la voie Wnt/ β -caténine). La décharge a aussi un effet sur l'ostéocyte puisqu'il a été observé qu'elle provoque une augmentation de l'apoptose des ostéocytes, facteur influençant l'ostéoclastogenèse (Aguirre *et al.* 2006).

2. Relation muscle - os

De nombreuses études ont démontré la relation positive entre la masse musculaire et la DMO. Cette corrélation a été montrée chez l'homme (Douchi *et al.* 2003) et chez la femme pré-ménopausée (Bailey et Brooke-Wavell 2010). De la même façon, une corrélation a été observée entre la perte de masse musculaire et la perte de masse osseuse chez la femme post-ménopausée ostéoporotique (Genaro *et al.* 2010). En effet, la contraction des muscles durant une activité entraîne une charge mécanique sur l'os, charge qui est nécessaire au développement et au maintien de la masse osseuse (Gross *et al.* 2010).

De telles observations ont été confirmées par des études dans des modèles animaux (Gross *et al.* 2010; Windahl *et al.* 2011).

3. Effet de l'exercice sur les hormones gonadotropes, somatotropes, corticotropes et sur les adipokines

Le tissu osseux s'adapte aux contraintes mécaniques, comme par exemple lors de la pratique d'une activité physique régulière. Il est régulé par l'action de nombreuses hormones, comme nous l'avons détaillé précédemment. Reprenons les effets connus de l'exercice physique sur le métabolisme des hormones liées à l'os.

a) Axe somatotrope

- **La GH**

L'exercice musculaire représente le stimulus physiologique le plus puissant de la sécrétion de GH (Gibney *et al.* 2007). Cependant, de nombreux facteurs modulent la réponse sécrétoire de la GH pendant l'exercice, comme l'intensité de l'exercice, l'effet de l'entraînement, le sexe, l'âge, la composition corporelle et la nutrition (Duclos 2001; Gibney *et al.* 2007). L'entraînement intense en endurance amplifie la pulsatilité de la GH. La stimulation de la sécrétion de la GH liée à l'exercice se prolonge pendant la phase de récupération. Une heure après l'arrêt d'un sprint, la concentration plasmatique de GH est 10 fois supérieure à celle mesurée au repos (Nevill *et al.* 1996). Il semble que les concentrations basales de GH soient élevées chez les athlètes comparées à des individus sédentaires (Sartorio *et al.* 2004a; Sartorio *et al.* 2004b). Felsing *et al.* (Felsing *et al.* 1992) ont montré que les variations de sécrétion de GH étaient liées à des variations sécrétoires hypophysaires.

- **L'IGF-I**

L'exercice musculaire ne provoque pas de modifications significatives des concentrations plasmatiques d'IGF-I libre lors d'exercices en résistance (Gibney *et al.* 2007; Kraemer *et al.* 1990; Milliken *et al.* 2003). En revanche, lors d'exercices en endurance, la concentration plasmatique d'IGF-I totale augmente d'environ 10% à l'arrêt d'un exercice de 10 min à forte intensité (80% de la VO_{2max}), avec un retour aux valeurs basales après 10 min de repos. Les valeurs d'IGF-I n'étaient pas modifiées par l'entraînement chez des sprinters, triathlètes, coureurs de cross, cyclistes, skieurs, hockeyeurs et nageurs dans l'étude de Sartorio *et al.* (Sartorio *et al.* 2004b).

b) Axe gonadotrope chez l'homme

- **La testostérone**

Un exercice d'une durée de 20 min à 2 h augmente la concentration plasmatique de testostérone. Cela a été montré chez des jeunes gymnastes (Jahreis *et al.* 1991) et chez des hommes adultes pratiquant la marche, le jogging, le cyclisme ou la natation (Remes *et al.* 2004). Cette augmentation est due à une réduction de la clairance métabolique hépatique de la testostérone (Duclos 2001). Quand l'exercice se prolonge (3-4h), l'augmentation transitoire de la testostérone est suivie d'une diminution de la concentration plasmatique de testostérone. Cette diminution est due à une diminution de la sécrétion hypothalamique de GnRH (voie centrale) ainsi qu'à une diminution du nombre de récepteurs à la LH sur les testicules (voie périphérique). L'entraînement régulier en résistance conduit à une augmentation des concentrations plasmatiques de testostérone suite à une stimulation hypothalamo-hypophysaire (Hakkinen et Pakarinen 1993). Plusieurs études ont rapportées que l'entraînement régulier en endurance entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone (Duclos 2001).

c) Axe gonadotrope chez la femme

Chez la femme, un entraînement intense régulier peut conduire à des anomalies de la fonction ovarienne allant jusqu'à l'aménorrhée dans les cas extrêmes. La fréquence de l'aménorrhée varie entre 34% et 79% chez les danseuses de ballet, 26% chez les marathoniennes et 12% chez les nageuses et les cyclistes (Warren 1999). Ces effets délétères sont dus à l'hypothalamus qui modifie la pulsatilité de la GnRH, conduisant à une diminution ou à une abolition de la pulsatilité de la LH (De Souza *et al.* 1998). Cela pourrait être également dû à une plus faible sécrétion de FSH. Ces modifications de la fonction ovarienne sont en rapport avec le métabolisme énergétique, et notamment aux adaptations neuroendocrines d'une prise alimentaire insuffisante (Loucks *et al.* 1998). L'aménorrhée de la sportive est due à une adaptation physiologique pour pallier à la déficience d'apport nutritionnel suffisant au regard de la dépense énergétique quotidienne (Laughlin et Yen 1996). En effet, certaines sportives comme les danseuses de ballet ont une masse grasse inférieure à des filles sédentaires de leur âge (Donoso *et al.* 2010). La triade

de l'athlète est un phénomène bien connu chez la sportive de haut niveau. Ce phénomène se caractérise par un trouble du cycle ovarien, une balance énergétique négative et une faible DMO (Pollock *et al.* 2010). L'augmentation du cortisol et de la GH observée chez ces sportives pourrait être une cascade d'adaptations de la glycorégulation dans le but de conserver les protéines de l'organisme. La diminution de la GnRH observée chez ces femmes serait régulée par la concentration en leptine, hormone sous le contrôle de la balance énergétique et de la quantité de tissu adipeux (Caro *et al.* 1996). En effet, les concentrations plasmatiques de leptine sont trois fois plus faibles chez ces athlètes que chez des femmes sédentaires (Donoso *et al.* 2010).

d) Axe corticotrope : le cortisol

L'activation de l'axe corticotrope pendant l'exercice associe la production d'ACTH par les cellules corticotropes hypophysaires à l'augmentation du cortisol plasmatique (Duclos 2001). L'importance de la production de cortisol pendant l'exercice musculaire dépend de l'intensité et de la durée de l'exercice (Scott *et al.* 2011). En effet, l'augmentation de la concentration plasmatique d'ACTH est liée de façon linéaire au pourcentage de $VO_2\text{max}$ atteint à l'exercice (Luger *et al.* 1987). Lors d'un exercice modéré (60% $VO_2\text{max}$), l'activation corticotrope s'observe après 1 heure d'exercice alors qu'elle s'effectue après 10 minutes d'exercice intense (90% $VO_2\text{max}$). Chez les sujets très entraînés en endurance, il existe une modification du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes, probablement dans le but de répondre à une stimulation ultérieure (Crewther *et al.* 2011). Il a par exemple été observé une abolition du cycle circadien du cortisol chez des gymnastes de haut-niveau (Georgopoulos *et al.* 2011).

e) Hormones calciotropes

L'homéostasie du calcium et les taux d'hormones calciotropes sont modifiés par l'exercice physique. En revanche, les variations de ces hormones dépendent de différents paramètres tels que la durée de l'exercice, son intensité, ainsi que l'âge, le sexe et l'état entraîné ou non des sujets.

- **La vitamine D**

En général, les concentrations de 1,25 vitamine D sont augmentées chez des sportifs pratiquant une activité nécessitant un anabolisme musculaire (athlètes, décathloniens, femmes post-ménopausées suivant un entraînement en endurance) (Maimoun et Sultan 2009). Les concentrations de 1,25 vitamine D restent normales chez des cyclistes, triathlètes et nageurs (Maimoun et Sultan 2009). Un mois d'exercice physique en résistance augmente la 1,25 vitamine D de façon non significative chez des sujets sédentaires jeunes (Tajima *et al.* 2000).

- **La PTH**

Chez des personnes âgées, un entraînement de 6 semaines sur ergomètre à raison d'une heure par jour et de 4 jours par semaine n'a pas modifié les concentrations de calcium, de 1,25 vitamine D ni de PTH (Zerath *et al.* 1997). De même, la marche à vive allure (50% VO₂max) n'a pas modifié les concentrations de PTH chez des femmes post-ménopausées (Thorsen *et al.* 1996). Les effets de l'exercice à court terme sont très controversés et dépendent beaucoup du type d'exercice, et du niveau d'entraînement des sujets (Brahm *et al.* 1997). Il a aussi été rapporté une différence des effets de l'exercice sur la concentration de PTH selon le statut osseux des athlètes (Grimston *et al.* 1993). Chez les athlètes, de nombreuses études ont montré une augmentation de la PTH suite à un exercice n'excédant pas 60 minutes (Maimoun et Sultan 2009; Salvesen *et al.* 1994; Scott *et al.* 2011).

- **La calcitonine**

L'exercice physique ne semble pas avoir d'effet sur les concentrations basales en calcitonine (Maimoun et Sultan 2009; Thorsen *et al.* 1996). Seuls de minimes changements ont été rapportés dans certaines études (Grimston *et al.* 1993).

f) Adipokines

- **La leptine**

Les concentrations de leptine ne sont pas affectées par des exercices courts (moins de 60 min) chez l'homme ni chez la femme. De même, des protocoles d'entraînement courts (inférieurs à 12 semaines) n'affectent pas les concentrations de leptine, à l'exception des patients atteints de diabète de type 2 (Kraemer *et al.* 2002). Cependant, les protocoles d'entraînement longs (supérieurs à 12 semaines) qui peuvent entraîner une diminution de la masse grasse diminuent les concentrations de leptine (Kraemer *et al.* 2002). C'est le cas des danseuses de ballet, qui ont une masse grasse beaucoup plus faible que des femmes sédentaires et ont des concentrations de leptine diminuées significativement par rapport à des femmes sédentaires (Donoso *et al.* 2010). La leptine est également diminuée lors de phases de perte de poids volontaires liées à la pratique sportive, comme par exemple chez les judoka dans la phase pré-compétition (Prouteau *et al.* 2006). Les concentrations en leptine peuvent être diminuées après un exercice demandant une haute dépense énergétique (plus de 800 Kcal) (Bouassida *et al.* 2010).

- **L'adiponectine**

L'adiponectine, adipocytokine impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, ne semble pas être modifiée suite à un entraînement long (supérieur à 60 min) ni d'intensité modéré, mais serait modifiée suite à un exercice intense (Jurimae *et al.* 2005). Cependant, les données concernant l'adiponectine et la durée d'un protocole d'entraînement sont contradictoires (Kraemer et Castracane 2007). Il semble que la plupart des protocoles améliorant la condition physique et la masse grasse pourrait diminuer la leptine et augmenter les concentrations d'adiponectine (Bouassida *et al.* 2010; Kraemer et Castracane 2007). Une étude a montré une augmentation d'adiponectine pendant la puberté chez des jeunes danseuses de ballet (Donoso *et al.* 2010). De même, des valeurs élevées d'adiponectine ont été observées chez des sportives aménorrhées, en combinaison avec une faible masse grasse et une DMO inférieure à des sportives non aménorrhées (O'Donnell et De Souza 2011).

C. Consommation d'alcool chez les sportifs

1. Généralités

La consommation d'alcool peut être associée à la pratique sportive (Gutgesell et Canterbury 1999), et certaines études américaines et néo-zélandaises rapportent une consommation d'alcool plus fréquente chez les sportifs que chez les non sportifs, surtout dans les sports d'équipe comme le football et le baseball (Martens *et al.* 2006; Maughan 2006). Cela a été observé chez les femmes (Leichliter *et al.* 1998), chez les étudiants sportifs de niveau élite mais non professionnels (Moore et Werch 2005; O'Brien *et al.* 2005) et également chez les sportifs professionnels (Dietze *et al.* 2008). Les épisodes de binge drinking et les problèmes secondaires dus à l'alcool sont également plus fréquents chez ces populations (Rainey *et al.* 1996; Tao *et al.* 2007). Certaines études rapportent également un lien entre l'intensité et le niveau de pratique et la proportion d'étudiants s'initiant à la consommation d'alcool (Aaron *et al.* 1995; Martens *et al.* 2006). Une étude de Maughan (Maughan 2006) a rapporté que la consommation aigue d'alcool a un effet négatif sur la performance sportive. La prise d'alcool s'accompagne d'une diminution du contrôle moteur et d'une diminution du temps de réaction (Maughan 2006). La consommation d'alcool atteindrait jusqu'à 19% de l'apport calorique total les jours de match dans le cas du football, sachant que les joueurs consomment l'alcool plutôt après le match (Maughan 2006).

Une consommation d'alcool supérieure à des sédentaires a également été observée dans les sports d'endurance, où l'énergétique est important (Bethell *et al.* 1991; Blair *et al.* 1981; Gutgesell *et al.* 1996; Gutgesell et Timmerman 1998).

Cela pourrait s'expliquer par le fait que malgré la reconnaissance sociale liée à la réussite sportive, le plaisir de pratiquer une activité physique, et la position sociale offerte quelquefois aux athlètes, ceux-ci doivent gérer à la fois leur scolarité, les entraînements collectifs et individuels, les suivis médicaux et les matches, avec la pression et l'anxiété qui leur est associée. De ce fait, les étudiants athlètes vivent souvent dans un environnement isolé du reste des étudiants, et sont moins enclin à participer à des activités non sportives proposées sur les campus universitaires. Cette population évolue donc différemment des étudiants lambda sur des plans émotionnels et psychologiques, ce qui a été observé dans le

cas de l'abus d'alcool (Martens *et al.* 2006). Il a également été observé que les sportifs considérés comme leader de leur équipe buvaient plus et s'engageaient plus dans des gros épisodes d'alcoolisation que leurs coéquipiers non leaders (Martens *et al.* 2006). En effet, il semblerait que l'influence des coéquipiers soit importante dans ce type de comportement. L'aspect compétitif développé par les sportifs de haut niveau pourrait aussi transférer à cet autre comportement social, où l'aspect compétitif dans la tenue à l'alcool est observé, notamment lorsque la consommation est réalisée devant des coéquipiers ou amis. Aux Etats-Unis, le lien entre marques d'alcool (sponsors) et sport existe (Henriksen *et al.* 2008; Maher *et al.* 2006). Certaines marques d'alcool possèdent également des équipes, qui jouissent en retour de privilèges de consommation.

2. Effets sur l'os

Les effets d'une consommation d'alcool combinée à la pratique d'une activité physique régulière sur l'os ne sont pas connus chez l'Homme et ont été très peu étudiés chez l'animal. Une étude a montré chez le rat adulte (6 mois) que la sédentarité accentuait les effets délétères de l'alcool sur l'os, quand elle était associée à une consommation chronique d'alcool de 35% de l'apport calorique total (Hefferan *et al.* 2003). Les effets inhibiteurs sur la formation osseuse étaient additifs, suggérant que la réduction de l'activité physique chez les alcooliques peut être un facteur de comorbidité dans le cas de l'ostéoporose. Une seconde étude, également chez le rat adulte (6 mois), a été réalisée dans le but d'étudier un potentiel effet synergique de la consommation d'alcool et de l'exercice dans l'augmentation de l'occurrence des fractures de fatigue (Reed *et al.* 2002). Après 16 semaines d'entraînement sur tapis roulant, les paramètres de microarchitecture de l'os trabéculaire et cortical étaient inférieurs dans le groupe alcoolisé comparé au groupe contrôle. En revanche, aucun effet favorable ou défavorable de l'exercice n'a été observé chez les rats alcoolisés et entraînés. Il a été conclu de cette étude que la consommation d'alcool peut très certainement augmenter le risque de blessures (fractures) durant la pratique sportive.

RESUME :

Les effets bénéfiques de l'exercice sur le tissu osseux ont été régulièrement démontrés : les activités physiques porteuses, où le squelette est soumis à des charges mécaniques importantes ou à des impacts, engendrent une augmentation de la DMO. Ceci a été montré chez les hommes et les femmes, de l'enfant à l'adulte senior, et également dans des modèles animaux. Les effets de l'exercice semblent se maintenir sur du long terme. Le mécanisme lié à l'adaptation de l'os par rapport à l'exercice physique n'est pas entièrement connu. Il semblerait que la composition corporelle joue un rôle important, notamment à travers les concentrations en adipokines. La GH ainsi que d'autres hormones pourraient également relayer les effets de l'exercice sur l'anabolisme osseux. Toutefois, les effets de l'exercice sur l'ostéocyte n'ont pas encore été réellement étudiés.

De nombreuses études rapportent que la pratique d'une activité physique et la consommation d'alcool sont liées. La consommation d'alcool serait même plus importante chez les sportifs que chez les sédentaires. Cependant, aucune étude n'a analysé les effets combinés d'une consommation chronique d'alcool et de la pratique régulière d'une activité physique sur le tissu osseux, dans le but d'observer un potentiel effet protecteur de l'exercice.

Nos hypothèses et objectifs

I. Introduction

La consommation chronique et excessive d'alcool a un effet catabolique sur l'os. Elle entraîne une diminution de la DMO et du CMO (Broulik *et al.* 2010; Nyquist *et al.* 2002), via des modifications de l'os trabéculaire et cortical (Sampson *et al.* 1997; Sampson *et al.* 1998), principalement dues à une inhibition de la formation osseuse (Diamond *et al.* 1989; Sampson 1998). La conséquence de ces modifications est un risque accru de fracture (Hernandez-Avila *et al.* 1991; Hoidrup *et al.* 1999), et une pathologie appelée ostéoporose secondaire (Kaufman et Goemaere 2008; Seeman 1997). **La dose à partir de laquelle la consommation d'alcool entraîne des effets délétères sur l'os n'est pas définie à ce jour et les modifications architecturales, notamment de porosité liée à l'effet-dose d'alcool ne sont pas connues.** De plus, si les modifications du nombre et de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes ont été étudiées suite à un traitement alcoolique (Cheung *et al.* 1995; Dyer *et al.* 1998; Turner *et al.* 2001), **les effets de l'alcoolisme sur les ostéocytes sont encore peu élucidés,** et personne n'a observé ces effets dans un modèle d'ostéopénie alcoolique avérée. Le tissu osseux est sensible à de nombreux paramètres dont l'activité physique (Sampson 2002). L'exercice physique régulier a un effet ostéogénique sur l'os, chez l'homme et chez l'animal. De nombreuses études ont montré qu'une activité physique en charge générant des impacts sur l'os, permet d'améliorer la densité minérale osseuse et la résistance osseuse (Turner et Robling 2005; Young *et al.* 2007). L'activité physique est d'ailleurs recommandée aux femmes post-ménopausées pour prévenir la perte de masse osseuse et le développement de l'ostéoporose (Rizzoli *et al.* 2009; Sinaki *et al.* 2010).

Dans nos sociétés modernes, les jeunes adolescents et adultes, non sportifs et sportifs, s'adonnent à un nouveau type de consommation alcoolique : le binge drinking (Arvers et Choquet 1999; Moore et Werch 2005). Ce type de comportement peut dériver vers une pathologie alcoolique. La pratique d'une activité physique chez ces personnes qui s'alcoolisent régulièrement pourrait permettre de limiter les effets de l'alcool sur le tissu osseux. A ce jour, **il n'y a qu'une seule étude (Reed *et al.* 2002) qui a combiné la consommation d'alcool (excessive) et une activité physique régulière** pour observer les effets combinés de ces deux types de facteurs environnementaux sur le tissu osseux.

II. Développement des hypothèses et objectifs dans les différentes études

A. Etude 1

Suite à la revue de la littérature, nous avons souhaité tester les effets combinés d'une consommation chronique modérée d'alcool associée à un exercice physique régulier sur le métabolisme osseux d'animaux jeunes adultes. L'objectif de cette étude est de mimer un début d'alcoolisation chronique modérée chez de jeunes adultes pratiquant une activité physique régulière. Des analyses de densité et de microarchitecture osseuse ainsi qu'une analyse de la résistance seront réalisées afin d'affirmer ou d'infirmer notre hypothèse d'un effet délétère de l'alcool à dose modérée sur l'os, effet qui pourrait être diminué par la pratique d'une activité physique concomitante. L'intérêt de cette étude est de montrer que chez des sujets jeunes et actifs physiquement, l'activité physique peut avoir un effet protecteur sur l'os et contrecarrer les effets délétères d'une consommation d'alcool régulière et modérée.

Ainsi, notre hypothèse est qu'une pratique physique régulière chez des sujets peut permettre de limiter la perte de masse musculaire ainsi que la diminution de la densité osseuse, chez des sujets s'alcoolisant régulièrement.

B. Etude 2

Suite à l'étude 1, où la consommation d'alcool est modérée, l'objectif de l'étude 2 est de tester les effets de trois différentes doses chroniques et élevées d'alcool sur le métabolisme osseux chez le rat. En effet, la sensibilité du tissu osseux à l'alcoolisation chronique n'a pas été testée avec un modèle proche de ce que l'on observe chez l'homme, à savoir une boisson alcoolisée séparée de la nourriture. Les effets de l'alcool sur l'os cortical ont également été peu étudiés, notamment au niveau de la microarchitecture osseuse. Troisièmement il n'y a pas d'étude permettant de définir le seuil à partir duquel l'alcool a un effet néfaste sur l'os. Trois doses d'alcool seront administrées à des animaux distincts et comparés à un groupe contrôle. Notre hypothèse est que le groupe recevant la dose d'alcool la plus faible n'aura pas beaucoup de changements au niveau des paramètres osseux, contrairement aux doses plus élevées. Nous pensons également observer un effet-dose avec une plus grande perte osseuse chez le groupe le plus alcoolisé.

C. Etude 3

Même s'il est admis depuis peu de temps que l'ostéocyte n'est pas une cellule inerte et passive, les fonctions de cette cellule ne sont pas toutes connues. Des études récentes ont montré que l'ostéocyte régirait la formation et la résorption osseuse, y compris lorsque celle-ci devient apoptotique. Cependant, les effets de l'alcool sur l'ostéocyte ont été très peu étudiés. Lorenz et Lorenz ont observé l'état des ostéocytes au microscope électronique en transmission chez des rates alcoolisées et ont rapporté une modification de la morphologie des ostéocytes (Lorenz et Janicke-Lorenz 1983). Une seconde étude chez le lapin s'est intéressée au mécanisme lipidique dans l'ostéonécrose d'origine alcoolique et a observé plus de lacunes ostéocytaires vides chez ces animaux (Wang *et al.* 2003). En revanche l'évolution du tissu osseux n'a pas été caractérisée. Nous pensons qu'une consommation chronique d'alcool a un effet sur l'ostéocyte, et que cet effet pourrait être lié à ce que l'on observe au niveau de la densité minérale osseuse.

En utilisant les tibias des rats des groupes contrôles et alcool 35% v/v de l'étude 2, l'objectif de l'étude 3 est d'analyser les effets d'une alcoolisation chronique sur la morphologie 2D, 3D, et sur le pourcentage d'apoptose des ostéocytes sur des os d'animaux préalablement alcoolisés. Nous comptons effectuer ces observations et quantifier les changements grâce à différentes sortes d'expérimentations : marquage des coupes de tibia puis microscopie en lumière blanche, en épifluorescence, électronique en transmission et confocale. Nous pensons observer une modification de la morphologie des ostéocytes et une augmentation de l'apoptose de ces cellules, comme rapportées précédemment par Lorenz et Lorenz (1983) et par Wang *et al.* (2003) sur des modèles d'animaux non ostéoporotiques.

D. Etude 4

Après l'étude des effets d'un traitement alcoolisé sur la morphologie des ostéocytes, nous avons souhaité étudier la relation entre la DMO, la modification du métabolisme lipidique et l'ostéocyte. Pour cela, nous allons réaliser des coupes de tibia de différentes épaisseurs sur des échantillons de rats de l'étude 2 et allons observer les ostéocytes, la moelle et les vaisseaux sanguins en microscopie électronique à transmission et en lumière blanche après une coloration au bleu de toluidine. Le but de cette étude est de mettre en

évidence les mécanismes responsables de la modification des ostéocytes et de la diminution de DMO suite à un traitement alcoolisé prolongé.

Nous pensons observer une modification du contenu lipidique de la moelle, corrélée à l'apoptose des ostéocytes. Nous pensons que ces modifications sont corrélées à la diminution de la DMO observée dans notre modèle d'ostéoporose d'origine alcoolique.

E. Etude 5

Après avoir observé les effets combinés d'une consommation modérée d'alcool et de l'exercice physique sur le tissu osseux dans l'étude 1 et, après avoir défini quelle quantité élevée d'alcool a un effet délétère sur le tissu osseux dans l'étude 2, notre objectif pour cette étude est d'analyser les potentiels effets bénéfiques de l'activité physique sur des animaux soumis à un traitement d'alcoolisation élevée. Personne dans la littérature n'a mené d'étude pour essayer de montrer si l'exercice a un effet protecteur sur le tissu osseux de sujets alcooliques. Pourtant, l'alcoolisme chronique est une des causes d'ostéoporose secondaire chez l'homme et peut entraîner des fractures et accroître le risque de mortalité. Si certaines thérapies peuvent améliorer la densité osseuse en cas d'ostéoporose, est-ce que l'exercice physique régulier a un effet protecteur sur le risque de développer une ostéoporose secondaire ? La présence de contraintes mécaniques lors d'une activité physique a été rapportée comme un facteur favorisant l'augmentation de densité minérale osseuse, chez des personnes saines. Est-ce que cela est suffisant pour contrebalancer les effets de l'alcool ? C'est l'hypothèse de cette étude menée chez le rat mâle. Les rats seront alcoolisés pendant 17 semaines et/ou entraînés durant 14 semaines puis le tissu osseux sera analysé en termes de densité, microarchitecture, remodelage et résistance. Nous souhaitons également observer les effets combinés au niveau de l'ostéocyte, dans le but d'observer une augmentation de l'apoptose des ostéocytes avec l'alcool, augmentation qui serait limitée par la pratique de l'exercice physique.

Matériels et méthodes

I. Les animaux

Les expérimentations ont été conduites sur des rats mâles de souche Wistar, provenant de l'élevage CPA (Olivet, France) pour l'étude 1 et de l'élevage Janvier (LeGenest-St-Isle, France) pour les autres études. Les rats étaient âgés de 8 semaines en début de protocole, ce qui correspond à un jeune adulte chez l'être humain (Figure 25).

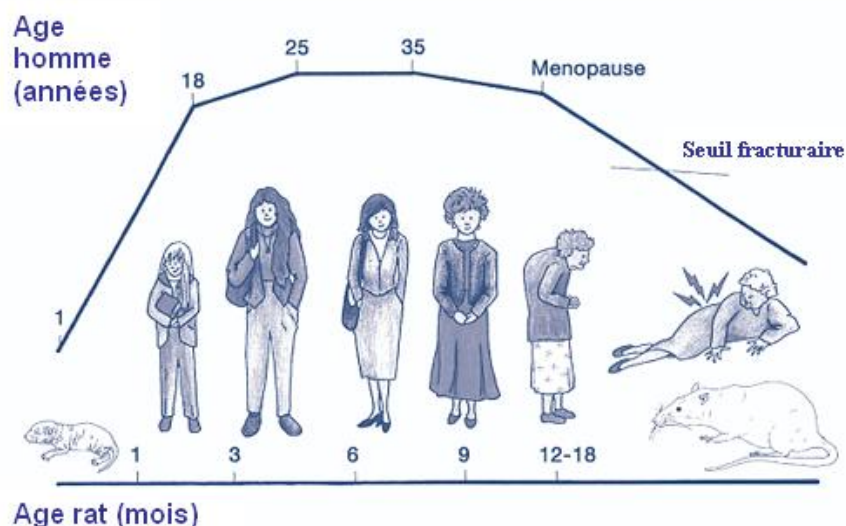


Figure 25 : Concordance des âges au niveau du tissu osseux entre l'homme et le rat.
D'après Sampson (Sampson 2002).

Les rats pesaient entre 250 et 300 grammes à leur arrivée. Ils ont été acclimatés pendant deux semaines dans l'animalerie du laboratoire de neurobiologie d'Orléans ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$, photopériode 12 h/12 h) avant le début des expériences. Les rats utilisés lors de l'étude 1 ont été nourris avec de l'aliment d'entretien A04 (Safe, Augy, France) contenant 12% d'eau, 16% de protéines, 3% de lipides et 60% de glucides, 4% de cellulose et 5% de minéraux. Les rats des autres études ont été alimentés avec de l'aliment M20 (Dietex, St Gratien, France), pendant toute la durée de l'étude. Cet aliment contenait 3% de lipides, 18% de protéines, 4% de fibres brutes, 6,8% de cendres, 57% de glucides et 3% de minéraux.

II. Le protocole d'alcoolisation

Après les deux semaines d'acclimatation, les rats étaient âgés de 10 semaines. Une période d'adaptation étant nécessaire, les rats ont été alcoolisés progressivement en

augmentant la dose d'alcool de 5% volume/volume tous les deux jours. L'éthanol 96% v/v (Grosseron, St Herblain, France) a été mélangé avec de l'eau et de l'aspartame dans un biberon, pour adoucir le goût.

Les rats des groupes A et AE utilisés lors de l'étude 1 ont été alcoolisés progressivement de 8% à 20% v/v sur une durée de 8 semaines. La dose de 20% v/v a été atteinte au cours des deux dernières semaines (équivalent à 75 cl de whisky par jour). Les rats ont consommé volontairement et *ad libitum* la boisson alcoolisée.

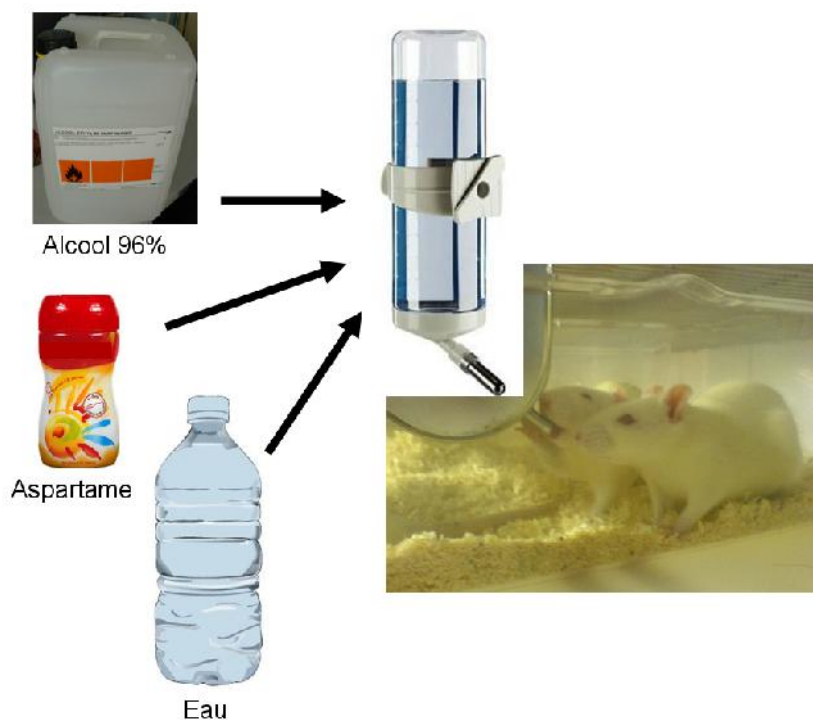


Figure 26 : Schématisation de l'alcoolisation volontaire des animaux.

Les rats des groupes A25, A30 et A35 utilisés lors de l'étude 2 ont été alcoolisés à 25% (équivalent à 1 bouteille de whisky de 1,5L plus 7 verres de vin pour un homme de 70kg), 30% (équivalent à 2L de whisky par jour plus 4 verres de vin par jour) et 35% v/v (équivalent à 2L de whisky plus 2 bouteilles de vin par jour) sur une durée de 17 semaines. Les doses ont été progressivement augmentées de 8% jusqu'aux doses maximales pour chaque groupe, sur une durée de trois semaines. Les doses de 25%, 30% et 35% ont ainsi été consommées par les rats pendant 14 semaines (Figure 26).

Pour l'étude 5, les groupes AE et A ont été alcoolisés à 35% v/v pendant une durée de 17 semaines. La dose d'alcool a également été augmentée progressivement sur trois semaines, de 8% à 35% v/v.

Les rats ont consommé boisson et nourriture *ad libitum* pendant l'étude 1, tandis que les quantités d'aliment et de boisson ont été contrôlées dans les études 2 et 5. Les rats des groupes C et E (études 1 et 5) ont reçu quotidiennement des biberons contenant uniquement de l'eau. Une mesure du volume hydrique bu a été effectuée chaque fin de semaine.

Pour les études 2 et 5, la prise alimentaire a été mesurée et ajustée chaque semaine afin que tous les groupes consomment le même nombre de calories, en tenant compte des calories apportées par l'alcool (1mL d'alcool équivaut à 5,18 kcal).

III. Protocole d'entraînement sur tapis roulant

Pour les protocoles incluant l'activité physique, un tapis roulant comportant 10 couloirs a été utilisé. Ce tapis a été spécialement conçu pour l'entraînement de rat et a déjà été utilisé et validé dans d'autres études (Bonnet *et al.* 2007a; Lespessailles *et al.* 2009). La longueur des 10 couloirs était de 70 cm et la largeur de 10,5 cm. Des câbles non électrifiés à l'arrière de chaque couloir permettaient à l'animal de se rendre compte qu'il devait courir un peu plus vite. Le tapis avait une longueur totale de 3,25 m et était entraîné par un moteur Siemens (250 V, 50 Hz). La vitesse était contrôlée à l'aide d'un boîtier à affichage numérique, qui correspondait à la vitesse moteur du tapis. La vitesse réelle a été calculée en début d'étude grâce à un chronomètre et à un repère placé sur le tapis. Un bouton d'arrêt d'urgence était également présent sur le tapis, pour pouvoir l'arrêter rapidement au cas où un rat se coincerait la queue ou une patte dans les câbles, afin de limiter le risque de blessure.

Les rats des groupes entraînés ont été conditionnés au tapis roulant durant quatre jours après la période d'acclimatation. Les rats ont été posés sur le tapis la première journée, sans qu'il soit mis en marche. Le 2^{ème} jour, le tapis a été utilisé pendant 10 min à une vitesse très faible correspondant à une vitesse de marche. Les 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} jours, la vitesse a été augmentée progressivement et la durée d'entraînement est passée de 10 min à 20 min par jour. Les entraînements ont eu lieu à la même heure, 5 fois par semaine, à raison de 40 à 45 min d'entraînement pour l'étude 1, et d'1 heure d'entraînement par jour pour l'étude 5.

La vitesse maximale aérobie (VMA), définie par Léger et Boucher comme un bon reflet de l'aptitude physique, a été calculée au début des études (Leger et Boucher 1980). La VMA représente la vitesse pour laquelle le sujet ou l'animal atteint sa consommation d'oxygène maximale. Après 5 minutes d'échauffement à faible vitesse (7 m/min) pendant 5 min, la vitesse du tapis a été augmentée de 2 m/min toutes les 2 minutes, comme défini par Boissiere *et al.* (Boissiere *et al.* 2008). La VMA correspond à la vitesse maximale où le rat est capable de maintenir le rythme de course. Lorsque le rat touchait 5 fois de suite les câbles à l'arrière et n'arrivait pas à ré accélérer, il était enlevé du tapis et la vitesse réelle du tapis était notée (VMA).

La vitesse du tapis a été augmentée progressivement selon la procédure suivante pour l'étude 1 (Tableau 8) :

Semaines	Durée d'entraînement (min)	Vitesse de course (m/min)
1	10	10
2	20	12,5
3	30	15
4	40	17,5
5	40-45	20
6-7-8	40-45	22,5

Tableau 8 : Protocole d'entraînement sur tapis roulant pour l'étude 1.

Pour l'étude 5, le protocole d'entraînement a été le suivant (Tableau 9):

Semaines	Durée d'entraînement (min)	Vitesse de course (m/min)
1	20-40	7
2	60	10
3	60	14
4	60	14-16
5-6	60	16
7-10	60	16-18
10-14	60	18-22

Tableau 9 : Protocole d'entraînement sur tapis roulant pour l'étude 5.

L'entraînement a été réalisé en continu pendant les deux études. La vitesse d'entraînement représentait environ 50% de la VMA (ou VO_2 max) des animaux pour l'étude 1 et 60% à 70% de la VMA des animaux pour l'étude 5 (Figure 27).

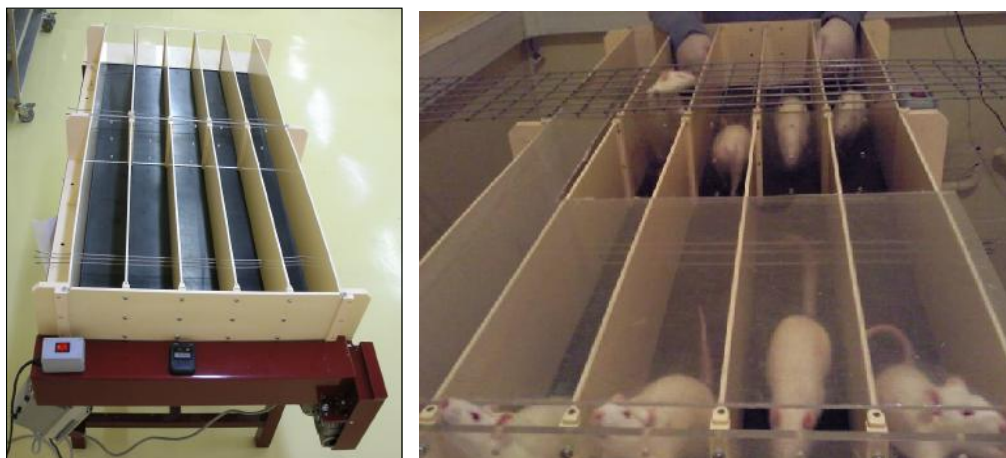


Figure 27 : Tapis roulant à 10 couloirs utilisé pour le protocole d'entraînement des rats.

IV. Mesures *in vivo*

A. Absorptiométrie biphotonique

Il existe plusieurs techniques non invasives pour quantifier la masse osseuse : radiogramétrie, absorptiométrie simple et absorptiométrie biphotonique. Nous avons choisi l'absorptiométrie biphotonique car cette technique a une bonne reproductibilité et permet de distinguer les tissus minéralisés des tissus mous. Cette technique est couramment utilisée pour mesurer le contenu minéral osseux (CMO) et la densité minérale osseuse (DMO) dans les études actuelles.

1. Principe de l'absorptiométrie biphotonique

Cette technique consiste à faire passer au-dessus de la région du corps à étudier, un tube contenant des émetteurs de photons (Figure 28). Un détecteur de photons est installé de l'autre côté de l'os. Plus l'os est dense, moins nombreux sont les photons qui atteignent le détecteur. L'absorption relative est calibrée pour exprimer la teneur en substance minérale et la masse de l'os par unité de longueur. C'est un examen qui se pratique en général chez la femme après la ménopause et chez toute personne souffrant d'une maladie métabolique susceptible de provoquer une déminéralisation osseuse. Il a l'avantage d'être rapide, indolore et ne nécessite chez l'homme aucune préparation. Notre appareil est pourvu d'un logiciel adapté pour le petit animal. Chez l'animal, il est nécessaire d'anesthésier les animaux afin qu'ils ne bougent pas. Après calibration, l'appareil est capable de discerner la masse grasse et la masse maigre de l'os. C'est le cas également lorsque l'appareil est adapté au petit animal, avec une étape de calibration de la machine spécialement pour le petit animal. La reproductibilité de cet appareil pour les mesures de DMO et CMO chez le rat a été testée précédemment dans notre laboratoire (Bonnet *et al.* 2005a).



Figure 28 : Appareil Discovery, Hologic.

2. Mesure de la composition corporelle

La composition corporelle (poids, masse maigre, masse grasse, et pourcentage de masse grasse) a été évaluée par absorptiométrie biphotonique à rayons X lors des semaines 1, 5 et 8 pour l'étude 1 et lors des semaines 2, 12 et 19 pour les autres études.

Pour ce faire, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital pendant 30 min (mélangé avec du NaCl à hauteur de 50/50 volume/volume ; injection de 0,1mL par 100g de poids de corps soit une concentration finale de 27,4mg/Kg). L'appareil que nous avons utilisé pour toutes les études était un appareil Hologic, modèle Discovery (Bedford, USA), ayant un logiciel adapté au petit animal. Pour maintenir une bonne reproductibilité, les rats ont été scotchés sur une feuille de plastique où le contour du corps et de la queue était dessiné (Figure 29). A la suite de l'examen, les rats ont été placés sur des bouillottes chaudes, pour faciliter leur réveil, avant de les remettre dans leurs cages.

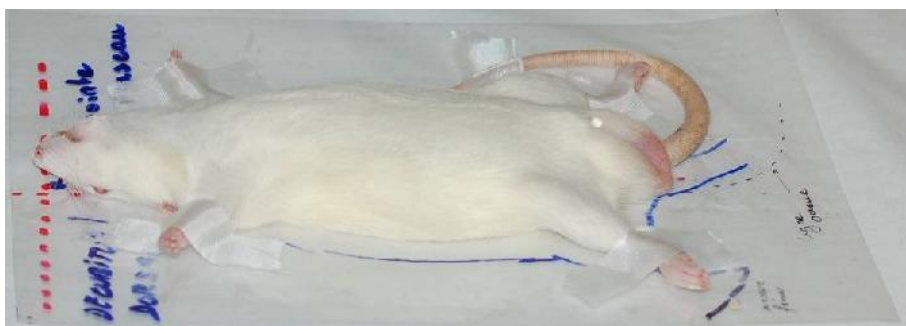


Figure 29 : Rat anesthésié pour l'examen d'absorptiométrie biphotonique *in vivo*.

3. Mesure de la DMO et du CMO

L'absorptiométrie biphotonique à rayons X nous a permis d'obtenir le CMO et la DMO. Ces mesures ont été réalisées au niveau du corps entier (Figure 30 A) ainsi que sur le fémur droit des rats (Figure 30 B). Le logiciel adapté au petit animal (Hologic QDR, version 12.6.1) permet d'analyser le corps entier et également une région spécifique du corps à haute résolution. Ce logiciel nous a permis de sélectionner précisément le fémur, et d'en obtenir le CMO et la DMO, sans prendre en compte la rotule ou la hanche.

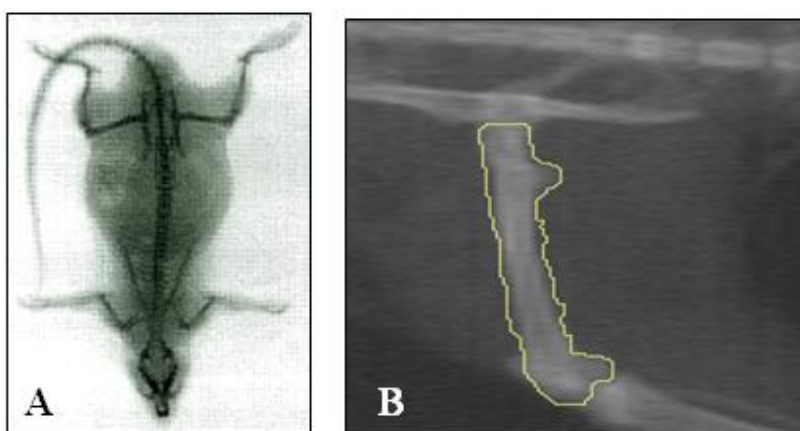


Figure 30 : Acquisitions de la DMO et du CMO du corps entier (A) et du fémur droit (B) par DXA.

V. Mesures ex vivo

A. Les os

Après le sacrifice, les fémurs et tibias droits et gauches ont été prélevés. Dans l'étude 1, les fémurs et tibias ont été placés à -20°C. Le fémur gauche des autres études a également été placé à -20°C tandis que le fémur droit et les tibias ont été fixés dans de la formaline et stockés à +4°C. Pour l'étude 1, les fémurs droits et gauches *ex vivo* ont été analysés par absorptiométrie biphotonique à rayons X. Pour toutes les études, la microarchitecture du fémur gauche a été analysée avec un micro tomographe à rayons X (Skyscan 1072, Belgique), puis un test biomécanique de flexion 3 points a été réalisé.

Les tibias de l'étude 2 ont été analysés avec plusieurs types de microscopies (en épifluorescence, électronique à transmission, confocale, en lumière blanche) afin d'étudier l'aspect cellulaire (Résultats présentés dans l'étude 3).

Nous avons choisi de prélever le fémur et le tibia car ils sont composés à la fois d'os cortical et d'os trabéculaire, ce qui nous a permis d'analyser les effets de l'alcool et de l'exercice sur ces deux types de tissus.

B. Le sang et les muscles

Le sang a été prélevé à la fin de toutes les études, par ponction intracardiaque et a été recueilli dans des tubes héparinés, EDTA et des tubes secs pour analyser des marqueurs du remodelage osseux, de l'inflammation du foie, du métabolisme lipidique et pour doser l'alcoolémie. Immédiatement après le prélèvement, le sang a été centrifugé 10 min à 3500 rpm (rotations par minute, équivalent à 1400g environ) puis aliquoté et congelé à -80 °C. De plus, des coupes de foie ont été réalisées sur les prélèvements de l'étude 2 dans le but de détecter une éventuelle atteinte hépatique (stéatose, fibrose). Pour ce faire, les foies ont été inclus dans de la paraffine, coupés avec un microtome puis colorés avec une solution de type HES (Hématoxyline Eosine Safran). L'hématoxyline colore les noyaux et les structures nucléaires en bleu-violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose et le tissu conjonctif est mis en évidence par la coloration jaune-orangée que lui donne le safran.

C. Mesure de la microarchitecture osseuse



Figure 31 : Micro tomographe à rayons X Skyscan 1072 (Belgique).

Principe de la micro tomographie à rayons X :

La micro tomographie à rayons X est une radiographie en 3 dimensions, à une très petite échelle avec une grande résolution. Cela permet d'imager les structures internes d'un

objet en 3 dimensions de façon très précise sans que ces structures soient endommagées. L'échantillon imagé ne nécessite pas de préparation spéciale : il n'a pas besoin d'être découpé en fines lamelles ni d'être coloré.

Dispositif

Nous avons utilisé un micro tomographe à rayons X (ou μ CT) Skyscan (Skyscan 1072, Aartselaar, Belgique) (Figure 31). La micro tomographie à rayons X est basée sur l'acquisition d'une multitude de projections radiographiques selon l'axe z. Entre chaque projection, l'échantillon tourne d'un angle très faible ($0,45^\circ$) grâce à un moteur pas à pas. Pour une étude de l'os dans sa totalité, il faut réaliser une rotation de 180° . Des coupes horizontales 2D dans le plan (x0y) sont ensuite reconstruites à partir de toutes les projections radiographiques (logiciel N-Recon). Les projections radiographiques sont acquises en 4096 niveaux de gris (12 bits). La reconstruction fournie par Skyscan donne des images recadrées sur 8 bits au moment de la reconstruction des coupes (256 niveaux de gris). La segmentation est une étape très importante et permet de passer des images 8 bits aux images binarisées. Sans la segmentation, l'image serait trop complexe pour être analysée. L'histogramme des niveaux de gris de l'os contient les niveaux de gris de l'os cortical, de l'os trabéculaire et du bruit de fond de reconstruction. L'histogramme est difficile à segmenter. Il faut donc savoir ce que l'on veut étudier pour maximiser le rapport signal sur bruit. La représentation du volume en 3D est ensuite obtenue en compilant toutes les coupes.

Zone d'étude et positionnement :

La métaphyse distale a été étudiée dans le fémur, car c'est une région riche à la fois en os trabéculaire et à la fois en os cortical. Le fémur a été placé de telle façon que l'extrémité proximale se situait dans le porte échantillon (Figure 32).



Figure 32 : Placement du fémur sur le porte échantillon pour l'acquisition avec le μ CT.

Acquisition des projections radiographiques :

L'acquisition des projections radiographiques permet de visualiser la projection de l'os dans le plan (y0z). Grâce aux études faites précédemment dans le laboratoire sur le rat (Cf articles de N. Bonnet et E. Lespessailles), les paramètres d'acquisition ont pu être optimisés afin d'améliorer la qualité de l'acquisition des projections. La tension et l'intensité de la source de rayons X ont été réglées à 70 kV et 100 μ A. Le pas de rotation pas à pas a été fixé à 0,45°, ce qui correspond à l'acquisition de 400 projections radiographiques. Un zoom $\times 28$ a été choisi pour obtenir un compromis entre la taille du pixel (11.16 μ m) et la taille de la zone d'étude (plus la taille du pixel est petite et plus la zone d'étude est restreinte). L'acquisition a servi à l'analyse de la microarchitecture trabéculaire et corticale.

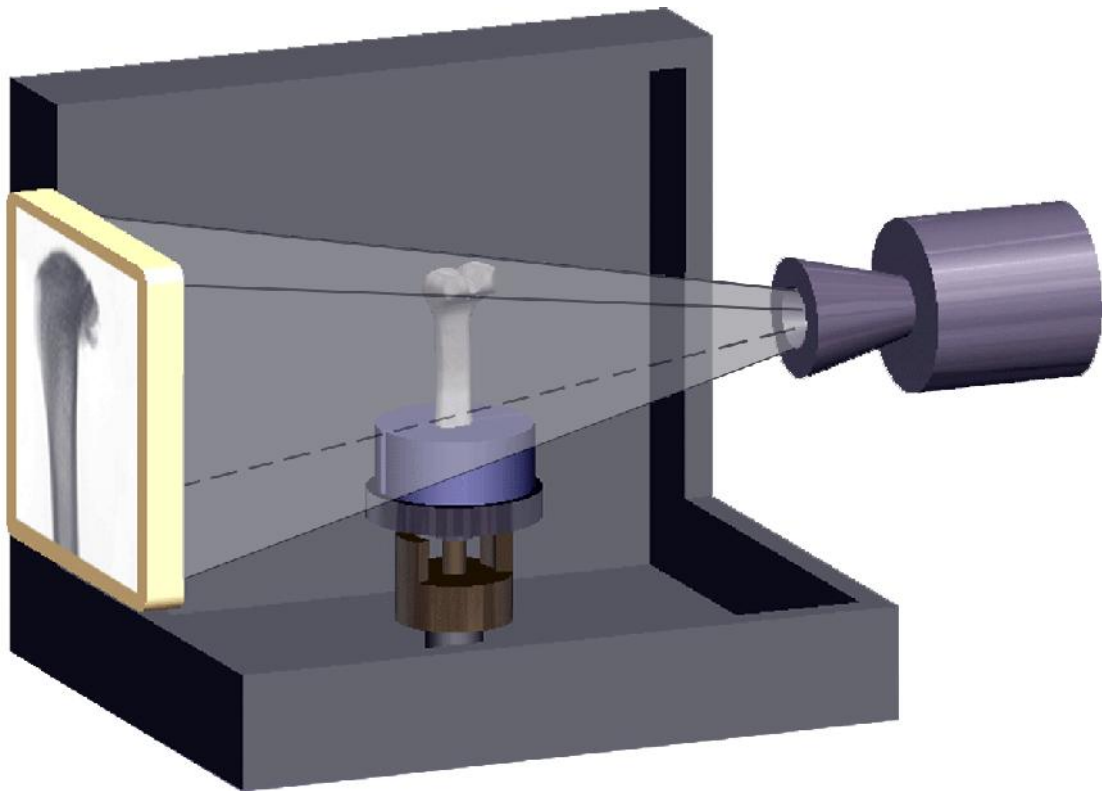


Figure 33 : Reconstitution du balayage de l'échantillon par les rayons X lors de l'acquisition au μ CT.

Une source de rayons X illumine l'objet et un écran plan reçoit les projections de l'objet (Figure 33). Comme l'échantillon est en rotation pendant l'acquisition, plusieurs centaines de vues de l'objet sont obtenues sous différents angles (Figure 35 A). Ces données sont récupérées par un ordinateur qui va créer un empilement de sections horizontales de l'objet (Figure 35 B). Cette technologie permet de descendre de section en section et d'analyser les structures internes de l'objet. Cela permet de calculer des

paramètres en 3 dimensions de l'objet (Figure 34) et de créer des reconstructions en 3 dimensions très réalistes de l'objet (Figure 35 C).

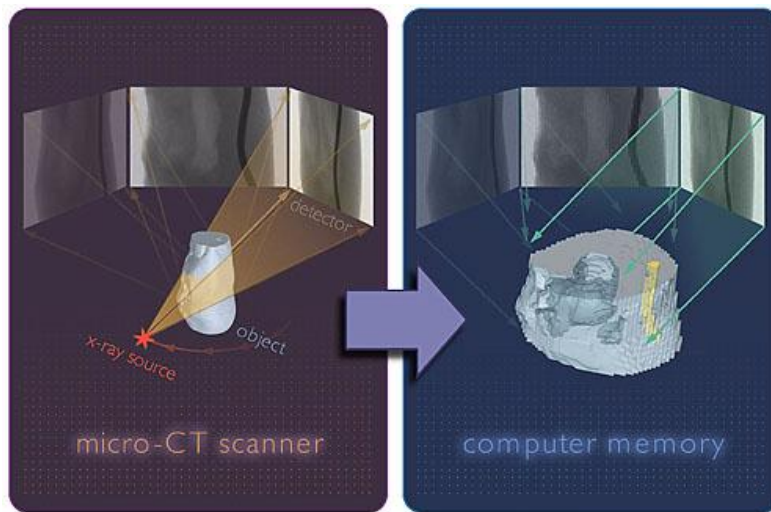


Figure 34 : Principe de la technique du μ CT : balayage de l'échantillon avec les rayons X puis reconstruction de la morphologie en 3D de l'échantillon.

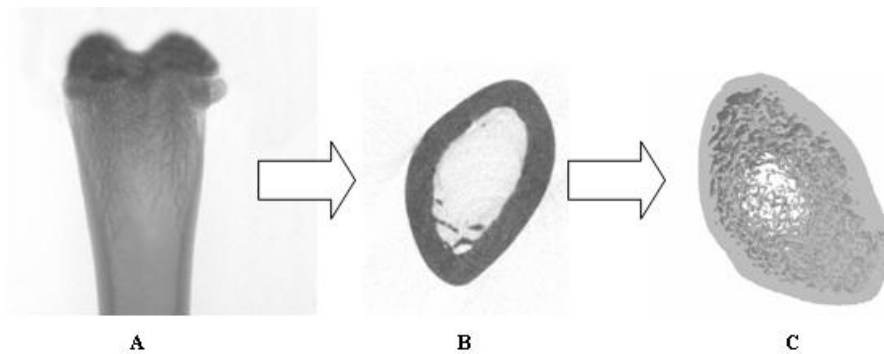


Figure 35 : Différentes étapes de la transformation de l'échantillon entre la phase d'acquisition, d'analyse et de reconstruction 3D.

Reconstitutions 3D

Un algorithme de reconstruction tomographique basé sur l'algorithme de Feldkamp permet l'obtention de 1024 coupes à partir des projections radiographiques de l'os. Une segmentation standardisée a été utilisée pour tous les os afin de minimiser les biais entraînés par le traitement de l'image. Cela a été réalisé avec le logiciel N-Recon (Skyscan, Belgique).

Régions d'intérêt

225 coupes ont été sélectionnées pour être analysées. Ces coupes étaient situées au-dessous de l'épiphyse distale (Figure 36). Nous avons sélectionné visuellement à l'écran la première coupe qui correspondait à la fermeture complète de l'os cortical. Pour obtenir les paramètres microarchitecturaux de l'os trabéculaire, nous avons sélectionné une région d'intérêt (ROI) purement trabéculaire en plaçant visuellement sur l'écran de l'ordinateur un polygone à la limite de la zone corticale, toutes les 30 coupes (Figure 37). L'ordinateur interpolait les polygones entre ceux positionnés toutes les 30 coupes par le chercheur (2D). L'ensemble de ces ROI constitue le volume d'intérêt (VOI).

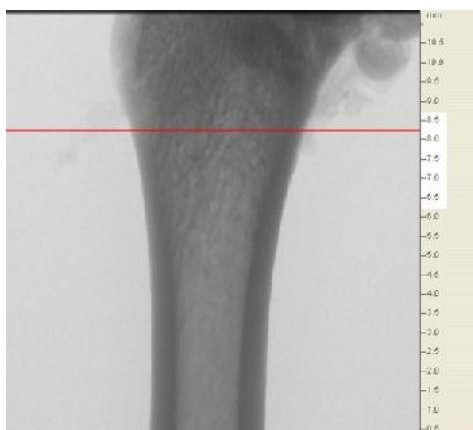


Figure 36 : Zone du fémur analysée pour évaluer la microarchitecture.

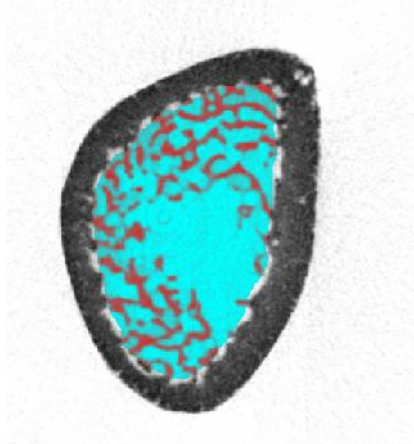


Figure 37 : Région d'intérêt pour l'analyse de l'os trabéculaire (métaphyse du fémur).

Pour l'os cortical, les mêmes 225 coupes sélectionnées sous l'épiphyse distale ont été analysées. En revanche sur ces coupes, nous avons tracé une ROI purement corticale, en traçant un polygone toutes les 30 coupes (Figure 38).

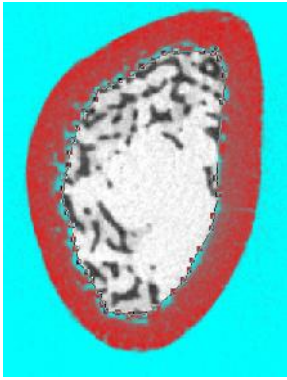


Figure 38 : Choix de la région d'intérêt pour l'analyse de l'os cortical (métaphyse du fémur).

Le seuillage

Le seuillage est la dernière étape avant le calcul des paramètres microarchitecturaux. Il consiste à séparer sur l'ensemble du VOI les niveaux de gris d'os trabéculaire, des niveaux de gris correspondant à la moelle ou au bruit de fond. La binarisation va permettre de définir si le niveau de gris visualisé est de l'os ou du vide. Pour déterminer le seuillage, un histogramme des niveaux de gris a été établi et adapté pour chaque échantillon par l'utilisateur (Figure 39). Différents histogrammes sont établis pour l'os trabéculaire et pour l'os cortical.

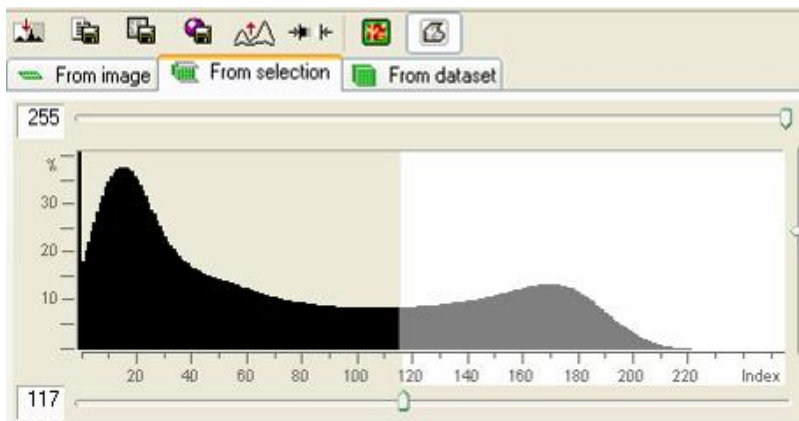


Figure 39 : Phase de seuillage qui déterminera le plein du vide sur les coupes 2D.

Suite à ces seuillages, l'analyse de l'os trabéculaire a été faite sur un niveau de gris compris entre 117 et 255. Tout niveau de gris inférieur à 117 était considéré comme du vide. Pour l'os cortical, les niveaux de gris choisis étaient de 60 à 100. Les niveaux de gris inférieurs à 60 ou supérieurs à 100 étaient considérés comme du vide. L'intérêt étant de caractériser les pores, qui sont du vide, le seuillage a été inversé.

Paramètres mesurés

Paramètres trabéculaires

Les paramètres de micro architecture ont été déterminés à l'aide du logiciel CT-An (CT analyser) (Figure 40).

Paramètres morphologiques : le rapport du volume des travées osseuses sur le volume de tissu osseux (BV/TV, en %), la densité de surface osseuse : rapport de la surface des travées osseuses sur le volume de tissu (BS/TV, en mm^2/mm^3), le nombre de travées osseuses (Tb.N, en 1/mm) sont calculés par le logiciel CT-An par la méthode du mean intercept length (MIL). L'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th, en mm) et l'espacement entre les travées osseuses (Tb.Sp, en mm) sont calculés par la méthode de la sphère (Hildebrand et Ruegsegger 1997).

Paramètres topologiques : le trabecular pattern factor (Tb.Pf, en 1/mm) est calculé à partir de deux mesures successives d'aire et de périmètre. Ce facteur est sensible à l'organisation des travées convexes (poutres) et concaves (plateaux). Plus le Tb.Pf est élevé et plus l'organisation des travées est en forme de poutres. Le structure model index (SMI) reflète également l'organisation des travées, de 0 (100% travées en forme de plateaux) à 3 (100% des travées en forme de poutres). Le degré d'anisotropie (DA) est calculé à partir du MIL (mean intercept length). Le DA caractérise l'orientation de la structure dans l'espace (Ulrich *et al.* 1999). Il renseigne sur la capacité du réseau tubulaire à supporter des contraintes dans différentes directions. Quand un degré d'anisotropie est proche de 1, l'os est isotrope : il a une résistance identique dans toutes les directions. Pour un degré d'anisotropie élevé, l'os est anisotrope, sa résistance varie selon les directions.

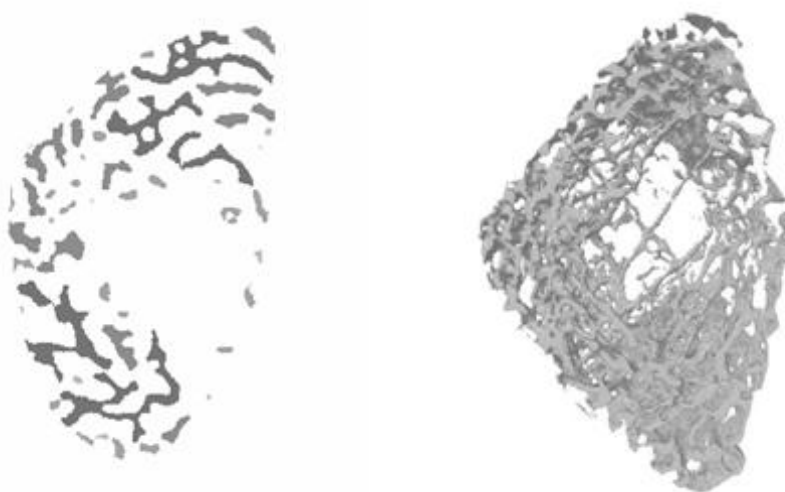


Figure 40 : Visualisation 2D de l'os trabéculaire, avant la reconstruction 3D du volume d'intérêt.

Paramètres corticaux

Les mêmes algorithmes ont été utilisés pour caractériser la porosité corticale avec le logiciel Ct Analyser (Figure 41). Les paramètres obtenus sont la porosité corticale Ct.Po (%), le nombre de pores Po.N (1/mm, équivalent au Tb.N), la taille des pores Po.Dm (mm, équivalent au Tb.Th), l'espacement entre les pores Po.Sp (mm, équivalent au Tb.Sp), et la densité de surface des pores PoS/PoV (mm^2/mm^3 , équivalent de BS/TV).



Figure 41 : Visualisation 2D de l'os cortical avant la reconstruction 3D de cette zone.

D. Macroarchitecture

Avant de réaliser les tests biomécaniques, différentes données morphométriques des sites osseux ont été mesurées. Pour une analyse complète de la corticale, l'épaisseur corticale Ct.Th a été mesurée avec le logiciel Image J, sur des coupes 2D acquises au μCT et reconstruites avec le logiciel N-recon (Figure 42). Les diamètres internes et externes ont également été déterminés. Ensuite, la hauteur du fémur gauche a été mesurée grâce à un pied à coulisse digital d'une précision de $1\mu\text{m}$ (Mitutoyo, Roissy, France).



Figure 42 : Mesure des diamètres internes et externes des os avec le logiciel Image J, et mesure de la hauteur du fémur avec un pied à coulisse.

E. Mesures biomécaniques

Dispositif

Les propriétés mécaniques du fémur ont été mesurées avec une méthode expérimentale de flexion à 3 points. Les essais de flexion visent surtout à analyser la résistance de l'os cortical. Les essais ont été réalisés avec une presse (Instron 3343, Melbourne, Australie) (Figure 44 A et B).

Principe du test de flexion 3 points

Nous avons choisi d'utiliser un test de flexion trois points pour analyser la résistance en flexion des os. Il représente le cas d'une poutre posée sur deux appuis simples et soumise à une charge concentrée, appliquée au milieu de la poutre avec un contact simple (Figure 43). Ce modèle a été validé dans notre laboratoire (Bonnet *et al.* 2005a).

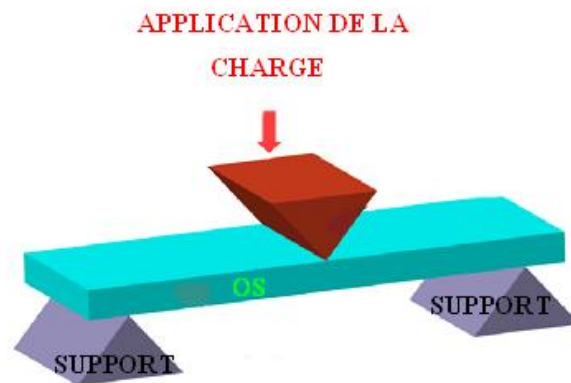


Figure 43 : Schéma d'un test de flexion 3 points.

Les os ont été décongelés 2h avant le début du test. Chaque os a été placé sur deux supports fixes horizontaux et soumis à une force verticale (contrainte uniforme) jusqu'à leur rupture (Figure 44 B). L'os a été placé de façon à ce que la charge soit appliquée perpendiculairement, et au milieu de la diaphyse. La largeur de chaque support était de 8 mm, l'espacement entre les supports inférieurs a été réglé à 20 mm et la vitesse de déplacement du bras supérieur a été fixée à 1mm/min. Le logiciel d'acquisition des données Instron Bluehill (logiciel Instron 3343) traçait simultanément l'évolution de la

force appliquée sur l'os en fonction du déplacement (Figure 44 C). Les données ont ensuite été analysées avec un tableur (Excel).

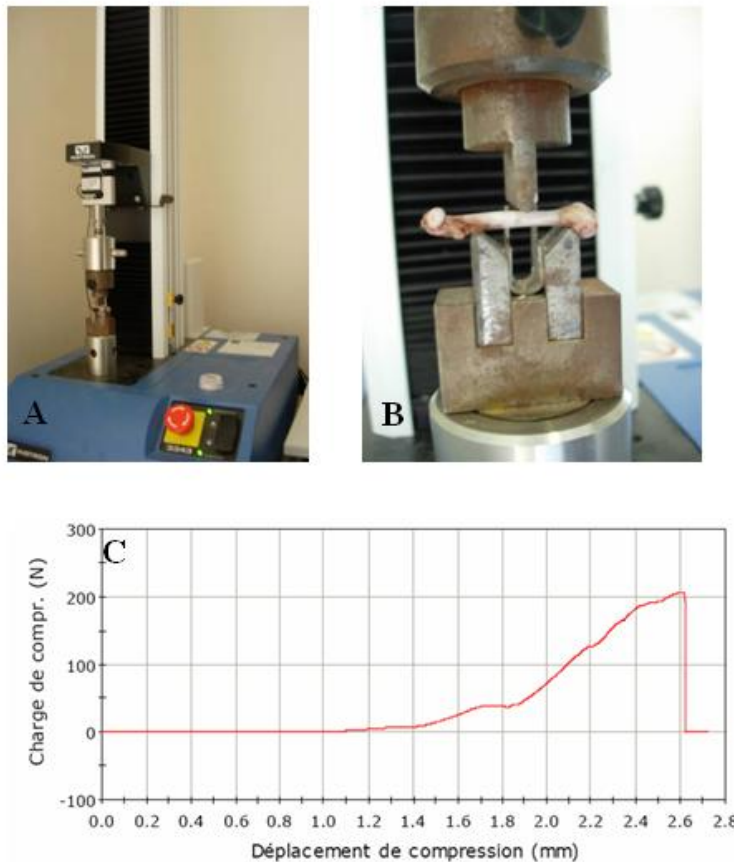


Figure 44 : Presse Instron Bluehill (A), positionnement du fémur sur la presse (B), et courbe charge/déplacement obtenue avec le test de flexion 3 points (C).

Paramètres mesurés

A partir des données de la courbe force/déplacement, il est possible de calculer les paramètres biomécaniques extrinsèques et intrinsèques suivants (Turner et Burr 1993) :

- La force maximale ($F_{\max}$ en N) correspondant au maximum de force que l'échantillon peut supporter avant de rompre
- La rigidité (R en N/mm) qui est représentée par la pente de la partie linéaire (élastique) de la courbe force/déplacement
- L'énergie à $F_{\max}$ (U en N.mm) qui est définie par l'aire sous la courbe force/déplacement
- La contrainte max ($\sigma_{\max}$ en MPa) qui correspond au maximum de contrainte supportée par l'échantillon avant rupture
- Le module d'Young (E en MPa)

Les paramètres extrinsèques sont calculés directement à partir des données force et déplacement enregistrées pendant les essais ($F_{\max}$, R, U).

Pour calculer les paramètres intrinsèques, il est nécessaire de connaître les valeurs géométriques de la section corticale (CSA), en supposant que l'on puisse assimiler la section à une ellipse :

$$CSA = (\pi /4) (AB-ab)$$

Où A est le diamètre extérieur antéro-postérieur, B est le diamètre extérieur médio-latéral, a est le diamètre médullaire antéro-postérieur et b le diamètre médullaire médio-latéral (Figure 45).

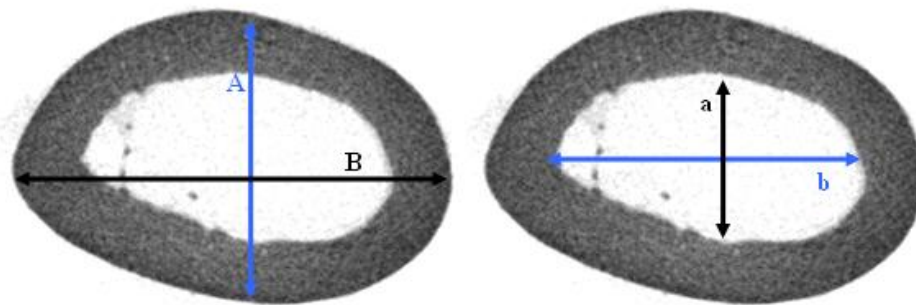


Figure 45 : Représentations des diamètres externes (A et B) et internes (a et b) servant à calculer les paramètres de résistance osseuse.

Pour calculer les valeurs de $\sigma_{\max}$ et de E, il est nécessaire de connaître la valeur du moment d'inertie I :

$$\text{Moment d'inertie : } I = (\pi /64) (A^3B-a^3b)$$

Ensuite il est possible de calculer les paramètres intrinsèques (propres à la taille de l'os):

$$\text{Contrainte maximale: } \sigma_{\max} = F_{\max} * L_0 * (A/2) / (4I)$$

$$\text{Module d'Young: } E = r * (L_0)^3 / 48I$$

Où L_0 représente la distance entre les deux supports ($L_0=20$ mm), I est le moment d'inertie et r la rigidité.

F. Dosages hormonaux et métaboliques

Certains dosages hormonaux et métaboliques ont été réalisés par ELISA, technique de dosage colorimétrique utilisant la réaction antigène-anticorps.

Principe d'un test ELISA

Un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est un dosage couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie. L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie, mais pas uniquement, afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme (Figure 46).

Schéma d'un test ELISA en sandwich

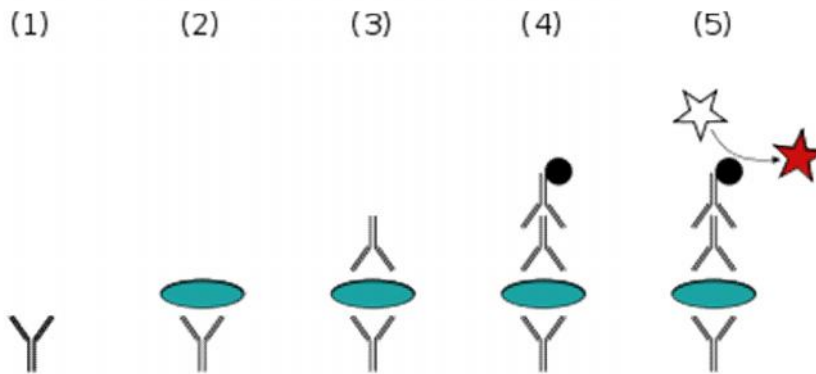


Figure 46 : Différentes étapes d'un dosage ELISA.

Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit :

1. La plaque est recouverte d'un anticorps dit de capture.
2. L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque et tout antigène présent se lie à l'anticorps de capture.
3. L'anticorps de détection est ajouté et se lie à l'antigène.
4. Les anticorps secondaires conjugués à l'enzyme sont ajoutés. Ils se lient à l'anticorps de détection.

5. Le substrat convertible est ajouté et est converti par l'enzyme en signal fluorescent ou coloré (détectable).

Le résultat est analysé dans un spectrophotomètre spécialement conçu pour accepter directement les plaques de 96 puits (Figure 47). Nous avons analysé nos dosages avec un spectrophotomètre ELx 800 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

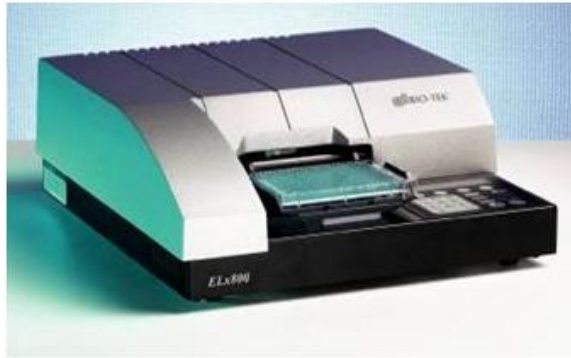


Figure 47 : Spectrophotomètre ELx 800.

Dosages de leptine

La concentration en leptine a été dosée par ELISA (TECOmedical, France) pour les études 2 et 5. La limite de détection du test était de 10 pg/mL et les coefficients intra- et inter-individuels donnés par le fabricant étaient inférieurs à 4,4% et 4,7% respectivement.

Dosages métaboliques

Des marqueurs du métabolisme osseux (NTx, CTx plasmatiques, OC), et lipidique (HDL, cholestérol total, TG sanguins) ont été mesurés dans le plasma à partir du prélèvement effectué le jour du sacrifice.

Les dosages liés au métabolisme osseux ont été réalisés au laboratoire à Orléans, avec des kits ELISA. Tous les dosages ont été effectués en duplicat. 10 plasmas par groupe ont été analysés. L'ostéocalcine, marqueur de la formation osseuse a été analysée avec le kit ELISA Metra® Osteocalcin Plus (Quidel® Corporation, San Diego, Ca, USA) pour l'étude 1. Les coefficients de variation intra and inter-individuels donnés par le fabricant étaient respectivement de 3,4 et 7,7% et la limite de détection de 0,45 ng.mL⁻¹. Pour les autres études, l'ostéocalcine a été évaluée avec un kit EIA (IDS, France). Les coefficients de variation intra et inter-individuels donnés par le fabricant étaient respectivement de 5,0% et 5,5% et la limite de détection était de 50

ng.mL⁻¹. La résorption osseuse a été analysée en étudiant la concentration plasmatique en télépeptides du collagène de type II (CTx) pour l'étude 1 avec le kit ELISA RatLapsTM ELISA (Nordic Bioscience, Herlev, Danemark). Les coefficients de variation intra et inter-individuels donnés par le fabricant étaient respectivement de 9,2 et 14,9 % et la limite de détection était de 2,0 ng.mL⁻¹. Les concentrations en N-terminal télépeptide collagénique de type I (NTx) ont été étudiées dans les autres études avec le kit Osteomark® (TECOmedical, France). Les coefficients de variation intra- et inter-individuels donnés par le kit étaient 4,6 et 6,9% respectivement et la limite de détection était 3,2 nM Equivalents Collagène Osseux/L (nM ECO/L).

Les concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol et cholestérol HDL ont été mesurées par enzymo colorimétrie dans le laboratoire de biochimie et toxicologie du CHU de Poitiers. Les coefficients de variation étaient de 0,85% et la limite de détection était de 0,05 mmol/L.

G. Analyse cellulaire par microscopie

Préparation des échantillons pour l'histologie

Après avoir été fixés entiers avec de la formaline pendant 4 jours, les tibias des rats des études 3 et 5 ont été placés dans de l'éthanol 70% pendant une semaine puis dans de l'éthanol 50%. Des coupes transversales d'une épaisseur d'environ 400 µm ont ensuite été réalisées sur la partie supérieure de la diaphyse du tibia, avec un outil multifonction rotatoire (Dremel 300, Dremel, USA). Les coupes ont été décalcifiées dans de l'EDTA 177 g/L, pH 7,0-7,3 (molarité 0,61 mol/L) (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) pendant 24h avant d'être colorées. Deux coupes ont été marquées avec des anticorps primaires et secondaires pour la microscopie en épifluorescence. D'autres coupes transversales ont été préparées pour la microscopie à fond clair (protocole décrit ci-après).

1. Microscopie en épifluorescence

Principe de la microscopie en épifluorescence

La microscopie en fluorescence (ou en épifluorescence) est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion (physique) ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle. On peut ainsi observer divers objets, substances (organiques ou inorganiques) ou échantillons d'organismes morts ou vivants.

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

En fluorescence on distingue deux types d'objets :

- les premiers émettent de la lumière fluorescente par eux-mêmes, on parle de « fluorescence primaire » ou autofluorescence (chlorophylle, huile...)
- les autres doivent être combinés à une substance fluorescente pour émettre de la fluorescence on parle donc de « fluorescence secondaire »

En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes. Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes, comme par exemple le DAPI qui fluoresce en bleu lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin.

Il existe différentes techniques de marquage. Nous avons utilisé l'immunomarquage pour nos expérimentations.

Grâce à différents filtres correspondant à différentes longueurs d'ondes, nous avons pu réaliser différents immunomarcages en même temps sur les mêmes coupes, et observer différentes molécules fluorescentes dans différentes longueurs d'ondes (Figure 48).

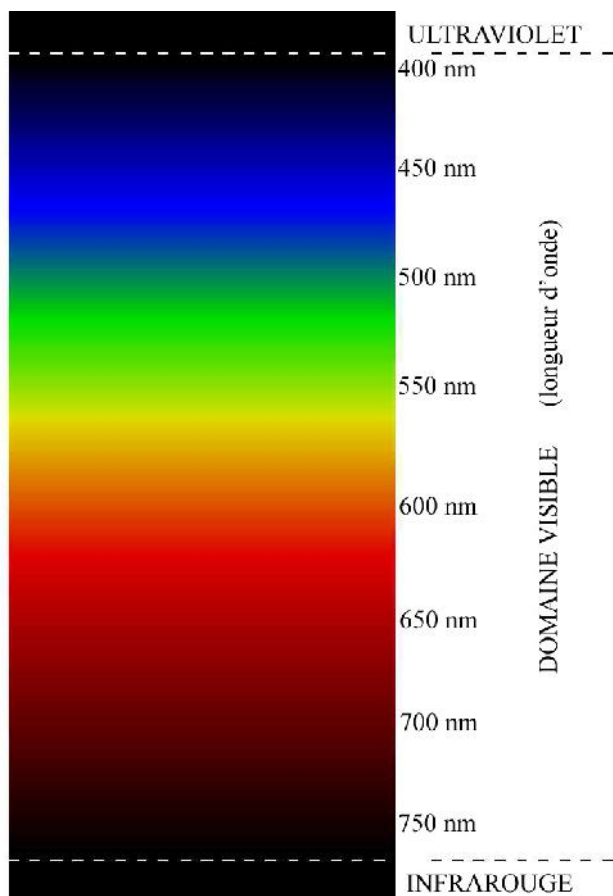


Figure 48 : Longueurs d'onde correspondant aux couleurs dans le domaine du visible.

Préparation des échantillons pour la microscopie en épifluorescence

Nous avons réalisé des immunomarquages avec différents anticorps primaires, révélés par des anticorps secondaires. Nous avons fait des marquages avec de la caspase-3 (Rabbit mAb Asp 175, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) qui est un marqueur de l'apoptose, avec du CD44 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) qui est un marqueur de l'ostéocyte dans l'os minéralisé et avec de l'ostéocalcine (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) et du collagène de type I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), marqueurs de la formation osseuse. Ces marquages primaires ont été révélés par des anticorps secondaires anti-lapin pour la caspase-3 et l'ostéocalcine, anti-souris pour le CD44 et anti-chèvre pour le collagène de type I. Ces anticorps secondaires ont été choisis dans différentes longueurs d'ondes afin qu'il n'y ait pas d'interférences entre les différents marquages. Nous disposons comme anticorps secondaires de DylightTM anti-souris 488 et anti-souris 549, de DylightTM anti-lapin 488 et anti-lapin 549 et de DylightTM anti-chèvre 488 et anti-chèvre 549 (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA), comme décrit précédemment par Vatsa *et al.* (Vatsa *et al.* 2008b). La longueur d'excitation pour le Dylight 488 était exactement 493 nm et la longueur d'onde d'émission de 518 nm, ce qui donnait la couleur verte au microscope sous excitation UV. La longueur

d'onde d'excitation pour le Dylight 549 était précisément de 550 nm et la longueur d'émission était de 568 nm, ce qui donnait la couleur rouge au microscope sous UV. Le DAPI, marqueur nucléaire a été déposé sur les coupes juste avant de sceller les lames concaves (Figure 49) et fluoresce en bleu.

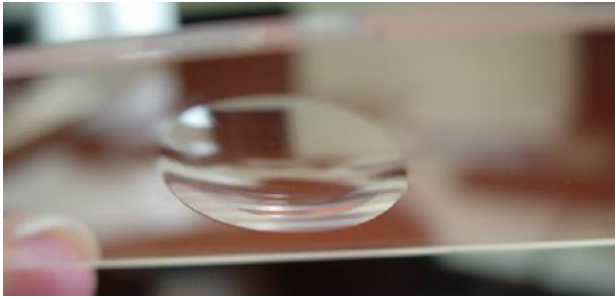


Figure 49 : Lames concaves utilisées pour la microscopie en épifluorescence et la microscopie confocale.

Acquisition des images

Les images des ostéocytes en microscopie en épifluorescence ont été réalisées avec une caméra Motic AE21 attachée à un microscope Microvision. Le zoom était de 10X. Cinq régions d'intérêt (ROI) ont été imagées pour chaque rat (7 par groupe), à différents endroits de l'os cortical. La taille de chaque ROI était d'environ 300000 μm^2 . Ainsi, la taille totale d'os cortical analysé était de 1,5 mm^2 pour chaque animal. Des images des marquages avec la caspase-3, le CD44, l'ostéocalcine, le collagène de type I et le DAPI ont été réalisées dans chaque ROI. Les images ont été analysées avec le logiciel Image J. Le nombre de cellules marquées avec la caspase-3, le CD44, l'ostéocalcine, le collagène de type I et le DAPI par mm^2 dans chaque ROI a été calculé.

2. Microscopie en fond clair de l'os cortical

Préparation des coupes pour la microscopie à fond clair

10 rats (5 dans chacun des groupes de l'étude 3) ont servi à l'analyse en microscopie à fond clair. Des morceaux de tibia ont été fixés dans de la paraffine et coupés au microtome (1 micron d'épaisseur), au département des Microscopies de la faculté de médecine de Tours. Les sections ont ensuite été colorées une minute à température ambiante avec une solution standard de bleu de toluidine, comme décrit par Trump *et al.* (Trump *et al.* 1961), avec modifications (Figure 50). Après cela, les sections ont été séquentiellement lavées 20 sec dans de l'eau distillée, 20 sec dans de l'éthanol 96%, et

lavées une nouvelle fois 5 sec avec de l'eau distillée. Après séchage sur une plaque chauffante (30 min à 60°C), les coupes ont été montées dans de la résine Epoxy et couvertes. Après polymérisation de la résine (48h à 60°C), les préparations ont été analysées en microscopie à fond clair. Les images de l'os cortical et de la moelle osseuse ont été acquises avec un microscope Axioplan (Zeiss, Allemagne), équipé d'une caméra couleur 11.2. Les images de l'os cortical ont été acquises avec un grossissement de 40X tandis que les images de la moelle osseuse ont été acquises à un grossissement de 20X.



Figure 50 : Coupes de tibia colorées au bleu de Toluidine.

Microscopie à fond clair de l'os cortical

Les images de l'os cortical coloré au bleu de toluidine ont été analysées avec le logiciel Image J. Pour chaque rat, cinq différentes régions d'intérêt (ROI) ont été analysées. Les ROI ont été choisies tout autour de la coupe afin d'avoir la meilleure représentation possible de l'échantillon d'os cortical. La taille de chaque ROI était d'environ 70000 μm^2 et de ce fait la taille de la région totale analysée représentait une surface d'environ 0,35 mm^2 , ce qui correspond à 5% de l'os cortical disponible, suivant le calcul de Power *et al.* (Power *et al.* 2001). La surface des lacunes a été déterminée avec le logiciel Image J en traçant à la main le contour de chaque lacune (Figure 51). Le nombre total de lacunes ostéocytaires par mm^2 , contenant un ostéocyte ou non à l'intérieur, a été compté.

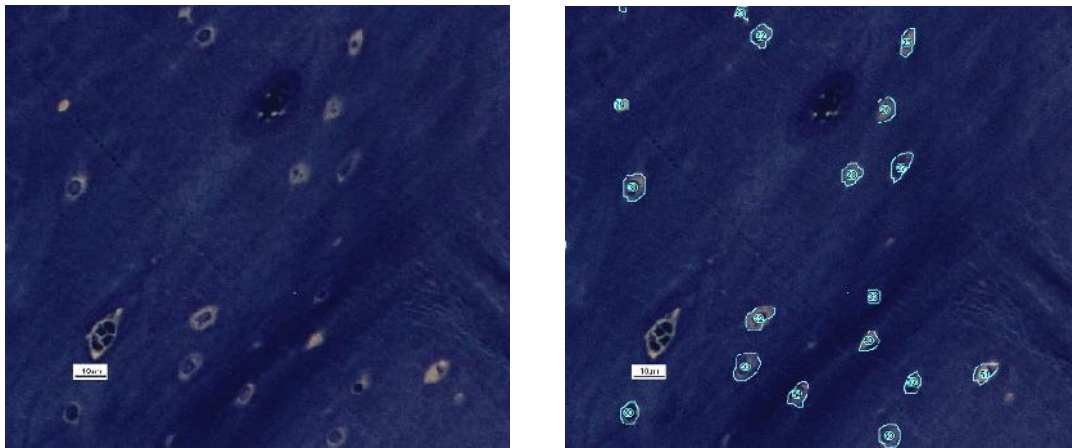


Figure 51 : Analyse de la taille des lacunes ostéocytaires sur des coupes colorées au bleu de Toluidine.

Microscopie à fond clair de la moelle osseuse

Quatre rats de chaque groupe ont été sélectionnés pour analyser la teneur en lipides dans la moelle osseuse. Pour chaque rat, quatre différentes ROI ont été choisies dans la moelle. Les ROI ont été analysées avec le logiciel Image J. Leur surface était d'environ 100000 μm^2 . De ce fait, la région totale analysée était de 0,4 mm^2 . Le nombre de gouttelettes lipidiques dans chaque ROI a été quantifié et la surface moyenne de chaque gouttelette a été mesurée en traçant le contour des gouttelettes à la main (Figure 52). Le diamètre des gouttelettes a été obtenu de la même manière.

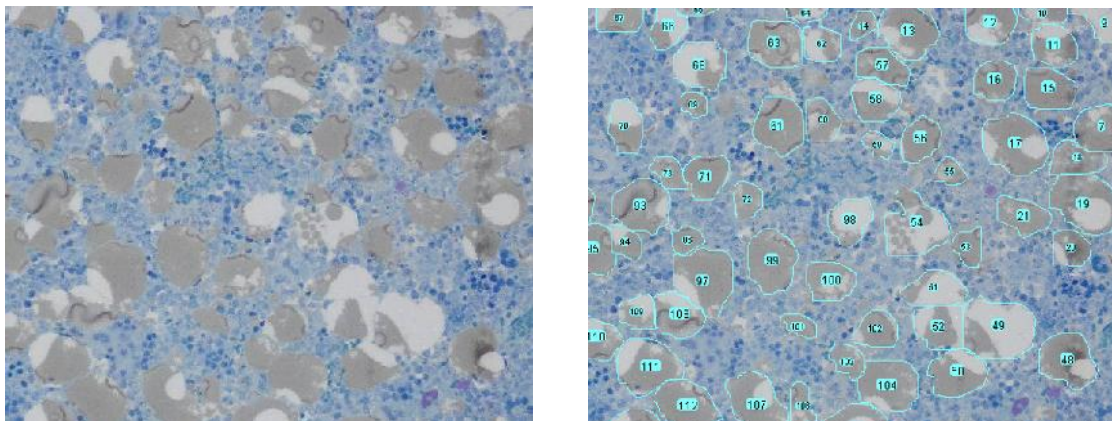


Figure 52 : Analyse de la taille des gouttelettes lipidiques dans la moelle sur des coupes colorées au bleu de Toluidine.

3. Microscopie électronique en transmission

Des coupes ultra-fines (75 nm) ont été réalisées au département des microscopies de la faculté de médecine de Tours sur le tibia (étude 3) avec un microtome Leica (Leica, Allemagne) (Figure 53).



Figure 53 : Microtome Leica (Allemagne).

Les coupes ont été placées sur des grilles de microscopie (EM), recouvertes de membranes de Formwar et teintées avec une solution d'acétate d'uranyle 4 % (w/v) (solution avec de l'eau pendant 20 min) et du citrate de plomb selon Reynolds (5 min) (Reynolds 1963). Les sections ont ensuite été imagées avec un microscope électronique JEM 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) équipé d'une caméra vidéo Gatan fonctionnant avec le logiciel Digital Micrograph (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

4. Microscopie confocale

Principe de la microscopie confocale

Un microscope confocal est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par un ordinateur.

Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence. La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière.

Acquisition des images en microscopie confocale

Les images de microscopie confocale ont été réalisées pour l'étude 3 sur des coupes de tibia (épaisseur environ 400 μm), immunomarquées avec de la caspase-3, du CD44 et du DRAQ 5 (marqueur nucléaire), comme décrit précédemment. Les images des ostéocytes en microscopie confocale ont été obtenues grâce à un microscope confocal laser Zeiss LSM 510 Meta couplé à un microscope inversé Zeiss (Axiovert 200M, Zeiss, Germany). Ces images ont été réalisées au Centre de Biologie Moléculaire, au CNRS d'Orléans. Un objectif Zeiss 40X à immersion dans l'huile a été utilisé pour les acquisitions, avec une ouverture numérique de 1,3 et une distance de travail de 210 μm . Un laser argon (longueur d'onde émise 488 nm) et deux lasers helium/neon (longueur d'onde émise 549 nm) ont été utilisés pour visualiser les marquages au CD44 (détecté par un anticorps secondaire conjugué au FITC), et à la caspase-3 (détecté par un anticorps secondaire conjugué au Texas Red) sur les coupes de tibia. Les longueurs d'émission ont été collectées à 520/40 nm et 600/40 nm. Les coupes séquentielles obtenues sur l'axe x-y, mesurant 1,1 μm d'épaisseur, ont été empilées sur l'axe z, séparées par un espace de 0,68 μm sur l'axe z. Une seule image représentant la projection de l'empilement des coupes sur l'axe z a ensuite été obtenue à l'aide du logiciel LSM Image Examiner (Figure 54).

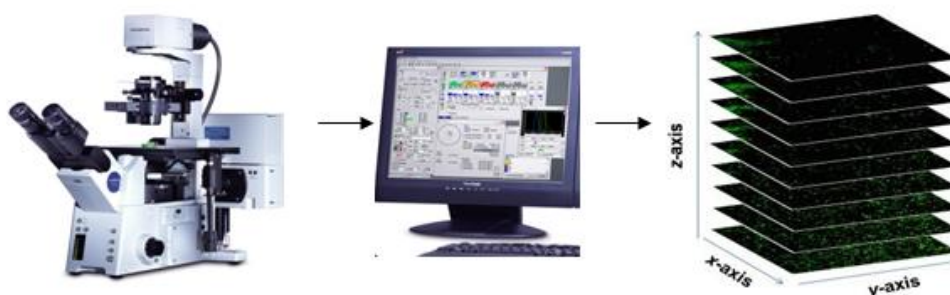


Figure 54 : Etapes de l'acquisition à l'obtention des images en microscopie confocale.

Nous avons choisi d'étudier nos échantillons de l'étude 3 en microscopie confocale afin de visualiser les ostéocytes en 3 dimensions. Nous avons utilisé cette technique pour observer l'alignement et l'orientation des ostéocytes dans l'os, parce qu'il a été montré auparavant que l'orientation des ostéocytes est différente selon l'os dans lequel ils se trouvent (Vatsa *et al.* 2008a), et qu'il peut être modifié dans différentes pathologies osseuses (Van Hove *et al.* 2009). L'orientation des ostéocytes pourrait influencer leur propriété mécano-sensitive.

VI. Statistiques

Les statistiques des études 1 à 5 ont été réalisées avec le logiciel Statview. Toutes les données des paramètres osseux (DMO, microarchitecture, résistance osseuse) sont exprimées sous forme de moyenne, plus ou moins l'écart-type (Sorensen *et al.*). Toutes les données métaboliques sont exprimées sous forme de moyenne, plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM).

La normalité de la distribution des valeurs pour chaque paramètre et pour chaque groupe a été testée avec le test de Shapiro-Wilk. L'homogénéité des variances a été vérifiée avec le test F de Fisher.

Quand les conditions de normalité et d'homogénéité étaient réunies, une ANOVA a été menée. Lorsque les conditions de normalité et d'homogénéité n'étaient pas réunies, des tests non paramétriques ont été choisis (un test de Kruskal-Wallis, suivi du test de Mann et Whitney lorsqu'il existait des différences significatives).

Une ANOVA à deux voies a été menée pour étudier les effets combinés de l'alcool et de l'exercice sur les paramètres osseux et la composition corporelle. Lorsqu'il y avait un effet de l'exercice, de l'alcool ou un effet combiné alcool $\times$ exercice, une analyse post-hoc a été menée (test de Tukey). Les corrélations ont été réalisées par le test de Spearman en non paramétrique et par le test de Pearson en paramétrique. Pour l'ensemble des études, la significativité est acceptée pour des valeurs de p strictement inférieures à 0,05.

ETUDE 1 : EFFETS COMBINES D'UNE CONSOMMATION CHRONIQUE ET MODEREE D'ALCOOL ET DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LE METABOLISME OSSEUX CHEZ LE RAT.

Cette étude a donné lieu à :

- la publication d'un article original :

Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffré C. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health. Study in a rat model. European Journal of Applied Physiology (2011), 111(12):2931-40. IF (2010)= 2.214

- des présentations lors de congrès nationaux et internationaux :

Présentations orales :

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Alcoolisme et exercice physique : effets d'une consommation chronique d'alcool sur le contenu minéral osseux, la masse osseuse, l'architecture osseuse et le métabolisme osseux chez le rat. Institut de Recherche Scientifique sur les Boissons (IREB), Paris, Décembre 2008.

Maurel DB, Boisseau N, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffré C. Alcoholism and exercise: effects of chronic alcohol consumption on bone mineral content, density, bone micro architecture and bone remodelling in the rat. European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Helsinki, Finlande, Juin 2009.

Communications affichées :

Maurel DB, Rochefort GY, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Bone micro-architecture, mineral density and content in rats femurs after a period of chronic alcohol abuse. International Bone Densitometry Workshop (IBDW), Foggia, Italy, Juin 2008.

Maurel DB, Rochefort GY, Boisseau N, Lespessailles E, Benhamou CL, Jaffré C. Bone metabolism, micro-architecture and densitometric measurement in rat femur after chronic alcohol consumption. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Montreal, Septembre 2008.

> Proceeding publié dans JBMR 2008, M239-S432.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Influence of endurance training on bone parameters in alcoholised rats. Pharmacologie, Physiologie et Thérapeutique (P2T), Marseille, Avril 2009.



I. Introduction

Les jeunes consomment de plus en plus d'alcool dans nos sociétés modernes. Les adolescents pratiquant une activité physique régulière ne font pas exception. Il a notamment été rapporté une corrélation entre la pratique sportive en équipe et la consommation d'alcool (Martens *et al.* 2006; Maughan 2006). Il a aussi été montré que les sportifs de haut-niveau (sports collectifs) boivent de l'alcool de façon plus dangereuse que les non sportifs et que les sportifs de sports individuels (Brenner et Swanik 2007; Ford 2007; Martens *et al.* 2006). Les effets bénéfiques d'une activité physique régulière sur la DMO sont bien connus, notamment dans le cas d'activités à impacts (judo, gymnastique). Elle entraîne un gain de DMO qui peut persister tout au long de la vie. Cependant, la consommation chronique d'alcool peut avoir des effets délétères sur le tissu osseux (Sampson *et al.* 1998; Turner 2000). Les effets combinés de la consommation chronique d'alcool et de la pratique physique régulière sont peu connus. Une seule étude a analysé si l'occurrence des fractures de fatigue était augmentée en combinant l'alcool à l'exercice, dans un modèle de consommation abusive d'alcool (35% de l'apport énergétique total quotidien - AETQ) chez le rat (Reed *et al.* 2002). Cette étude n'a pas pu mettre en évidence d'effets de l'exercice sur le tissu osseux, mais a observé une diminution de la formation osseuse, et de l'épaisseur des travées osseuses au niveau de la métaphyse du tibia suite à l'absorption d'alcool.

II. Objectif étude 1

Le but de cette étude a été d'analyser les effets combinés d'une alcoolisation chronique progressive modérée (jusqu'à 20% de l'AETQ) et d'un entraînement régulier, afin d'étudier les possibles effets préventifs de l'exercice physique chez le rat.

III. Méthodologie spécifique

48 rats âgés de 8 semaines ont été répartis en 4 groupes. Les rats des groupes alcool (A) et alcool+exercice (AE) ont été alcoolisés progressivement durant 6 semaines de 8% volume/volume jusqu'à 20% volume/volume, dose ensuite consommée pendant 2 semaines. Les groupes exercice (E) et alcool+exercice (AE) ont été entraînés sur tapis

roulant durant 8 semaines. Un groupe contrôle (C) a permis de comparer les effets des deux paramètres. La durée totale du protocole était de 8 semaines.

Une analyse de la densité osseuse au corps entier et au fémur, de la composition corporelle du corps entier, de la microarchitecture trabéculaire et corticale du fémur, et de la résistance osseuse du fémur a été réalisée. Des dosages de marqueurs du remodelage osseux (CTx et ostéocalcine) ont également été effectués.

IV. Résultats de l'étude 1

A. Apports hydriques et énergétiques

	Contrôle			Alcool			Exercice			Alcool+Exercice		
	pre	Post	p	pre	post	p	pre	post	p	pre	post	p
Apport énergétique/j (Kcal)	40,1 ± 3,2	35,8 ± 8,3	NS	56,6 ± 7,8 ^c	56,3 ± 6,9 ^c	NS	50,3 ± 9,8 ^c	51,2 ± 10,4 ^c	NS	49,2 ± 5,6 ^{c,a}	60,8 ± 6,5 ^{c,e}	0,007
Quantité boisson/j (mL)	14,3 ± 3,2	15,2 ± 3,3	NS	16,4 ± 3,0	10,9 ± 1,4 ^c	<0,05	14,3 ± 2,3	10,3 ± 1,3 ^c	<0,05	12,5 ± 2,0	10,4 ± 1,3 ^c	<0,05
Calories provenant alcool/j (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NS	12,2 ± 2,7 ^{c,e}	20,3 ± 2,8 ^{c,e}	0,003	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	NS	10,6 ± 2,3 ^{c,e}	18,7 ± 4,1 ^{c,e}	0,005

Tableau 10 : Apports hydriques et énergétiques durant l'étude pour les 4 groupes.

Pre: pré test. Post: post test. P: degré de significativité entre le pré test et le post test (p<0,05).

NS: pas de différence significative. ^c: différence significative avec le groupe C. ^a: différence significative avec le groupe A. ^e: différence significative avec le groupe E. ^{ae}: différence significative avec le groupe AE.

La quantité de boisson consommée a diminué entre les visites 1 (début de l'étude) et 3 (avant le sacrifice) dans les groupes A, E et AE. De plus, la quantité de boisson ingérée à la fin du protocole était plus faible dans les groupes A, E et AE par rapport au groupe contrôle (p=0,003). La quantité totale d'énergie consommée a augmenté entre les visites 1 et 3 dans le groupe AE (p=0,007), mais pas dans les trois autres groupes. Lors de la visite 3, la quantité d'énergie totale consommée était supérieure dans les groupes A, E et AE par rapport au groupe C (p<0,0001), et supérieure dans le groupe AE par rapport au groupe E (p=0,02).

B. Densité osseuse et composition corporelle

	Contrôle (n=10)	Alcool (n=10)	Exercice (n=8)	Alcool+Exercice (n=10)	P _{alcool}	P _{exercice}	P _{interaction}
Surface osseuse (cm²)	83,93 ± 3,70	81,54 ± 4,13	80,86 ± 3,10	80,82 ± 2,62	0,16	0,44	0,33
CMO corps entier (g)	14,59 ± 0,65	14,54 ± 0,69	13,95 ± 0,66	14,19 ± 0,52	0,0084	0,38	0,18
DMO corps entier (g/cm²)	0,174 ± 0,004	0,178 ± 0,005	0,173 ± 0,006	0,176 ± 0,005	0,0027	0,88	0,27
Poids (g)	515,76 ± 21,64	483,42 ± 24,66 _{c,e,ae}	473,56 ± 19,84	479,08 ± 19,43	0,012	0,77	0,011
Masse grasse (g)	95,33 ± 21,34	88,74 ± 23,41	82,04 ± 18,13 _{c,a}	82,63 ± 16,53 _{c,a}	0,077	0,0014	0,16
Masse maigre (g)	405,84 ± 31,01	380,14 ± 23,21 _{c,e,ae}	377,55 ± 7,70	382,28 ± 25,43	0,025	0,13	0,016

Tableau 11 : Poids, densités osseuses et compositions corporelles à la fin du protocole.

^c: différence significative avec le groupe C. ^a: différence significative avec le groupe A. ^e: différence significative avec le groupe E. ^{ae}: différence significative avec le groupe AE.

1. Composition corporelle

Nous avons constaté que les gains de poids et de masse maigre étaient significativement plus faibles dans le groupe A comparé aux autres groupes. L'augmentation de masse maigre était d'environ 60 à 70 % dans les groupes C, E et AE tandis qu'elle n'était que de 43% dans le groupe A. L'augmentation de masse grasse entre le début et la fin du traitement était significativement plus faible avec l'exercice physique, associé ou non avec la consommation d'alcool. Il y avait donc un effet négatif de l'alcool sur le gain de poids et de masse maigre, et un effet positif de l'exercice sur le gain de masse grasse. Le poids et la masse maigre du groupe AE n'étaient pas différents du groupe C (Tableau 11).

2. Contenu minéral osseux et densité

Après ajustement au poids, car il était non homogène entre les groupes en début d'étude, le CMO du groupe A était significativement supérieur par rapport aux groupes C et E (p=0,0084), et la DMO était significativement supérieure dans les groupes A et AE versus C (p=0,0027). La consommation modérée d'alcool a engendré une augmentation de la DMO et du CMO sur une période de 8 semaines (+25% et +15% respectivement) (Tableau 11).

C. Microarchitecture de l'os trabéculaire du fémur

Seule l'épaisseur des travées était modifiée. Elle était significativement plus élevée dans les groupes alcoolisés (Tableau 12).

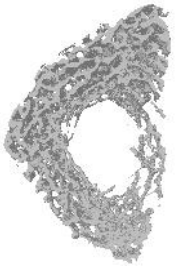
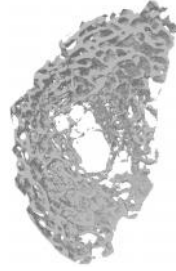
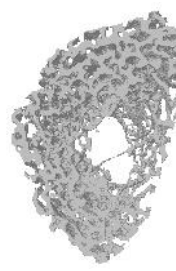
	C (n=9)	A (n=10)	E (n=8)	AE (n=10)	P _{alcool}	P _{exercice}	P _{interaction}
							
BV/TV (%)	15,67 ± 3,25	16,67 ± 4,40	16,48 ± 3,56	18,69 ± 5,57	0,27	0,33	0,68
BS/BV (mm ² /mm ³)	40,99 ± 3,69	39,86 ± 4,50	42,59 ± 4,34	39,02 ± 5,37	0,13	0,80	0,42
Tb.Pf	8,59 ± 2,09	8,32 ± 3,06	8,75 ± 1,63	7,44 ± 3,33	0,38	0,68	0,56
SMI	1,68 ± 0,19	1,73 ± 0,25	1,74 ± 0,24	1,61 ± 0,35	0,66	0,73	0,34
Tb.Th (mm)	0,095 ± 0,007	0,099 ± 0,008 ^{c,e}	0,092 ± 0,004	0,098 ± 0,007 ^{c,e}	0,029	0,56	0,73
Tb.N (1/mm)	1,66 ± 0,33	1,67 ± 0,33	1,78 ± 0,35	1,89 ± 0,52	0,63	0,19	0,70
Tb.Sp (mm)	0,63 ± 0,22	0,63 ± 0,15	0,58 ± 0,17	0,57 ± 0,17	0,91	0,38	0,99
DA	2,45 ± 0,25	2,37 ± 0,39	2,56 ± 0,28	2,67 ± 0,40	0,88	0,091	0,41

Tableau 12 : Microarchitecture de l'os trabéculaire du fémur.

^c : différence significative avec le groupe C. ^e : différence significative avec le groupe E.

D. Microarchitecture de l'os cortical du fémur

	C (n=9)	A (n=10)	E (n=9)	AE (n=10)	P _{alcool}	P _{exercice}	P _{interaction}
Ct.Po (%)	1,59 ± 0,26	1,44 ± 0,44	1,63 ± 0,25	1,72 ± 0,36	0,75	0,16	0,29
Po.Dm (mm)	0,046 ± 0,002	0,044 ± 0,003	0,046 ± 0,004	0,047 ± 0,005	0,70	0,49	0,30
Po.Sp (mm)	1,05 ± 0,08	1,14 ± 0,19	1,04 ± 0,08	1,05 ± 0,09	0,18	0,18	0,31
PoS/PoV (mm ² /mm ³)	142,61 ± 13,00	147,21 ± 22,93	143,13 ± 17,58	132,00 ± 21,71	0,61	0,25	0,22
Po.N (1/mm)	0,345 ± 0,044	0,321 ± 0,083	0,356 ± 0,041	0,370 ± 0,068	0,80	0,15	0,35

Tableau 13 : Microarchitecture de l'os cortical du fémur.

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes au niveau de la microarchitecture de l'os cortical (Tableau 13).

E. Propriétés biomécaniques du fémur

La taille de la section corticale était significativement inférieure dans les groupes entraînés, comparés aux groupes C et A (Tableau 14).

	C (n=11)	A (n=11)	E (n=9)	AE (n=9)	P _{alcohol}	P _{exercice}	P _{interaction}
Force max (N)	127,11 ± 13,77	127,95 ± 15,59	121,67 ± 10,20	125,50 ± 13,08	0,59	0,36	0,73
Contrainte (N/mm²)	156,16 ± 13,38	155,81 ± 14,81	165,97 ± 8,29	155,87 ± 11,69	0,20	0,22	0,23
CSA (mm²)	7,41 ± 0,46	7,44 ± 0,61	6,80 ± 0,37 ^{c,a}	7,16 ± 0,71 ^{c,a}	0,27	0,017	0,35
Module d'Young (Mpa)	6664,49 ± 802,26	6680,62 ± 791,92	7228,10 ± 785,41	6584,93 ± 829,61	0,23	0,36	0,20
Rigidité (N/m)	260,06 ± 22,08	264,96 ± 23,92	246,64 ± 15,95	255,67 ± 18,03	0,29	0,091	0,75
Energie max (N.m)	86,06 ± 20,44	79,57 ± 24,38	66,66 ± 23,73	74,64 ± 18,62	0,92	0,090	0,31

Tableau 14 : Propriétés biomécaniques du fémur.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. CSA : Surface de la section corticale.

F. Remodelage osseux

	Contrôle (n=12)	Alcool (n=12)	Exercice (n=9)	Alcool+Exercice (n=10)	p _{alcohol}	P _{exercice}	P _{interaction}
Ostéocalcine (ng/mL)	24,58 ± 4,70	21,49 ± 5,22	27,12 ± 4,44 ^{c,a}	27,49 ± 7,75 ^{c,a}	0,44	0,018	0,33
CTx (ng/mL)	49,00 ± 32,60	103,34 ± 20,92 ^c	127,65 ± 16,40 ^{c,a}	129,63 ± 37,45 ^{c,a}	0,0025	<0,0001	0,0046

Tableau 15 : Concentration des marqueurs du remodelage osseux.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A.

Les concentrations d'ostéocalcine étaient significativement supérieures dans les groupes entraînés (E et AE) comparés aux groupes non entraînés (C et A) (+18%). Les concentrations en CTx étaient significativement plus élevées dans les groupes A, E et AE comparé au groupe C (+111%, +161% et +165% respectivement), et également plus élevées dans les groupes E et AE versus A (+24% et +25%) (Tableau 15).

V. Discussion

Le but de cette étude était d'analyser les effets d'une consommation modérée et progressive d'alcool combinée ou non à un entraînement chez des rats en croissance. La composition corporelle a été modifiée par la consommation d'alcool. Les rats du groupe A avaient un gain de poids et de masse maigre inférieurs aux autres groupes. En revanche, l'exercice a limité la prise de masse grasse dans les deux groupes entraînés par rapport aux groupes C et A. Cet effet bénéfique de l'exercice a déjà été rapporté dans la littérature (Kyle *et al.* 2004). De plus, l'exercice physique semble prévenir le moindre gain de poids et de masse maigre induits par la consommation chronique d'alcool. Après ajustement par le poids (en raison d'une non homogénéité en début d'étude), une augmentation de la DMO et de l'épaisseur trabéculaire ont été observées dans les groupes alcoolisés. La quantité d'alcool a augmenté progressivement dans notre protocole et les faibles doses administrées au début de l'étude ont pu avoir un effet bénéfique sur la DMO, comme cela a été rapporté dans la littérature (Fanti *et al.* 1997; Ganry *et al.* 2000). L'exercice n'a pas eu d'effet

additif sur la DMO, déjà augmentée par la consommation d'alcool. Dans les études rapportant un effet anabolique de l'exercice sur l'os, les sessions d'entraînement journalières étaient plus longues (1 h/jour). L'épaisseur des travées osseuses était supérieure dans les groupes alcoolisés comparés aux autres groupes. Cette augmentation est certainement le reflet des faibles doses d'alcool ingérées par les rats au début du protocole. Il semble qu'une faible consommation d'alcool durant une courte période n'ait pas d'effet négatif sur la microarchitecture osseuse en comparaison avec des doses plus élevées. L'effet positif de l'alcool sur la DMO semble être dû à une augmentation de l'épaisseur trabéculaire, étant donné l'absence de modifications des paramètres de microarchitecture corticale dans cette étude. L'exercice physique associé à la consommation d'alcool semble prévenir les altérations du remodelage osseux chez les rats alcoolisés qui n'ont pas été entraînés. En effet, dans le groupe A, la résorption osseuse était supérieure et la formation osseuse tendait à diminuer par rapport au groupe C. L'activité physique associée à une consommation chronique d'alcool a augmenté à la fois la formation et la résorption osseuse par rapport aux groupes contrôle et alcool seul. Cela montre un remodelage osseux plus actif avec l'exercice physique, ce qui a été montré dans plusieurs études.

En conclusion, une consommation modérée d'alcool durant une courte période améliore la masse, la densité osseuse et l'épaisseur trabéculaire. Cependant, cette consommation modérée d'alcool durant 8 semaines a diminué le gain de poids, de masse maigre et le remodelage osseux, ce qui n'a pas été observé lorsque l'alcool était associé à de l'exercice physique. Ces résultats suggèrent qu'une consommation modérée d'alcool associée à un entraînement régulier n'altère pas la masse et la densité osseuse sur du court terme. En revanche, comme le remodelage osseux et la composition corporelle ont été modifiés par la consommation d'alcool régulière, une alcoolisation prolongée pourrait être néfaste pour l'os.

Si cette consommation d'alcool a eu un effet positif sur le tissu osseux, le seuil à partir duquel l'alcool diminue la DMO n'est pas connu. De plus, les effets d'une consommation chronique élevée sur la porosité corticale n'ont jamais été analysés. Nous avons mené l'étude suivante dans le but de déterminer à partir de quelle dose l'alcool peut avoir un effet délétère sur l'os. Nous cherchions également à d'observer la présence ou non d'un effet-dose.

Article 1

Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: study in a rat model

Delphine B. Maurel · Nathalie Boisseau ·
Isabelle Ingrand · Eric Dolleans ·
Claude-Laurent Benhamou · Christelle Jaffre

Received: 30 September 2010 / Accepted: 8 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Chronic alcohol consumption may be deleterious for bone tissue depending on the amount of ethanol consumed, whereas physical activity has positive effects on bone. This study was designed to analyze the effects of moderate alcohol consumption on bone in trained rats. 48 male Wistar rats were divided into four groups: control (C), alcohol (A), exercise (E) and alcohol + exercise (AE). A and AE groups drank a solution composed of water and ethanol. E and AE groups were trained for 2 months (treadmill: 40 min/day, 5 times/week). Body composition and bone mineral density (BMD) were assessed by dual X-ray absorptiometry and microarchitectural parameters using micro-computed tomography. Serum osteocalcin and CTx were determined by ELISA assays. The body weight and lean mass gain were lower in group A, while the fat mass gain was lower in exercised groups. BMD and BMC were higher with alcohol after body weight adjustment. Trabecular thickness was significantly higher in AE and A groups compared to C and E; cross-sectional area was

larger in A and C groups compared to AE and E. CTx levels were higher in A compared to C and in AE and E versus C and A. Osteocalcin levels were significantly greater in AE and E groups versus C and A. In conclusion, the light to moderate alcohol consumption over a short period increased the trabecular thickness, BMC and BMD in A and AE groups. However, we observed alterations in bone remodeling and body composition with alcohol, at the end of the protocol, which did not appear when alcohol was combined to exercise.

Keywords Alcohol · Exercise · Bone remodeling · Bone density · Rats

Introduction

It is well known that regular physical activity limits the risk of a number of critical health problems, including obesity, heart disease, stroke, colon cancer, diabetes and osteoporosis (Education 2000; Koo et al. 2010). For these reasons, physical activity is encouraged throughout life. However, in adolescents and young adults, there have been conflicting findings regarding the relationship between sports involvement, alcohol, tobacco and other drug consumption (Davis et al. 1997; Ewing 1998; Garry and Morrissey 2000; Rainey et al. 1996).

In non-professional athletes, sport participation among adolescents and adults may be associated with significant alcohol consumption (Garry and Morrissey 2000; Hoffmann 2006; Rainey et al. 1996). Different studies indicate that total alcohol consumption is greater in male athletes compared to their sedentary counterparts (Aaron et al. 1995) and appears more frequent in male than in female athletes (Hoffmann 2006). Studies of non-professional elite

Communicated by Susan A. Ward.

D. B. Maurel · E. Dolleans · C.-L. Benhamou · C. Jaffre
INSERM Unit 658, Caractérisation du Tissu Osseux par
Imagerie: Techniques et Applications, Hôpital Porte Madeleine,
1 rue Porte Madeleine, BP 2439, 45032 Orléans Cedex 01,
France

N. Boisseau (✉)
Laboratoire de Biologie des Activités Physiques et Sportives
(BAPS, EA 3533), 24 avenue des Landais, BP 26,
63177 Aubière Cedex, France
e-mail: Nathalie.BOISSEAU@univ-bpclermont.fr

I. Ingrand
Epidémiologie et Biostatistique, INSERM CIC 802,
CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Poitiers, France

sports-people (typically in university or United States college athlete settings) show that they have higher rates of hazardous drinking than non-sporty people and non-elite sports-people (Martens et al. 2006; O'Brien et al. 2005).

It has been shown in males that chronic alcohol consumption decreases bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone formation (Alvisa-Negrin et al. 2009; Malik et al. 2009). The decrease of bone formation could be due to an inhibition of the proliferation and activity of the osteoblasts (Klein 1997; Nyquist et al. 1996; Turner 2000; Wezeman et al. 1999). Chronic alcohol consumption also increases the risk of fractures (Chakkalakal 2005) and is a cause of osteoporosis in males (Peer and Newsham 2005).

On the other hand, physical exercise has been shown to improve BMC and BMD, especially weight-bearing physical activities (Cauley et al. 2005; Greendale et al. 1995; Karlsson et al. 2008). These beneficial effects on bone mass and density persist for some time (Kontulainen et al. 2001; Nordstrom et al. 2006).

To date and to our knowledge, only one study has analyzed the combined effects of ethanol consumption and regular exercise on bone. This rat study was performed in order to assess a greater potential risk of fracture (Reed et al. 2002). The authors recorded a lower bone formation with alcohol consumption but did not show an improvement of BMC, BMD or alterations of bone microarchitecture following physical training.

The aim of this study was to analyze the combined effects of physical activity and chronic alcohol consumption on bone. As a human study is not practicable for ethical reasons, we designed a study using a rat model to assess the effects of alcohol and exercise on bone mass, density, microarchitecture and bone remodeling.

Materials and methods

Forty-eight male Wistar rats (Animal Production Center, Olivet, France) were acclimatized for 2 weeks and maintained in a constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) environment and under 12 h/12 h light–dark cycles during the experiment. Rats were housed, two per standard cage, and provided with a commercial standard diet (A04, Safe, France).

The rats were 8 weeks old at baseline. At 10 weeks of age, the rats were chosen at random and assigned to one of the following groups: controls (C), alcohol (A), exercise (E) or alcohol + exercise (AE).

The protocol lasted 8 weeks. Food was consumed ad libitum. The quantities of food and drink ingested were recorded weekly for all groups. The weights of the rats have been measured at 8, 12 and 16 weeks of age.

After killing, the femurs were excised and cleared of fat and connective tissues. The bones were placed in plastic tubes and frozen at -20°C for microarchitecture assessment and biomechanical tests.

The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'agriculture, France, Authorization INSERM45-001).

Alcohol protocol

The rats of the alcohol (A) and alcohol + exercise (AE) groups drank ad libitum a solution of ethanol and water for 8 weeks. The percentage of ethanol in the solution was progressively increased over 6 weeks from 8 to 20% volume/volume, to mimic progressive chronic alcohol consumption. The lowest alcohol dose represented 10% of the caloric intake as alcohol, and was equivalent to a consumption of 3–4 glasses of ethanol per day for men. Then the dose was increased to 12, 15, 17 and 20% volume/volume. The 20% volume/volume alcohol dose was given in the two last weeks of the protocol. This was equivalent to 3 g/kg/day in the rat, and mimicked a consumption of seven glasses of alcohol per day for humans. The food and beverage intake was recorded daily.

Exercise protocol

The rats of the exercise (E) and alcohol + exercise (AE) groups were trained 40–45 min, 5 days a week for 8 weeks. During the first week, the treadmill speed and the duration of each running session were gradually increased from 10 m/min for 15 min to 22.5 m/min for 40–45 min. Maximal aerobic speed (MAS) (Chavassieux et al. 1993), defined by Leger and Boucher (1980) as a good marker of physical activity, was determined to confirm that our treadmill training corresponded to moderate exercise. MAS was measured at the end of the first week of the treadmill training. The measurement protocol has been previously described (Boissiere et al. 2008). The intensity of the exercise training sessions corresponded to 50% of the maximal aerobic speed.

Measures

Body weight, fat mass and lean mass

Body weight, lean mass and fat mass were measured at baseline and after 4 and 8 weeks by DXA (Discovery, Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) using a specific rat body composition mode. The root-mean square CV of whole body fat mass was 3.8%. It was determined from two repeated measures with repositioning on 30 animals.

BMC and BMD measurements

In vivo BMC and BMD of the whole body were measured at baseline and after 4 and 8 weeks by DXA using a Discovery Hologic apparatus adapted to small animals. This device has been validated in animals and is commonly used in the literature (Nagy et al. 2001). In order to perform the in vivo exam, the rats were anesthetized with pentobarbital diluted in sodium chlorure (50/50 v/v).

Morphological and topological characteristics of the trabecular bone

The microarchitecture of the distal metaphysis of the femoral bone was studied using μ CT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium). We chose this region because it is rich in cancellous bone. The characteristics and methods have already been described elsewhere (McLaughlin et al. 2002). The X-ray source was set at 70 kV and 100 μ A, with a pixel size of 11 μ m. Four hundred projections were acquired over an angular range of 180° (angular step of 0.45°). The image slices were reconstructed using the cone-beam reconstruction software version 2.6 based on the Feldkamp algorithm. The acquired image data sets were segmented into binary images. Two hundred and twenty-five slices were selected under the cartilaginous bone. Because of the relatively good resolution of the data sets, simple global threshold methods were used. The trabecular bone was extracted by drawing ellipsoid contours with 'CT analyzer' software (Skyscan). The parameters analyzed were: the tissue volume TV (mm^3), the trabeculae bone volume BV (mm^3), the bone volume fraction BV/TV (%), the tissue surface TS (mm^2), the bone surface BS (mm^2), the ratio of bone surface to bone volume BS/BV (mm^2/mm^3), the trabeculae thickness Tb.Th (mm), the trabeculae number Tb.N (1/mm), the trabeculae spacing Tb.Sp (mm) (Bourrin et al. 1992), the trabecular pattern factor Tb.Pf, the structure model index SMI and the degree of anisotropy DA which defines the preferred orientation of the trabeculae.

The use of 3D microtomography to evaluate bone with ethanol treatment has been validated previously (Lima et al. 2008).

Morphological characteristics of cortical bone

Cortical bone was analyzed in the femoral mid-diaphysis using μ CT. The characteristics and methods have already been described elsewhere (Bonnet et al. 2007a). The acquisition characteristics were the same as those used for the trabecular bone. After reconstruction, cortical bone was extracted by drawing polygonal contours with "CT analyzer" software. Before inversion of the image, simple

global threshold methods were applied, and the algorithms developed for trabecular bone analysis used to characterize the cortical porosity network. Porosity (BV/TV equivalent) labeled Ct.Po and pore number (Tb.N equivalent) labeled Po.N were measured with the MIL method. The pore diameter Po.Dm (Tb.Th equivalent) and pore spacing Po.Sp (Tb.Sp equivalent) were derived from the Hildebrand method and the total surface represented by the pores in the total pore volume PoS/PoV (BS/BV equivalent) was derived from the triangulation method.

Bone mechanical tests

Mechanical properties of the left femur were assessed by a three-point bending test. Four hours before the mechanical test, the bones were thawed at room temperature. Each bone was secured on the two lower supports of the anvil of a Universal Testing Machine (Instron 3343, Instron, Melbourne, Australia). The width of these supports was 8 mm, and the distance between the two supports was 20 mm. The cross-head speed for all tests was 1 mm/min. Load–displacement curves were recorded using specialized software (Instron 3343 software). Biomechanical properties were calculated from these curves: ultimate force (the maximal force supported by the bone before fracture, N); energy to ultimate force (work required to fracture the bone, N.m) and stiffness (extrinsic rigidity of the femur, N/m). Stress (N/mm^2) and Young's modulus (modulus of elasticity, MPa) were determined by the equations previously described by Turner and Burr (1993). This protocol has been described before (Bonnet et al. 2007b). To ensure good reproducibility between measurements, the femur was always mounted so that the cross-head could be applied in the middle of the bone.

Biochemical analysis

Bone remodeling has been analyzed from blood samples taken the day of the absorptiometry and before killing. The blood was centrifuged and the serum was frozen at -80°C . The markers assayed to evaluate bone remodeling were osteocalcin (OC) for bone formation and the C-terminal collagen cross-links (CTX) for bone resorption. Serum was assayed in duplicate by ELISA. The osteocalcin concentration was measured with the commercial kit Metra[®] Osteocalcin (Quidel Corporation, USA). Intra and inter-assay CV was, respectively, 3.4 and 7.7% and the detection limit was 0.45 ng/mL. CTx assays were performed with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Crosslaps kit[®] (Nordic Bioscience Diagnostics, Denmark). Intra and inter-assay CV were 9.2 and 14.9%, respectively, and the detection limit was 2.0 ng/mL.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Relative differences (Δ = post-test – pre-test/pre-test) were analyzed for body composition parameters; the absolute value was analyzed for the variables measured postmortem (post-test). Analysis of the combined effects of alcohol and exercise on selected variables used a two-factor model of analysis of variance (ANOVA) including alcohol and exercise main effects and interaction between alcohol and exercise. Post hoc Tukey multiple comparisons tests were performed following significant ANOVA models. Normal distribution and homogeneity of variances have been checked on ANOVA residuals. All analyses used the SAS software version 9.1 with significant level of difference set at $P < 0.05$.

Results

Food and beverage intake (Table 1)

The beverage intake decreased between visit 1 (beginning of the protocol) and visit 3 (before killing) in A, E and AE groups. Moreover, the beverage intake at the end of the protocol was lower in A, E and AE groups compared to controls ($P = 0.003$). The total energy intake increased between visit 1 and visit 3 in AE group ($P = 0.007$), but not in C, A and E groups. At visit 3, the total energy intake was higher in A, E and AE groups versus C ($P < 0.0001$), and higher in AE versus E ($P = 0.02$). The calories provided by alcohol per day were increased between visit 1 and 3 for A and AE groups, and were higher at visit 1 and at visit 3 in A and AE compared to C and E groups ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$).

Body composition, fat mass and lean mass (Table 2)

The body weight gain was significantly lower in group A compared to the other groups ($\Delta = 94.31 \pm 14.77$, 62.86 ± 17.99 , 80.27 ± 22.54 and 80.42 ± 16.81 g for C, A, E and AE groups; $P < 0.05$). The increase of lean mass was also significantly lower in the A group compared to other groups ($\Delta = 68.40 \pm 17.78$, 42.67 ± 12.76 , 63.21 ± 17.50 and 64.22 ± 16.52 g for C, A, E and AE groups). The increase of lean mass was about 60–70% in C, E and AE groups while it was only 43% in the A group.

The increase of fat mass between pre- and post-test was significantly lower with exercise training, both with and without alcohol consumption ($P = 0.0014$).

Therefore, there was a negative effect of alcohol consumption on body weight and lean mass, and a positive effect of exercise on fat mass. The body weight and lean mass of the AE group were not different from the C group.

Bone area, BMC, and BMD measurements (Table 2)

After adjustment by the initial body weight, BMC was higher in A versus C and E ($P = 0.0084$), and BMD was higher in A and AE versus C ($P = 0.0027$).

The alcohol consumption increased BMD and BMC on the 8-week period.

Characteristics of trabecular bone (Table 3)

Concerning the microarchitectural parameters of the trabecular bone, only the trabecular thickness was modified. It was significantly greater with alcohol consumption (0.099 ± 0.008 and 0.098 ± 0.007 vs. 0.095 ± 0.007 and 0.092 ± 0.004 mm for A and AE groups vs. C and E groups, respectively; $P = 0.029$).

Table 1 Daily caloric intake and beverage consumption

	Control			Alcohol			Exercise			Alcohol + exercise		
	Pre	Post	<i>P</i>	Pre	Post	<i>P</i>	Pre	Post	<i>P</i>	Pre	Post	<i>P</i>
Energy intake/day (kcal)	40.1 $\pm$ 3.2	35.8 $\pm$ 8.3	NS	56.6 $\pm$ 7.8 ^a	56.3 $\pm$ 6.9 ^a	NS	50.3 $\pm$ 9.8 ^a	51.2 $\pm$ 10.4 ^a	NS	49.2 $\pm$ 5.6 ^{a,b}	60.8 $\pm$ 6.5 ^{a,c}	0.007
Beverage intake/day (mL)	14.3 $\pm$ 3.2	15.2 $\pm$ 3.3 ^{b,c,d}	NS	16.4 $\pm$ 3.0	10.9 $\pm$ 1.4 ^a	<0.05	14.3 $\pm$ 2.3	10.3 $\pm$ 1.3 ^a	<0.05	12.5 $\pm$ 2.0	10.4 $\pm$ 1.3 ^a	<0.05
Energy from alcohol/day (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	12.2 $\pm$ 2.7 ^{a,c}	20.3 $\pm$ 2.8 ^{a,c}	0.003	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	10.6 $\pm$ 2.3 ^{a,c}	18.7 $\pm$ 4.1 ^{a,c}	0.005

Pre pre-test, Post post-test, *P* degree of significant difference ($P < 0.05$), NS non-significant

^a Significant difference with C group

^b Significant difference with A group

^c Significant difference with E group

^d Significant difference with AE group

Table 2 Densitometric characteristics and body composition

	Control (<i>n</i> = 10)	Alcohol (<i>n</i> = 10)	Exercise (<i>n</i> = 8)	Alcohol + exercise (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> _{alcohol}	<i>P</i> _{exercise}	<i>P</i> _{interaction}
Bone area	51.41 ± 7.06	42.63 ± 13.83	50.67 ± 11.84	49.03 ± 10.88	0.16	0.44	0.33
WB BMC (g)	93.66	108.09	95.34	100.34	0.0084	0.38	0.18
WB BMD (g/cm ²)	30.38	38.02	32.57	36.34	0.0027	0.88	0.27
Body weight (g)	94.31 ± 14.77	62.86 ± 17.99 ^{a,c,d}	80.27 ± 22.54	80.42 ± 16.81	0.012	0.77	0.011
Fat body mass (g)	412.2 ± 101.1	296.3 ± 153.9	237.7 ± 87.1 ^{a,b}	223.4 ± 73.6 ^{a,b}	0.077	0.0014	0.16
Lean body mass (g)	68.40 ± 17.78	42.67 ± 12.76 ^{a,c,d}	63.21 ± 17.50	64.22 ± 16.52	0.025	0.13	0.016

*P*_{interaction} statistical interaction between the effects of alcohol and exercise (<0.05), *P*_{alcohol} statistical degree of the influence of alcohol (<0.05), *P*_{exercise} statistical degree of influence of exercise (<0.05). The *P*_{interaction} has to be considered at first: if there is an interaction between the effects of alcohol and exercise, the other *P* value have not to be considered. If the *P*_{interaction} is not significant, then we can analyze the *P*_{alcohol} and *P*_{exercise}

The data regarding WB BMC and WB BMD have been adjusted by the initial body weight

Pre pre-test (baseline), *Post* post-test, *WB BMC* whole body bone mineral content, *WB BMD* whole body bone mineral density

^a Significant difference with C group

^b Significant difference with A group

^c Significant difference with E group

^d Significant difference with AE group

Alcohol increased trabecular thickness in the alcohol-fed groups.

Characteristics of cortical bone (Table 4)

No significant difference between the groups has been identified for the microarchitecture of the cortical bone.

Mechanical tests (Table 5)

The cross-sectional area of bone was significantly lower with exercise training, when comparing the E and AE groups to the C and A groups (*P* = 0.017). There was no difference between the groups for the ultimate force before fracture, the maximal stress, the Young modulus (E), the stiffness and for the maximal energy absorbed by bones before rupture.

Biochemical analysis (Table 6)

The osteocalcin concentrations were significantly higher in the trained groups (E and AE groups) versus untrained groups (C and A) (24.58 ± 4.70, 21.49 ± 5.22, 27.12 ± 4.44 and 27.49 ± 7.75 ng/mL for C, A, E and AE groups; *P* = 0.018).

The CTx concentrations were significantly greater in the A, E and AE groups compared to the C group, with a significantly higher concentration in the E and AE groups compared to the A group (*P* = 0.0046).

Bone resorption was increased in A, E and AE groups compared to C, while bone formation was increased only in

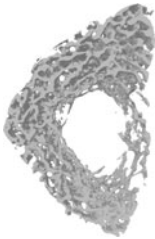
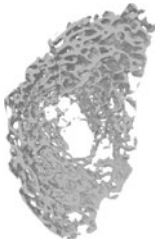
E and AE compared to C. Bone formation was not different between C and A groups.

Discussion

This study was designed to analyze the effect of a moderate chronic alcohol consumption combined to a physical training on bone in rats. Body composition and bone remodeling were modified by alcohol intake. An increase in BMC, BMD and trabecular thickness was observed with alcohol. Physical activity associated with alcohol consumption seems to prevent the body composition and bone remodeling alterations observed in alcohol-fed rats which did not train.

The increase of body weight and lean body mass were significantly lower in the A group compared to the other groups. This is in accordance with the literature, as it has been already shown in males and in rats that chronic ethanol ingestion leads to lower body weight and lean mass compared to controls (Addolorato et al. 2000; Preedy et al. 1999). The mechanism by which alcohol decreases these parameters is not fully understood. Maddalozzo et al. (2009) reported decreased body weight and lean mass with alcohol-fed rats and explained it by modified growth, due in part to the reduced calories intake. However, in the present study, we did not observe self caloric restriction in the alcohol-fed animals, as A and AE total caloric intake at the end of the protocol was higher compared to C (*P* = 0.0001 and *P* = 0.0001). Maddalozzo et al. (2009) also observed a decrease of total body fat in the alcohol-fed

Table 3 Microarchitectural parameters of the trabecular bone

	Control (<i>n</i> = 9)	Alcohol (<i>n</i> = 10)	Exercise (<i>n</i> = 8)	Alcohol + exercise (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> _{alcohol}	<i>P</i> _{exercise}	<i>P</i> _{interaction}
							
Tissue volume TV (mm ³)	23.08 ± 2.35	23.01 ± 2.81	21.49 ± 2.60	22.73 ± 2.98	0.52	0.30	0.47
Bone volume BV (mm ³)	3.60 ± 0.80	3.92 ± 1.42	3.53 ± 0.86	4.36 ± 1.70	0.18	0.67	0.55
Bone volume/tissue volume BV/TV (%)	15.67 ± 3.25	16.67 ± 4.40	16.48 ± 3.56	18.69 ± 5.57	0.27	0.33	0.68
Bone surface BS (mm ²)	147.03 ± 33.87	151.21 ± 40.13	149.19 ± 32.89	164.35 ± 56.35	0.50	0.59	0.70
Tissue surface TS (mm ²)	54.86 ± 3.51	56.21 ± 4.58	52.14 ± 4.75	54.42 ± 5.64	0.25	0.16	0.77
BS/BV (mm ² /mm ³)	40.99 ± 3.69	39.86 ± 4.50	42.59 ± 4.34	39.02 ± 5.37	0.13	0.80	0.42
Trabecular pattern factor Tb.Pf	8.59 ± 2.09	8.32 ± 3.06	8.75 ± 1.63	7.44 ± 3.33	0.38	0.68	0.56
Structure model index SMI	1.68 ± 0.19	1.73 ± 0.25	1.74 ± 0.24	1.61 ± 0.35	0.66	0.73	0.34
Trabecular thickness Tb.Th (mm)	0.095 ± 0.007	0.099 ± 0.008 ^{a,b}	0.092 ± 0.004	0.098 ± 0.007 ^{a,b}	0.029	0.56	0.73
Trabecular number Tb.N (1/mm)	1.66 ± 0.33	1.67 ± 0.33	1.78 ± 0.35	1.89 ± 0.52	0.63	0.19	0.70
Trabecular spacing Tb.Sp (mm)	0.63 ± 0.22	0.63 ± 0.15	0.58 ± 0.17	0.57 ± 0.17	0.91	0.38	0.99
Degree of anisotropy DA	2.45 ± 0.25	2.37 ± 0.39	2.56 ± 0.28	2.67 ± 0.40	0.88	0.091	0.41

*P*_{alcohol} significant effect of alcohol (<0.05), *P*_{exercise} significant effect of exercise (<0.05), *P*_{interaction} significant interactions between alcohol and exercise when <0.05. The *P*_{interaction} has to be considered at first: if there is an interaction between the effects of alcohol and exercise, the other *P* value have not to be considered. If the *P*_{interaction} is not significant, then we can analyze the *P*_{alcohol} and *P*_{exercise}

BS/BV bone surface/bone volume

^a Significant difference with C group

^b Significant difference with E group

rats compared to controls. In the present study, the total fat mass was not different between controls and alcohol-fed rats. Lands and Zakhari (1991) have studied ethanol metabolism to understand why the energy intake from ethanol (7 kcal/g) is not transformed and stored in fat tissue, and associated with increased body weight. They discussed the “missing calories” that disappear from the energy balance. These authors hypothesized that alcohol is oxidized to acetaldehyde using an unregulated futile cycle which could dissipate the supplemented calories ingested from alcohol. This hypothesis has been confirmed by Rigaud (2009) who added that alcohol would furthermore increase the resting energy expenditure and the diet-induced thermogenesis. It is also probable that alcohol or its metabolites modify the absorption and/or utilization of the nutrients provided by food. This hypothesis is supported by Lieber (1993). In the present study, exercise limited the fat mass gain in both trained groups compared to C and A. This beneficial effect of exercise was

previously reported (Kyle et al. 2004). Moreover, physical exercise seems to protect the loss of body weight and lean mass induced by alcohol consumption.

In this study, BMC and BMD were higher in the alcohol-fed rats after adjustment for body weight. The decrease of BMC and BMD in rats has been shown with protocols that used higher alcohol caloric intake, which mimics heavy alcohol consumption (Nishiguchi et al. 2000; Wezeman et al. 2003). Similarly, the protocols reporting improvement of BMC and BMD with exercise training had longer individual training sessions over more weeks than the present protocol (Iwamoto et al. 1999; Yeh et al. 1993). Several studies already have reported the positive effects of low alcohol intake on BMC and BMD in post-menopausal women (Ganry et al. 2000; Rapuri et al. 2000) and in young male soldiers (Venkat et al. 2009). In the study of Venkat et al., a low alcohol consumption represented three glasses of alcohol per week. In the present study, the BMC and BMD data reflect the effects of the low concentrations of

Table 4 Microarchitectural parameters of the cortical bone

	Control (<i>n</i> = 9)	Alcohol (<i>n</i> = 10)	Exercise (<i>n</i> = 9)	Alcohol + exercise (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> _{alcohol}	<i>P</i> _{exercise}	<i>P</i> _{interaction}
Porosity Ct.Po (%)	1.59 ± 0.26	1.44 ± 0.44	1.63 ± 0.25	1.72 ± 0.36	0.75	0.16	0.29
Pore diameter Po.Dm (mm)	0.046 ± 0.002	0.044 ± 0.003	0.046 ± 0.004	0.047 ± 0.005	0.70	0.49	0.30
Pore spacing Po.Sp (mm)	1.05 ± 0.08	1.14 ± 0.19	1.04 ± 0.08	1.05 ± 0.09	0.18	0.18	0.31
PoS/PoV (mm ² /mm ³)	142.61 ± 13.00	147.21 ± 22.93	143.13 ± 17.58	132.00 ± 21.71	0.61	0.25	0.22
Pore number Po.N (1/mm)	0.345 ± 0.044	0.321 ± 0.083	0.356 ± 0.041	0.370 ± 0.068	0.80	0.15	0.35

*P*_{interaction} significant interaction between the effects of alcohol and exercise when <0.05, *P*_{alcohol} significant effect of alcohol (<0.05), *P*_{exercise} significant effect of exercise (<0.05). The *P*_{interaction} has to be considered at first: if there is an interaction between the effects of alcohol and exercise, the other *P* value have not to be considered. If the *P*_{interaction} is not significant, then we can analyze the *P*_{alcohol} and *P*_{exercise}

PoS/PoV pore surface to pore volume

Table 5 Biomechanical parameters

	Control (<i>n</i> = 11)	Alcohol (<i>n</i> = 11)	Exercise (<i>n</i> = 9)	Alcohol + exercise (<i>n</i> = 9)	<i>P</i> _{alcohol}	<i>P</i> _{exercise}	<i>P</i> _{interaction}
Ultimate force (N)	127.11 ± 13.77	127.95 ± 15.59	121.67 ± 10.20	125.50 ± 13.08	0.59	0.36	0.73
Stress (N/mm ²)	156.16 ± 13.38	155.81 ± 14.81	165.97 ± 8.29	155.87 ± 11.69	0.20	0.22	0.23
CSA (mm ²)	7.41 ± 0.46	7.44 ± 0.61	6.80 ± 0.37 ^{a,b}	7.16 ± 0.71 ^{a,b}	0.27	0.017	0.35
Young modulus (MPa)	6664.49 ± 802.26	6680.62 ± 791.92	7228.10 ± 785.41	6584.93 ± 829.61	0.23	0.36	0.20
Stiffness (N/m)	260.06 ± 22.08	264.96 ± 23.92	246.64 ± 15.95	255.67 ± 18.03	0.29	0.091	0.75
Energy max (N.m)	86.06 ± 20.44	79.57 ± 24.38	66.66 ± 23.73	74.64 ± 18.62	0.92	0.090	0.31

*P*_{interaction} significant interaction between the effects of alcohol and exercise when <0.05, *P*_{alcohol} significant effect of alcohol (<0.05), *P*_{exercise} significant effect of exercise (<0.05). The *P*_{interaction} has to be considered at first: if there is an interaction between the effects of alcohol and exercise, the other *P* value have not to be considered. If the *P*_{interaction} is not significant, then we can analyze the *P*_{alcohol} and *P*_{exercise}

CSA cross-sectional area

^a Significant difference with C group

^b Significant difference with A group

Table 6 Serum concentrations of bone markers of formation (OC) and resorption (CTX)

	Control (<i>n</i> = 12)	Alcohol (<i>n</i> = 12)	Exercise (<i>n</i> = 9)	Alcohol + exercise (<i>n</i> = 10)	<i>P</i> _{alcohol}	<i>P</i> _{exercise}	<i>P</i> _{interaction}
Osteocalcin (ng/mL)	24.58 ± 4.70	21.49 ± 5.22	27.12 ± 4.44 ^{a,b}	27.49 ± 7.75 ^{a,b}	0.44	0.018	0.33
Crosslaps of type II collagen (ng/mL)	49.00 ± 32.60	103.34 ± 20.92 ^a	127.65 ± 16.40 ^{a,b}	129.63 ± 37.45 ^{a,b}	0.0025	<0.0001	0.0046

*P*_{interaction} significant interaction between the effects of alcohol and exercise when <0.05, *P*_{alcohol} significant effect of alcohol (<0.05), *P*_{exercise} significant effect of exercise (<0.05). The *P*_{interaction} has to be considered at first: if there is an interaction between the effects of alcohol and exercise, the other *P* value have not to be considered. If the *P*_{interaction} is not significant, then we can analyze the *P*_{alcohol} and *P*_{exercise}

^a Significant difference with C group

^b Significant difference with A group

alcohol (8% v/v), which corresponds to three glasses of alcohol per day for a men.

Alcohol intake representing 36% of the total daily energy intake are reported to have negative effects on bone mass. In this model, the dose range of alcohol fed to the rats was 8–20% v/v which is equivalent to an alcohol energy intake of about 10–20% of the total daily calories. The calories provided by ethanol, that we chose by design, were lower compared to the literature to mimic a progressive chronic alcohol consumption in athletes. The

trabecular microarchitecture has been shown to be very sensitive in response to treatment or diseases as osteoporosis (Greenspan et al. 2010). In the present study, most of the microarchitectural parameters of the trabecular bone were neither increased nor decreased by alcohol consumption and/or exercise training. However, the trabecular thickness was greater in the alcohol-fed groups compared to the other groups. This increase may be due to the small amounts of alcohol ingested by the rats at the beginning of the protocol. Similar data on low alcohol intakes and BMD

- Duran-Castellon MC, de Los Angeles G, omez-Rodriguez M (2009) Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol (Oxf Oxfords)* 44:468–475
- Boissiere J, Eder V, Machet MC, Courteix D, Bonnet P (2008) Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. *J Appl Physiol* 104:321–327
- Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D (2007a) Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol* 102:1502–1509
- Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D, Benhamou CL (2007b) Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:111–118
- Bourrin S, Ghaemmaghami F, Vico L, Chappard D, Gharib C, Alexandre C (1992) Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. *Calcif Tissue Int* 51:137–142
- Cauley JA, Fullman RL, Stone KL, Zmuda JM, Bauer DC, Barrett-Connor E, Ensrud K, Lau EM, Orwoll ES (2005) Factors associated with the lumbar spine and proximal femur bone mineral density in older men. *Osteoporos Int* 16:1525–1537
- Chakkalakal DA (2005) Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res* 29:2077–2090
- Chavassieux P, Serre CM, Vergnaud P, Delmas PD, Meunier PJ (1993) In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone Miner* 22:95–103
- Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ (1995) Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone* 16:143–147
- Davis TC, Arnold C, Nandy I, Bocchini JA, Gottlieb A, George RB, Berkel H (1997) Tobacco use among male high school athletes. *J Adolesc Health* 21:97–101
- Diez A, Puig J, Serrano S, Marinoso ML, Bosch J, Marrugat J, Mellibovsky L, Nogues X, Knobel H, Aubia J (1994) Alcohol-induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. *J Bone Miner Res* 9:825–831
- Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW (1998) Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 16:337–341
- Education (2000) Promoting better health for young people through physical activity and sports (report). Secretary of Health and Human Services and the Secretary of Education, Silver Spring
- Evans RK, Antczak AJ, Lester M, Yanovich R, Israeli E, Moran DS (2008) Effects of a 4-month recruit training program on markers of bone metabolism. *Med Sci Sports Exerc* 40:S660–S670
- Ewing BT (1998) High school athletes and marijuana use. *J Drug Educ* 28:147–157
- Garry O, Baudoin C, Fardellone P (2000) Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study. *Epidemiologie de l'Osteoporose*. *Am J Epidemiol* 151:773–780
- Garry JP, Morrissey SL (2000) Team sports participation and risk-taking behaviors among a biracial middle school population. *Clin J Sport Med* 10:185–190
- Greendale GA, Barrett-Connor E, Edelstein S, Ingles S, Haile R (1995) Lifetime leisure exercise and osteoporosis. The Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 141:951–959
- Greenspan SL, Perera S, Recker R, Wagner JM, Greeley P, Gomberg BR, Seaman P, Kleerekoper M (2010) Changes in trabecular microarchitecture in postmenopausal women on bisphosphonate therapy. *Bone* 46:1006–1010
- Hoffmann JP (2006) Extracurricular activities, athletic participation, and adolescent alcohol use: gender-differentiated and school-contextual effects. *J Health Soc Behav* 47(3):275–290
- Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 21:809–816
- Hogan HA, Groves JA, Sampson HW (1999) Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1825–1833
- Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF (1999) Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 24:163–169
- Karlsson MK, Nordqvist A, Karlsson C (2008) Physical activity increases bone mass during growth. *Food Nutr Res* 52
- Klein RF (1997) Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 21:392–399
- Kontulainen S, Kannus P, Haapasalo H, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, Oja P, Vuori I (2001) Good maintenance of exercise-induced bone gain with decreased training of female tennis and squash players: a prospective 5-year follow-up study of young and old starters and controls. *J Bone Miner Res* 16:195–201
- Koo BK, Han KA, Ahn HJ, Jung JY, Kim HC, Min KW (2010) The effects of total energy expenditure from all levels of physical activity vs. physical activity energy expenditure from moderate-to-vigorous activity on visceral fat and insulin sensitivity in obese Type 2 diabetic women. *Diabet Med* 27:1088–1092
- Kyle UG, Genton L, Gremion G, Slosman DO, Pichard C (2004) Aging, physical activity and height-normalized body composition parameters. *Clin Nutr* 23:79–88
- Lands WE, Zakhari S (1991) The case of the missing calories. *Am J Clin Nutr* 54:47–48
- Leger L, Boucher R (1980) An indirect continuous running multistage field test: the Universite de Montreal track test. *Can J Appl Sport Sci* 5:77–84
- Lieber CS (1993) Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 7:581–608
- Lima I, Rocha MS, Lopes RT (2008) Ethanol bone evaluation using 3D microtomography. *Micron* 39:617–622
- Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, Iwaniec UT (2009) Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* 20:1529–1538
- Maimoun L, Mariano-Goulart D, Couret I, Manetta J, Peruchon E, Micallef JP, Verdier R, Rossi M, Leroux JL (2004) Effects of physical activities that induce moderate external loading on bone metabolism in male athletes. *J Sports Sci* 22:875–883
- Malik P, Gasser RW, Kemmler G, Moncayo R, Finkenstedt G, Kurz M, Fleischhacker WW (2009) Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. *Alcohol Clin Exp Res* 33:375–381
- Martens MP, Dams-O'Connor K, Beck NC (2006) A systematic review of college student-athlete drinking: prevalence rates, sport-related factors, and interventions. *J Subst Abuse Treat* 31:305–316
- McLaughlin F, Mackintosh J, Hayes BP, McLaren A, Uings IJ, Salmon P, Humphreys J, Meldrum E, Farrow SN (2002) Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers. *Bone* 30:924–930
- Mukamal KJ, Robbins JA, Cauley JA, Kern LM, Siscovick DS (2007) Alcohol consumption, bone density, and hip fracture among older adults: the cardiovascular health study. *Osteoporos Int* 18:593–602
- Nagy TR, Prince CW, Li J (2001) Validation of peripheral dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of bone

- mineral in intact and excised long bones of rats. *J Bone Miner Res* 16:1682–1687
- Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, Ochi H (2000) Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Metab* 18:317–320
- Nordstrom A, Olsson T, Nordstrom P (2006) Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2600–2604
- Nyquist F, Ljunghall S, Berglund M, Obrant K (1996) Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 19:51–54
- O'Brien KS, Blackie JM, Hunter JA (2005) Hazardous drinking in elite New Zealand sportspeople. *Alcohol Alcohol* 40:239–241
- Pedreira-Zamorano JD, Lavado-Garcia JM, Roncero-Martin R, Calderon-Garcia JF, Rodriguez-Dominguez T, Canal-Macias ML (2009) Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition* 25:1057–1063
- Peer KS, Newsham KR (2005) A case study on osteoporosis in a male athlete: looking beyond the usual suspects. *Orthop Nurs* 24:193–199 (quiz 200–201)
- Preedy VR, Reilly ME, Patel VB, Richardson PJ, Peters TJ (1999) Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body. *Nutrition* 15:604–608
- Rainey CJ, McKeown RE, Sargent RG, Valois RF (1996) Patterns of tobacco and alcohol use among sedentary, exercising, nonathletic, and athletic youth. *J Sch Health* 66:27–32
- Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, Ryschon KL (2000) Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *Am J Clin Nutr* 72:1206–1213
- Reed AH, McCarty HL, Evans GL, Turner RT, Westerlind KC (2002) The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1269–1274
- Rigaud D (2009) Alcohol and body weight? *Rev Prat* 59:75–78
- Turner RT (2000) Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1693–1701
- Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14:595–608
- Venkat KK, Arora MM, Singh P, Desai M, Khatkhatay I (2009) Effect of alcohol consumption on bone mineral density and hormonal parameters in physically active male soldiers. *Bone* 45:449–454
- Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF 2nd, Woods M, Suri M, Steiner J, LaPaglia N (1999) Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1534–1542
- Wezeman FH, Juknelis D, Frost N, Callaci JJ (2003) Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. *Alcohol* 31:87–92
- Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintz S (1993) Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: determined by dual energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 52:234–238

ETUDE 2 : EFFETS DE 3 DIFFERENTES DOSES D'ALCOOL SUR LES PARAMETRES OSSEUX CHEZ LE RAT

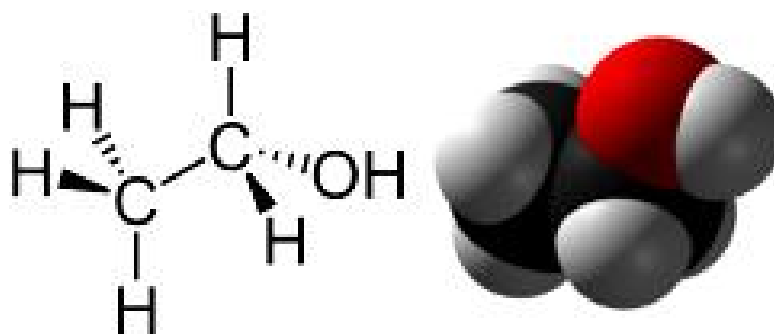
Cette étude a donné lieu à :

- la publication d'un article original :

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Cortical bone is more sensitive to alcohol dose effects than trabecular bone in the rat. Accepté dans Joint Bone Spine, Octobre 2011.

- une communication affichée en congrès :

Maurel DB, Boisseau N, Dolleans E, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL, Jaffré C. Influence de différentes doses d'alcool sur le contenu, la densité minérale osseuse, et la microarchitecture osseuse chez le rat. Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Nice, Mars 2009.



Molécule d'éthanol

I. Introduction

Le risque de développer une ostéoporose est influencé en partie par différents facteurs environnementaux auquel le squelette est soumis durant l'adolescence et l'âge adulte (Torgerson *et al.* 1995). L'un des facteurs environnementaux qui augmente le risque d'ostéoporose est la consommation excessive d'alcool (Audran *et al.* 2004). La consommation chronique d'alcool diminue le CMO et la DMO ainsi que la microarchitecture trabéculaire. La microarchitecture corticale a été moins étudiée que celle de l'os trabéculaire. L'os cortical est important sur un plan quantitatif, principalement à travers les paramètres d'épaisseur et de porosité (Bouxsein et Seeman 2009; Dalle Carbonare et Giannini 2004). L'épaisseur, la surface et la densité de l'os cortical sont diminuées suite à une alcoolisation élevée et prolongée (Sampson *et al.* 1998). Cependant, l'effet de l'alcool sur la porosité corticale n'a pas encore été étudié. Le remodelage osseux est modifié par l'alcool, principalement la formation osseuse qui est diminuée. Les données dans la littérature concernant la résorption osseuse sont plus variables (Turner 2000). Un effet dose a été rapporté sur l'os trabéculaire (Turner *et al.* 2001), mais à ce jour, aucune étude n'a analysé l'effet dose de l'alcool sur la microarchitecture corticale et la porosité.

II. Objectif

Le but de cette étude était d'évaluer les effets de différentes consommations chroniques d'alcool sur la DMO, la résistance osseuse, et la microarchitecture de l'os trabéculaire et de l'os cortical.

III. Protocole spécifique

Cette expérimentation a été conduite sur 48 rats Wistar mâles, âgés de 8 semaines en début d'expérience. Les rats ont été répartis en 4 groupes : Contrôle (C), Alcool à 25% volume/volume (A25), Alcool à 30% v/v (A30) et Alcool à 35% v/v (A35).

La prise d'alcool a été réalisée *ad libitum* via un biberon dans lequel était placée une solution contenant de l'eau, de l'éthanol et de l'aspartame, durant 17 semaines. Une période d'adaptation étant nécessaire, la quantité d'alcool a été élevée progressivement pendant trois semaines afin d'arriver aux différentes dose d'alcool utilisées pour l'étude (25%, 30% et 35% v/v). Les rats du groupe C ont reçu quotidiennement des biberons contenant uniquement de l'eau.

La prise alimentaire a été contrôlée (aliment d'entretien M20, Dietex, France), en prenant en compte les calories apportées par l'alcool dans les groupes alcoolisés, afin que tous les groupes aient le même apport calorique journalier (rats pair-fed). De ce fait, plus les groupes étaient alcoolisés et moins ils avaient des granulés dans leur cage.

IV. Résultats

A. Consommations de boisson et de nourriture calculées sur les 4 derniers week-ends

	C	A25	A30	A35	p
Boisson /jour (mL)	26,93 ± 2,35	20,85 ± 2,11 ^a	18,93 ± 1,82 ^a	18,23 ± 2,90 ^a	0,017
Aliment /jour (g)	28,85 ± 1,11	22,13 ± 2,02 ^{a,d}	19,28 ± 1,27 ^a	18,15 ± 1,29 ^a	0,008
Kcalories éthanol /jour (%)	0,00 ± 0,00	29,35 ± 1,01 ^{a,c,d}	34,15 ± 1,20 ^a	38,10 ± 3,07 ^a	0,003
Kcalories totales /jour	84,74 ± 3,26	91,99 ± 8,39	86,02 ± 6,30	86,36 ± 8,41	NS

Tableau 16 : Consommations de boisson et nourriture des animaux des quatre groupes.

C : groupe contrôle. A25 : groupe alcool à dose 25% v/v. A30 : groupe alcool à dose 30% v/v. A35 : groupe alcool à dose 35% v/v.

^a : différence significative avec le groupe C. ^b : différence significative avec le groupe A25. ^c : différence significative avec le groupe A30. ^d : différence significative avec le groupe A35.

La consommation de boisson a diminué significativement dans les trois groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle, tout comme la quantité de nourriture consommée. En revanche, la quantité totale de kilocalories consommées par jour n'était pas différente entre les quatre groupes (Tableau 16).

Les rats ont été alcoolisés de façon suffisante puisque nous avons observé une péliose hépatique (Figure 55). Cette pathologie était plus marquée dans les groupes les plus alcoolisés.

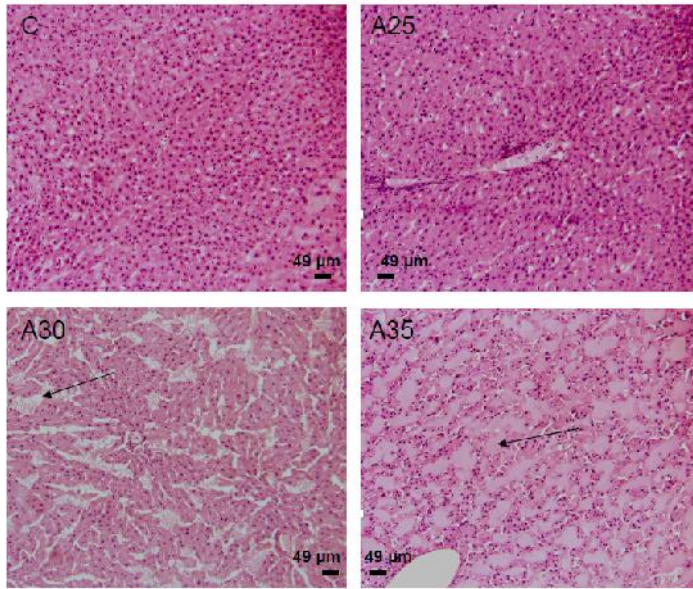


Figure 55 : Péliose hépathique (dilatation des veines sinusoides) observée sur des coupes de foies colorées avec de l'hémathoxyline, de l'éosine et du safran (HES).

B. Evolution du CMO, de la DMO et de la composition corporelle

	C (n=12)		A25 (n=10)		A30 (n=11)		A35 (n=11)			
	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin	p déb	p fin
Surface corps entier (cm ²)	70,89 ± 2,11	95,88 ± 3,10	72,61 ± 2,39	89,59 ± 5,92 ^a	73,79 ± 2,25 ^a	87,16 ± 5,02 ^a	72,65 ± 1,97 ^a	83,00 ± 4,59 ^{a,b,c}	0,02	< 0,0001
CMO corps entier (g)	10,93 ± 0,55	19,68 ± 0,98	11,28 ± 0,39 ^a	17,43 ± 1,21 ^a	11,60 ± 0,46 ^a	17,08 ± 1,00 ^a	11,50 ± 0,50 ^a	15,82 ± 1,09 ^{a,b,c}	0,01	< 0,0001
DMO corps entier (g/cm ²)	0,154 ± 0,005	0,205 ± 0,006	0,155 ± 0,003	0,195 ± 0,005 ^a	0,157 ± 0,005	0,196 ± 0,007 ^a	0,158 ± 0,004	0,191 ± 0,006 ^{a,c}	NS	< 0,0001
Surface fémur (cm ²)	1,70 ± 0,09	2,26 ± 0,12	1,83 ± 0,09 ^a	2,14 ± 0,15 ^a	1,89 ± 0,09 ^a	2,16 ± 0,11	1,82 ± 0,10 ^a	2,10 ± 0,11 ^a	0,0004	0,02
CMO fémur (g)	0,46 ± 0,03	0,88 ± 0,07	0,48 ± 0,03	0,75 ± 0,06 ^a	0,52 ± 0,03 ^{a,b}	0,76 ± 0,04 ^a	0,51 ± 0,04 ^a	0,71 ± 0,05 ^{a,c}	0,006	< 0,0001
DMO fémur (g/cm ²)	0,272 ± 0,013	0,389 ± 0,020	0,265 ± 0,008	0,350 ± 0,012 ^a	0,276 ± 0,012	0,355 ± 0,018 ^a	0,279 ± 0,014	0,340 ± 0,020 ^a	NS	< 0,0001
Poids (g)	414,67 ± 25,37	641,61 ± 56,34	425,45 ± 16,43	550,46 ± 47,94 ^a	422,61 ± 16,62	524,47 ± 41,96 ^a	420,32 ± 13,98	466,65 ± 44,69 ^{a,b,c}	NS	< 0,0001
Masse grasse (g)	42,48 ± 9,97	106,96 ± 35,68	56,46 ± 8,86	84,29 ± 29,66	54,04 ± 7,87 ^a	79,99 ± 22,8	48,74 ± 5,50 ^{a,b}	57,22 ± 17,33 ^{a,b,c}	0,001	0,0046
Masse maigre (g)	361,23 ± 21,93	514,98 ± 30,83	357,72 ± 13,83	448,73 ± 32,36 ^a	356,97 ± 14,29	427,39 ± 30,53 ^a	360,07 ± 14,95	393,61 ± 36,54 ^{a,b,c}	NS	< 0,0001
% Masse grasse (%)	10,23 ± 2,18	16,40 ± 4,34	13,27 ± 1,86	15,11 ± 4,21	12,76 ± 1,67 ^a	15,10 ± 3,69	11,60 ± 1,37 ^b	12,19 ± 3,26	0,001	NS

Tableau 17 : Evolution du CMO, de la DMO et de la composition corporelle.

C : groupe contrôle. A25 : groupe alcool à dose 25% v/v. A30 : groupe alcool à dose 30% v/v. A35 : groupe alcool à dose 35% v/v.

^a : différence significative avec le groupe C. ^b : différence significative avec le groupe A25. ^c : différence significative avec le groupe A30.

Composition corporelle

Des différences significatives de masse grasse existaient entre les groupes avant le début du protocole. De ce fait, les variations dues au protocole ont été analysées en calculant les valeurs relatives, c'est-à-dire en tenant compte des différences déjà existantes à T1. Les gains de poids, masse grasse et masse maigre étaient inférieurs pour les groupes A25, A30 et A35 comparés à C. Le gain de poids était plus faible pour le groupe A35 versus A25 et A30, et le gain de masse maigre était plus faible chez A35 versus A25 et A30, et chez A30 versus A25 (Tableau 17).

CMO et DMO

Les différences relatives ont été calculées également pour le CMO et la DMO. Les gains de CMO et de DMO du corps entier étaient significativement plus faibles chez les groupes A25, A30 et A35 comparé à C et plus faible dans le groupe A35 comparé à A25 et A30. Le gain de DMO au fémur était plus faible dans les trois groupes alcoolisés comparés à C, et plus faible dans le groupe A35 comparé à A25 et A30. Après ajustement au poids et à la masse maigre, les différences existaient toujours entre les quatre groupes pour le CMO et la DMO au niveau du corps entier et du fémur (Tableau 17).

C. Microarchitecture trabéculaire

Le BS/BV était significativement supérieur dans les groupes A25 et A35 comparé au groupe C. Le Tb.Th était significativement plus faible dans les groupes A25, A30 et A35 comparés au groupe C (Tableau 18).

D. Microarchitecture corticale

Le Po.N était significativement supérieur dans les groupes A30 et A35 comparés au groupe C. Le Ct.Po était significativement supérieur dans le groupe A35 comparé à C. Le PoS/CtV était significativement augmenté dans les groupes A25, A30 et A35 vs C. L'épaisseur corticale était significativement plus faible dans les deux axes pour les groupes A25, A30 et A35 comparés à C; et plus faible dans le groupe A35 versus A25 et A30. Cela était dû à une augmentation du diamètre

interne du fémur. La longueur du fémur était significativement plus faible dans le groupe A35 comparé aux groupes C, A25 et A30 (Tableau 19).

Paramètres de microarchitecture osseuse de l’os trabéculaire au niveau de la diaphyse du fémur

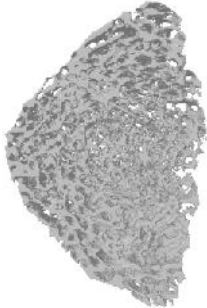
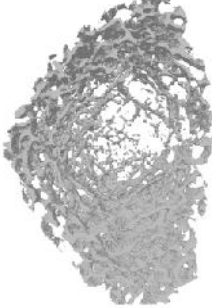
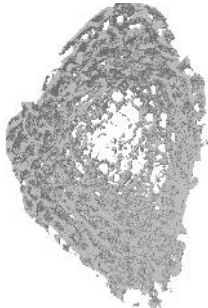
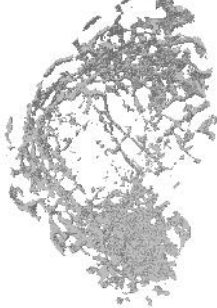
	C (n=12)	A25 (n=10)	A30 (n=11)	A35 (n=11)	P
					
BV/TV (%)	15,61 ± 5,49	13,27 ± 3,50	14,99 ± 4,58	11,74 ± 3,10	NS
BS/BV (mm ² /mm ³)	44,98 ± 7,75	52,01 ± 3,37 ^a	49,53 ± 5,62	53,59 ± 4,74 ^a	0,005
SMI	1,83 ± 0,24	1,92 ± 0,18	1,80 ± 0,26	2,01 ± 0,16	NS
Tb.Th (mm)	0,096 ± 0,012	0,084 ± 0,003 ^a	0,087 ± 0,007 ^{a,b}	0,084 ± 0,007 ^a	0,007
Tb.N (1/mm)	1,61 ± 0,44	1,58 ± 0,39	1,71 ± 0,48	1,39 ± 0,31	NS
Tb.Sp (mm)	0,47 ± 0,19	0,43 ± 0,11	0,44 ± 0,15	0,52 ± 0,19	NS
DA	2,68 ± 0,47	2,26 ± 0,15	2,34 ± 0,31	2,31 ± 0,25	NS (0,07)

Tableau 18 : Paramètres de microarchitecture trabéculaire.
BV/TV : Fraction volumique d’os. BS/BV : Bone Surface on Tissue Surface (Surface osseuse spécifique). SMI : Structure Model Index. Tb.Th : Epaisseur des travées osseuses.
Tb.N : Nombre de travées osseuses. Tb.Sp : Espace entre les travées osseuses. DA : Degré d’anisotropie.
^a : différence significative avec le groupe C. ^b : différence significative avec le groupe A25.

Paramètres de micro et macroarchitecture de l'os cortical

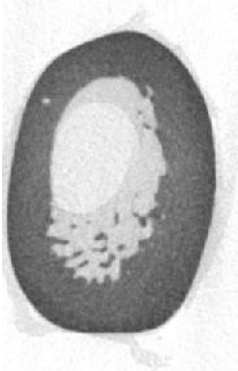
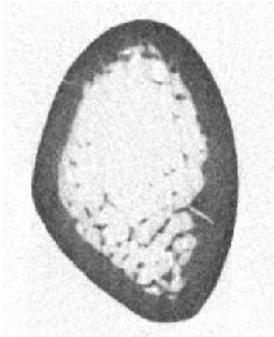
	C (n=12)	A25 (n=10)	A30 (n=11)	A35 (n=11)	p
					
Ct.Po (%)	1,01 ± 0,27	1,15 ± 0,30	1,12 ± 0,25	1,35 ± 0,32 ^a	0,02
Po.Dm (mm)	0,042 ± 0,004	0,040 ± 0,005	0,038 ± 0,004	0,040 ± 0,002	NS
Po.Sp (mm)	1,28 ± 0,12	1,24 ± 0,13	1,22 ± 0,08	1,18 ± 0,12	NS
PoS/PoV (mm²/mm³)	168,91 ± 30,83	172,89 ± 31,60	177,61 ± 26,93	161,88 ± 19,21	NS
PoS/CtV (mm²/mm³)	1,64 ± 0,17	1,92 ± 0,29 ^a	1,95 ± 0,27 ^a	2,16 ± 0,48 ^a	0,0008
Po.N (1/mm)	0,24 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,29 ± 0,05 ^a	0,34 ± 0,08 ^a	0,005
Ø ext AP (mm)	3,53 ± 0,16	3,49 ± 0,15	3,54 ± 0,15	3,63 ± 0,20	NS
Ø ext ML (mm)	5,28 ± 0,27	5,2 ± 0,29	5,24 ± 0,26	5,37 ± 0,20	NS
Ø int AP (mm)	1,97 ± 0,17	2,19 ± 0,18 ^a	2,23 ± 0,20 ^a	2,44 ± 0,23 ^{a,b,c}	<0,0001
Ø int ML (mm)	3,72 ± 0,31	3,92 ± 0,34	3,91 ± 0,36	4,2 ± 0,30 ^{a,b,c}	0,01
Ct.Th AP (mm)	0,78 ± 0,07	0,65 ± 0,05 ^a	0,66 ± 0,06 ^a	0,60 ± 0,04 ^{a,b,c}	< 0,0001
Ct.Th ML (mm)	0,78 ± 0,06	0,64 ± 0,06 ^a	0,66 ± 0,07 ^a	0,59 ± 0,08 ^{a,b,c}	< 0,0001
Longueur du fémur (mm)	42,28 ± 1,01	42,39 ± 1,16	42,33 ± 0,87	41,22 ± 0,81 ^{a,b,c}	0,02

Tableau 19 : Paramètres de microarchitecture corticale.

Ct.Po : Porosité corticale. Po.Dm : Diamètre des pores. Po.Sp : Espace entre les pores. PoS/CtV : Surface des pores par rapport au volume d'os cortical. Po.N : Nombre de pores. Ext Ø AP : Diamètre externe antéro postérieur. Ext Ø ML : Diamètre externe medio latéral. Int Ø AP : Diamètre interne antéro postérieur. Int Ø ML : Diamètre interne medio lateral. Ct.Th AP : Epaisseur corticale antero postérieure. Ct Th ML : Epaisseur corticale medio latérale.

^a : différence significative avec le groupe C. ^b : différence significative avec le groupe A25. ^c : différence significative avec le groupe A30.

E. Caractéristiques biomécaniques du fémur

	C (n=12)	A25 (n=10)	A30 (n=11)	A35 (n=11)	p
Force à rupture (N)	184,46 ± 28,97	162,86 ± 29,86	171,95 ± 31,82	156,75 ± 27,27	NS
Contrainte maximale	14703,69 ± 3082,55	13494,20 ± 2677,88	13387,73 ± 4005,31	11222,59 ± 2908,41	NS
Section corticale (mm²)	8,87 ± 0,80	7,51 ± 0,54 ^a	7,73 ± 0,60 ^a	7,27 ± 0,57 ^{a,c}	0,0001
Rigidité (N/mm)	319,47 ± 58,51	293,18 ± 42,54	285,46 ± 42,75	274,01 ± 58,64	NS
Energie maximale (N-mm)	118,39 ± 40,36	87,13 ± 33,23 ^a	89,78 ± 31,32	76,17 ± 31,52 ^a	0,04

Tableau 20 : Paramètres biomécaniques du fémur.

CSA : Surface de la section corticale.

^a : différence significative avec le groupe C. ^c : différence significative avec le groupe A30.

F. Marqueurs de formation, résorption osseuse et leptine

	C (n=11)	A25 (n=10)	A30 (n=10)	A35 (n=10)	p
OC (ng/mL)	229,82 ± 50,42	210,10 ± 55,10	295,54 ± 88,22	232,97 ± 31,77	NS
NTx (nM BCE/L)	45,79 ± 8,62	13,41 ± 3,26 ^a	19,86 ± 3,53 ^{a,b}	31,53 ± 5,75 ^{a,b,c}	< 0,0001
Leptine (ng/mL)	4,43 ± 0,86	2,71 ± 1,16 ^a	3,21 ± 0,80 ^a	3,28 ± 0,68 ^a	0,015

Tableau 21 : Concentrations des marqueurs du remodelage osseux et de la leptine.

OC : Ostéocalcine. NTx : télépeptides N réticulés de collagène de type I.

^a : différence significative avec le groupe C. ^b : différence significative avec le groupe A25. ^c : différence significative avec le groupe A30.

Biomécanique

La section corticale (CSA) des os était significativement diminuée chez les trois groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle, et elle était également inférieure dans le groupe A35 comparé au groupe A30. L'énergie maximale absorbée par l'os était diminuée dans les groupes A25 et A35 comparés au groupe C (Tableau 20).

Remodelage osseux et leptine

La concentration en NTx était significativement plus faible dans les groupes A25, A30, et A35 vs C. Elle était aussi plus faible chez les rats appartenant aux groupes A25 vs A30 et A35; et dans le groupe A30 vs A35. Il n'y avait pas de différence entre les groupes concernant la concentration d'ostéocalcine. La concentration de leptine sérique était plus faible dans les trois groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle (Tableau 21).

G. Corrélations

La dose d'alcool consommée était inversement corrélée au gain de poids ($r = -0,86$, $p < 0,0001$), de masse maigre ($r = -0,85$, $p < 0,0001$), de masse grasse ($r = -0,67$, $p < 0,0001$), de DMO au corps entier ($r = -0,78$, $p < 0,0001$), et de CMO au corps entier ($r = -0,82$, $p < 0,0001$). Il y avait également une corrélation modérée entre la quantité de masse grasse et la leptine ($r = 0,43$, $p = 0,01$) et entre le poids et la leptine ($r = 0,47$, $p = 0,008$). Nous avons observé une corrélation significative entre la CSA et l'énergie maximale ($r = 0,60$, $p < 0,0001$) et une forte corrélation entre la CSA et l'épaisseur corticale ($r = 0,80$, $p < 0,0001$).

V. Discussion

Il ressort de cette étude qu'une consommation excessive d'alcool sur une période de 17 semaines est associée à une altération de la microarchitecture corticale, et que ces effets sont dose-dépendants.

Les trois doses d'alcool ont réduit le gain de CMO et de DMO au fémur et au corps entier comparés au groupe contrôle. De plus, comme attendu, la dose d'alcool la plus élevée a entraîné le plus faible gain de CMO et de DMO, comparés aux deux autres doses d'alcool. Ces résultats montrent qu'une consommation élevée d'alcool consommée de façon chronique a un effet délétère sur l'os et cela avec un effet-dose.

Les gains de poids, masse grasse et masse maigre étaient plus faibles dans les groupes alcoolisés par rapport au groupe contrôle, ce qui a été observé chez l'Homme et l'animal. La concentration en leptine était diminuée dans les groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle et pourrait concourir à diminuer la masse osseuse via un déclin de la différenciation des CSM en ostéoblastes dans la moelle.

Le Tb.Th était diminué dans les trois groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle, mais il n'y avait pas de différences entre les groupes A25, A30 et A35 (pas d'effet-dose). Le PoS.CtV était supérieur dans les groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle. Le Po.N dans l'os cortical était augmenté avec les doses 30% et 35% v/v, mais pas avec la dose 25%. De plus, le Ct.Po était significativement supérieur au groupe contrôle seulement avec la dose 35% v/v. Ces données montrent un effet de l'alcool sur l'os cortical et mettent en évidence un effet dose. Le Ct.Th était diminuée dans les groupes alcoolisés comparés au groupe contrôle, et cette épaisseur variait selon la dose d'alcool ingérée. La longueur du fémur était diminuée dans le groupe A35 seulement. L'énergie maximale était diminuée dans les groupes A25 et A35 comparés au groupe C et était corrélée à la CSA (également inférieure).

En conclusion, la consommation excessive d'alcool ne diminue pas seulement la densité et l'épaisseur trabéculaire, elle induit également une diminution de l'épaisseur corticale et augmente la porosité. De plus, on note également une réelle augmentation de la toxicité de l'alcool à partir de la dose 35% v/v, augmentant la porosité et diminuant la DMO et la longueur du fémur.

Cette étude a permis de valider notre modèle d'ostéoporose d'origine alcoolique. Nous avons observé une diminution de la DMO, liée à la fois à une diminution de l'épaisseur trabéculaire, mais également de l'os cortical. Nous avons également montré

que l'alcool augmente le nombre de pores et la porosité corticale. Nous avons mis en évidence un effet-dose de l'alcool sur la DMO, le nombre de pores, l'épaisseur corticale, la longueur du fémur et sur l'énergie maximale. La dose 35% v/v était beaucoup plus nocive pour les paramètres osseux que les deux autres doses. Après avoir défini quelle dose engendre une réelle diminution de la masse osseuse, nous souhaitons analyser les mécanismes plus fondamentaux responsables de cette perte osseuse. C'est l'objectif de l'étude 3.

Article 2



Available online at
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

Cortical bone is more sensitive to alcohol dose effects than trabecular bone in the rat

Delphine B. Maurel^{a,*}, Nathalie Boisseau^b, Claude-Laurent Benhamou^{a,c}, Christelle Jaffré^a

^a IPROS, unité Inserm U658, caractérisation du tissu osseux par imagerie: techniques et applications, hôpital Porte-Madeleine, 1, rue Porte-Madeleine, BP 2439, 45032 Orléans cedex 01, France

^b Laboratoire de biologie des activités physiques et sportives, EA3533, université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France

^c CHR Orléans, Orléans, France

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 11 October 2011
Available online xxx

Keywords:
Alcohol
Bone mineral density
Cortical and trabecular bone
Bone strength
Rats

ABSTRACT

Objective: While chronic alcohol consumption is known to decrease bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD), and negatively modify trabecular bone microarchitecture, the impact of alcohol on cortical microarchitecture is still unclear. The aim of this study was to investigate the effects of various doses of alcohol on bone density, trabecular and cortical parameters and bone strength in rats.

Methods: Forty-eight male Wistar rats were divided into four groups: control (C), alcohol 25% v/v (A25), alcohol 30% v/v (A30) and alcohol 35% v/v (A35). Rats in the alcohol groups were fed a solution composed of ethanol and water for 17 weeks while the control group drank only water. Bone quality and quantity were evaluated through the analysis of density, trabecular and cortical bone microarchitectural parameters, osteocalcin and N-Telopeptide concentrations and a 3-point bending test.

Results: Bone density along with trabecular and cortical thickness were lower in alcohol groups compared to C. BMD was lower in A35 vs. A30 and cortical thickness was lower in A35 vs. A25 and A30. Pore number was increased by alcohol and the porosity was greater in A35 compared to C. N-Telopeptide concentration was decreased in alcohol groups compared to control whereas no differences were observed in osteocalcin concentrations. Maximal energy to failure was lower in A25 and A35 compared to C.

Conclusion: Chronic ethanol consumption increases cortical bone damage in rats and may have detrimental effects on bone strength. These effects were dose-dependent, with greater negative effects proportionate to greater alcohol doses.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of the Société Française de Rhumatologie.

1. Introduction

The risk of having a fracture and developing osteoporosis is greatly influenced by lifestyle factors during adolescence and adulthood. Alcohol consumption is well known to be a lifestyle factor that markedly increases the risk of osteoporosis [1,2]. Alcohol consumption lowers bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD) [3–5] and disrupts trabecular bone microarchitecture [1,6]. Alcohol negatively impacts bone health for several reasons. Bone remodeling is modified, mostly due to a decreased bone formation [1,5]. The data concerning the effects of alcohol on bone resorption are controversial with studies reporting increases and decreases with alcohol intake while some studies reported no change [7–10]. In animal models of alcohol abuse, where weight and nutrition are controlled carefully, rats fed ethanol at comparable doses to that of alcoholics develop osteopenia and other skeletal

abnormalities similar to those observed in men [11]. A dose effect of alcohol has been reported in trabecular bone [11], but to date and to our knowledge, no study has assessed the dose effect of alcohol on the cortical microarchitecture and porosity. Less is known about cortical bone microarchitecture than the trabecular microarchitecture. Cortical bone is known to be an important determinant of bone resistance, principally through parameters of width and porosity [12] and it should be noted that alcohol consumption has been shown to have detrimental effects on cortical thickness and density [13,14]. However, the porosity network has not been assessed.

The purpose of the current study was to evaluate the effects of chronic administrations of different ethanol doses, up to 38% of the total daily energy intake, on bone mass, strength, and architecture in rats, with particular focus on cortical bone.

2. Material and methods

2.1. Animals

Forty-eight male Wistar rats (Janvier, Le Genet-St-Isle, France), 8-weeks-old, were acclimatized for 2 weeks and maintained under

* Corresponding author. Tel.: +0033 238744067; fax: +0033 238744024.
E-mail addresses: delphine.maurel@inserm.fr (D.B. Maurel), nathalie.boisseau@univ-bpclermont.fr (N. Boisseau), claude-laurent.benhamou@chr-orleans.fr (C.-L. Benhamou), christelle.jaffre@univ-orleans.fr (C. Jaffré).

constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and under 12 h/12 h light-dark cycles during the experiment. Rats were housed in pairs in standard cages and provided with a standard diet (M20, Dietex, France). At ten weeks of age, the rats were randomly assigned to one of the following groups: control (C), alcohol at 25% v/v (A25), alcohol at 30% v/v (A30) and alcohol at 35% v/v (A35). The protocol lasted 17 weeks. The rats of the A25, A30 and A35 groups drank a solution composed of ethanol and water *ad libitum*. The percentage of ethanol in the solution was progressively increased over two weeks from 8% to the final concentration as specified for each group: 25% v/v (7.3 g/kg/day; A25), 30% v/v (8.7 g/kg/day; A30) or 35% v/v (10.7 g/kg per day; A35). The food and drinking solutions were separated in order to better mimic human consumption. The quantity of food eaten was controlled in order maintain isocaloric intakes across all groups, i.e., the more alcohol that was in the drinking solution, the less food the rats had available to them. The quantities of food and drink solution ingested were recorded weekly for all groups.

At the end of the study, all groups were killed by exsanguinations via cardiac puncture, following anesthesia with pentobarbital sodium (0.1 ml per 100 g of body weight). The left femur was excised, cleared of fat and connective tissues, placed in a soft tissue wipe and frozen at -20°C for the microarchitectural and biomechanical investigations.

2.2. Body weight, fat mass and lean mass

Body weight was measured throughout the study. At age 11 and 27 weeks, lean and fat mass were measured by DXA (Discovery, Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) using a specific 'small animal body composition' mode. In order to perform the *in vivo* examination, the rats were anaesthetized with pentobarbital diluted in sodium chloride (0.5 mL v/v). This apparatus is commonly used in small animals, and has been validated in our laboratory [15].

2.3. Bone area, bone mineral content and bone mineral density measurements

In vivo BMC and BMD of the left femur and whole body were measured at age 11 and 27 weeks by DXA using a Discovery Hologic apparatus adapted to small animals as described above.

2.4. Morphological characteristics of the trabecular bone

The microarchitecture of the metaphysis of the femoral bone was analyzed by high resolution μCT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium). We chose this subregion because it is rich in trabecular bone. The characteristics and methods used in our laboratory have previously been described [15]. The parameters analyzed were: the bone volume to tissue volume ratio (BV/TV, %), bone surface to bone volume BS/BV (mm^2/mm^3), the trabecular thickness Tb.Th (mm), the trabecular number Tb.N (1/mm), the trabecular spaces Tb.Sp (mm) and the degree of anisotropy DA.

2.5. Morphological characteristics of cortical bone

Cortical bone of the femoral metaphysis was studied using μCT , as described in Bonnet et al.'s study [15,16]. The acquisition characteristics were the same as those used for the trabecular bone. We obtained the porosity (Ct.Po, %), the pore number (Po.N, 1/mm), the pore diameter (Po.Dm, mm), the pore spacing (Po.Sp, mm), pore surface on volume (PoS/PoV, mm^2/mm^3) and the ratio of the pore surface to the cortical volume (PoS/CtV, mm^2/mm^3).

2.6. Bone mechanical tests

Mechanical properties of the left femur were assessed by a three-point bending test with a Universal Testing Machine (Instron 3343, Instron, Melbourne, Australia). The method has been described previously [17]. We analyzed ultimate force (N); energy to ultimate force (N.m), stiffness (N.m) and ultimate stress (MPa). The inner and outer diameters in both axes (ML and AP) were assessed with the Image J software, utilizing the reconstructed bone slices obtained by μCT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium).

2.7. Biochemical analysis

Bone remodeling was analyzed by assaying biomarkers from blood samples taken on the day of sacrifice. The blood was centrifuged and the plasma was frozen at -80°C . To evaluate bone remodeling we measured, in duplicate, osteocalcin concentration (bone formation) and the N-telopeptide of type I collagen concentration (NTx, bone resorption) by immunoassay. Osteocalcin concentration was measured with the commercial Rat-MidTM Osteocalcin EIA kit, IDS, France, following manufacturer's instructions. Intra and interassay CV were respectively 5.0% and 5.5% and the detection limit was 50 ng.mL^{-1} . NTx Osteomark assays were performed with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Ntx Osteomark[®] (TECOMedical, France). Intra- and interassay CV were 4.6 and 6.9% respectively and the detection limit was 3.2 nM Bone Collagen Equivalents/L (BCE/L). Dickkopf-1 (DKK1) is an antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway. Therefore it can be used as a negative marker of bone formation. We assessed DKK1 with the Rat Dickkopf 1 Elisa kit (EIAabTM, Wuhan EIAab Science Co., Ltd., Wuhan, China). The detection range was 62.5 pg/mL–00 pg/mL.

Serum leptin was measured by ELISA testing (m/r Leptin ELISA Kit, TECOMedical, France) following manufacturer's instructions, in order to assess the evolution of blood concentrations with alcohol intake and to establish whether any degree of correlation with body composition could be detected. The sensitivity of the detection of the assay was 10 pg/mL and intra-assay and inter-assay variation coefficients were lower than 4.4% and 4.7% respectively.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) for all bone parameters; and are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) for serum chemistry. The statistical analyses were done using the Statview 1992–98 SAS software. Normal distribution (Gaussian) of the data was assessed with the Shapiro-Wilk test. ANOVA and the Student t-test were used when the distribution followed the normal law. Otherwise, Kruskal-Wallis and Mann & Whitney tests were used. Spearman correlation and analysis for covariances were also assessed with Statview software. Analyze of covariance was calculated for BMD and BMC. BMD and BMC were modeled as the dependent variables, while body weight, fat and lean mass were treated as the independent variables. Significance was determined as $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Food and beverage consumption

The spontaneous beverage intake decreased significantly in the three alcohol-fed groups compared to controls ($P=0.0008$). However, there was no significant difference in the total amount of beverage consumed between A25, A30 and A35. The percentage of calories derived from ethanol was significantly different between the three alcohol-fed groups. It was significantly lower in the A25

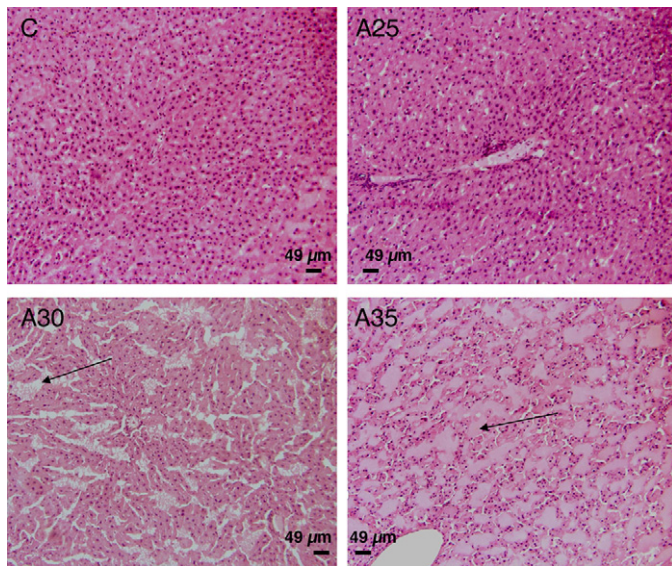


Fig. 1. Histological features of the liver in the four groups. Tissue sections of 3 μ m in thickness were cut and stained with HES (Hematoxylin, Eosin, and Safran). We observed peliosis (vascular condition characterized by multiple blood-filled cavities) (arrows) in the alcohol-fed groups livers, with a dose-dependent increase, as the highest alcohol dose showed the most pathologic livers. Magnification ($\times 100$).

compared to A30 and A35 ($P=0.02$ and $P<0.0001$) and lower in A30 vs. A35 ($P=0.007$). The total amount of food consumed was also significantly different, with a lower food-derived energy intake for A25, A30 and A35 compared to C ($P<0.0001$). The spontaneous food consumed was also decreased in A35 and A30 compared to A25 ($P=0.002$ and $P=0.02$). There was no difference for the total energy intake per day between the four groups.

The rats received sufficient alcohol to induce liver peliosis (Fig. 1). We observed an increase of the degree of liver damage according to the increasing alcohol doses.

3.2. Body composition, fat mass and lean mass (Table 1)

There were significant differences between the groups at baseline (before the beginning of alcohol intakes) in fat mass and percentage of fat mass (Table 1). For this reason, we calculated the relative values to counterbalance the morphological differences in the pre-test condition ($T3-T1/T1 \times 100$). The differences between the groups for the body composition parameters were still very significant ($P<0.0001$ for all the parameters). The overall increases in body weight, lean mass and fat mass were lower in A25, A30 and A35 compared to C. The body weight gain was lower in A35 versus A25 and A30, and the lean mass gain was found to be lower in A35 versus A25 and A30, as well as in A30 versus A25.

3.3. Bone mineral content and bone mineral density measurements (Table 1)

We also analyzed the relative differences for BMC and BMD, due to the differences we observed at baseline. Whole body BMC and BMD gains were significantly lower in A25, A30 and A35 compared to C and lower in A35 compared to A25 and A30 (Table 1). The femoral BMD gain was lower in the three alcohol-fed groups compared to the C group and lower in A35 compared to A25 and A30. The femoral BMC gain was lower in A25, A30 and A35 compared to the C and lower in A35 versus A25.

After adjusting for body weight, the same significant patterns were observed between the four groups for whole body and femur BMC and BMD. After adjusting for lean mass, the significant

Table 1
Whole body and femur BMC, BMD and body composition measured by DXA.

	C (n = 12)		A25 (n = 10)		A30 (n = 11)		A35 (n = 11)		P	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Whole body surface (cm^2)	70.89 $\pm$ 2.11	95.88 $\pm$ 3.10	72.61 $\pm$ 2.39	89.59 $\pm$ 5.92 ^a	73.79 $\pm$ 2.25 ^a	87.16 $\pm$ 5.02 ^a	72.65 $\pm$ 1.97 ^a	83.00 $\pm$ 4.59 ^{abc}	0.02	<0.0001
Whole body BMC (g)	10.93 $\pm$ 0.55	19.68 $\pm$ 0.98	11.28 $\pm$ 0.39 ^a	17.43 $\pm$ 1.21 ^a	11.60 $\pm$ 0.46 ^a	17.08 $\pm$ 1.00 ^a	11.50 $\pm$ 0.50 ^a	15.82 $\pm$ 1.09 ^{abc}	0.01	<0.0001
Whole body BMD (g/cm^2)	0.154 $\pm$ 0.005	0.205 $\pm$ 0.006	0.155 $\pm$ 0.003	0.195 $\pm$ 0.005 ^a	0.157 $\pm$ 0.005	0.196 $\pm$ 0.007 ^a	0.158 $\pm$ 0.004	0.191 $\pm$ 0.006 ^{abc}	NS	<0.0001
Femur surface (cm^2)	1.70 $\pm$ 0.09	2.26 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.09 ^a	2.14 $\pm$ 0.15 ^a	1.89 $\pm$ 0.09 ^a	2.16 $\pm$ 0.11	1.82 $\pm$ 0.10 ^a	2.10 $\pm$ 0.11 ^a	0.0004	0.02
Femur BMC (g)	0.46 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.06 ^a	0.52 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.76 $\pm$ 0.04 ^a	0.51 $\pm$ 0.04 ^a	0.71 $\pm$ 0.05 ^{ac}	0.006	<0.0001
Femur BMD (g/cm^2)	0.272 $\pm$ 0.013	0.389 $\pm$ 0.020	0.265 $\pm$ 0.008	0.350 $\pm$ 0.012 ^a	0.276 $\pm$ 0.012	0.355 $\pm$ 0.018 ^a	0.279 $\pm$ 0.014	0.340 $\pm$ 0.020 ^a	NS	<0.0001
Body weight (g)	414.67 $\pm$ 25.37	641.61 $\pm$ 56.34	425.45 $\pm$ 16.43	550.46 $\pm$ 47.94 ^a	422.61 $\pm$ 16.62	524.47 $\pm$ 41.96 ^a	420.32 $\pm$ 13.98	466.65 $\pm$ 44.69 ^{abc}	NS	<0.0001
Fat Mass (g)	42.48 $\pm$ 9.97	106.96 $\pm$ 35.68	56.46 $\pm$ 8.86	84.29 $\pm$ 29.66	54.04 $\pm$ 7.87 ^a	79.99 $\pm$ 22.8	48.74 $\pm$ 5.50 ^{ab}	57.22 $\pm$ 17.33 ^{abc}	0.001	0.0046
Lean Mass (g)	361.23 $\pm$ 21.93	514.98 $\pm$ 30.83	357.72 $\pm$ 13.83	448.73 $\pm$ 32.36 ^a	356.97 $\pm$ 14.29	427.39 $\pm$ 30.53 ^a	360.07 $\pm$ 14.95	393.61 $\pm$ 36.54 ^{abc}	NS	<0.0001
% Fat Mass (%)	10.23 $\pm$ 2.18	16.40 $\pm$ 4.34	13.27 $\pm$ 1.86	15.11 $\pm$ 4.21	12.76 $\pm$ 1.67 ^a	15.10 $\pm$ 3.69	11.60 $\pm$ 1.37 ^b	12.19 $\pm$ 3.26	0.001	NS

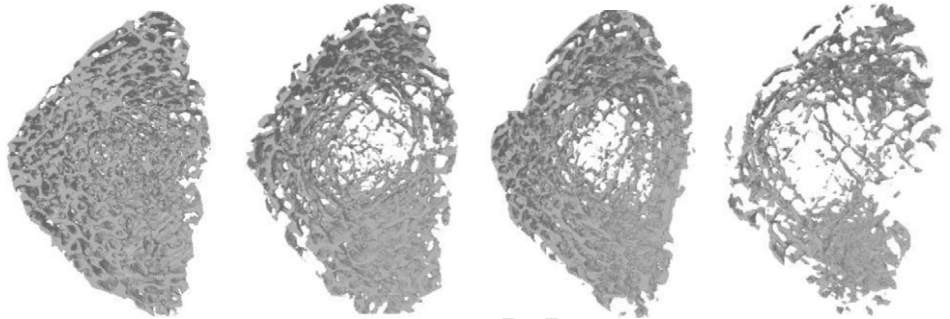
Results are expressed as absolute values; Pre: pre test (baseline); Post: post test (end of the study); P: pre: degree of significance at pre test; P post: degree of significance at post test; BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; NS: non significant.

^a Significant difference with C group ($P < 0.05$).

^b Significant difference with A25 group ($P < 0.05$).

^c Significant difference with A30 group ($P < 0.05$).

Table 2
Microarchitectural parameters of the trabecular bone.

	C (n = 12)	A25 (n = 10)	A30 (n = 11)	A35 (n = 11)	P
					
Bone volume / tissue volume BV/TV (%)	15.61 ± 5.49	13.27 ± 3.50	14.99 ± 4.58	11.74 ± 3.10	NS
Bone surface/ bone volume	44.98 ± 7.75	52.01 ± 3.37 ^a	49.53 ± 5.62	53.59 ± 4.74 ^a	0.005
BS/BV (mm ² /mm ³)					
Structure model index (SMI)	1.83 ± 0.24	1.92 ± 0.18	1.80 ± 0.26	2.01 ± 0.16	NS
Trabecular thickness Tb.Th (mm)	0.096 ± 0.012	0.084 ± 0.003 ^a	0.087 ± 0.007 ^{a,b}	0.084 ± 0.007 ^a	0.007
Trabecular number Tb.N (1/mm)	1.61 ± 0.44	1.58 ± 0.39	1.71 ± 0.48	1.39 ± 0.31 ^c	NS
Trabecular spacing Tb.Sp (mm)	0.47 ± 0.19	0.43 ± 0.11	0.44 ± 0.15	0.52 ± 0.19	NS
Degree of anisotropy (DA)	2.68 ± 0.47	2.26 ± 0.15	2.34 ± 0.31	2.31 ± 0.25	NS

C: control group; A25: group alcoholized at 25% v/v; A30: group alcoholized at 30% v/v; A35: group alcoholized at 35% v/v; NS: non significant.

^a Significant difference with C group ($P < 0.05$).

^b Significant different with A25 group ($P < 0.05$).

^c Significant different with A30 group ($P < 0.05$).

differences for whole body BMC ($P < 0.0001$) and BMD ($P < 0.0001$) remained. After adjusting for fat mass, there was still a difference in whole body BMC ($P < 0.0001$) although whole body BMD no longer displayed the differences.

3.4. Characteristics of trabecular bone

BS/BV was significantly greater in A25 and A35 compared to the C group (Table 2). Tb.Th was significantly lower in A25, A30 and A35 compared to C. There was a trend of the DA towards a decrease with alcohol ($P = 0.07$). We did not find any difference for BV/TV and Tb.N.

3.5. Characteristics of cortical bone

Po.N was significantly higher in A30 and A35 compared to the C group, but there was no difference between A25, A30 and A35 (Table 3). Ct.Po was significantly higher in A35 compared to C. PoS/CtV was significantly higher in A25, A30 and A35 vs. C. There was no difference for Po.Dm and Po.Sp.

3.6. Morphological parameters of the cortical bone (Table 3)

There were no differences between the groups regarding the external diameters in both axes. However, all the alcohol-fed groups had significantly higher internal AP and ML diameters compared to C. These parameters were also significantly higher in A35 compared to A25 and A30. The cortical thickness was smaller in both axes, with A25, A30 and A35 significantly thinner than C; and A35 thinner than A25 and A30. The femur length was significantly smaller in A35 compared to the C, A25 and A30.

3.7. Mechanical tests

The cross-sectional area (CSA) of the bones was significantly decreased in alcohol-fed groups compared to the control group and it was also significantly lower in A35 compared to A30 (Table 4). Maximal energy was decreased in A25 and A35 compared to C.

We found no differences between groups for ultimate force and stiffness.

3.8. Biochemical analysis

Serum NTx concentration was significantly decreased in A25, A30, and A35 vs. C (Table 5). It was also lower in A25 vs. both A30 and A35; and in A30 vs. A35. We did not observe any change in serum osteocalcin concentration ($P = \text{NS}$). Serum DKK1 was not significantly different between the groups but there was a trend of DKK1 to be increased in alcohol-fed groups ($P = 0.052$). Serum leptin concentration was lower in the three alcohol-fed groups compared to the control group.

3.9. Correlations

The amount of alcohol ingested was inversely correlated to the body weight gain ($P < 0.0001$, $r = -0.86$), the muscle mass gain ($P < 0.0001$, $r = -0.85$), the fat mass gain ($P < 0.0001$, $r = -0.67$), whole body BMD gain ($P < 0.0001$, $r = -0.78$), whole body BMC gain ($P < 0.0001$, $r = -0.82$). We found moderate but significant correlations between fat mass and leptin ($P = 0.016$, $r = 0.43$) and between leptin and body weight ($P = 0.008$, $r = 0.47$). We also observed a moderate and significant correlation between the CSA and the maximal energy ($P < 0.0001$; $r = 0.60$) and a strong, significant correlation between the CSA and the cortical thickness ($P < 0.0001$; $r = 0.80$).

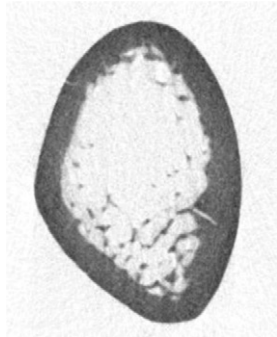
4. Discussion

The main finding of this study is that excessive ethanol consumption over 17 weeks is associated with negative alterations in cortical bone parameters, and that these effects are dose-dependent.

All three ethanol doses decreased the whole body and femur BMC and BMD compared to the control group. Moreover, the highest dose of ethanol induced the greatest reduction, as BMC and BMD were lower in A35 versus A25 and A30. These data demonstrate that

Table 3

Micro architectural parameters of the cortical bone and morphology of the femur.

	C (n = 12)	A25 (n = 10)	A30 (n = 11)	A35 (n = 11)	P
					
Cortical porosity Ct.Po (%)	1.01 ± 0.27	1.15 ± 0.30	1.12 ± 0.25	1.35 ± 0.32 ^a	0.02
Pore diameter Po.Dm (mm)	0.042 ± 0.004	0.040 ± 0.005	0.038 ± 0.004	0.040 ± 0.002	NS
Pore spacing Po.Sp (mm)	1.28 ± 0.12	1.24 ± 0.13	1.22 ± 0.08	1.18 ± 0.12	NS
Pore Surface on Volume PoS/PoV (mm ² /mm ³)	168.91 ± 30.83	172.89 ± 31.60	177.61 ± 26.93	161.88 ± 19.21	NS
Pore Surface/Cortical Volume PoS/CtV (mm ² /mm ³)	1.64 ± 0.17	1.92 ± 0.29 ^a	1.95 ± 0.27 ^a	2.16 ± 0.48 ^a	0.0008
Pore number Po.N (1/mm)	0.24 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.29 ± 0.05 ^a	0.34 ± 0.08 ^a	0.005
External Ø AP diaphysis (mm)	3.53 ± 0.16	3.49 ± 0.15	3.54 ± 0.15	3.63 ± 0.20	NS
External Ø ML diaphysis (mm)	5.28 ± 0.27	5.2 ± 0.29	5.24 ± 0.26	5.37 ± 0.20	NS
Internal Ø AP diaphysis (mm)	1.97 ± 0.17	2.19 ± 0.18 ^a	2.23 ± 0.20 ^a	2.44 ± 0.23 ^{a,b,c}	< 0.0001
Internal Ø ML diaphysis (mm)	3.72 ± 0.31	3.92 ± 0.34	3.91 ± 0.36	4.2 ± 0.30 ^{a,b,c}	0.01
Cortical thickness AP (mm)	0.78 ± 0.07	0.65 ± 0.05 ^a	0.66 ± 0.06 ^a	0.60 ± 0.04 ^{a,b,c}	< 0.0001
Cortical thickness ML (mm)	0.78 ± 0.06	0.64 ± 0.06 ^a	0.66 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.08 ^{a,b,c}	< 0.0001
Femur length (mm)	42.28 ± 1.01	42.39 ± 1.16	42.33 ± 0.87	41.22 ± 0.81 ^{a,b,c}	0.02

C: control group; A25: rats fed with alcohol at a dose of 25% v/v; A30: rats fed with alcohol at a dose of 30% v/v; A35: rats fed with alcohol at a dose of 35% v/v; NS: non significant; p: degree of significance (post test)

^a Significant difference with C group ($P < 0.05$).^b Significant different with A25 group ($P < 0.05$).^c Significant different with A30 group ($P < 0.05$).

Table 4
Biomechanical characteristics of the femur.

	C (n = 12)	A25 (n = 10)	A30 (n = 11)	A35 (n = 11)	P
Ultimate force (N)	184.46 ± 28.97	162.86 ± 29.86	171.95 ± 31.82	156.75 ± 27.27	NS
Maximal strain	14703.69 ± 3082.55	13494.20 ± 2677.88	13387.73 ± 4005.31	11222.59 ± 2908.41	NS
Cross sectional area CSA (mm ²)	8.87 ± 0.80	7.51 ± 0.54 ^a	7.73 ± 0.60 ^a	7.27 ± 0.57 ^{a,c}	0.0001
Stiffness (N/mm)	319.47 ± 58.51	293.18 ± 42.54 ^b	285.46 ± 42.75	274.01 ± 58.64	NS
Energy max (N-mm)	118.39 ± 40.36	87.13 ± 33.23 ^a	89.78 ± 31.32	76.17 ± 31.52 ^a	0.04

C: control group; A25: rats fed with alcohol at a dose of 25% v/v; A30: rats fed with alcohol at a dose of 30% v/v; A35: rats fed with alcohol at a dose of 35% v/v; NS: non significant; p: degree of significance (post test)

^a Significant difference with C group ($P < 0.05$).

^b Significant different with A25 group ($P < 0.05$).

^c Significant different with A30 group ($P < 0.05$).

ethanol consumption damages BMC and BMD in a dose-dependent manner. The correlation between the amount of alcohol ingested and the degree of bone loss has previously been reported in men [4]. These data also confirm that when ethanol-derived calories comprise around 38% of total calories, the effects of ethanol on bone are more damaging.

We observed lowest gains in body weight, fat mass and lean mass in the alcohol-fed groups compared to controls. This phenomenon has been observed previously in rats and in humans [18–20]. Moreover, the gains were lower in the highest alcohol dose. Alcohol is a high caloric beverage (about seven calories per gram) but these calories are considered as “empty” because they do not contain any beneficial nutrients [21,22]. As the diets given to the rats in each of the four groups were isocaloric, the differences observed following the protocol cannot be attributed to a difference in the total calories consumed; rather they are due to the calories provided by ethanol. Lean mass and fat mass are key determinants of bone mass [23]. Lean mass creates mechanical stimuli that enhance bone mass, while fat mass acts as an endocrine gland and regulates bone mass via adipokines such as leptin. These mechanisms underlie the indirect effect of alcohol on bone. In this study, leptin concentration was decreased in all alcohol-fed groups compared to controls. The decreased fat mass induced by alcohol may be the reason of the decreased leptin concentration. As reported by Cirmanova et al., leptin has a direct anabolic effect within the bone, leading to the differentiation of bone marrow stem cells to the osteoblastic cell lineage [24]. It is likely the decreased leptin concentration could lead to decrease bone mass via the decline of osteoblastic differentiation in the bone marrow, explaining why some studies report higher adipocyte numbers in bone marrow [25]. We continued to observed significant differences for BMC and BMD between the groups even after adjusting for fat mass and lean mass. Therefore, the observed BMC and BMD decreases were also caused in part by direct effects of alcohol on bone.

In the last decade, trabecular bone microarchitecture has often been studied in addition to BMC and BMD to further understand changes to the bone and to better predict fractures. In the present study, Tb.Th was decreased in the three alcohol-fed groups

compared to controls while there were no differences between the alcohol-fed groups. Our results confirm the literature showing that alcohol intake reduces the cancellous bone volume and leads to trabecular thinning [1,11,19,26]. The evolution of BS/BV in A25 and A35 compared to the control group and the trend of DA to decrease with alcohol may indicate that alcohol tends to disorganize bone tissue.

In this study, the pore surface on cortical volume was increased in the three alcohol-fed groups compared to the group C. The 30% and 35% v/v alcohol doses increased the number of pores in the cortical bone compared to controls, but not the 25% dose. Moreover, only the 35% v/v dose increased the cortical porosity compared to controls. This is evidence of the damaging effect of alcohol on the cortical bone and helps us understand why alcohol may decrease bone strength. Hogan et al. [27] studied the cortical bone area using histomorphometry and showed that cortical bone area was lower in alcohol fed animals compared to controls. In the same way, Madalozzo et al. [19] reported significantly lower cortical volume in alcohol-fed rats compared to controls after studying the microarchitecture by micro-CT. Our study is the first showing the effect of alcohol on cortical pores and porosity. In the normal aging process, the increased porosity is due to an increase in the canal diameters rather than to an increase in the canal number [28,29]. In our rats, the porosity was due to an increase in the pore number, as we did not observe any change in the pore diameters. This suggests that chronic alcohol consumption affects cortical porosity in a manner different to the normal ageing process. In the current study, we also show a dose-dependent effect of ethanol on the cortical bone. Our results showed a decrease in the cortical thickness in all alcohol-fed groups compared to controls. This decrease in cortical thickness was observed in all three alcohol doses and this was also dose-dependent, with the rats in the group receiving the highest dose of alcohol having the lowest cortical thickness values. Such a decrease in the cortical thickness following alcohol consumption has been reported previously in rats [19,30]. Broulik et al. suggested this may be due to either increased resorption at the endocortical surface, or decreased formation at the endosteal or periosteal surface. In our study, the external diameters were not modified by alcohol, so the

Table 5
Biological markers of bone formation, bone resorption and leptin.

	C (n = 11)	A25 (n = 10)	A30 (n = 10)	A35 (n = 10)	P
OC (ng/mL)	229.82 ± 50.42	210.10 ± 55.10	295.54 ± 88.22	232.97 ± 31.77	NS
NTx (nM BCE/L)	45.79 ± 8.62	13.41 ± 3.26 ^a	19.86 ± 3.53 ^{a,b}	31.53 ± 5.75 ^{a,b,c}	< 0.0001
DKK1 (pg/mL)	56.85 ± 18.78	146.80 ± 120.68	143.93 ± 89.82	61.99 ± 26.77	0.052
LEPTIN (ng/mL)	4.43 ± 0.86	2.71 ± 1.16 ^a	3.21 ± 0.80 ^a	3.28 ± 0.68 ^a	0.015

C: control group; A25: rats fed with alcohol at a dose of 25% v/v; A30: rats fed with alcohol at a dose of 30% v/v; A35: rats fed with alcohol at a dose of 35% v/v; OC: osteocalcin concentration (bone formation marker); NTx: cross-linked N-terminal telopeptides of type I collagen (bone resorption marker); DKK1: dickkopf 1 (negative bone formation marker); p: degree of significance (post test); NS: non significant.

^a Significant difference with C group ($P < 0.05$).

^b Significant different with A25 group ($P < 0.05$).

^c Significant different with A30 group ($P < 0.05$).

decreased cortical thickness was due either to an increased endocortical resorption or to decreased endocortical formation, which is supported by our observations of an increase in the medullary cavity of the femur.

A decrease of the femur length was observed only in A35. This was previously reported by Maddalozzo et al. [19] in 3-week-old and 9-week-old male Sprague-Dawley rats following a diet where ethanol represented 35% of the total caloric intake. In their study the decreased bone size was likely due to the self-imposed caloric restriction in alcohol-fed rats which consumed *ad libitum*. In our study, there was no daily caloric intake difference between the groups but the alcohol-fed rats consumed less food than the control rats. Thus, the decreased growth reported in that study may have been due to a restriction of nutrients from food as underlined by Maddalozzo or to specific action of ethanol and its metabolic use [21].

In the present study the CSA of the alcohol-fed rats was significantly lower than controls. It was also significantly lower in the A35 group compared to A30. This is explained by the decreased cortical thickness observed in the femur, as shown by the very strong correlation found between these two parameters. The decrease of the maximal energy absorbed by the femur found in A25 and A35 compared to C is interesting as it is correlated to the decrease of the CSA ($P < 0.0001$; $r = 0.60$). They may explain the reduced bone strength observed in alcoholics and show the importance of bone size and morphology in regards to bone strength. The maximal energy is potentially not significantly different in A30 group compared to C because the CSA is not decreased as much as for the other doses. Our results are consistent with the report by Kusy et al. [31] of a reduced mechanical strength of the femur following a four-week ethanol diet (8% w/v) in male and female rats.

In our study, NTx concentrations were significantly lower in the alcohol-fed groups compared to the control group. NTx was also lower in the lowest doses compared to the highest dose. Moreover, we did not observe any change in bone formation. This is interesting because whilst the data concerning bone resorption is a little controversial, most of the studies that assess the effects of alcohol on bone reported a decrease in bone formation [19,30,32]. However, Sampson et al. reported no change in serum osteocalcin levels following a 35% ethanol-derived caloric diet in young female rats [33]. The present data confirm the dose effect of alcohol, but the higher decrease of bone resorption in the lower alcohol doses is curious. Chronic alcohol consumption has been shown to decrease bone remodeling mainly with low alcohol doses (2.5% ethanol diet) [34,35]. A possible explanation might be that the bone remodeling process is not a continuous and regular one. As Turner highlights [10], there has been no longitudinal study on the effects of alcohol on bone remodeling. Therefore, it cannot be excluded that there are periods of intense bone resorption followed by resting metabolic periods with little or no change in bone remodeling. Secondly, according to Parfitt [36], bone formation and bone resorption must not be considered as two independent processes, but as coupled processes. Therefore, what is important is not the separated effects of alcohol on bone formation and resorption, but that alcohol changes and decelerates bone remodeling, which may affect normal bone repair as shown with bisphosphonates [37]. There was a trend of DKK1 to be increased in the alcohol-fed groups compared to controls. DKK1 is an antagonist of the Wnt/ β -catenin pathway, which is a potential regulator responsible for directing mesenchymal stem cells to differentiate toward the osteoblastic lineage [38]. An increase of DKK1 could be responsible for disturbed bone formation. This has been reported by Chen et al. following alcohol consumption in female rats [38].

In conclusion, alcohol decreased not only bone density and trabecular bone, but it also induced negative changes in cortical thickness and porosity. In addition, there was a marked increase of

the potency of alcohol at a dose of 35% v/v, which induced a greater degree of damage to the cortical porosity, the femur length and the BMD gain. Our findings suggest that chronic alcohol consumption has a profound negative effect on the cortical bone, which adversely affects bone strength.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Institut de recherche scientifique sur les Boissons (IREB, France) for its financial support, Eric Dolléans, Gael Y Rochefort, Stéphane Pallu, Arnaud Boude-not, and Leila Khacef for their technical help during sacrifices. We acknowledge Jean-Jacques Beaubois and Dr Patrick Michenet from the department of anatomopathology and cytogenetic at Orléans Regional Hospital for their help with the liver staining and slices. We thank Nicola L Fazzalari for helpful comments during the preparation of this manuscript. We also would like to acknowledge the laboratory of neurobiology in Orléans for the housing of the rats.

References

- [1] Diamond T, Stiel D, Lunzer M, et al. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med* 1989;86:282–8.
- [2] Olszynski WP, Shawn Davison K, Adachi JD, et al. Osteoporosis in men: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Clin Ther* 2004;26:15–28.
- [3] Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 2009;44:468–75.
- [4] Gonzalez-Calvin JL, Garcia-Sanchez A, Bellot V, et al. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol* 1993;28:571–9.
- [5] Laitinen K, Lamberg-Allardt C, Tunninen R, et al. Bone mineral density and abstinence-induced changes in bone and mineral metabolism in noncirrhotic male alcoholics. *Am J Med* 1992;93:642–50.
- [6] De Vernejoul MC, Herve BJ, Guerin M, Hott J, Modrowski M, Kuntz D, Miravet D, Ryckewaert LA. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Orthop Relat Res* 1982;179:107–15.
- [7] Bikle DD, Stesin A, Halloran B, et al. Alcohol-induced bone disease: relationship to age and parathyroid hormone levels. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:690–5.
- [8] Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, et al. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health. Study in a rat model. *Eur J Appl Physiol* 2011;DOI: 10.1007/s00421-011-1916-1.
- [9] Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Mander A, et al. Moderate ingestion of alcohol is associated with acute ethanol-induced suppression of circulating CTX in a PTH-independent fashion. *J Bone Miner Res* 2009;24:1380–8.
- [10] Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1693–701.
- [11] Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, et al. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res* 2001;16:589–94.
- [12] Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *J Endocrinol Invest* 2004;27:99–105.
- [13] Hogan HA, Groves JA, Sampson HW. Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1825–33.
- [14] Sampson HW, Perks N, Champney TH, et al. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1375–84.
- [15] Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, et al. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone* 2005;37:622–33.
- [16] Lotinun S, Evans GL, Bronk JT, et al. Continuous parathyroid hormone induces cortical porosity in the rat: effects on bone turnover and mechanical properties. *J Bone Miner Res* 2004;19:1165–71.
- [17] Bonnet N, Beaupied H, Vico L, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2007;22:578–88.
- [18] Gonzalez-Reimers E, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Santolaria-Fernandez F, et al. Pro-inflammatory cytokines in stable chronic alcoholics: relationship with fat and lean mass. *Food Chem Toxicol* 2007;45:904–9.
- [19] Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* 2009;20:1529–38.
- [20] Preedy VR, Reilly ME, Patel VB, et al. Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body. *Nutrition* 1999;15:604–8.

- [21] Lands WE, Zakhari S. The case of the missing calories. *Am J Clin Nutr* 1991;54:47–8.
- [22] Lieber CS. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993;7:581–608.
- [23] Pluijm SM, Visser M, Smit JH, et al. Determinants of bone mineral density in older men and women: body composition as mediator. *J Bone Miner Res* 2001;16:2142–51.
- [24] Cirmanova V, Bayer M, Starka L, et al. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* 2008;57:S143–51.
- [25] Wang Y, Li Y, Mao K, et al. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2003:213–24.
- [26] Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1534–42.
- [27] Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, et al. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:809–16.
- [28] Cooper DM, Thomas CD, Clement JG, et al. Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. *Bone* 2007;40:957–65.
- [29] Thomas CD, Feik SA, Clement JG. Increase in pore area, and not pore density, is the main determinant in the development of porosity in human cortical bone. *J Anat* 2006;209:219–30.
- [30] Broulik PD, Vondrova J, Ruzicka P, et al. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res* 2010;59:599–604.
- [31] Kusy RP, Hirsch PF, Peng TC. Influence of ethanol on stiffness, toughness, and ductility of femurs of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1989;13:185–9.
- [32] Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 1998;16:337–41.
- [33] Sampson HW, Chaffin C, Lange J, et al. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:352–9.
- [34] Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, et al. Moderately high consumption of ethanol suppresses bone resorption in ovariectomized but not in sexually intact adult female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1150–4.
- [35] Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, et al. Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1206–13.
- [36] Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* 2000;26:319–23.
- [37] Sellmeyer DE. Atypical fractures as a potential complication of long-term bisphosphonate therapy. *JAMA* 2010;304:1480–4.
- [38] Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, et al. A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 2010;25:1117–27.

ETUDE 3 : EFFETS D'UNE FORTE ALCOOLISATION CHRONIQUE SUR L'OSTEOCYTE CHEZ LE RAT.

Cette étude a donné lieu à :

- la publication d'un article original :

Maurel DB, Jaffré C, Rochefort GY, Aveline PC, Boisseau N, Uzbekov R, Gosset D, Pichon C, Fazzalari NL, Pallu S*, Benhamou CL* (* : co derniers auteurs). Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. Bone, 2011; 49(3):543-52. Impact Factor (2011)= 4.601.

- des communications en congrès nationaux et internationaux :

Communication orale :

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Dolleens E, Jaffré C, Benhamou CL. Diminution de l'ostéoformation dans l'ostéoporose d'origine alcoolique : rôle de l'ostéocyte dans un modèle murin. Société Française de Rhumatologie (SFR), Paris, Décembre 2010.

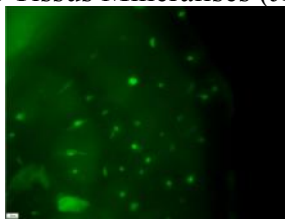
Communications affichées :

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Dolleens E, Jaffré C, Benhamou CL. Impact of chronic alcohol consumption on the osteocytes and bone marrow adipocytes in a wistar rat model. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, Octobre 2010.

> Proceeding dans J Bone Miner Res (2010), 25 (Suppl 1).

Maurel DB, Pallu S, Aveline PC, Boisseau N, Rochefort GY, Jaffré C, Benhamou CL. Secondary alcohol-induced osteoporosis is linked to osteocyte apoptosis and bone fat excess. European Congress of Clinical and Economic aspects of Osteoporosis (ECCEO), Valence, Mars 2011.

Maurel DB, Jaffré C, Aveline PC, Boisseau N, Benhamou CL, Pallu S. L'ostéoporose d'origine alcoolique est liée à une augmentation de l'apoptose des ostéocytes chez le rat. Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Paris, Mai 2011.



I. Introduction

La consommation excessive d'alcool entraîne des changements au niveau du fonctionnement et du nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes mais les effets de l'alcool sur l'ostéocyte ne sont pas encore bien connus à ce jour. Il a été montré récemment que l'ostéocyte est une cellule importante dans l'os et qu'elle régule la formation et la résorption osseuse (Bonewald 2011). Une étude a montré qu'un traitement alcoolisé administré de façon chronique chez la rate entraîne une modification de la morphologie des ostéocytes (Lorenz et Janicke-Lorenz 1983). Une autre étude a observé chez le lapin une augmentation de l'apoptose des ostéocytes ainsi qu'une augmentation du nombre de lacunes vides, dans un modèle d'ostéonécrose (Wang *et al.* 2003). Cependant, aucune étude n'a analysé les effets de l'alcool sur l'ostéocyte dans un modèle d'ostéoporose induite par la consommation d'alcool.

II. Objectif étude 3

Le but de cette étude était d'analyser les effets d'une consommation chronique d'alcool sur la morphologie et l'apoptose des ostéocytes *in situ*, dans un modèle animal d'ostéoporose induite par l'alcool.

III. Méthodologie spécifique

24 rats mâles Wistar ont été répartis en deux groupes : contrôle (C) ou alcool (A35). Les rats du groupe alcool ont consommé une boisson alcoolisée (35% volume/volume) pendant 17 semaines, et les rats du groupe contrôle ont bu de l'eau. Le pourcentage d'alcool a été augmenté progressivement de 3% tous les trois jours jusqu'à la concentration finale. La nourriture était séparée de la boisson pour mimer une alcoolisation humaine et le nombre de kilocalories a été ajusté par rapport au groupe A35 afin que les deux groupes consomment le même nombre de kilocalories chaque jour. Cette population est la population de l'étude 2.

Une densitométrie a été réalisée avant le sacrifice afin de vérifier l'induction d'une « ostéoporose » d'origine alcoolique. La microarchitecture de l'os cortical et trabéculaire a été étudiée au fémur par microCT. Afin de vérifier l'alcoolisation des animaux, des coupes de foie d'une épaisseur de 3 μ m ont été réalisées *post mortem* et colorées au HES (hématoxyline-

éosine-safran) puis observée en microscopie à fond clair.

Des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de tibia : caspase-3, CD44, ostéocalcine et collagène de type I, afin d'étudier l'apoptose, la différenciation des ostéocytes et la formation osseuse. Des coupes de tibias ont été colorées au bleu de Toluidine et imagées en microscopie à fond clair dans le but d'étudier le nombre de lacunes ostéocytaires ainsi que le nombre de lacunes vides. Ces coupes nous ont également permis d'analyser les gouttelettes lipidiques dans la moelle (nombre et surface des gouttelettes). Des sections ultra-fines ont été réalisées à Tours et imagées en microscopie électronique à transmission afin d'observer la morphologie en 2D des ostéocytes et la présence ou non d'apoptose. Des lames immunomarquées ont été imagées en microscopie confocale, dans le but d'analyser la morphologie en 3D des ostéocytes et leur orientation.

IV. Résultats

A. Coupes histologiques du foie

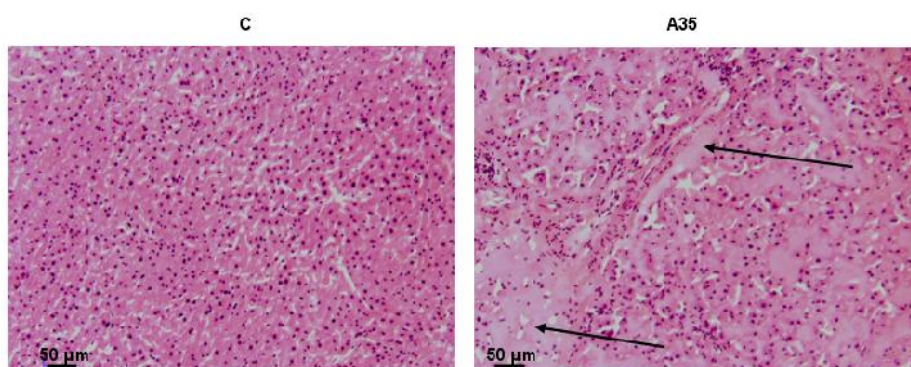


Figure 56 : Coupes histologiques du foie.

Les coupes histologiques du foie montrent une dilatation des veines sinusoides dans le groupe A35, caractéristique d'une pathologie appelée péliose (Figure 56). Ceci indique que le tissu a été modifié par l'alcool. En revanche, nous n'avons pas observé de stéatose ou de présence d'adipocytes dans le tissu hépatique.

B. DMO, composition corporelle et dosages biochimiques

Composition corporelle

Le poids, la masse maigre et la masse grasse étaient significativement plus faibles dans le groupe A35 comparé au groupe C (Cf tableau 17 de l'étude 2).

CMO et DMO

Le CMO et la DMO au fémur et au corps entier étaient significativement plus faibles dans le groupe A35 comparé au groupe contrôle (Cf tableau 17 de l'étude 2).

C. Microarchitecture trabéculaire et corticale

Microarchitecture trabéculaire

Les BV/TV et Tb.Th étaient significativement plus faibles dans le groupe A35 (Cf tableau 18 de l'étude 2).

Microarchitecture corticale

Les PoS/CtV et Ct.Po étaient significativement supérieurs dans le groupe A35 comparé au groupe C. Le Po.Sp était diminué dans le groupe A35 tandis que le Po.N était augmenté chez le groupe A35 comparé au groupe C. Le Ct.Th était diminué dans le groupe A35 ($p < 0,0001$). Le diamètre interne était plus grand dans le groupe A35 comparé au groupe C. La longueur du fémur était également inférieure dans le groupe A35 comparé au groupe contrôle (Cf tableau 19 de l'étude 2).

D. Biochimie

Les concentrations en NTx étaient significativement plus faibles avec le traitement alcoolisé. Les concentrations en TRAP étaient également diminuées de 27% avec l'alcool. La leptine sérique était inférieure de 23% suite au traitement alcoolisé (Cf tableau 21 de l'étude 2 et article 3).

E. Immunomarquages avec les anticorps Caspase-3, CD44, ostéocalcine et collagène 1

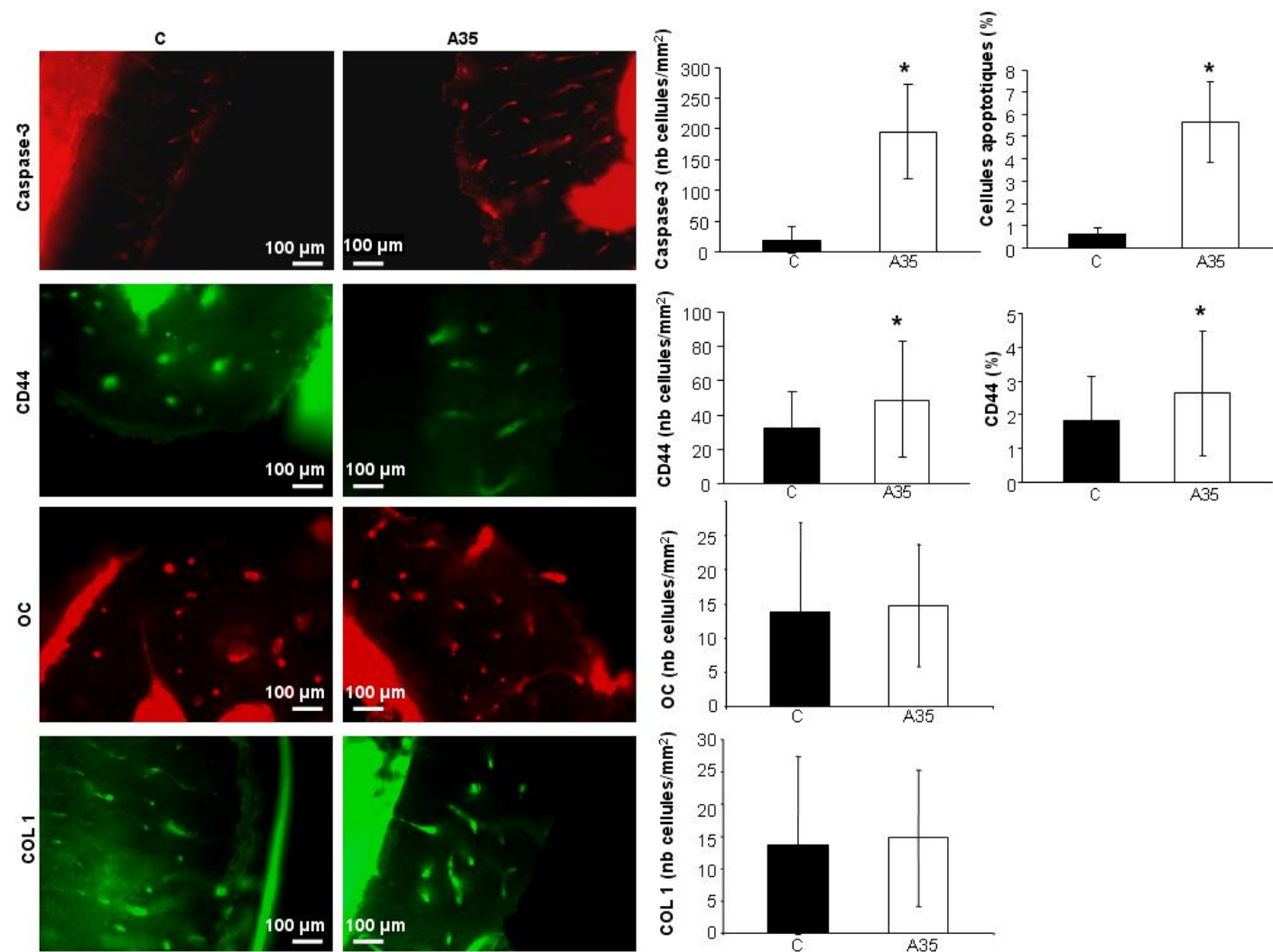


Figure 57 : Immunomarquages avec les anticorps caspase-3, ostéocalcine (OC), cluster de différenciation 44 (CD44) et collagène de type I (COL 1).

* Différence significative avec le groupe C.

Immunomarquages avec les anticorps Caspase-3, CD44, ostéocalcine et collagène 1

Le nombre de cellules marquées au CD44 était supérieur dans le groupe A35 comparé au groupe C (+51%). Nous avons également observé plus de cellules marquées à la caspase-3 dans le groupe A35 comparé au groupe C (+916%) (Figure 57).

F. Morphologie des lacunes ostéocytaires et gouttelettes lipidiques dans la moelle osseuse.

Lacunes ostéocytaires dans l'os cortical

Il y avait 35% de plus de lacunes vides dans le groupe A35. La surface moyenne des lacunes était 38% plus grande dans le groupe A35 comparé au groupe C. La surface occupée par les pores dans l'os cortical (porosité lacunaire) était également supérieure dans le groupe A35 versus C (Figure 58).

Gouttelettes lipidiques dans la moelle osseuse

La taille des gouttelettes lipidiques dans la moelle osseuse était supérieure dans le groupe A35 vs C. La surface et le diamètre des gouttelettes lipidiques étaient supérieurs. De plus, le nombre de gouttelettes lipidiques par unité de surface était plus important dans le groupe alcoolisé (+351%) (Figure 58). En conséquence, une plus grande surface de la moelle osseuse du tibia était occupée par des gouttelettes lipidiques dans le groupe A35 ($29,0 \pm 13,8$ vs $4,4 \pm 5,9$ %; $p < 0,0001$).

Morphologie des lacunes ostéocytaires et gouttelettes lipidiques dans la moelle osseuse.

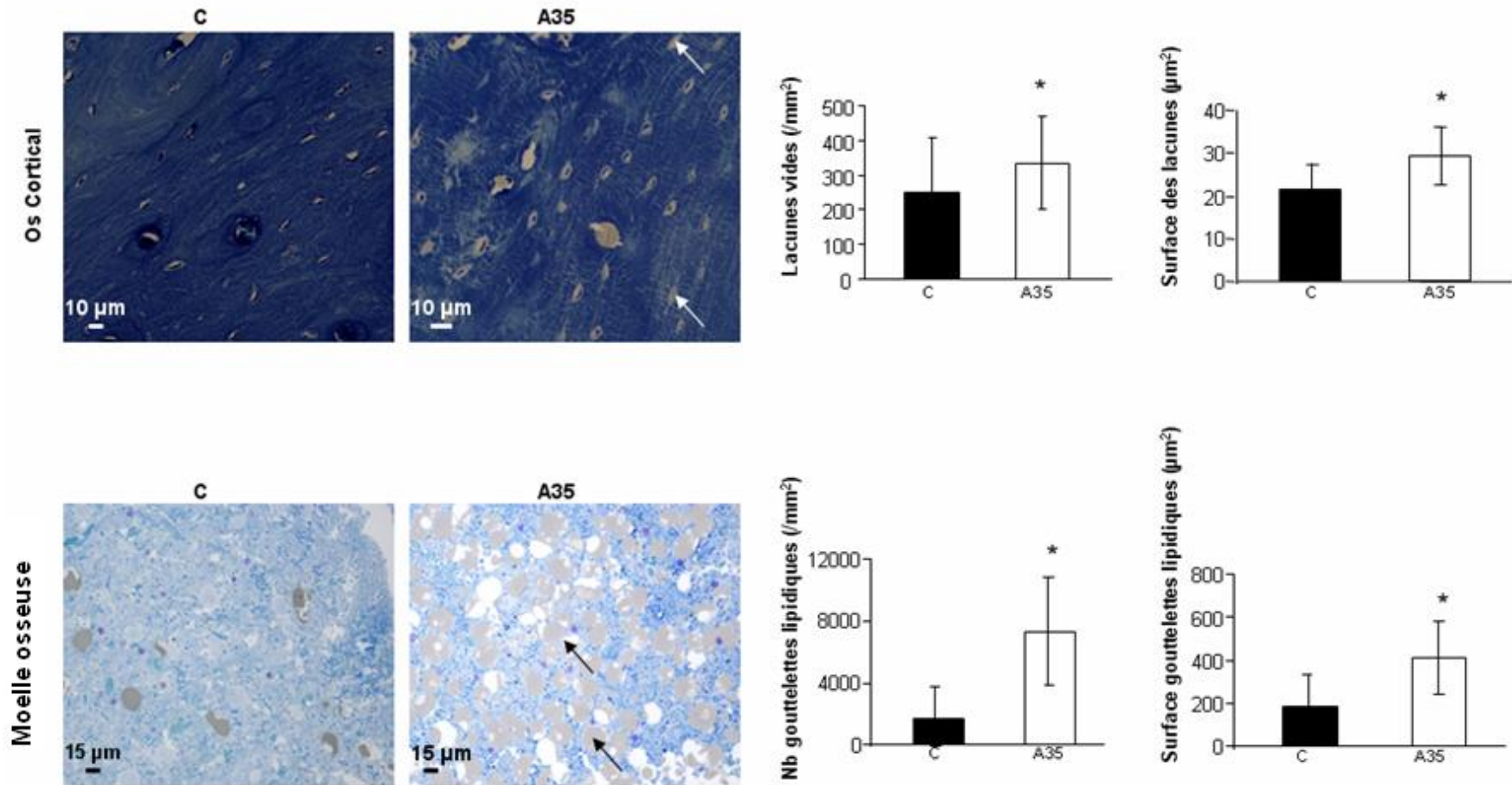


Figure 58 : Surfaces des lacunes ostéocytaires, nombre de lacunes vides dans l'os cortical (tibia) et nombre et surfaces des gouttelettes lipidiques dans la moelle.

* Différence significative avec le groupe C.

G. Morphologie 2D des ostéocytes

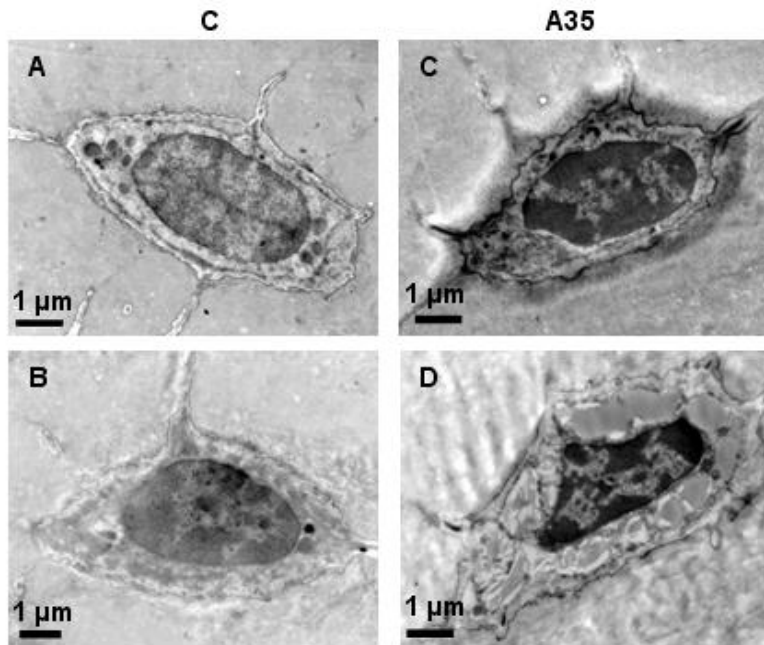


Figure 59 : Images d'ostéocytes en 2D obtenues sur des coupes ultra-fines et imagées en microscopie électronique à transmission.

Nous avons observé beaucoup plus d'ostéocytes apoptotiques dans le groupe A35 comparé au groupe C (Figure 59).

H. Morphologie 3D des ostéocytes (microscopie confocale)

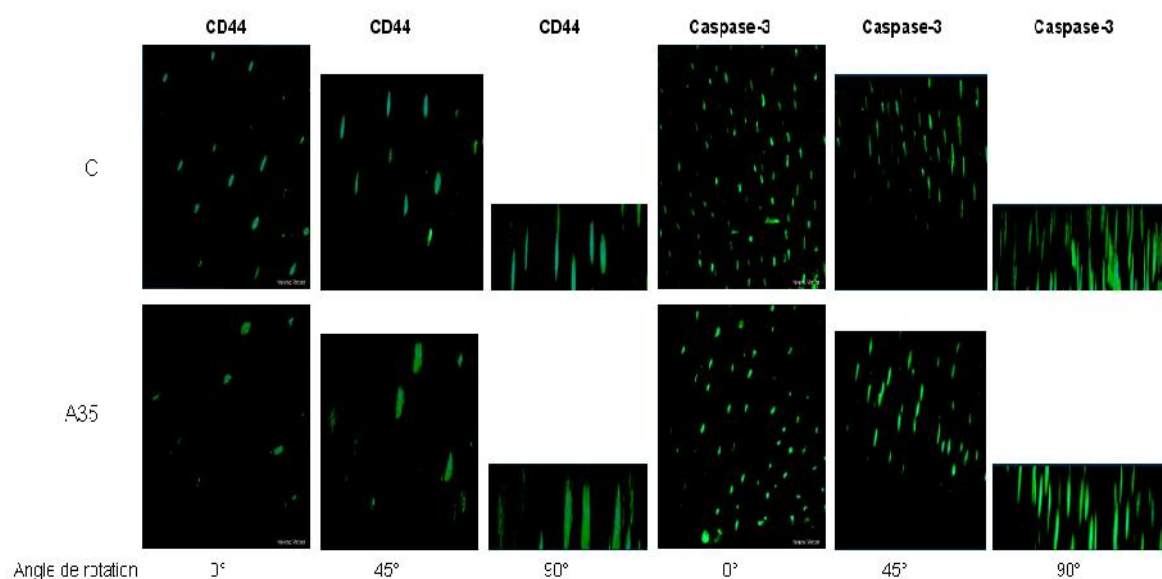


Figure 60 : Morphologie en 3D des ostéocytes obtenues en microscopie confocale après immuno-marquages avec du CD44 et de la caspase-3.

Il n'y avait pas de différence dans l'orientation des ostéocytes entre les deux groupes. Cependant la morphologie des ostéocytes était modifiée suite au traitement alcoolisé. Les ostéocytes du groupe A35 étaient plus larges et moins fusiformes que ceux observés dans le groupe C (Figure 60).

Corrélations

La DMO du fémur était corrélée à la leptine ($r = 0,61$, $p=0,008$). La concentration de leptine était fortement corrélée avec le pourcentage de lipides dans la moelle ($r = -0,79$, $p=0,05$). Il existait une corrélation modérée entre le nombre de gouttelettes lipidiques dans la moelle et le marquage avec la caspase-3 ($r = 0,46$, $p=0,018$). Il y avait une forte corrélation inverse entre l'expression de la caspase-3 clivée et la DMO au fémur ($r = -0,72$, $p=0,0017$), et des corrélations modérées entre la caspase-3 et la DMO au corps entier ($r = -0,54$, $p=0,018$) et entre la caspase-3 et le Tb.Th ($r = -0,45$, $p=0,05$). La DMO était fortement inversement corrélée avec le nombre de gouttelettes lipidiques dans la moelle ($r = -0,70$, $p=0,002$ au fémur; $r = -0,69$, $p=0,0027$ au corps entier). Le Tb.Th était également corrélée de façon modérée avec le nombre de gouttelettes lipidiques dans la moelle ($r = -0,62$, $p=0,007$).

V. Discussion

Le principal résultat de cette étude concerne l'augmentation très importante du nombre d'ostéocytes apoptotiques, phénomène vraisemblablement relié à l'ostéopénie observée chez les animaux traités. Cette étude a aussi confirmé qu'une consommation chronique d'alcool induit une réduction de la DMO, et de plus faibles épaisseurs d'os trabéculaire et cortical chez le rat.

Le traitement alcoolisé a entraîné une réduction du gain de poids, de masse maigre et de masse grasse chez les animaux, ce qui est cohérent avec les observations faites dans la littérature (Maddalozzo *et al.* 2009).

La diminution de la DMO observée dans le groupe A35, ainsi que les plus faibles valeurs de BV/TV et de Tb.Th valident notre modèle d'ostéopénie induite par l'alcool.

L'os cortical était également touché par l'alcool : nous avons observé une plus faible épaisseur corticale au niveau du fémur dans le groupe A35, ainsi qu'un plus grand nombre de pores. Nous avons observé 35% de lacunes vides en plus dans le groupe alcoolisé, et la surface des lacunes était supérieure dans ce groupe. Il y avait beaucoup plus d'apoptose des ostéocytes dans le groupe A35 comparé au groupe C. Le marquage à la caspase-3 clivée était corrélé avec les valeurs de DMO. Le contenu de la moelle a changé en faveur des triglycérides. Ce contenu était corrélé à la DMO. Cette différenciation pourrait être médiée par la leptine, hypothèse renforcée par l'hypoleptinémie observée dans le groupe A35 et par la corrélation montrée entre la leptine et le contenu lipidique dans la moelle. La morphologie des ostéocytes était modifiée dans le groupe A35.

En conclusion, ces résultats montrent que l'ostéopénie observée suite à une alcoolisation chronique et excessive est associée à un excès d'apoptose des ostéocytes et à une accumulation de lipides dans la moelle. L'hypoleptinémie sérique pourrait jouer ici un rôle clé dans l'augmentation de l'adiposité médullaire.

Nous avons montré dans cette étude que l'ostéoporose d'origine alcoolique est associée à une augmentation très élevée de l'apoptose des ostéocytes, ainsi qu'à une modification de leur morphologie. L'augmentation de l'apoptose des ostéocytes est corrélée à la diminution de la DMO. Nous avons de plus mis en évidence une augmentation de lipides dans la moelle osseuse avec l'alcool, augmentation corrélée aux valeurs de DMO. Suite à ce travail, nous avons souhaité approfondir plus en détails la

relation entre DMO, apoptose des ostéocytes et métabolisme lipidique. C'est l'objectif de l'étude 4.

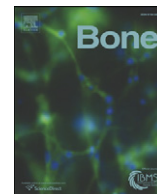
Article 3



Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone



Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia^{☆,☆☆}

D.B. Maurel^{a,*}, C. Jaffre^a, G.Y. Rochefort^a, P.C. Aveline^a, N. Boisseau^b, R. Uzbekov^c, D. Gosset^d, C. Pichon^d, N.L. Fazzalari^{a,e}, S. Pallu^{a,1}, C.L. Benhamou^{a,1}

^a Unité Inserm U658, Hôpital Porte Madeleine, Orleans, France

^b Laboratoire de Biologie des Activités Physiques et Sportives (BAPS), EA 3533, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France

^c Département des Microscopies, Programme Pluriformation Analyse des Systèmes Biologiques, Université de Tours, Faculté de Médecine, Tours, France

^d Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS, Orléans, France

^e Bone and Joint Research Laboratory, SA Pathology, Adelaide, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2011

Revised 30 May 2011

Accepted 1 June 2011

Available online 13 June 2011

Edited by: Rene Rizzoli

Keywords:

Bone microarchitecture

Osteocyte

Bone turnover markers

Apoptosis

Alcohol

ABSTRACT

Introduction: Alcohol is known to decrease bone mineral density (BMD) and to induce trabecular microarchitecture deterioration. However, little is known about the effects of chronic alcohol consumption on osteocytes *in situ*. The aim of this study was to assess the effects of a high alcohol dose on osteocytes in an alcohol-induced osteopenia model.

Materials and methods: 24 male Wistar rats, 2-months old were separated in 2 groups: Control (C) or Alcohol (A35). The rats in the A35 group drank a beverage composed of 35% ethanol v/v mixed to water for 17 weeks. BMD was assessed by DXA, while the microarchitecture was analyzed using μ CT. Bone remodeling was studied measuring serum concentration of osteocalcin, NTx and TRAP. Bone marrow adiposity, osteoblastic lineage differentiation, osteocyte morphology and apoptosis were assessed using bright field, epifluorescence, transmission electron and confocal microscopy.

Results: BMD, trabecular thickness, TRAP and NTx concentration were significantly decreased in A35, while cortical thickness was thinner. There were 10 fold more cells stained with cleaved caspase-3, and 35% more empty lacunae in A35, these data indicating a large increase in osteocyte apoptosis in the A35 group. The number of lipid droplets in the marrow was increased in A35 (7 fold). Both the osteocyte apoptosis and the fat bone marrow content strongly correlated with femur BMD ($p = 0.0017$, $r = -0.72$ and $p = 0.002$, $r = -0.70$) and whole body BMD.

Conclusion: These data suggest that low BMD is associated with osteocyte apoptosis and bone marrow fat content in alcohol-induced osteopenia.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Chronic alcohol consumption has been associated with a lower bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) in trabecular and cortical bone [1], enhancing the risk of osteoporotic

fracture [2,3]. This osteopenia is considered as a consequence of an unbalance in bone remodeling [3].

Several data suggest a direct effect of ethanol on osteoblasts and osteoclasts [1,4]. Bone formation is often decreased and bone resorption is sometimes increased in drinkers *versus* non drinkers [5,6] and in animal models [7,8]. The decrease of bone formation in men has been shown to be due to an inhibition of the osteoblast proliferation and activity [9,10]. The inhibitory effects of alcohol on bone formation seem to be dose dependent, as well as the effects on bone resorption [3]. In a study by Turner, the bone formation rate (BFR) decreased as the ethanol dose increased, while the number of osteoclasts decreased with low alcohol consumption but not with high doses [3]. These results confirm that excessive alcohol consumption is responsible for an uncoupling process with a reduction of bone formation and in some studies an excess in bone resorption [7,11].

Osteocyte is the third bone cell type and is the most abundant in bones [12]. It is embedded in the bone matrix and has not been as much studied as osteoblasts and osteoclasts because of its localization.

[☆] This work was supported by two grants from the IREB (Institut de Recherche sur les Boissons, France) and the Programme interdisciplinaire Longévité et vieillissement, CNRS, France.

^{☆☆} Disclosures: All the authors state that they have no conflicts of interest.

* Corresponding author at: IPROS, Unité Inserm U658, Hôpital Porte Madeleine, 1 rue porte Madeleine, BP 2439, 45032 Orleans cedex 01, France. Fax: +33 238744024.

E-mail addresses: delphine.maurel@inserm.fr (D.B. Maurel), christelle.jaffre@univ-orleans.fr (C. Jaffre), gael.rochefort@gmail.com (G.Y. Rochefort), aveline.priscilla@gmail.com (P.C. Aveline), Nathalie.BOISSEAU@univ-bpclermont.fr (N. Boisseau), rustuzbekov@aol.com (R. Uzbekov), david.gosset@cnrs-orleans.fr (D. Gosset), chantal.pichon@cnrs-orleans.fr (C. Pichon), nick.fazzalari@health.sa.gov.au (N.L. Fazzalari), stephane.pallu@inserm.fr (S. Pallu), claudel-laurent.benhamou@chr-orleans.fr (C.L. Benhamou).

¹ Both senior authors equally contributed to this work.

It was thought to be a passive cell but some recent studies attribute important roles to osteocytes such as the mechano-transduction activity [13]. It is now understood that the osteocyte network is connected to bone lining cells on the bone surface and with cells within the bone marrow [14]. One of the roles of the osteocyte is to send signals to prevent bone loss under normal conditions, or to induce bone loss in response to unloading, to conserve energy [15,16]. Osteocyte apoptosis has been shown to signal the triggering of resorption [17,18]. It has also been shown that some proteins expressed in osteocytes can target osteoblasts to inhibit bone formation [19]. In patients with different bone pathologies such as osteopenia and osteopetrosis, osteocytes are associated with increased lacunar size and different 3D morphology compared to osteoarthritis osteocytes, which may reflect an adaptation in response to environmental factors such as different external loading conditions [20]. For example, it has been shown that the administration of glucocorticoids increases the lacunar size and induces the apoptosis of osteocytes (revealed by trypan blue, nuclear morphology or caspase 3 activation) [21].

Recently, Vatsa et al. [22] have demonstrated differences in alignment of osteocytes between mouse fibulae and calvaria samples, and have underlined the possible role of multi-directional loading in calvaria versus unidirectional loading in fibula in this different anisotropy. Characterization and location of osteocytes *in situ*, especially their spatial relationships with the bone matrix, have been particularly difficult because the mineralized matrix of bone was an impediment in the analysis of their fine structural details at the subcellular level *in situ*. Nevertheless, combination of imaging by confocal microscopy or classic photonic epifluorescent microscopy and recently developed live-cell staining with fluorescent markers have allowed evaluating details of the osteocyte cytoskeleton *in situ* [23]. It has been demonstrated that CD44, a transmembrane glycoprotein with cell–cell and cell–matrix adhesion functions could be a sensitive marker of the osteoblastic lineage differentiation in humans [24,25].

Alcohol induces changes in the function of osteoblasts and osteoclasts [3,8,26] but little is known about the effects of alcohol on the osteocytes. We performed this study to analyze if chronic alcohol consumption elicits changes in osteocyte morphology and apoptosis *in situ*, in relation to the changes occurring in bone.

Materials and methods

Animals

Thirty four male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genet-St-Isle, France) were acclimatized for 2 weeks and maintained under constant temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and under 12 h/12 h light–dark cycles all along the experiment. The rats were housed two per standard cage and provided with a commercial standard diet (M20, SDS, France).

Alcoholization treatment

The rats were 8 weeks old at baseline. They were not skeletally mature but skeletal maturity occurs late in rats (7 months old) compared to sexual maturity (2 months old) [27]. We wanted to apply our model of alcohol treatment in the young adult. The animal models used to mimic the effects of alcohol abuse on adult rats usually take rats after 4 weeks of age and look at the bones at the age of 7 or 9 months old [1].

At ten weeks of age, 10 rats were anesthetized with pentobarbital sodium and sacrificed by cardiac exsanguination, to get baseline bone remodeling data. The 24 other rats were randomly assigned to one of the two following groups: controls (C) or ethanol at 35% v/v (10.7 g of ethanol/kg of body weight) (A35). The protocol lasted 19 weeks. The

rats of the A35 group drank *ad libitum* a solution composed of ethanol and water for 17 weeks. The percentage of ethanol in the solution began at 8% v/v and was progressively increased during three weeks of 3% v/v every three days to reach the final concentration of 35% v/v. The food and the beverage were separated to better mimic the human drinking pattern. The quantity of food eaten and beverage drunk was weekly controlled in the alcohol-treated group and the amount of total calorie intake was matched in the control group having only the solid food as a caloric supply, in order for the two groups to be pair-fed (as described by Sampson et al. [1]). We isolated randomly a pair of rats from each group each week by individually housing the rats in a cage and checking the consumption of each rat. If the consumption was too different, we changed the pair of rats in the cage and control them another time the week after. To check that rats have been submitted to the alcohol effects correctly, liver slices (thickness 3 μm) were cut, paraffin embedded, stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) and observed with bright field microscopy (Fig. 1). In order to perform the *in vivo* analyses, the rats were anesthetized with pentobarbital diluted in sodium chloride (50/50% v/v). The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals and local ethic committee (Ministère de l'agriculture, France, Agreement number: INSERM45-001).

At the end of the study, the 24 rats were anesthetized with pentobarbital sodium (0.1 ml per 100 g of body weight) and then sacrificed by cardiac exsanguinations. Blood sample was collected and tibias were dissected free of connective and fat tissues and fixed in a 4% v/v formalin solution.

Body fat mass and lean mass

At 10 and 19 weeks of age, body weight, lean and fat masses were measured in A35 and C groups by DXA (Discovery, Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) using a specific small animal body composition mode calibrated with defined small animal phantom. This apparatus is commonly used in small animals and has been validated in our laboratory. The root-mean square CV of whole body fat mass was 3.8% and was determined from two repeated measures with repositioning on thirty animals.

BMC and BMD measurements

In vivo BMC and BMD of the left femur and whole body were measured in A35 and C at 10 and 19 weeks of age by DXA using a Discovery Hologic apparatus adapted to small animals. The root-mean square CV of *in vivo* whole body BMC and whole body BMD were respectively 1.2% and 0.87% and were determined from two repeated measures with repositioning on thirty animals.

Morphological and topological characteristics of the trabecular bone

The study endpoint microarchitecture of the metaphysis of the femoral bone was studied *post mortem* using μCT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium). We chose this subregion because it is rich in trabecular bone. The characteristics and methods have already been described elsewhere [28]. The X-ray source was set at 70 kV and 100 μA , with an isotropic pixel size of 11 μm . Two hundred and twenty-five slices were selected in the metaphysis under the cartilaginous bone. Simple global thresholding methods were used. The trabecular bone region of interest (ROI) was drawn with the free hand tool with “CT analyzer” software (Skyscan). The parameters analyzed were: the bone volume fraction BV/TV (%), the trabeculae thickness Tb.Th (mm), and the trabeculae number Tb.N (1/mm) [29].

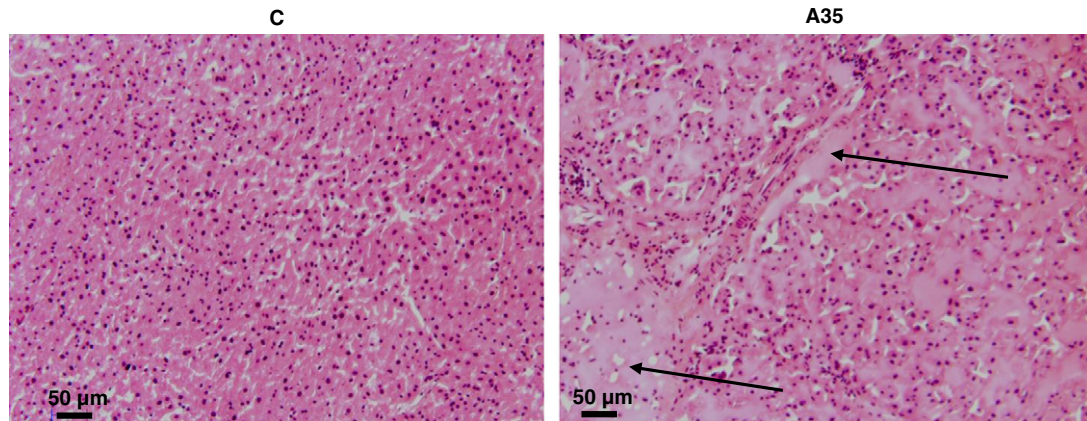


Fig. 1. Histological features of peliosis. Tissue sections of 3 µm in thickness were cut and stained with HES (Hematoxylin, Eosin, and Safran). Peliosis is characterized by abnormal randomly distributed multiple blood-filled cavities throughout the liver (arrows). Magnification ($\times 100$).

Morphological characteristics of cortical bone

Cortical bone was described in the femoral metaphysis using μ CT *post mortem*. The characteristics and methods have already been described elsewhere [30,31]. We analyzed the cortical porosity Ct.Po (%) (BV/TV equivalent), the pore number Po.N (1/mm) (Tb.N equivalent), the pore spacing Po.Sp (mm) (Tb.Sp equivalent) and the pore surface on the cortical volume PoS/CtV (mm^2/mm^3) (BS/TV equivalent). At pixel size of 11 µm, the pores are generally considered to be Haversian and Volkmann canals, as described by Zebaze [32]. Cortical thickness Ct.Th (mm) was obtained by measuring the internal and external diameter on the medio-lateral axis of the femur with a caliper rule (Mitutoyo, Japan) and then by subtracting the internal to the external diameter. The femur length has also been measured after the sacrifice with the caliper rule, to have an indication of the effect of alcohol on bone growth.

Biochemical analysis

Blood alcohol level was assessed with an ethanol ELISA assay kit (Biovision, Ca, USA). The detection range was 10–800 nM.

Bone turnover markers were analyzed at baseline and at the end of the protocol. The blood was centrifuged and the plasma was frozen at -80°C . The markers analyzed were osteocalcin for bone formation and the telopeptide N of type I collagen (NTx) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for bone resorption. They were assayed in duplicate by ELISA. The osteocalcin concentration was measured with a commercial Rat Osteocalcin EIA kit (IDS, France). Intra and inter-assay CV were respectively 5.0% and 5.5% and the detection limit was 50 ng.mL^{-1} . NTx assay was performed with the ELISA NTx Osteomark® (TECOMedical, France). Intra- and inter-assay CV were 4.6% and 6.9% respectively and the detection limit was 3.2 nM Bone Collagen Equivalents/L (nM BCE/L). TRAP assay was performed with the ratTRAP™ assay for the determination of osteoclast-derived tartrate-resistant acid phosphatase form 5b from IDS (Immunodiagnostic Systems Ltd, Paris, France). Intra- and inter-assay CV were 4.5% and 3.8% respectively and the detection limit was 0.1 U/L.

Serum leptin was also assessed by ELISA assay (m/r Leptin ELISA Kit, TECOMedical, France). The sensitivity of the detection of the assay was 10 pg/mL and intra- and inter-assay CV were lower to 4.4% and 4.7% respectively. Triglycerides, cholesterol and HDL cholesterol levels in serum were measured by an enzyme colorimetric assay in a laboratory of biochemistry and toxicology in Poitiers, France. The CV was 0.85% and the detection limit was 0.05 mmol/L.

Bone explants preparation for histology

Epifluorescence microscopy

Bone explants for epifluorescence microscopy were fixed in formalin 4% (v/v) for 4 days at $+4^\circ\text{C}$. After the 4 days, bone slices (thickness 400 µm) were cut transversally in the superior part of the tibia diaphysis with a high speed rotary tool (Dremel 300, Dremel, USA) equipped with a diamond saw, without previous embedding. Two bone slices were decalcified with EDTA 177 g/L, pH 7.0–7.3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 24 h and then immunostained for epifluorescence microscopy: with cleaved caspase-3 (Rabbit mAb Asp 175, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) which is an early marker of apoptosis and CD44 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) as a marker of osteocytes in the mineralized bone. The other bone slice was stained with osteocalcin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and type I collagen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) primary antibodies to assess bone formation. These staining were revealed by secondary antibodies Dylight™ 488 anti-mouse for CD44, Dylight™ 488 anti-goat for type I collagen and Dylight™ 549 anti-rabbit (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA) for cleaved caspase-3 and osteocalcin, as described by Vatsa et al. [33].

Section preparation for bright field microscopy

Ten rats (5 in each group) were analyzed for bright field microscopy. Bone explants were fixed in formalin 4% (v/v) for 4 days and then placed in EDTA for 24 h (as previously described in [Epifluorescence microscopy section](#)). The two tibial slices per rat for histology were stained with toluidine blue, as described by Trump et al. [34] with modifications. Sections (thickness — 1 µm) were embedded in Epoxy resin and stained with standard Toluidine blue solution. The preparations were analyzed by light microscopy. Images of either cortical bone or bone marrow were acquired with Axioplan (Zeiss, Germany) microscope equipped with 11.2. Color Mosaic camera. Images of the cortical bone were acquired at 40 $\times$ objective magnification while images of the bone marrow were acquired at 20 $\times$ objective magnification.

Transmission electron microscopy

After cutting, bone tibia sections for TEM were fixed in formaldehyde 4% v/v, glutaraldehyde 1% v/v in 0.2 M sodium cacodylate buffer for 48 h. Cross-sectional slices were then decalcified in EDTA for 12 h (as described in [Epifluorescence microscopy section](#)). After decalcification, specimens were washed in 0.2 M sodium cacodylate buffer. Samples were postfixed in 1% osmium tetroxide, 1% tannic acid and then 1% uranyl acetate. Samples were embedded in Epoxy resin. Ultra

thin sections (75 nm) were cut using a Leica ultra microtome (Leica, Germany), placed on EM grids and coated with Formvar membranes. Sections were stained with 4% (w/v) uranyl acetate (water solution, 20 min) and lead citrate by Reynolds (5 min)[35].

Image acquisition

Epifluorescence microscopy

Epifluorescence images of osteocytes were obtained by using a Motic AE21 video camera attached to a Microvision microscope. The objective magnification was 10×. Two groups of seven rats were analyzed. We imaged five regions of interest around the cortical bone. The size of one region of interest (ROI) was about 300,000 μm^2 so that the total cortical area analyzed was 0.15 mm^2 . We acquired images of cleaved caspase-3, CD44, osteocalcin and type I collagen staining in each region of interest. The images were analyzed with Image J software. The number of cells stained per mm^2 with cleaved caspase-3, CD44, osteocalcin and type I collagen in each ROI was calculated.

Bright field microscopy of the cortical bone

Images of cortical bone samples stained with Toluidine blue were analyzed with Image J software. In each rat, five different cortical ROI were analyzed. The ROIs were chosen to get the best representation of the whole bone slice. The size of each ROI was about 70,000 μm^2 and therefore the whole region analyzed represented a surface of about 0.35 mm^2 , which corresponded to 5% of the cortical bone available [36]. The osteocyte lacunae areas were determined with the Image J freehand tool by drawing their contour line in the ROI. The number of total osteocyte lacunae and lacunae without a cell inside per mm^2 was counted. The ratio of the total lacunae area to the cortical bone area was calculated in each ROI, which reflected the lacunar porosity. The pores due to vasculature were not taken in the counting.

Bright field microscopy of the bone marrow

Four rats from each group were used to analyze the adiposity of the bone marrow. For each rat, four different ROI of the bone marrow were imaged. Each ROI was analyzed with Image J software and their surface was about 100,000 μm^2 so that the total region analyzed represented 0.4 mm^2 . The number of lipid droplets inside the ROI was counted and the mean surface area of the lipid droplets was assessed in each ROI by drawing the contour line of each lipid droplet with the Image J freehand tool.

Transmission electron microscopy

The sections have been observed with a JEM 1011 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) equipped with Gatan digital camera driven by Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

Confocal microscopy analysis

The goal of confocal microscopy analysis was to visualize osteocytes in three dimension space. This technique was used to study the orientation and alignment of osteocytes in bone, because it has been previously reported that osteocytes may be oriented differently regarding the bone in which they are [22]. Osteocyte orientation may influence their mechanosensory ability. Seven rats were compared in each group. Confocal images of osteocytes were obtained by using Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 Meta confocal system attached to a Zeiss inverted microscope (Axiovert 200M, Zeiss, Germany). A Zeiss 40× oil immersion objective lens was used with a numerical aperture of 1.3 and a working distance of 210 μm to acquire images. The tibia bone explants were excited by using an argon/2 laser at 488 nm and two helium/neon lasers at 549 nm respectively to visualize CD44 (detected by indirect antibody conjugated with Dylight 488), and cleaved caspase-3 (detected by indirect antibody conjugated with Dylight 549). The emission wavelengths were collected at 520/40 nm and 600/40 nm. Sequences

of x-y optical slices, measuring 1.1 μm in thickness, were collected as z-stacks, separated by 0.68 μm on the z-axis. A single image of maximum projection was obtained from the z-stacks by using LSM Image Examiner software. A typical z-stack contained about 20 slices and the final dimensions of the ROI studied were 225 $\mu\text{m} \times 225 \mu\text{m} \times 17 \mu\text{m}$ (thickness).

Statistics

Numerical variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was conducted with the Stview 5.0 software. The normality of the distribution was tested with the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variance was tested with the F-test. When the distribution of the data for each group respected the normal law and the variance of both groups were homogeneous, *t*-test for non paired measures was used. When the distribution of at least one of the groups did not follow the normal law, the U-Mann Whitney test was applied. Then, the Spearman's rho correlation was achieved to assess the correlation between parameters. The critical *p*-value for statistical significance was *p* = 0.05. The exact *p*-value was quoted unless it was lower than 0.0001. Changes that have been reported in percentages have been calculated with respect to the C group.

Results

The average daily beverage consumption was lower in A35 versus C (18.2 ± 2.9 versus 26.9 ± 2.4 ml for A35 and C; *p* = 0.02). The percentage of calories provided by ethanol among the total calories was significantly higher in A35 (38.1 ± 3.1 versus $0.0 \pm 0.0\%$ for A35 and C; *p* = 0.01). As the food consumption was controlled in order to pair-fed the groups in the total amount of calories, we did not observe any difference in the average daily total calories between C and A35 (respectively 84.7 ± 3.3 and 86.4 ± 8.4 kcal for C and A35, *p* = NS).

At the end of the protocol, the blood alcohol level was 57 mg/dl in A35 and 0 mg/dl in C.

Body weight, fat mass and lean mass

At baseline, there was no significant difference in body weight between both groups (414.67 ± 25.37 g and 421.22 ± 14.68 g for C and A35; *p* = NS). The fat mass and lean mass were also not different at baseline. At the end of the study, body weight, fat mass and lean mass were significantly lower in the A35 group compared to C (Table 1).

Table 1

Bone mineral content, density, bone remodeling and body composition after a bone animal experiment on chronic alcohol consumption. The alcohol-fed rats (A35) drank alcohol for 17 weeks (35% v/v) while the control group (C) drank water. The critical *p*-value (*p*) was 0.05. Osteocalcin (OC), N terminal telopeptide of type I collagen (NTx) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were assessed by ELISA assays, as for the leptin content in serum. NS: Non significant.

		C (n = 12)	A35 (n = 11)	p
Dual X-ray absorptiometry	Whole body BMC (g)	19.68 ± 0.98	15.82 ± 1.09	<0.0001
	Whole body BMD (g/cm^2)	0.205 ± 0.006	0.191 ± 0.006	<0.0001
	Femur BMC (g)	0.88 ± 0.07	0.71 ± 0.05	<0.0001
	Femur BMD (g/cm^2)	0.389 ± 0.020	0.340 ± 0.020	<0.0001
	Body weight (g)	641.61 ± 56.34	466.65 ± 44.69	<0.0001
	Fat mass (g)	106.96 ± 35.68	57.22 ± 17.33	0.0004
ELISA	Lean mass (g)	514.98 ± 30.83	393.61 ± 36.54	<0.0001
	Leptin (ng/mL)	4.43 ± 0.86	3.39 ± 0.68	0.02
	OC (ng/mL)	229.82 ± 65.56	232.97 ± 43.82	NS
	NTx (nM BCE/L)	45.79 ± 10.73	31.53 ± 11.49	0.008
	TRAP (U/L)	3.29 ± 0.86	2.40 ± 0.43	0.007

BMC and BMD

At baseline, there was no whole body and femur BMD difference between A35 and C (whole body BMD: $0.154 \pm 0.005 \text{ g/cm}^2$ and $0.159 \pm 0.004 \text{ g/cm}^2$ for C and A35; $p = \text{NS}$). At the end of the protocol, whole body and femur BMD were significantly lower in the A35 group compared to C (Table 1). After adjustment for body weight, the femur BMD and whole body BMD remained very significant between the groups ($p < 0.0001$).

Trabecular bone microarchitecture

BV/TV and Tb.Th were significantly lower in the alcohol group versus controls (Table 2).

Vasculature porosity and cortical bone microarchitecture

PoS/CtV and Ct.Po were significantly higher in the A35 group compared to C (Table 2). Po.Sp was significantly lower in A35 while Po.N was higher in A35 compared to C. Porosity in cortical bone was present close to the endocortical area and also in the intracortical zone. Ct.Th was also significantly lower in the A35 group compared to C (Table 2). We did not find any difference between the two groups for the external diameter of the cortical bone, but the internal diameter was significantly higher in the A35 group compared to C. There were resorption spaces at the endosteal surface in the A35 group, which lead to trabecularization of the cortical bone. The femur length was lower in A35 versus C at the end of the protocol (Table 2).

Epifluorescence microscopy

There was 51% more CD44 staining in the A35 group compared to the C group. Moreover, there was 916% more cells stained with cleaved caspase-3 in the A35 group compared to the C group (Fig. 2). There was no difference between both groups regarding the number of cells stained with osteocalcin and type I collagen. After adjustment

for body weight, the difference between the groups for osteocyte apoptosis remained very significant ($p < 0.0001$).

Toluidine blue staining: osteocytes lacunae in cortical bone

We found 35% more empty lacunae in A35 group than in C group (Fig. 3). The mean lacunae area was 38% bigger in the A35 group compared to the C group (Fig. 3). The lacunar porosity was significantly higher in the A35 group compared to the C group.

Lipid droplets in the bone marrow

The size of the lipid droplets in the bone marrow was significantly greater in the A35 group compared to the C group. The number of lipid droplets in the marrow was higher (351%) in the A35 group. We found more bone marrow occupied by the lipid droplets in the A35 group compared to the C group, which represented an increase of 559% (Fig. 3).

Transmission electron microscopy

We observed more apoptotic osteocytes in TEM in the A35 group compared to C group, whereas extensive quantification of apoptosis was not the aim of this method (Fig. 4).

Confocal microscopy

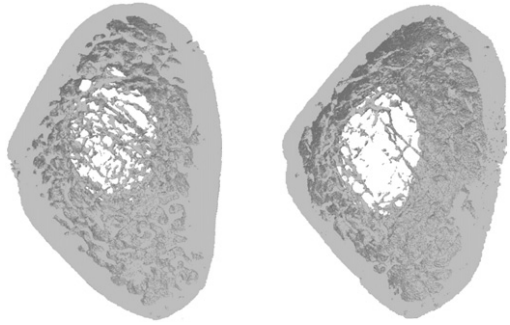
We did not observe any change in the osteocytes' alignment with alcohol. However the morphology of osteocytes was changed in the A35 group compared to the C group: the cells were larger and less fusiform (Fig. 5).

Biochemical analysis

At baseline, the osteocalcin concentration was $296.60 \pm 49.20 \text{ ng/ml}$ while the NTx concentration was $25.35 \pm 7.23 \text{ nM BCE/L}$.

Table 2

Microarchitecture of the trabecular and cortical bone at the femur diaphysis, and macroarchitecture of the femur of Wistar male rats after chronic alcohol consumption. The alcohol-fed rats (A35) drank alcohol for 17 weeks (35% v/v) while the control group (C) drank water. The critical p-value (p) was 0.05. NS: Non significant.

		C (n = 12)	A35 (n = 11)	p
				
Trabecular	Bone Volume/tissue volume BV/TV (%)	15.61 ± 5.49	11.74 ± 3.10	0.05
	Trabecular Thickness Tb.Th (mm)	0.096 ± 0.012	0.084 ± 0.007	0.009
	Trabecular number Tb.N (1/mm)	1.61 ± 0.44	1.39 ± 0.31	NS
Cortical	Cortical porosity Ct.Po (%)	1.01 ± 0.27	1.35 ± 0.32	0.004
	Pore surface/cortical volume PoS/CtV (mm^2/mm^3)	1.64 ± 0.17	2.16 ± 0.48	<0.0001
	Pore spacing Po.Sp (mm)	1.28 ± 0.12	1.18 ± 0.12	0.05
	Pore number Po.N (1/mm)	0.24 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.0009
Macroarchitecture	External medial-lateral diaphyseal diameter Ext Ø ML (mm)	5.28 ± 0.27	5.37 ± 0.20	NS
	Internal medial-lateral diaphyseal diameter Int Ø ML (mm)	3.72 ± 0.31	4.2 ± 0.30	0.001
	Cortical thickness ML (mm)	0.78 ± 0.06	0.59 ± 0.08	<0.0001
	Femur length (mm)	42.28 ± 1.01	41.22 ± 0.81	0.02

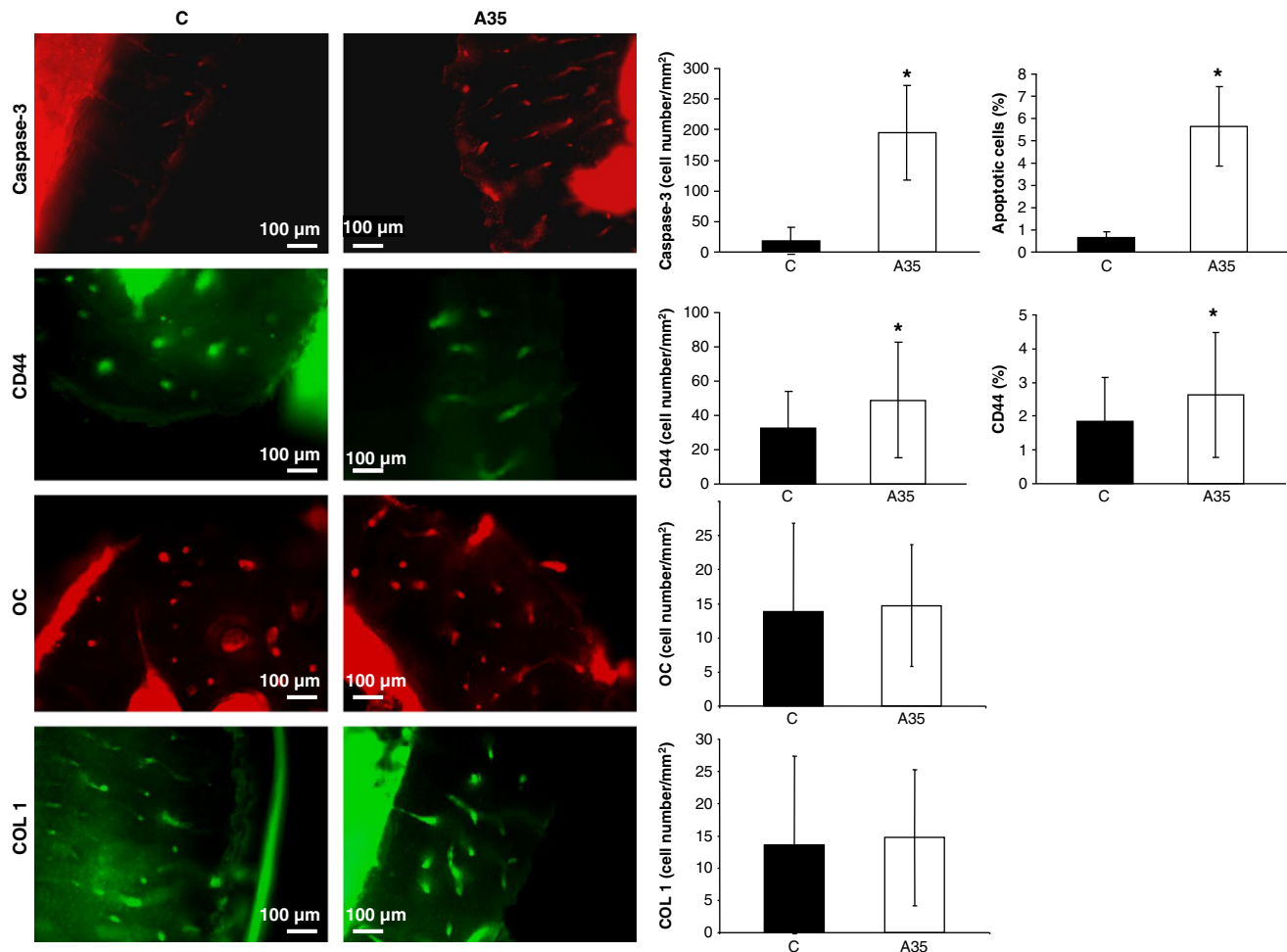


Fig. 2. Epifluorescence microscopy realized on tibia slices of alcohol-fed (A35) and control (C) rats. Osteocytes were stained for cleaved caspase-3, CD44, osteocalcin and collagen I. * shows a significant difference between the two groups ($p < 0.05$). The objective magnification for imaging the markers was $\times 100$. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). We calculated the number of cells stained with cleaved caspase-3 and osteocalcin per mm^2 (red), as well as the number of cells stained with CD44 and type I collagen per mm^2 (green). There were significantly more cells stained with cleaved caspase-3 and CD44 per mm^2 in A35 group versus C group. However there was no difference for the number of cells stained with osteocalcin and type I collagen between the two groups.

At the time of the sacrifice, the concentration of NTx was 31% lower in the A35 group than in C (Table 1). TRAP concentration was also 27% lower with alcohol (Table 1). The concentration of osteocalcin was not modified by alcohol (Table 1). Serum leptin concentration was 23% lower with alcohol consumption (Table 1). No differences were found between the groups for cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides in the serum ($p = \text{NS}$).

Correlations

We found a moderate correlation between BMD at the femur and leptin concentration ($r = 0.61$; $p = 0.008$). Leptin concentration was inversely correlated with the percentage of fat inside the bone marrow ($r = -0.79$, $p = 0.05$). We found a moderate but significant correlation between the number of lipid droplets in the bone marrow and the cells stained with cleaved caspase-3 ($r = 0.46$; $p = 0.018$). We found an inverse correlation between cleaved caspase-3 staining with BMD at the femur ($r = -0.72$; $p = 0.0017$), BMD at the whole body ($r = -0.54$; $p = 0.018$) and Tb.Th ($r = -0.45$; $p = 0.05$). BMD was also inversely and strongly correlated with the number of lipid droplets in the bone marrow ($r = -0.70$; $p = 0.002$ at the femur; $r = -0.69$; $p = 0.0027$ at the whole body). Tb.Th was moderately correlated with the number of lipid droplets in the bone marrow ($r = -0.62$; $p = 0.007$).

Discussion

This study has confirmed that in the rat, chronic alcohol consumption induces low BMD, trabecular and cortical thickness. The major finding of this study was the large increase of osteocyte apoptosis, which appears to be associated with the alcohol-induced osteopenia of these rats.

Alcohol consumption led to lower body weight gain in the A35 group compared to C (Table 1). The lean and fat mass gains were also significantly lower compared to the C group. These observations are consistent with the findings of Maddalozzo et al. who observed lower weight, lean mass and fat mass in alcohol-fed rats compared to *ad libitum* alcohol-free animals [37]. These researchers reported that the skeletal abnormalities observed in growing alcohol-fed rats were due to a combination of specific effects of alcohol combined to alcohol-induced caloric restriction [37]. Devlin et al. have recently observed that caloric restriction lowered BMD, trabecular thickness and increased bone marrow adiposity in mice [38]. In our study, the alcohol-fed rats did not undergo caloric restriction compared to controls, but they were rather subject to nutritive calorie restriction as they had some calories from alcohol, which do not provide nutrients. This may have accounted to some of the skeletal differences.

Chronic heavy alcohol consumption (35% v/v) led to lower whole body and femoral BMC and BMD compared to the control group.

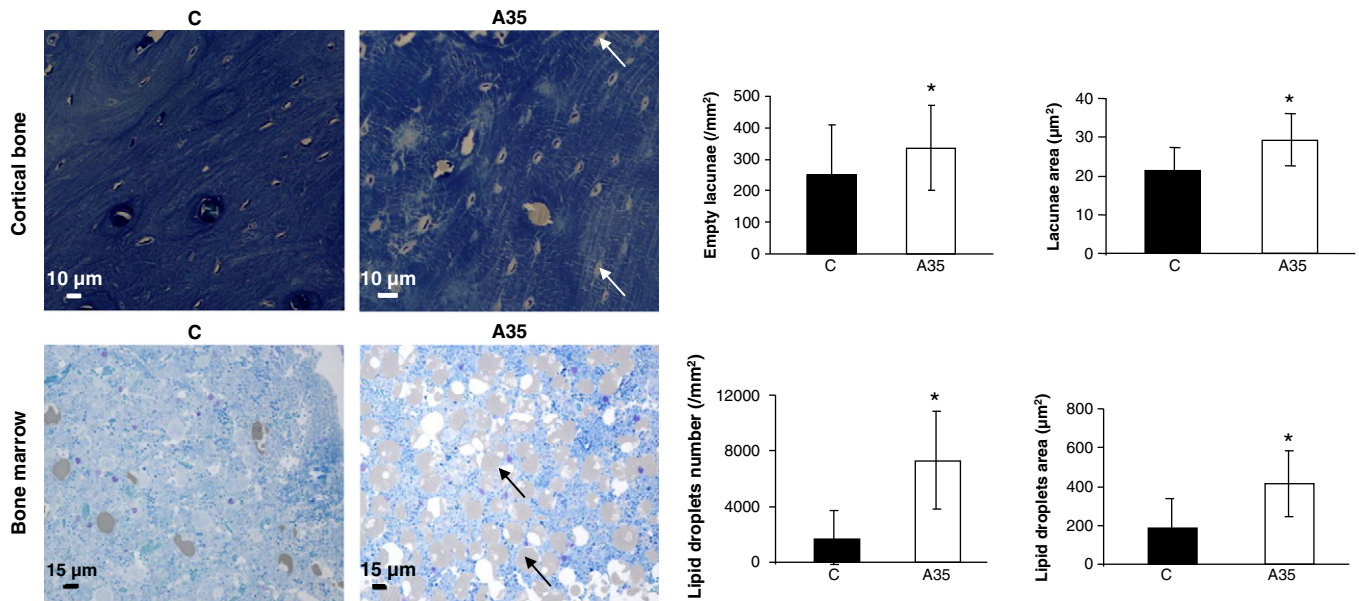


Fig. 3. Lacunar occupancy and bone marrow adiposity in alcohol-fed (A35) and control (C) rats observed with bright field microscopy on tibia slices stained by Toluidine blue. The objective magnification for the cortical bone was $\times 400$ and $\times 200$ for the bone marrow. * shows significant difference between the two groups ($p < 0.05$). Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The number of empty osteocyte lacunae per mm^2 (arrow) and the mean lacunae area in μm^2 have been calculated with Image J software. There were significantly more empty osteocyte lacunae per mm^2 in A35 versus C. The mean osteocytes lacunae area was greater in A35 compared to C. The number of lipid droplets per mm^2 (arrow) and the mean surface of the lipidic droplets in μm^2 were calculated with Image J software. There were significantly more lipid droplets in A35 versus C, and the mean surface of the lipid droplets was bigger in A35 versus C.

Concerning trabecular microarchitecture of the femoral metaphysis, we observed significantly lower BV/TV and Tb.Th values in the A35 group (Table 2). These data validate our model of alcohol-induced osteopenia. These effects of alcohol on BMC, BMD and trabecular microarchitecture have been reported previously [39,40]. In contrast to Maddalozzo's study [37], we did not observe any negative effect of alcohol on Tb.N in the metaphysis of the femur. Therefore, our reported low bone mass (BV/TV) seems to be mainly due to lower Tb.Th. This effect of alcohol on lower bone accrual shows that alcohol can limit bone growth. This hypothesis is reinforced by the lower femur length observed in A35. The difference in BMD was still

significant after adjusting for body weight. Therefore, the lower BMD is due in part to ethanol effects and not only to a difference of body weight.

The cortical bone microarchitecture has been previously far less investigated than the trabecular microarchitecture. At the femur level, we observed a higher internal diameter but no change in external diameter resulting in a lower cortical thickness in the alcohol treated group (Table 2). This finding is consistent with an excess of endocortical resorption, which we observed on the endosteal part of the cortical bone. There were many resorption spaces in the A35 group, leading to a trabecularization phenomenon, as described recently by Zebaze [32]. This was associated with higher intracortical vasculature porosity, higher pore number and pore surface and lower pore spacing in the A35 group (Table 2). The negative effects of alcohol on the cortical volume, cortical bone area and cortical thickness have been previously reported [37,41], but this is the first study showing an influence on cortical porosity in alcohol-fed rats, due to higher pore number and area.

In the present study, bone formation evaluated by serum osteocalcin level was not different between both groups, at the time of the sacrifice. We did not find a difference in epifluorescence microscopy between the groups concerning the number of cells expressing osteocalcin and type I collagen. Despite serum osteocalcin reflects bone formation in the whole body by many cells and that osteocalcin immunostaining reflects bone formation in the cells situated in the cortical bone (mainly osteocytes), we can say that bone formation was not different between both groups after the protocol. Bone formation is usually low with alcohol consumption [4] but a previous study did not find any difference in serum osteocalcin [39]. We observed low NTx and TRAP concentrations in alcohol-treated rats compared to controls, which has been previously reported [42,43]. The observations of the effects of alcohol consumption on bone resorption markers are not constant [4]. There has been no longitudinal study on bone remodeling, so it can not be excluded that bone loss due to alcohol is punctuated with brief periods of rapid bone loss followed by intervals with little or no change in bone mass [4]. Compared to baseline, both groups had decreased osteocalcin levels at

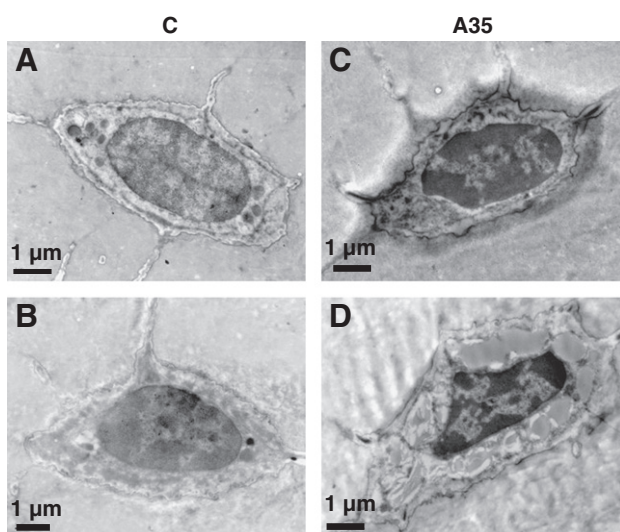


Fig. 4. Osteocytes morphology in alcohol-fed (A35) and control (C) rats, observed by Transmission Electron Microscopy. Images a and b: Osteocytes from Control group. The nucleus is healthy, in the middle of the cytoplasm. We can distinguish the organelles in the cytoplasm. Images c and d: Osteocytes from the Alcohol group. We can not see the organelles in the cytoplasm. There is a chromatin condensation and cell shrinking.

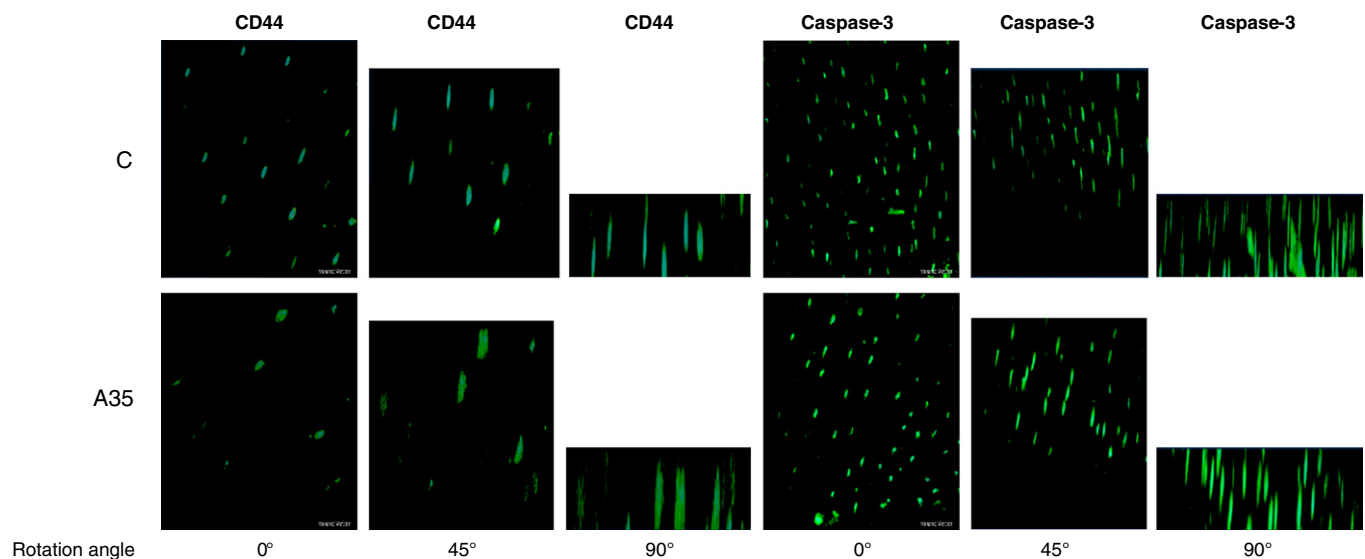


Fig. 5. Osteocyte morphology in alcohol-fed (A35) and control (C) rats observed by confocal microscopy. Tibia slices have been immunostained with CD44 and cleaved caspase-3. The reconstructed volume had a size of approximately $225\ \mu\text{m} \times 225\ \mu\text{m} \times 17\ \mu\text{m}$ in thickness and was imaged under different angles (0° , 45° , 90°). We can see that the osteocyte morphology is changed in the A35 group: they are less thin and fusiform.

the end of the protocol, while the NTx concentration was higher only in the C group. This is consistent with the literature, as the rats at baseline were younger, therefore undergoing little remodeling [39]. The degree of skeletal maturation could be involved in the variations observed in the bone markers and the other bone parameters after the alcohol treatment [39], as well as the great intra- and inter-individual variation for the bone markers [44].

The number of empty osteocyte lacunae per area of cortical bone was higher in the A35 group: there were 35% more empty osteocyte lacunae in the alcohol group than in the C group after 17 weeks of alcoholization at a dose of 14 mL/kg/day (35% v/v) (Fig. 3). Wang et al. have also reported an elevated percentage of empty osteocyte lacunae in femoral heads of rabbits which were administered alcohol intragastrically at a dose of 10 mL/kg/day for 1 to 6 months [45]. In their study, the percentage of empty osteocyte lacunae was of 12% in controls versus 22% in alcohol-fed rabbits after 6 months. The mean osteocyte lacunae area was significantly greater in the alcohol-fed rats compared to the controls in our study, but we did not find any difference regarding the total number of osteocytic lacunae per surface. Total osteocyte lacunae density has been reported to decrease with age in men and women [46]. Thus, we can hypothesize that alcohol and aging do not act the same way on the osteocyte density in bone.

We found significantly more osteocyte apoptosis in the alcohol-fed rats compared to control rats, as revealed by the cleaved caspase-3 staining and by TEM. In addition, the difference in osteocyte apoptosis was still significant after adjusting for body weight, which shows that it was not due only to lower body weight. Moreover, cleaved caspase-3 staining was strongly inversely correlated with the BMD and Tb.Th. Cleaved caspase-3 is an effector caspase required for regulated cell death [17]. We found a 10 fold increase in the cells stained with cleaved caspase-3 in the A35 group compared to C. This large excess in osteocyte apoptosis had not been previously described in alcohol-induced osteopenia models in animals. Widespread osteocyte apoptosis has been previously reported in femoral heads from patients undergoing total hip arthroplasty and suffering from alcohol-induced osteonecrosis [47,48], while osteocyte apoptosis was a rare event in patients also suffering from osteonecrosis due to alcohol abuse in a study by Weinstein et al. [49]. These differences are uneasy to interpret and may be due to sex, age differences among the patients, and also to the localization of the bone sections in the

femoral head. A study by Power et al. has reported that the percentage of lacunae containing an osteocyte varies according to the subject and to the quadrant region of the cortex examined [36]. Elevated osteocyte apoptosis has also been reported following ovariectomy in mice [50], bone fatigue in female Sprague–Dawley rats [17] and also after treatment with glucocorticoids [21,51]. This study shows for the first time an association between alcohol-induced osteopenia and osteocyte apoptosis, but the mechanistic link between osteopenia and osteocyte apoptosis remains unknown.

We observed more osteocytes labeled by CD44 in A35 compared to controls. The interpretation of this CD44 increase is rather difficult. Few papers have reported the influence of chronic alcohol consumption on osteoblastic lineage differentiation [52,53] and it has been shown that ethanol suppresses Wnt signaling through the stimulation of oxidative stress [52]. Alcohol seems to increase the speed of bone cell turnover, as shown by the increase of osteocyte apoptosis. CD44 is more expressed in the osteocyte than in the osteoblast [13]. Several studies suggest that CD44 has an anti-apoptotic effect in different cell types [54–57]. The higher CD44 expression observed could be a mechanism of defense to counterbalance the increased osteocyte apoptosis in the A35 group, but this is very hypothetical since we observed a difference in osteocyte death. Thus, what we observed may result from an interaction between the alcohol and the anti apoptotic effects.

We did not observe any difference between the two groups for triglycerides and cholesterol levels in serum. However, we reported a higher fat content in the bone marrow: 29% of the bone marrow was filled with lipid droplets in the A35 group versus 4% in the C group. The fat content in the marrow was strongly correlated with the BMD. The change in the marrow fat content with alcohol has been previously reported in rabbits [45] and in rats [37]. Alcohol consumption has been shown to alter the differentiation of mesenchymal stem cells to favor adipogenesis instead of osteoblastogenesis *in vitro* [58,59]. Leptin, an adipocyte derived hormone, has been shown to act directly on bone marrow cells to enhance their differentiation into osteoblasts instead of adipocytes [60]. Therefore, hypoleptinemia could induce an imbalance in the mesenchymal stem cell differentiation in favor of adipogenesis, explaining in part the excess of fat in bone marrow. This hypothesis is supported by the decreased level of leptin in the alcohol group in the present study (Table 1) and by the strong inverse correlation between leptin concentration and fat content of the

marrow. Hypoleptinemia was also found in a caloric restriction model in mice, where low BMD and high marrow adiposity was reported [38]. The decreased nutritive calories in our study may also play a part in the bone marrow changes. We found a direct correlation between leptin concentration and BMD. The amount of lipid droplets in the marrow correlated with the cleaved caspase-3 staining and with the BMD, suggesting that the change of the bone marrow content may have a link with the osteocyte apoptosis, and with the low bone density.

We did not observe any change in the osteocyte orientation with alcohol using confocal microscopy. Nevertheless, the osteocyte morphology was changed in A35: the osteocytes were less thin and fusiform compared to control osteocytes, as observed by confocal microscopy (Fig. 5). This is interesting regarding the alcohol-induced osteopenia, as some differences in osteocyte morphology have been previously shown in human tibia with different bone pathologies, not due to alcohol [20,22].

Our study has some limitations. First, we did not acquire densitometric, microarchitectural and cellular imaging data on the same bone: femur was used for bone structure parameters and tibia was chosen for cellular imaging. Second, the weight was voluntarily not matched between the two groups, which makes it difficult to distinguish the skeletal response to alcohol from that of weight. Third, we only measured fat marrow content and osteocyte apoptosis at a single time point. Therefore, despite finding correlations with osteopenia, we were unable to show cause and effect relationships between the changes of these parameters. It is plausible that the osteopenia observed in the alcohol-fed rats might be independent of the changes in fat and apoptosis. On the other hand, we did not establish the molecular mechanisms responsible for osteocyte apoptosis or the one responsible for fat content changes in the bone marrow.

In conclusion, these data suggest that in this model of alcohol-induced osteopenia, low BMD is associated with an excess in osteocyte apoptosis and with a fat accumulation in the bone marrow, and that serum hypoleptinemia may play a role in the increase of medullary adipogenesis.

Acknowledgments

We would like to thank Eric Dolleans for technical help in dissecting the bones, Carine Martin from the University of Orléans for the formalin preparation and Dr Brigitte Arbeille from the Département des Microscopies, Programme Pluriformation Analyse des Systèmes Biologiques, Université de Tours, Tours, France for the collaboration on the transmission electron microscopy. We also are grateful to the Department of Anatomopathologie in Orleans Regional Hospital directed by Dr Patrick Michenet for the staining and slicing of the livers, to Dr Claude Tallineau from the Laboratoire de Biochimie et Toxicologie in the CHU of Poitiers for her collaboration on the triglycerides measurement and to Dr Céline Montécot-Dubourg for her kind assistance with the epifluorescence microscopy software.

References

- [1] Sampson HW, Hebert VA, Booe HL, Champney TH. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1746–53.
- [2] Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int* 2005;16:737–42.
- [3] Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res* 2001;16:589–94.
- [4] Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1693–701.
- [5] Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-Gonzalez R, et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 2009;44:468–75.
- [6] Nyquist F, Ljunghall S, Berglund M, Obrant K. Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 1996;19:51–4.
- [7] Broulik PD, Vondrova J, Ruzicka P, Sedlacek R, Zima T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res* 2010;59:599–604.
- [8] Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 1998;16:337–41.
- [9] Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med* 1989;86:282–8.
- [10] Sampson HW. Alcohol's harmful effects on bone. *Alcohol Health Res World* 1998;22:190–4.
- [11] Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest* 2000;106:887–95.
- [12] Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006;3:7–15.
- [13] Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010;21:1457–69.
- [14] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008;42:606–15.
- [15] Bonewald LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab* 2007;5:410–1.
- [16] Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 2007;5:464–75.
- [17] Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* 2009;24:597–605.
- [18] Heino TJ, Kurata K, Higaki H, Vaananen HK. Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care* 2009;17:49–56.
- [19] Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papadopoulos SE, Lowik CW, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 2005;19:1842–4.
- [20] Van Hove RP, Nolte PA, Vatsa A, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, et al. Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density—Is there a role for mechanosensing? *Bone* 2009;45(2):321–9.
- [21] O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 2004;145:1835–41.
- [22] Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, Klein-Nulend J. Osteocyte morphology in fibula and calvaria — is there a role for mechanosensing? *Bone* 2008;43:452–8.
- [23] Palttauf-Doburzynska J, Kuezik T, Absenger M. Flow-driven loading of living cells with impermeable fluorescent molecules. *Microsc* 2007;21:23–5.
- [24] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006;235:176–90.
- [25] Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 1994;9:39–44.
- [26] Sampson HW. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:229–34.
- [27] Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005;21:775–7.
- [28] McLaughlin F, Mackintosh J, Hayes BP, McLaren A, Uings IJ, Salmon P, et al. Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers. *Bone* 2002;30:924–30.
- [29] Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25:1468–86.
- [30] Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:1118–27.
- [31] Lotinun S, Evans GL, Bronk JT, Bolander ME, Wronski TJ, Ritman EL, et al. Continuous parathyroid hormone induces cortical porosity in the rat: effects on bone turnover and mechanical properties. *J Bone Miner Res* 2004;19:1165–71.
- [32] Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, Iuliano-Burns S, Mirams M, Price RI, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet* 2010;375:1729–36.
- [33] Vatsa A, Semeins CM, Smit TH, Klein-Nulend J. Paxillin localisation in osteocytes—is it determined by the direction of loading? *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:1019–24.
- [34] Trump BF, Smuckler EA, Benditt EP. A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J Ultrastruct Res* 1961;5:343–8.
- [35] Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208–12.
- [36] Power J, Noble BS, Loveridge N, Bell KL, Rushton N, Reeve J. Osteocyte lacunar occupancy in the femoral neck cortex: an association with cortical remodeling in hip fracture cases and controls. *Calcif Tissue Int* 2001;69:13–9.
- [37] Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* 2009;20:1529–38.
- [38] Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res* 2010;25:2078–88.

- [39] Sampson HW, Chaffin C, Lange J, DeFee 2nd B. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:352–9.
- [40] Sampson HW, Perks N, Champney TH, DeFee 2nd B. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1375–84.
- [41] Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:809–16.
- [42] Bikle DD, Stesin A, Halloran B, Steinbach L, Recker R. Alcohol-induced bone disease: relationship to age and parathyroid hormone levels. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:690–5.
- [43] Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Mander A, Davidson SL, Thompson RP, Powell JJ. Moderate ingestion of alcohol is associated with acute ethanol-induced suppression of circulating CTX in a PTH-independent fashion. *J Bone Miner Res* 2009;24:1380–8.
- [44] Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ. Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2006;65:291–310.
- [45] Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang GJ. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;213–24.
- [46] Parfitt AM. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:499–500.
- [47] Calder JD, Buttery L, Revell PA, Pearse M, Polak JM. Apoptosis—a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:1209–13.
- [48] Youm YS, Lee SY, Lee SH. Apoptosis in the osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Surg* 2010;2:250–5.
- [49] Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2907–12.
- [50] Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska RJ, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone* 2010;46:577–83.
- [51] Kim HJ. New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* 2010;43:524–9.
- [52] Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ. A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 2010;25:1117–27.
- [53] Lin XH, Wu YB, Lin S, Zeng JW, Zeng PY, Wu JZ. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Molecules* 2010;15:241–50.
- [54] Allouche M, Charrad RS, Bettaieb A, Greenland C, Grignon C, Smadja-Joffe F. Ligation of the CD44 adhesion molecule inhibits drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 2000;96:1187–90.
- [55] Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Bartoli A, Nicoletti I, Riccardi C. CD44 (Pgp-1) inhibits CD3 and dexamethasone-induced apoptosis. *Blood* 1995;86:2672–8.
- [56] Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, et al. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett* 2002;528:101–8.
- [57] Wittig BM, Johansson B, Zoller M, Schwarzler C, Gunthert U. Abrogation of experimental colitis correlates with increased apoptosis in mice deficient for CD44 variant exon 7 (CD44v7). *J Exp Med* 2000;191:2053–64.
- [58] Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, Wang GJ, Balian G. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(Suppl 3):148–54.
- [59] Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2005:220–5.
- [60] Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol* 2002;175:405–15.

ETUDE 4 : RELATION ENTRE ADIPOSITE MEDULLAIRE, DMO ET APOPTOSE DES OSTEOCYTES.

Cette étude a donné lieu à :

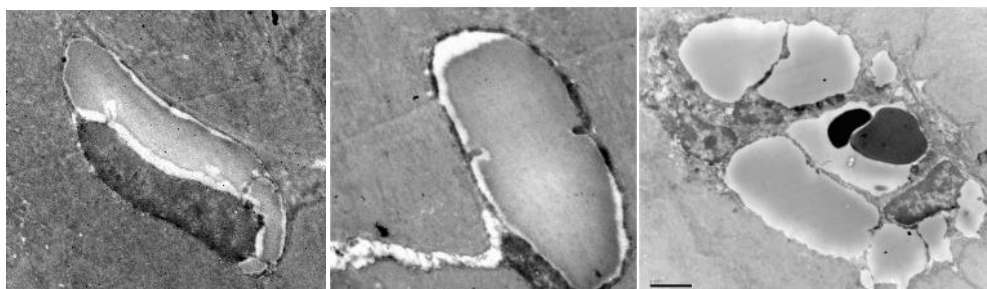
- l'écriture d'un article original :

Maurel DB, Pallu S, Jaffré C, Fazzalari NL, Boisseau N, Uzbekov R, Benhamou CL, Rochefort GY. Bone steatosis and osteocyte apoptosis as mechanisms of alcohol-induced osteoporosis. Soumis dans Alcohol & Alcoholism.

- des présentations orales en congrès :

Maurel DB, Jaffré C, Fazzalari NL, Uzbekov R, Boisseau N, Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Bone loss in alcohol abuse is associated with osteocyte apoptosis, bone marrow and micro-vessels fat incorporation. European Society for Biomedical Research on Alcoholism (ESBRA), Vienne, Autriche, Septembre 2011.

Maurel DB, Pallu S, Jaffré C, Fazzalari NL, Uzbekov R, Rochefort GY, Benhamou CL. Bone steatosis and osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteoporosis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), San Diego, USA, Septembre 2011.



I. Introduction

La consommation chronique d'alcool entraîne une perte de masse et de densité osseuse et diminue simultanément la masse maigre et la masse grasse (Maddalozzo *et al.* 2009). Nous avons également observé dans l'étude 3 une augmentation de l'apoptose des ostéocytes (10 fois plus), ainsi qu'une augmentation des gouttelettes lipidiques dans la moelle. En revanche, les mécanismes reliant adiposité médullaire et apoptose des ostéocytes n'ont pas encore été étudiés.

II. Objectif de l'étude 4

Le but de cette étude était d'analyser les mécanismes pouvant relier l'évolution de la DMO, l'apoptose ostéocytaire et l'adiposité médullaire après une alcoolisation chronique.

III. Méthodologie spécifique

La population analysée est identique à celle de l'étude 2 (groupes A35 et C).

Des coupes de tibia (300-400 μm) ont été imagées en microscopie en épifluorescence. D'autres coupes semi-fines de tibia de 1 micron d'épaisseur ont été réalisées grâce à un microtome. Ces coupes ont été colorées avec du bleu de toluidine et imagée en microscopie à lumière blanche. Des images de l'os cortical ont été faites (x40) pour visualiser les ostéocytes et les vaisseaux sanguins, et des images de la moelle osseuse (x20) ont été réalisées pour quantifier les lipides médullaires. Des coupes ultra fines (75 nm) prélevées sur le tibia ont été réalisées avec un microtome et préparées pour de la microscopie électronique en transmission. Les ostéocytes ont été observés et la surface de lipides présents dans les ostéocytes a été quantifiée.

IV. Résultats

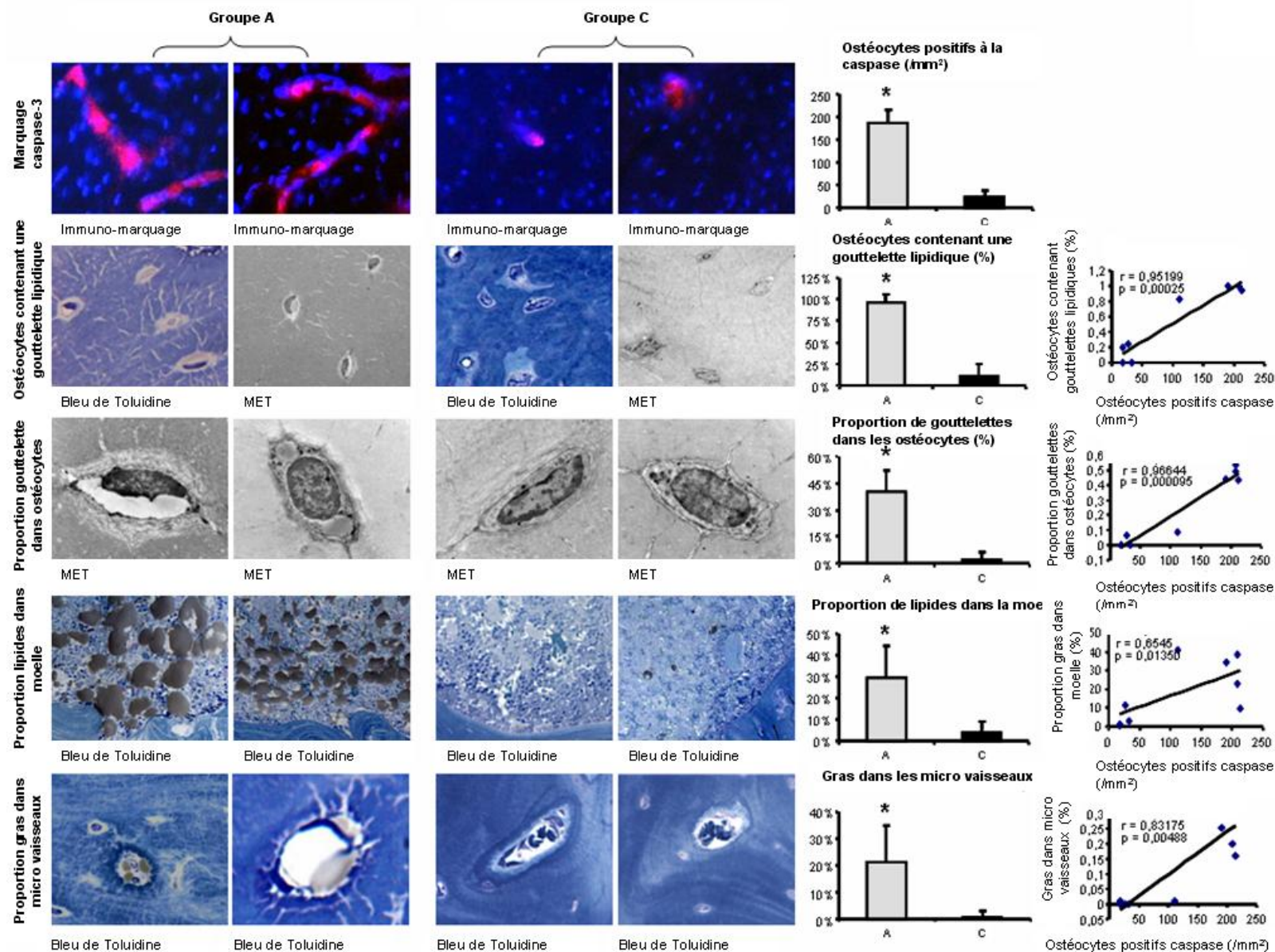


Figure 61 : Contenu lipidique de la moelle, des micro-vaisseaux et des ostéocytes sur des lames colorées au bleu de Toluidine, et immuno-marquages des ostéocytes avec de la caspase-3.

* Différence significative avec le groupe C.

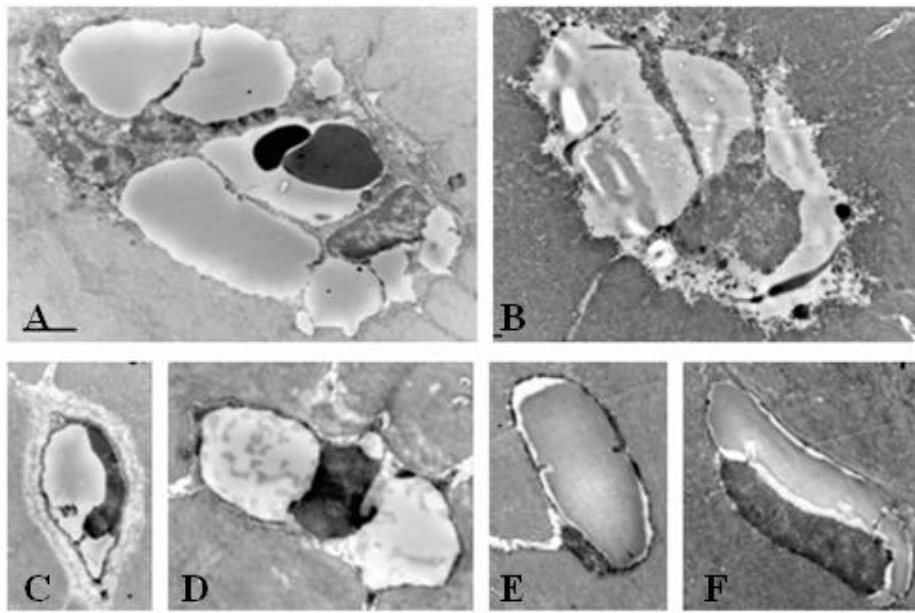


Figure 62 : Contenu lipidique dans les vaisseaux sanguins (A, B), et dans les ostéocytes (C, D, E, F) du groupe A35.

Comparé au groupe C, le groupe A35 avait une densité minérale osseuse inférieure, ce qui représentait une baisse de 10%. Après 17 semaines d'alcoolisation, le nombre d'ostéocytes apoptotiques a été considérablement augmenté dans le groupe A35 (Figure 61). Dans l'os cortical, la proportion d'ostéocytes contenant des gouttelettes lipidiques a été très largement augmentée. La surface représentée par les vacuoles lipidiques dans le cytoplasme des ostéocytes était plus importante dans les ostéocytes du groupe A35 (Figure 62). Une augmentation des lipides a été observée aussi dans la moelle osseuse et dans les micro-vaisseaux de l'os cortical (Figure 62). Nous avons observé de fortes corrélations positives entre le nombre d'ostéocytes apoptotiques et le nombre d'ostéocytes contenant des lipides ($r=0,95$, $p=0,0003$), la proportion de lipides dans le cytoplasme des ostéocytes ($r=0,97$, $p=0,000095$), la proportion de gouttelettes lipidiques dans la moelle ($r=0,65$, $p=0,01$) et la quantité de lipides dans les micro-vaisseaux ($r=0,83$, $p=0,005$).

V. Discussion

Nous avons montré que la consommation d'alcool induit bien une ostéopénie et une apoptose massive des ostéocytes et que ces phénomènes sont corrélés à une accumulation de lipides dans le tissu osseux.

La quantité de lipides dans les vaisseaux était augmentée chez les animaux

alcoolisés. Cette embolie partielle (20% de la lumière des vaisseaux) pourrait provoquer une ischémie locale qui pourrait favoriser l'augmentation de l'apoptose des ostéocytes que nous avons observée après le traitement. La proportion de lipides dans la moelle était supérieure après le traitement. Cette hausse pourrait induire une hypertension à l'intérieur de l'os, diminuant ainsi la perfusion du tissu osseux et obstruant en partie le système veineux. Les images de MET ont révélé des vacuoles lipidiques dans les ostéocytes. Ces vacuoles lipidiques pourraient compresser le noyau dans un côté du cytoplasme (observé en MET), induisant une discontinuité de la membrane cellulaire et suivie par l'apoptose des ostéocytes (mise en évidence par le marquage avec la capase-3 clivée). Généralement, il n'y a pas de dépôt de lipides dans les ostéocytes. L'hypothèse la plus raisonnable pour expliquer l'accumulation des lipides dans ces cellules serait que des composants lipidiques sortiraient des vaisseaux sanguins où ils se sont accumulés anormalement suite à l'intoxication alcoolique, et atteindraient les lacunes ostéocytaires via les canalicules. Une fois dans les lacunes, ces molécules pourraient être dégradées en petites particules via un processus de lipolyse et entrer dans les ostéocytes sous la forme d'acides gras. Ce processus "lipotoxique" a été décrit dans plusieurs organes dont le foie. La présence de graisse dans les cellules non dédiées à leur stockage peut causer un dysfonctionnement ou la mort de celles-ci (Shimabukuro *et al.* 1998; Unger 2003).

Dans l'étude 4 nous avons montré dans le groupe alcoolisé qu'une forte proportion d'ostéocytes contient des gouttelettes lipidiques. Cette incorporation de lipides dans les ostéocytes est fortement corrélée avec l'augmentation de l'apoptose de ceux-ci. Nous avons ensuite montré qu'il y avait également une incorporation de lipides dans les vaisseaux, modification également hautement corrélée avec l'apoptose des ostéocytes. Enfin, la quantité de lipides dans la moelle osseuse est corrélée avec l'apoptose des ostéocytes. Il semble donc qu'il y ait une « stéatose » osseuse associée à l'ostéoporose d'origine alcoolique. Ce processus est schématisé dans la figure 63.

Après avoir étudié les modifications potentiellement responsables de la diminution de la DMO dans notre modèle, nous avons souhaité combiner l'exercice physique à la consommation d'alcool, afin de montrer si oui ou non l'exercice peut prévenir les dégâts de l'alcool sur l'os. C'est l'objet de l'étude qui suit (étude 5).

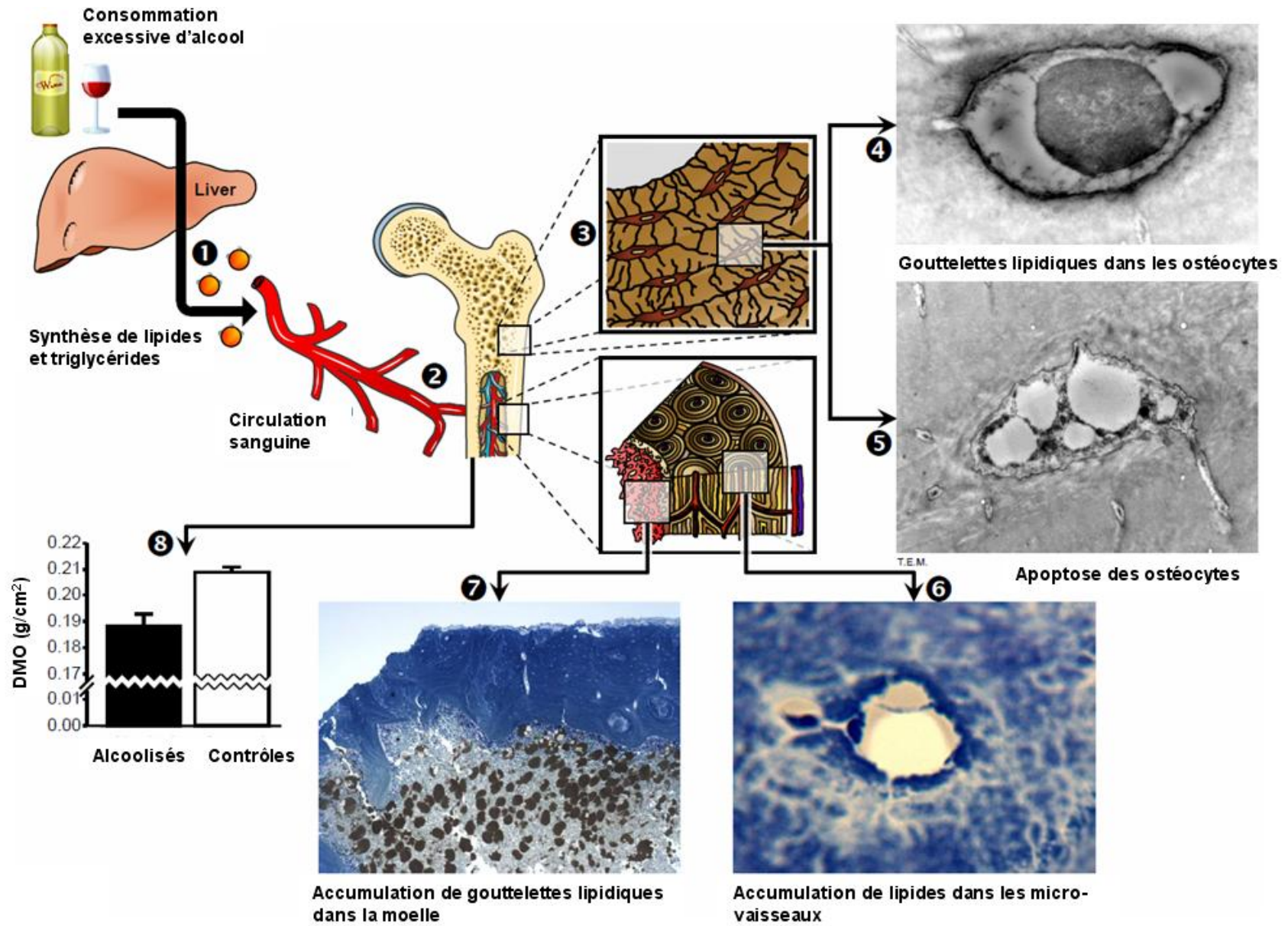


Figure 63 : Schéma récapitulatif des observations de l'étude 4.

Article 4

Osteocyte apoptosis and lipid infiltration as mechanisms of alcohol-induced bone loss

Running title:

Osteocyte apoptosis & lipid infiltration

Authors:

**Delphine B. Maurel¹, Stéphane Pallu¹, Christelle Jaffré¹, Nicola L. Fazzalari^{1,2},
Nathalie Boisseau³, Rustem Uzbekov⁴, Claude-Laurent Benhamou¹, Gaël Y.
Rocheffort¹**

1: Inserm Unit U658, Hospital Porte Madeleine, Orleans, France.

2: Bone and Joint Research Laboratory, SA Pathology, Adelaide, Australia.

3: BAPS, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.

4: Department of Microscopy, François Rabelais University, Tours, France.

Authors e-mail addresses:

db.maurel@gmail.com; stephane.pallu@inserm.fr; christelle.jaffre@univ-orleans.fr;
nick.fazzalari@internode.on.net; nathalie.boisseau@univ-bpclermont.fr;
rustem.uzbekov@univ-tours.fr; claude-laurent.benhamou@chr-orleans.fr;
gael.rocheffort@gmail.com

Corresponding author:

Gaël Y. ROCHEFORT, IPROS Unité Inserm U658, Hôpital Porte Madeleine, 1 rue Porte Madeleine, BP 2439, 45032 Orléans cedex 01, France

Phone: (+33) 238 744 053

Fax: (+33) 238 744 024

E-mail address: gael.rocheffort@gmail.com

Number of words in abstract: 118

Number of words in manuscript: 3975

Disclosures

All the authors state that they have no conflicts of interest.

Summary

We designed an *in vivo* study to assess the relationship between increase of adiposity in the marrow and osteocyte apoptosis in the case of alcohol-induced bone loss. After alcohol treatment, the number of apoptotic osteocytes was increased; lipid droplets were accumulated within the osteocytes, the bone marrow and the cortical bone micro-vessels. At last, we found an inverse correlation between BMD and osteocyte apoptosis and strong significant correlations between osteocyte apoptotic number and lipid droplet accumulation in osteocyte and bone micro-vessels. These data show that the alcohol-induced bone loss is associated with osteocyte apoptosis and lipid accumulation in the bone tissue. This lipid intoxication, or “bone steatosis”, is correlated to lipid accumulation in bone marrow and blood micro-vessels.

Key words: Osteocyte; Apoptosis; Alcohol; Lipid; Bone marrow

Introduction

Alcoholism constitutes a worldwide major health concern and it is well known that excessive alcohol consumption has catastrophic effects on many organs. In humans, it is generally considered that mild alcoholics drink more than 40 g of alcohol per day (i.e. up to a half bottle of wine per day, 15% of daily recommended caloric intake in man, 20% of daily recommended caloric intake in woman), whereas severe alcoholics drink more than 100 g of alcohol per day (i.e. 35% of daily recommended caloric intake in man, 45% of daily recommended caloric intake in woman) (Nyquist et al., 1996). Although liver damage is the most prevalent affection, few organs escape unscathed. Chronic alcohol consumption has a negative impact on bone health, and generally, it is considered that alcohol inhibits bone turnover (Rapuri et al., 2000a; Turner et al., 2001), stimulates calcitonin production (Rico, 1990) and reduces serum parathyroid hormone (Ilich et al., 2002; Laitinen et al., 1992b; Rapuri et al., 2000b). Regarding bone mineral density and/or bone fracture risk, alcohol has a bimodal effect depending on the dose ingested. In fact, whereas moderate alcohol intake (1 glass of alcohol per day in women, 2 glasses of alcohol per day for men) is associated with increased bone mineral density (Maurel et al., 2011; Rapuri et al., 2000a), excessive chronic alcohol consumption is associated with bone loss and increased fracture risk (Chakkalakal, 2005; Chakkalakal et al., 2005; Turner et al., 2001). Alcohol has been reported to decrease the bone density of trabecular and cortical bone compartments, and to decrease the elastic modulus and ultimate strength, due to an imbalance of bone remodeling where osteoblast-supported bone formation is decreased (Broulik et al., 2010; Hogan et al., 1999) and serum leptin is decreased (Maddalozzo et al., 2009). Alcohol has been shown to decrease osteoblast proliferation, the number of

osteoblasts and osteoid formation (Klein et al., 1996; Schnitzler and Solomon, 1984), and to modify bone metabolism resulting in osteopenia and osteoporosis (Laitinen et al., 1992a). However, the detailed mechanisms responsible for this alcohol-induced bone loss are not yet understood. As a result, the influence of alcohol on the morphology and function of bone cells, such as osteocytes, has been poorly reported (Lorenz and Janicke-Lorenz, 1983; Wang et al., 2003) and thus remains largely unknown.

Osteoporosis is considered as a disease of older women with the rate, pattern, and determinants of bone loss well defined. However, although osteoporosis is also common in men, far less information of the pathophysiology is available (Dennison et al., 1999; Smith, 2002). With the increasing global number of elderly people and the incidence of age-specific fractures, the health burden due to fragility fractures will increase. The three major causes of osteoporosis in men are excessive alcohol intake, long-term glucocorticoid therapy, and hypogonadism (Bilezikian, 1999; Kurland et al., 1997). These account for approximately 50% of all the cases of male osteoporosis (Kurland et al., 1997). Excessive chronic alcohol intake (Turner et al., 2001) has been shown to produce various free radicals, lipid peroxides, and oxidative stress on many organs (e.g. plasma, liver, intestine, pancreas, brain, retina...), which leads to cell apoptosis and finally to cell death. Triglyceride accumulation in bone marrow has been reported in alcohol-treated rodents (Maddalozzo et al., 2009; Wezeman and Gong, 2001) as well as in aseptic osteonecrosis (Rico, 1990), but the mechanisms responsible for these changes are incompletely elucidated. In 2003, Wang *et al.* first observed intracellular fatty deposits in osteocytes of previously alcohol-fed rabbits (10 mL/kg b.w. per day of 45% v/v alcohol, intragastrically, i.e. around 30% of the daily caloric intake) (Wang et al., 2003). Concomitantly, they

observed lipid hypertrophy and proliferation of adipocytes in the bone marrow (Wang et al., 2003).

Although a lot of study have already reported the impact of alcohol-feeding on bone mineral density, bone mineral content, bone micro-architecture, bone remodeling, bone strength and fractures (Hogan et al., 1999; Hogan et al., 1997; Sampson, 1998; Turner, 2000), no study has assessed the precise relationship between osteocyte apoptosis and lipid deposits in bone. The aim of this study was to assess the causality between increase of adiposity in the marrow, appearance of lipid droplets in osteocytes and osteocyte apoptosis in the case of alcohol-induced osteopenia.

Materials & Methods

Animals

Twenty four 9 week old male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genet-St-Isle, France) were acclimatized for 2 weeks and maintained in a controlled temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) environment and under 12h/12h light-dark cycles for the duration of the experiment. The rats were housed two per standard cage and provided with a commercial standard diet (M20, SDS, France). The procedures for the care and killing of the animals were in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'agriculture, France, Authorisation INSERM45-001).

Alcohol treatment

At eleven weeks of age, the rats were randomly assigned to one of the following groups: Controls (group C) or Alcohol at 35% v/v (=10.7g/kg, .e. around 40% of daily caloric intake (Martin et al., 1978)) (group A). The treatment protocol lasted 17 weeks. The rats of the A group had access *ad libitum* to a solution composed of ethanol and water. The percentage of alcohol in the solution began at 8% v/v and was progressively increased over three weeks by 3% v/v every two to three days to reach the final concentration of 35% v/v, which was used over a period of 14 weeks. The food and the beverage were separated in order to better mimic the human drinking pattern. The quantity of food eaten was controlled in the A group and the total calorie intake (including calories from ethanol) were matched in the C group (pair-fed groups). The quantities of food and drink ingested were recorded weekly for both groups. In order to perform the *in vivo* analyses, the rats were anaesthetized with pentobarbital diluted in sodium chloride (50/50 v/v). At the end of the

study, all rats were anesthetized with pentobarbital sodium (0.1 ml per 100 g of body weight) and then killed by cardiac exsanguinations. Blood samples were collected and tibias were dissected free of connective and fat tissue and fixed in a 4% v/v formalin solution. The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals. The study was approved by a board institution and an ethics committee from the French Institute INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and from the agriculture council (Ministère de l'agriculture, France, approval ID: INSERM45-001).

Alcohol level measurement in blood

After collection, the blood was centrifuged and the plasma was frozen at -80°C. Blood alcohol level was assessed with an ethanol ELISA assay kit (Biovision, Ca, USA). The detection range was 10-800 nM.

Body fat mass, lean mass, BMC and BMD measurements by DXA

At the end of the protocol, lean mass, fat masse, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) were measured by dual-energy x-ray Absorptiometry DXA (Discovery, Hologic, Bedford, Massachussets, USA) using a specific small animal body composition mode calibrated with a defined small animal phantom. The root-mean square CV were 3.8% for the whole body fat mass, 1.2% for the whole body lean mass, 1.2% for the whole body BMC and 0.87% for the whole body BMD (Lespessailles et al., 2010).

Bone explant preparation for epifluorescence microscopy

Slices (thickness around 400 μm) were cut transversally in the superior part of the tibia diaphysis with a high speed rotary tool (Dremel 300, Dremel, USA). Two bone slices were immunostained for epifluorescence microscopy with cleaved-caspase-3 (Rabbit mAb Asp 175, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) and revealed by a secondary antibody DylightTM 488 or Dylight 549TM (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA), as described by Vatsa *et al.* (Vatsa et al., 2008).

Epifluorescence images of osteocytes were obtained by using a Motic AE21 video camera attached to a BA400 epifluorescent microscope (Motic, Hong Kong) equipped with a halogen lamp and 3 fluorescent filters (460/50 nm, 535/40 nm and 630/60 nm). The objective magnification was x10. Seven rats from each group were analyzed. Five regions of interest around the cortical bone were chosen and imaged for analysis of caspase-3 immunostaining. The size of each region of interest was 300,000 μm^2 so that the total cortical surface analyzed represented 1.5 mm^2 . The images were analyzed with Image J software to determine the number of caspase-3 positive stained cells.

Two bone slices were stained with Nile red fluorescent hydrophobic dye, based on the published protocol by Fowler and Greenspan (Fowler and Greenspan, 1985). This Nile red dye can specifically detect neutral ubiquitous lipid deposits that are usually not seen with oil red O or other traditional fat stains (Fowler and Greenspan, 1985). A stock solution of Nile red (1 mg/mL) was prepared in acetone and protected from light at 4°C. A working Nile red solution was freshly made by the addition of 50 μL of the stock solution to 10 mL of 75% glycerol, followed by a brisk mixing. A drop of this diluted Nile red solution was added to the samples placed on concave slides and then the slides were

covered with a glass coverslip. After 5 min, the slice was examined by fluorescence microscopy with an adapted fluorescent filter (630/60 nm). The objective magnification was x40. Seven rats from each group were analyzed. Five regions of interest around the cortical bone were chosen and imaged for analysis of Nile red staining. The size of each region of interest was $30,000 \mu\text{m}^2$ so that the total cortical surface analyzed represented 0.15 mm^2 . The images were analyzed with Image J software to determine the number of Nile red positive stained cells.

Section preparation, bright field microscopy and measurements

Slices (thickness around $400 \mu\text{m}$) were cut transversally in the superior part of the tibia diaphysis with a high speed rotary tool (Dremel 300, Dremel, USA), and then 1 micron thick sections were obtained using a microtome (Leica, Germany). Five rats from each group were analyzed for bright field microscopy. Two tibial slices per rat were stained with toluidine blue, with modifications as described by Trump et al. (Trump et al., 1961). The 1 micron thick tissue preparations were analyzed by bright field microscopy. Images of either cortical bone or bone marrow were acquired with an Axioplan (Zeiss, Germany) bright field microscope equipped with a 11.2 Color Mosaic camera (Diagnostic Instruments, USA). Images of the cortical bone were acquired at x40 objective magnification while images of the bone marrow with lipid droplets colored in brown by toluidine blue were acquired at x20 objective magnification. For each rat, four region of interest (ROIs) were imaged. The ROIs were analyzed with Image J software and measured about 0.1 mm^2 so that the total region analyzed represented 0.4 mm^2 .

The luminal vessels surface area (transverse cross-section) inside each ROI of the cortical bone and the intra-luminal lipid surface area of the corresponding vessels were evaluated to estimate the lipid embolism proportion of bone micro-vessels (intra-luminal lipid area over luminal vessel area, in %).

The surface area of lipid droplets inside each ROI of the bone marrow and the total surface area of the corresponding bone marrow were determined to calculate the area fraction of lipid droplets in the bone marrow (total lipid droplet area surface over total bone marrow area surface, in %).

Transmission electron microscopy and measurements

After cutting, bone tibia sections for transmission electron microscopy were fixed in formaldehyde 4% v/v, glutaraldehyde 1% v/v in 0.2M sodium cacodylate buffer for 48h. Cross-sectional slices were then decalcified in EDTA for 12h. After decalcification, specimens were washed in 0.2M sodium cacodylate buffer. Samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 1% tannic acid and then 1% uranyl acetate. Samples were embedded in Epoxy resin. Ultra thin (75 nm) sections of the tibia were cut with a Leica ultra microtome (Leica, Germany) from the 400µm thick slices, placed on EM grids, coated with Formvar membranes and stained with 4 % w/v uranyl acetate (water solution, 20 min) and 1 % w/v lead citrate (5 min). The sections were imaged with a JEM 1011 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) equipped with Gatan digital camera driven by Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA USA). For each osteocyte observed, the surface of the intracellular lipid droplets and the cytoplasmic surface of the corresponding osteocyte were determined to calculate the proportion of the lipid vacuolar surface area occupied within the osteocyte

cytoplasm area surface (%). The total number of osteocytes and the number of osteocytes containing lipid droplets inside each ROI were counted to determine the overall proportion of osteocytes that contained lipid droplets (in %). The surface of lipid droplets inside each osteocyte and the corresponding osteocyte surface were evaluated to determine the proportion of lipidic deposits in osteocytes (intra-osteocyte lipid area over osteocyte area, in %).

Statistics

Statview software has been used for the data analysis. First, we used the Shapiro-Wilks test to assess the normality of the data distribution. When the data normality was confirmed, the Fisher's F-test was used to evaluate the homogeneity of the group variances. If the distribution was normal, Student's t-test was used to evaluate group differences. If the data was not normally distributed, non parametric tests were used (U test of Mann and Whitney). Pearson linear correlations were calculated between parameters. The critical level of significance was $p < 0.05$.

Results

Alcohol treatment

We undertook a rodent *in vivo* study where male Wistar rats, 11 weeks old at baseline, were progressively treated from 8% to 35% v/v alcohol in the drinking water over 3 weeks, and then with 35% v/v alcohol (= 10.7 g/kg b.w. per day, i.e. around 40% of daily caloric intake (Martin et al., 1978)) over a period of 14 weeks (group A) and compared to control animals (group C) drinking tap water. The animals were healthy throughout the protocol. At the end of the protocol, the blood alcohol level was 57 mg/dL in A and 0 mg/dL in C.

Alcohol-induced bone loss

At the end of the study, we measured body weight then lean and fat mass using dual-energy x-ray absorptiometry. Compared to the C group, the A group had a lower body weight ([mean $\pm$ SD] 460.6 ± 48.5 vs. 649.8 ± 51.6 g, $p < 0.0001$), a decreased lean mass (385.9 ± 37.2 vs. 518.3 ± 22.3 g, $p < 0.0001$) and a decreased fat mass (59.2 ± 18.8 vs. 111.2 ± 37.8 g, $p < 0.005$). The whole-body bone mineral content was lower (15.41 ± 0.94 vs. 20.27 ± 0.55 g, $p < 0.0001$) and the bone mineral density was decreased (0.188 ± 0.005 vs. 0.209 ± 0.002 g/cm², $p < 0.002$) by 10% in the A group compared to the C group. After adjustment for body weight, the whole body BMD remained very significant between the groups ($p < 0.0001$). As a comparison, ovariectomy in female Wistar rats also induces a 10% decrease of the bone mass after 4 months (French et al., 2008), consistent with the changes observed in women suffering from postmenopausal osteoporosis (French et al.,

2008). Therefore, these results confirmed that our chronic alcohol consumption model induces a bone loss leading to osteopenia.

Alcohol-induced lipid intoxication and apoptosis in osteocytes

After 14-weeks of alcohol consumption (35% v/v in the drinking water), the apoptotic osteocyte number was dramatically increased in the A group compared to the C group ([mean $\pm$ SD] 186.2 ± 42.7 vs. 23.9 ± 7.2 caspase-3 positive osteocyte/mm², $p < 0.001$), suggesting that alcohol promoted the osteocyte apoptosis. Within the cortical bone, the overall proportion of osteocytes that contained lipid droplets was considerably greater in the A group compared to the C group (95.5 ± 7.2 vs. $11.2 \pm 13.1\%$, $p < 0.001$), as revealed in toluidine blue staining and transmission electron microscopy (Fig. 1). This was also confirmed with Nile red staining: the overall proportion of osteocytes that were stained with Nile red was considerably greater in the A group compared to the C group (46.6 ± 12.8 vs. $12.8 \pm 8.6\%$, $p < 0.001$). The Nile red staining also revealed a strong accumulation of lipids all along the osteocyte dendritic network (Fig. 1).

Furthermore, the proportion of the lipid vacuolar surface area presented within the osteocyte cytoplasm surface area was also greater in the A group compared to the C group (39.9 ± 17.8 vs. $1.7 \pm 3.1\%$, $p < 0.001$). These two results may summarize as follows: chronic alcohol consumption induced the accumulation of lipid droplets into most osteocytes. This increased lipid deposit was also observed in both the bone marrow and the bone micro-vessels. Thus, the proportion of lipid droplets in the bone marrow (total lipid droplet surface area over total bone marrow surface area) was also greater (29.3 ± 13.0 vs. $4.1 \pm 4.9\%$, $p < 0.001$) and the lipid embolism proportion of bone micro-vessels (intra-

luminal lipid surface area over luminal vessel surface area) was larger (21.3 ± 15.5 vs. $0.2 \pm 0.5\%$, $p < 0.003$) in the A group compared to the C group.

Then, we have explored the potential relationship between osteocyte apoptosis and lipid accumulation in osteocytes, bone marrow and bone micro-vessels. We found strong and positive linear correlations between osteocyte apoptotic number and the proportion of osteocytes that contained lipid droplets evidenced by a Nile red staining ($r = 0.94$, $p < 0.001$) or visualized by a toluidine bleu staining ($r = 0.95$, $p < 0.001$), the proportion of the lipid vacuolar surface present within the osteocyte cytoplasm ($r = 0.97$, $p < 0.001$), the proportion of lipid droplets in the bone marrow (total lipid droplet surface area over total bone marrow surface area) ($r = 0.65$, $p < 0.02$) and the lipid embolism proportion of bone micro-vessels (intra-luminal lipid surface area over luminal vessel surface area) ($r = 0.83$, $p < 0.005$) (Fig. 1).

Discussion

In summary, we have shown that chronic alcohol consumption induces a bone loss leading to osteopenia and induces a massive osteocyte apoptosis likely related to lipid accumulation into the bone tissue.

Chronic heavy alcohol consumption (35% v/v) led to lower whole-body bone mineral content (BMC) and density (BMD) compared to the control group, indicating that this alcohol-fed treatment is an accurate model of induced osteopenia. The difference in BMD was still significant after adjusting for body weight. Therefore, the lower BMD is due in part to ethanol effects and not only to a difference of body weight. These effects of alcohol on BMC, BMD and lower bone accrual have been reported previously (Sampson et al., 1997; Sampson et al., 1998).

Osteocyte apoptosis was significantly increased in the alcohol-fed rats (A) compared to control rats (C), as revealed by the cleaved caspase-3 staining and by transmission electron microscopy. Cleaved caspase-3 is an effector caspase required for regulated cell death (Cardoso et al., 2009). We found a 10-fold increase in the cells stained with cleaved caspase-3 in the A group compared to C. Increased osteocyte apoptosis has been previously reported in femoral heads from patients undergoing total hip arthroplasty and suffering from alcohol-induced osteonecrosis (Calder et al., 2004; Youm et al., 2010), in mice after ovariectomy (Emerton et al., 2010), in rats after bone fatigue (Cardoso et al., 2009) and also after treatment with glucocorticoids (Kim, 2010; O'Brien et al., 2004).

Therefore, alcohol seems to increase the speed of bone cell turnover, as shown by the increase of osteocyte apoptosis.

Alcohol increases serum triglycerides and cholesterol levels (Hungerford and Lennox, 1985) promoting the production of many fatty vesicles in the circulation leading to micro-vessel embolism. This is confirmed by our results where the lipid embolism proportion of bone micro-vessels was dramatically increased in our alcohol-treated group. This partial embolism (around 20% of the vascular lumen) may induce a progressive and local ischemia (Hungerford and Lennox, 1985; Jones, 1985; Wang et al., 1981) that may promote our observed increase of osteocyte apoptosis after alcohol treatment. This partial micro-vessels embolism was strongly correlated with osteocyte apoptosis.

In the current study, marrow lipid proportion was increased in the alcohol-treated animals and also strongly correlated with osteocyte apoptosis. This increase could induce intra-osseous venous stasis and intra-osseous hypertension, decreasing arterial perfusion and obstructing the venous system in a “semi-intact bony compartment” (Hungerford and Lennox, 1985; Wang et al., 1981). This could induce marrow edema and also ischemia, once again leading to necrosis of bone cells (Hungerford and Lennox, 1985; Jones, 1985; Wang et al., 1981).

Transmission electron microscopy and Nile red staining were used to define the ultra-structural changes in osteocytes (Kawai et al., 1985), which showed lipid droplets after chronic alcohol consumption, finally resulting in the formation of vacuolated vesicles. Furthermore, this Nile red dye was used because it can specifically detect neutral ubiquitous lipid deposits (Fowler and Greenspan, 1985). We also found that the proportion

of osteocytes that contained lipid droplets and the proportion of the lipid vacuolar surface present within the osteocyte cytoplasm were strongly correlated with osteocyte apoptosis. These lipid droplets may compress the nucleus to one side of the cytoplasm (as observed in transmission electron microscopy, Fig. 1), resulting in discontinuities of the cell membrane followed by cell disruption, and finally culminating in osteocyte apoptosis (evidenced by capase-3 staining). This lipid deposition does not usually occur in osteocytes, except micro-lipid droplets in some immature osteocytes or osteoblasts (Kawai et al., 1985) and small lipid droplets occasionally observed in immature cells or osteoblasts in the vicinity of the haversian canal (Enlow et al., 1965). Lipid droplets that were observed in osteocytes by transmission electron microscopy appeared as low-electron-density particles or as electron-lucent droplets. These lipid droplets are triglycerides, consisting of saturated fatty acids (Ghadially et al., 1970). From past studies of the cellular accumulation of lipids in other sites (Heimann and Freiburger, 1960; Isselbacher, 1965), the mechanism of lipid accumulation in the osteocytes may follow two pathways: (i) lipolysis at the cell surface or in the extracellular environment may be followed by the uptake of fatty acids through the cell membrane and dendritic membranes in canaliculi, and triglycerides are then re-synthesized within cells; or (ii) uptake of small droplets via micro-pinocytotic vesicles or of larger droplets by means of entrapment by cell processes (pinocytosis). However, our observations have not revealed pinocytotic vesicles on the surface of osteocytes or the engulfment of lipids by the cell membrane. In view of these considerations, the most reasonable hypothesis may be the first: fatty acids or their component parts may leak out of the blood vessels in the abnormal state of alcohol intoxication and reach the osteocyte lacunae through dendrites in canaliculi (as observed in the Nile red staining in osteocytes

and dendrites, Fig. 1) (Kawai et al., 1985). Finally, a process broadly described as ‘lipotoxic’ has been reported in several organs such as for the pancreas, heart and liver, where lipid accumulation in these non-adipose cells can cause cell dysfunction or cell death via apoptosis (Dulloo et al., 2004; Shimabukuro et al., 1998; Unger, 2003). In particular, this excess accumulation of triglycerides within hepatocytes is one of the characteristics of the fatty liver disease or hepatic steatosis, and promotes the lipid-loaded cell apoptosis (Ji, 2008).

On the basis of published works (Dulloo et al., 2004; Ji, 2008; Kawai et al., 1985; Shimabukuro et al., 1998; Unger, 2003) and the present study, we are proposing a concept of “bone steatosis”, to explain the alcohol-induced apoptosis and lipid intoxication of osteocytes in bone cortical (Fig. 2). In this hypothesis of “bone steatosis”, high dose (e.g. 38% of daily caloric intake) chronic alcohol consumption could promote the synthesis of lipids and triglycerides into the liver (Choi and Diehl, 2008; Diraison et al., 2003). These lipids are circulating into the bloodstream and reach the osteocyte lacunae through dendrites in canaliculi where they are passing the cell bilayer membrane by passive permeability without forming endocytosis buds or vesicles. They are then degraded (lipolysis) into small particles and taken up into the osteocyte cytoplasm where they accumulate in the form of lipid droplets and finally promote osteocyte apoptosis.

References

- Bilezikian, JP (1999) Osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3431-3434.
- Broulik, PD, Vondrova, J, Ruzicka, P, Sedlacek, R and Zima, T (2010) The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res* **59**, 599-604.
- Calder, JD, Buttery, L, Revell, PA, Pearce, M and Polak, JM (2004) Apoptosis--a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* **86**, 1209-1213.
- Cardoso, L, Herman, BC, Verborgt, O, Laudier, D, Majeska, RJ and Schaffler, MB (2009) Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* **24**, 597-605.
- Chakkalakal, DA (2005) Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res* **29**, 2077-2090.
- Chakkalakal, DA, Novak, JR, Fritz, ED *et al.* (2005) Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol* **36**, 201-214.
- Choi, SS and Diehl, AM (2008) Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* **19**, 295-300.
- Dennison, E, Eastell, R, Fall, CH, Kellingray, S, Wood, PJ and Cooper, C (1999) Determinants of bone loss in elderly men and women: a prospective population-based study. *Osteoporos Int* **10**, 384-391.
- Diraison, F, Moulin, P and Beylot, M (2003) Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* **29**, 478-485.
- Dulloo, AG, Antic, V and Montani, JP (2004) Ectopic fat stores: housekeepers that can overspill into weapons of lean body mass destruction. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 4**, S1-2.
- Emerton, KB, Hu, B, Woo, AA *et al.* (2010) Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone* **46**, 577-583.
- Enlow, DH, Conklin, JL and Bang, S (1965) Observations on the occurrence and the distribution of lipids in compact bone. *Clin Orthop Relat Res* **38**, 157-169.
- Fowler, SD and Greenspan, P (1985) Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* **33**, 833-836.
- French, DL, Muir, JM and Webber, CE (2008) The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine* **15**, 1069-1078.
- Ghadially, FN, Mehta, PN and Kirkaldy-Willis, WH (1970) Ultrastructure of articular cartilage in experimentally produced lipoarthrosis. *J Bone Joint Surg Am* **52**, 1147-1158.
- Heimann, WG and Freiburger, RH (1960) Avascular necrosis of the femoral and humeral heads after high-dosage corticosteroid therapy. *N Engl J Med* **263**, 672-675.
- Hogan, HA, Groves, JA and Sampson, HW (1999) Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res* **23**, 1825-1833.

- Hogan, HA, Sampson, HW, Cashier, E and Ledoux, N (1997) Alcohol Consumption by Young Actively Growing Rats: A Study of Cortical Bone Histomorphometry and Mechanical Properties. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **21**, 809-816.
- Hungerford, DS and Lennox, DW (1985) The importance of increased intraosseous pressure in the development of osteonecrosis of the femoral head: implications for treatment. *Orthop Clin North Am* **16**, 635-654.
- Ilich, JZ, Brownbill, RA, Tamborini, L and Crncevic-Orlic, Z (2002) To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* **21**, 536-544.
- Isselbacher, KJ (1965) Metabolism and Transport of Lipid by Intestinal Mucosa. *Fed Proc* **24**, 16-22.
- Ji, C (2008) Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* **23 Suppl 1**, S16-24.
- Jones, JP, Jr. (1985) Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* **16**, 595-633.
- Kawai, K, Tamaki, A and Hirohata, K (1985) Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* **67**, 755-763.
- Kim, HJ (2010) New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* **43**, 524-529.
- Klein, RF, Fausti, KA and Carlos, AS (1996) Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 572-578.
- Kurland, ES, Rosen, CJ, Cosman, F *et al.* (1997) Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2799-2805.
- Laitinen, K, Lamberg-Allardt, C, Tunninen, R, Harkonen, M and Valimaki, M (1992a) Bone mineral density and abstention-induced changes in bone and mineral metabolism in noncirrhotic male alcoholics. *Am J Med* **93**, 642-650.
- Laitinen, K, Tahtela, R and Valimaki, M (1992b) The dose-dependency of alcohol-induced hypoparathyroidism, hypercalciuria, and hypermagnesuria. *Bone Miner* **19**, 75-83.
- Lespessailles, E, Jaffre, C, Rochefort, GY, Dolleans, E, Benhamou, CL and Courteix, D (2010) Exercise and zoledronic acid on lipid profile and bone remodeling in ovariectomized rats: a paradoxical negative association? *Lipids* **45**, 337-344.
- Lorenz, R and Janicke-Lorenz, J (1983) Electron microscopic observation on osteocytes of chronically alcoholized rats. *Arch Orthop Trauma Surg* **102**, 118-122.
- Maddalozzo, GF, Turner, RT, Edwards, CH *et al.* (2009) Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* **20**, 1529-1538.
- Martin, JC, Martin, DC, Radow, B and Sigman, G (1978) Blood alcohol level and caloric intake in the gravid rat as a function of diurnal period, trimester, and vehicle. *Pharmacol Biochem Behav* **8**, 421-427.
- Maurel, DB, Boisseau, N, Benhamou, CL and Jaffre, C (2011) Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int*.
- Nyquist, F, Ljunghall, S, Berglund, M and Obrant, K (1996) Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* **19**, 51-54.

- O'Brien, CA, Jia, D, Plotkin, LI *et al.* (2004) Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* **145**, 1835-1841.
- Rapuri, PB, Gallagher, JC, Balhorn, KE and Ryschon, KL (2000a) Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *Am J Clin Nutr* **72**, 1206-1213.
- Rapuri, PB, Gallagher, JC, Balhorn, KE and Ryschon, KL (2000b) Smoking and bone metabolism in elderly women. *Bone* **27**, 429-436.
- Rico, H (1990) Alcohol and bone disease. *Alcohol Alcohol* **25**, 345-352.
- Sampson, HW (1998) Effect of Alcohol Consumption on Adult and Aged Bone: A Histomorphometric Study of the Rat Animal Model. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **22**, 2029-2034.
- Sampson, HW, Chaffin, C, Lange, J and DeFee, B, 2nd (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 352-359.
- Sampson, HW, Hebert, VA, Booe, HL and Champney, TH (1998) Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res* **22**, 1746-1753.
- Schnitzler, CM and Solomon, L (1984) Bone changes after alcohol abuse. *S Afr Med J* **66**, 730-734.
- Shimabukuro, M, Zhou, YT, Levi, M and Unger, RH (1998) Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2498-2502.
- Smith, MR (2002) Osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Urology* **60**, 79-85; discussion 86.
- Trump, BF, Smuckler, EA and Benditt, EP (1961) A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J Ultrastruct Res* **5**, 343-348.
- Turner, RT (2000) Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* **24**, 1693-1701.
- Turner, RT, Kidder, LS, Kennedy, A, Evans, GL and Sibonga, JD (2001) Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res* **16**, 589-594.
- Unger, RH (2003) Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* **144**, 5159-5165.
- Vatsa, A, Breuls, RG, Semeins, CM, Salmon, PL, Smit, TH and Klein-Nulend, J (2008) Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing? *Bone* **43**, 452-458.
- Wang, GJ, Lennox, DW, Reger, SI, Stamp, WG and Hubbard, SL (1981) Cortisone-induced intrafemoral head pressure change and its response to a drilling decompression method. *Clin Orthop Relat Res*, 274-278.
- Wang, Y, Li, Y, Mao, K, Li, J, Cui, Q and Wang, GJ (2003) Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*, 213-224.
- Wezeman, FH and Gong, Z (2001) Bone marrow triglyceride accumulation and hormonal changes during long-term alcohol intake in male and female rats. *Alcohol Clin Exp Res* **25**, 1515-1522.

Youm, YS, Lee, SY and Lee, SH (2010) Apoptosis in the osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Surg* **2**, 250-255.

Acknowledgements

We thank P.C. Aveline for the cleaved-caspase-3 staining realization; R. Uzbekov and B. Arbeille from the *Département des Microscopies, Programme Pluriformation Analyse des Systèmes Biologiques, Université de Tours, Tours, France*, for the toluidine blue staining and transmission electron microscopy imaging; and D. Gosset from the *Plateforme de Cytométrie et d'Imagerie Cellulaire at the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, France*, for the confocal microscopy imaging. D.B. Maurel is a PhD student at the Orléans University and is funded by the *Région Centre, France*. G.Y. Rochefort is funded by the *Industry Department, the Loiret General Council, and the Région Centre, France*. This work has been supported by grants from INSERM, Région Centre, France, and Ireb (*Institut de recherches scientifiques sur les boissons*).

Figure legends

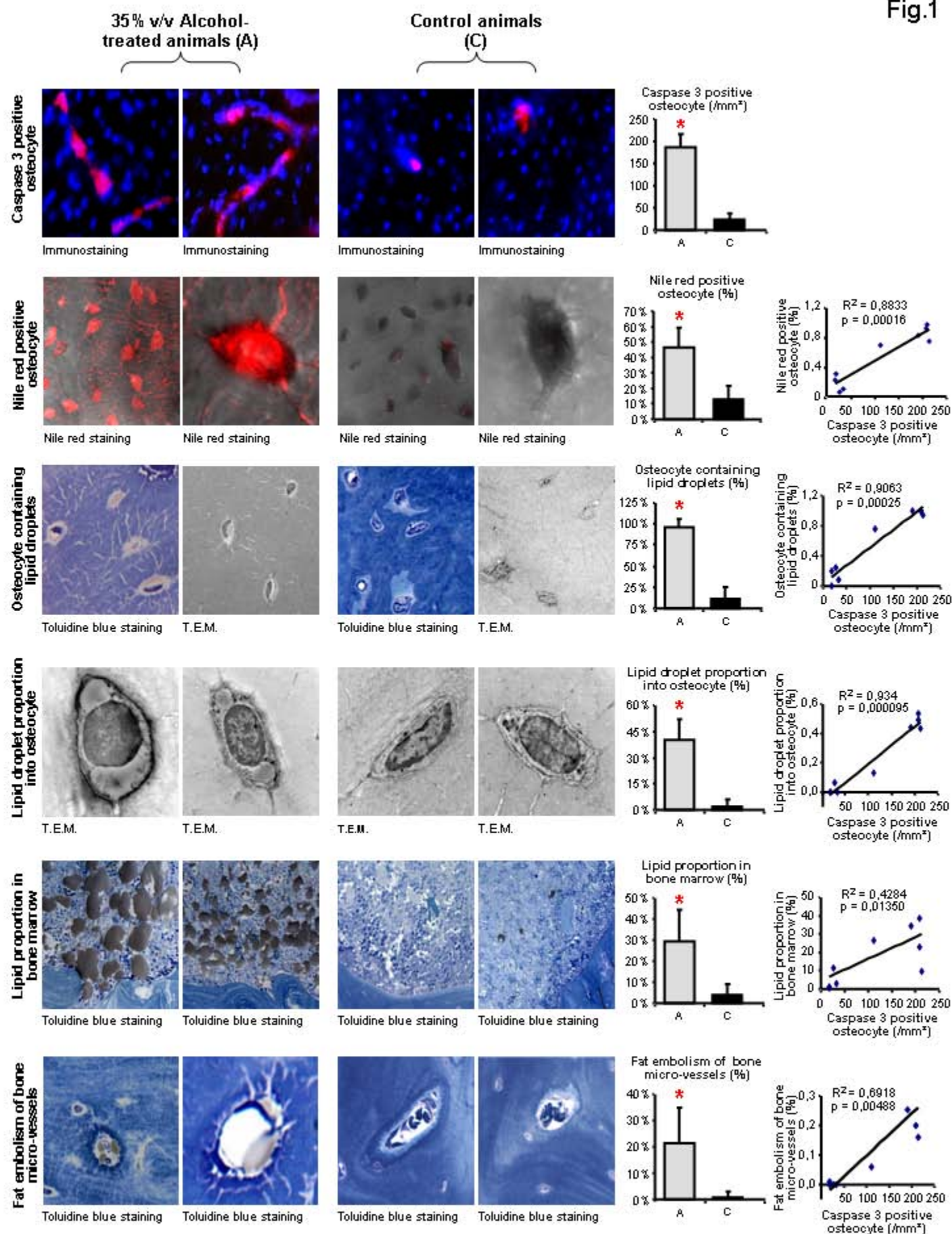
Fig. 1: Effects of chronic and heavy alcohol consumption on osteocyte apoptosis, and lipid droplet accumulation in osteocytes, bone micro-vessels and bone marrow.

Slices of tibia were obtained from 35% v/v alcohol-fed rats or control rats. Nile red staining was used to specifically detect neutral ubiquitous lipid deposits in osteocytes and their dendritic network within the cortical bone. Toluidine blue staining was used to observed osteocytes and blood vessels in the cortical bone and fat (stained in brown) in the bone marrow. Ultra thin sections were prepared of the tibia and examined with transmission electron microscopy (T.E.M.) to analyze osteocyte morphology and lipid content. Rat tibia sections were immunostained with cleaved-caspase-3, a marker of apoptosis, to assess osteocyte apoptosis. The graphs (mean $\pm$ SD) show the difference between the alcohol-fed group (A) and the control group (C). * means that there is a significant difference between the two groups ($p < 0.05$). We found significantly more osteocytes stained with caspase-3 in A group compared to C. Four times more osteocytes containing lipid droplets were observed in A group versus C. The proportion of lipid deposits in osteocytes was also greater in A versus C. The presence of fat in the bone marrow and blood vessels was significantly higher in A vs. C. All these parameters correlated highly with osteocyte apoptosis (caspase-3 immunostaining), as shown by the coefficient of correlation calculated with the Pearson correlation.

Fig. 2: Osteocyte apoptosis and lipid intoxication: a “bone steatosis” concept

To explain the alcohol-induced apoptosis and lipid intoxication of bone cortical osteocytes, we propose the concept of “bone steatosis” that can be explained as follows: 1. high dose (e.g. more than 30% of daily calorie intake) chronic alcohol consumption could promote the synthesis of lipids and triglycerides into the liver; 2. lipids are circulating into the bloodstream; 3. they reach the osteocyte lacunae through dendrites in canaliculi where they are passing the cell bilayer membrane by passive permeability; 4. lipids are then degraded (lipolysis) into small particles and then be taken up into the osteocyte cytoplasm where they are accumulating in the form of lipid droplets (as observed with transmission electron microscopy [T.E.M.]); 5. accumulation of lipid droplets promote the osteocyte apoptosis; 6. lipid droplets accumulate into the bone micro-vessels (as observed with toluidine blue staining showing a tight communication between osteocytes and endothelial vascular cells via the canalicular dendrites of the osteocyte network); 7. the number of lipid droplets present into the bone marrow dramatically increases; 8. all these phenomena are parts of the alcohol-induced bone mineral density (BMD) decrease revealed in the alcohol-fed group (white histogram), compared to the control-fed group (black histogram).

Fig.1



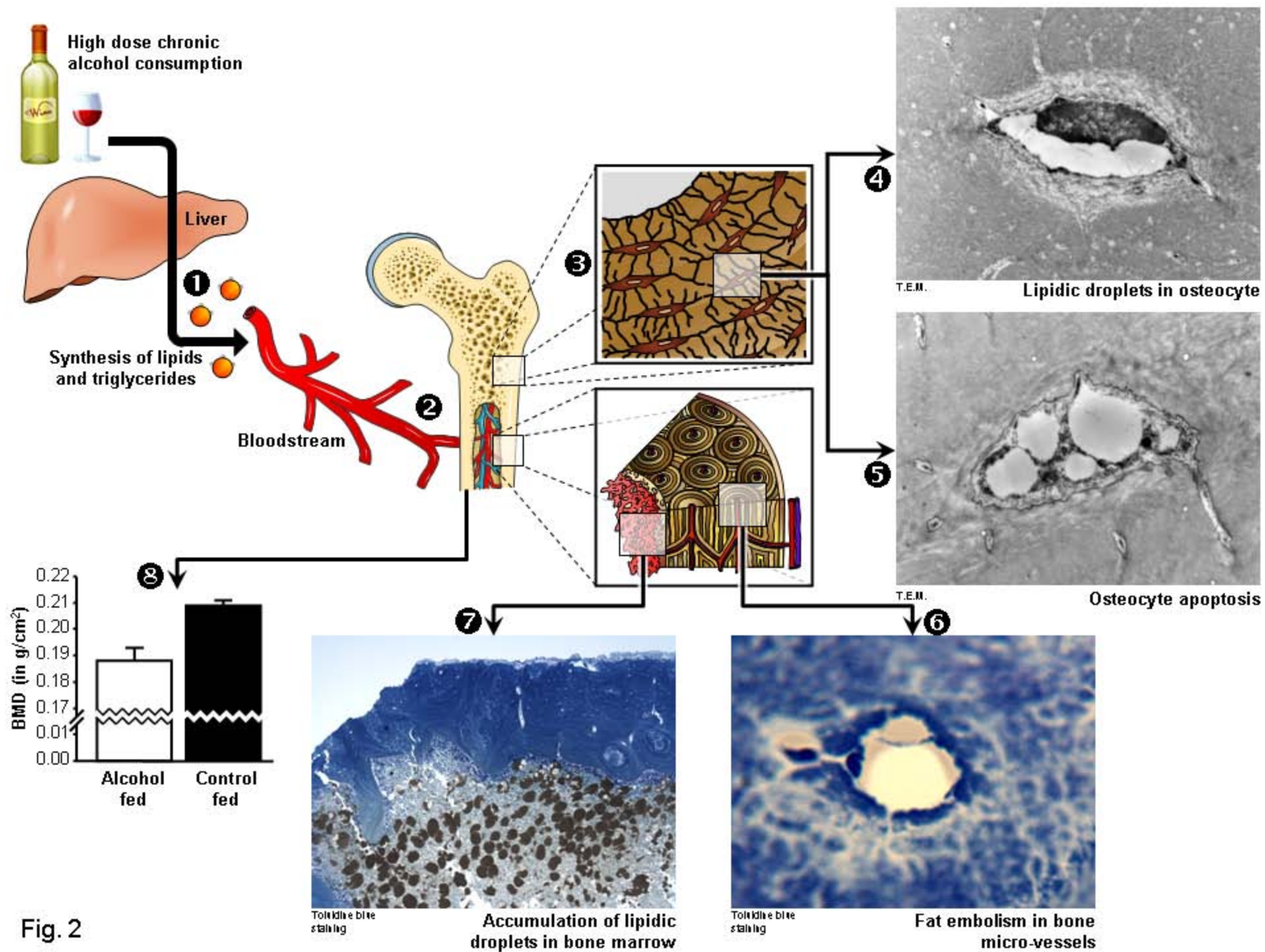


Fig. 2

ETUDE 5 : ANALYSE DES EFFETS COMBINES D'UN ENTRAÎNEMENT ET D'UNE CONSOMMATION EXCESSIVE D'ALCOOL SUR LE MÉTABOLISME OSSEUX ET LES OSTEOCYTES CHEZ LE RAT.

Cette étude a donné lieu à :

- l'écriture d'un article original :

Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL, Jaffré C. Regular exercise prevents alcohol-induced osteoporosis and osteocyte apoptosis in rats. Soumis à Medicine & Science in Sports & Exercise, Septembre 2011.

- des communications affichées en congrès :

Maurel DB, Boisseau N, Dolleens E, Benhamou CL, Jaffré C. Beneficial effects of physical activity on bone loss induced by chronic alcoholism. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA), Paris, Septembre 2010.

> Proceeding dans Alcoholism : Clinical and Experimental Research, Supplément Août 2010, Vol 34 (8).

Maurel DB, Jaffré C, Dolleens E, Boisseau N, Benhamou CL. Combined effects of exercise and alcohol on bone status in rats. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, Octobre 2010.

> Proceeding dans JBMR (2010), 25 (Suppl 1).

Maurel DB, Jaffré C, Boisseau N, Benhamou CL. Exercise prevents the alcohol-induced bone loss in the rat. European Congress of Clinical and Economic aspects of Osteoporosis (ECCEO), Valence, Mars 2011.



I. Introduction

Les effets négatifs d'une consommation excessive et chronique d'alcool sur le tissu osseux sont bien connus (Sampson 1998; Turner 2000). A contrario, les effets bénéfiques d'une pratique physique régulière sur l'os ont été démontrés (Notomi *et al.* 2002; Yeh *et al.* 1993). A notre connaissance, très peu d'études ont été menées sur les effets combinés de l'alcool et de l'exercice sur l'os. Nous avons ainsi montré dans l'étude 1 qu'une consommation modérée d'alcool pouvait induire un effet positif sur le tissu osseux et que cet effet n'était pas majoré par l'ajout d'une activité physique. Par contre, il n'existe pas de données concernant les effets combinés d'une pratique physique et d'une consommation excessive d'alcool, dans le but de montrer un effet protecteur de l'exercice. De plus, ces effets combinés n'ont jamais été étudiés sur l'ostéocyte. Pourtant, l'ostéocyte est une cellule clé tant dans la réponse à l'alcoolisation que dans celle liée à l'activité physique (Tan *et al.* 2007; Vezeridis *et al.* 2006; Wang *et al.* 2003).

II. But de l'étude

Le but de cette étude était d'analyser les effets combinés d'une consommation chronique et excessive d'alcool (35% v/v) et d'un exercice physique régulier (1H par jour, 60-70% de la VMA) sur différents paramètres du tissu osseux (CMO, DMO, microarchitecture trabéculaire et corticale, résistance osseuse, remodelage osseux) et sur l'apoptose des ostéocytes chez le rat.

III. Méthodologie spécifique

48 rats mâles Wistar âgés de 8 semaines ont été aléatoirement répartis dans un des groupes suivants : Contrôle (C), Alcool (A), Exercice (E) ou Alcool+Exercice (AE). Le protocole a duré 19 semaines, dont 2 semaines d'acclimatation, 17 semaines d'alcoolisation et/ou 14 semaines d'entraînement. Les rats des groupes A et AE ont été alcoolisés progressivement jusqu'à une dose de 35% v/v. Les rats des groupes E et AE ont été entraînés sur tapis roulant 1H par jour, 5 jours par semaine. Le CMO, la DMO et la composition corporelle ont été évalués par DXA au corps entier (plus au fémur pour le CMO et la DMO), la microarchitecture de l'os trabéculaire et cortical du fémur a été analysée par μ CT et la

résistance osseuse avec un test de flexion 3 points. Une évaluation du remodelage osseux a été faite via la concentration de deux marqueurs (ostéocalcine et NTx). Le nombre d'ostéocytes apoptotiques a été évalué sur des coupes de tibia grâce à un immunomarquage avec de la caspase-3 clivée, révélée par un anticorps secondaire fluorescent.

Dans un but éthique, afin de respecter les conseils donnés au niveau européen, les groupes C et A sont les groupes de l'étude 2. Ceci a été fait dans le but de limiter le nombre d'animaux sacrifiés. Les groupes E et AE ont été traités à posteriori des groupes C et A. Cependant, les conditions de température, de luminosité de l'animalerie, et l'alimentation ont été strictement les mêmes. De plus, les examens réalisés avant le sacrifice (densitométrie) ont été réalisés strictement à la même semaine du protocole pour tous les groupes.

IV. Résultats

A. Consommation quotidienne : boisson et nourriture

	C	A	E	AE	p
Boisson /jour (mL)	26,93 ± 2,35	18,23 ± 2,90 ^c	22,88 ± 2,71 ^{c,a,ae}	17,85 ± 2,14 ^c	0,01
Aliment /jour (g)	28,85 ± 1,11	18,15 ± 1,29 ^c	23,90 ± 3,03 ^{c,a,ae}	17,93 ± 2,27 ^c	0,016
Kcalories éthanol /jour (%)	0,00 ± 0,00	38,10 ± 3,07 ^{c,e}	0,00 ± 0,00	38,13 ± 1,31 ^{c,e}	0,005
Kcalories totales /jour (Kcal)	84,74 ± 3,26	86,36 ± 8,41	70,20 ± 8,92	85,03 ± 10,28	NS

Tableau 22 : Consommations de boisson et nourriture des quatre groupes.

Moyennes des consommations hydriques et alimentaires des 4 groupes, calculées sur les 4 derniers week-ends de l'étude.

C : groupe contrôle. A : groupe alcoolisé à 35% v/v et non entraîné. E : groupe exercice. AE : groupe alcoolisé à 35% v/v et entraîné. p : degré de significativité (p<0,05).

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

B. Densité, contenu minéral osseux et composition corporelle

	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	p alcool	p exercice	P interaction
CMO corps entier (g)	19,68 ± 0,98	15,61 ± 1,06 ^{c,e}	17,64 ± 0,98 ^c	16,67 ± 1,73 ^c	< 0,0001	0,21	0,0003
DMO corps entier (g/cm²)	0,205 ± 0,006	0,189 ± 0,006 ^c	0,194 ± 0,010 ^c	0,196 ± 0,010 ^c	0,0003	0,25	< 0,0001
CMO fémur (g)	0,88 ± 0,07	0,70 ± 0,05 ^c	0,74 ± 0,03 ^c	0,73 ± 0,08 ^c	< 0,0001	0,01	< 0,0001
DMO fémur (g/cm²)	0,389 ± 0,020	0,337 ± 0,019 ^{c,e,ae}	0,364 ± 0,013 ^c	0,359 ± 0,019 ^c	< 0,0001	0,81	0,0002
Poids (g)	641,61 ± 56,34	460,20 ± 41,49 ^c	560,54 ± 38,63 ^{c,a,ae}	505,02 ± 59,40 ^c	< 0,0001	0,26	0,0004
Masse maigre (g)	514,98 ± 30,83	386,66 ± 34,13 ^{c,e,ae}	450,18 ± 28,44 ^c	427,54 ± 51,05 ^c	< 0,0001	0,31	< 0,0001
Masse grasse (g)	106,96 ± 35,68	57,93 ± 17,47 ^{c,e}	92,73 ± 18,05	60,82 ± 19,09 ^{c,e}	< 0,0001	0,48	0,29

Tableau 23 : CMO, DMO et composition corporelle.

C : groupe contrôle. A : groupe alcoolisé à 35% v/v et non entraîné. E : groupe exercice. AE : groupe alcoolisé à 35% v/v et entraîné. p : degré de significativité (p<0,05).

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

Consommation quotidienne : boisson et nourriture

La quantité de boisson consommée était inférieure dans les groupes A, E et AE comparés au groupe C, et dans les groupes A et AE comparés à E. La quantité de nourriture consommée chaque jour était inférieure dans les groupes A, E et AE comparés à C, et inférieure dans les groupes A et AE comparés au groupe E. En revanche, la quantité totale de kcalories ingérée chaque jour n'était statistiquement pas différente entre les 4 groupes (Tableau 22).

Densité, contenu minéral osseux et composition corporelle

Composition corporelle

A la fin de l'étude, le poids des rats était significativement inférieur dans les groupes A, E et AE comparés au groupe C, et significativement inférieur dans les groupes A et AE versus E. Un effet de l'alcool sur la masse grasse a été observé (groupes A et AE inférieurs aux groupes C et E). Ces différences persistaient après ajustement à la composition corporelle au début de l'étude. La masse maigre était plus faible dans les groupes A, E et AE versus C, et A versus E et AE (Tableau 23).

CMO et DMO

La DMO au niveau du corps entier et du fémur était significativement plus faible dans les groupes A, E et AE comparés au groupe C en fin de protocole. La DMO au fémur était également inférieure dans le groupe A comparé aux groupes E et AE. Ces différences restaient significatives après ajustement au poids, à la masse maigre et à la masse grasse (Tableau 23).

C. Paramètres de microarchitecture trabéculaire

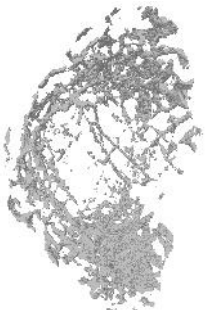
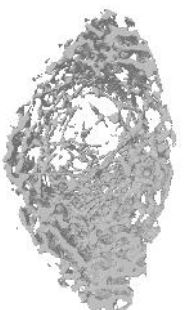
	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	p alcool	p exercice	p interaction
							
BV/TV (%)	15,61 ± 5,49	11,28 ± 3,05	12,28 ± 4,37	16,43 ± 3,86	0,95	0,52	0,005
BS/BV (1/mm)	44,98 ± 7,75	54,46 ± 4,80 ^{c,e,ae}	40,38 ± 2,90	40,52 ± 4,26	0,009	< 0,0001	0,01
SMI	1,83 ± 0,24	2,04 ± 0,16	2,32 ± 0,31 ^{c,a,ae}	2,02 ± 0,23	0,54	0,004	0,003
Tb.Th (mm)	0,096 ± 0,012	0,084 ± 0,007 ^{c,e,ae}	0,106 ± 0,005 ^c	0,101 ± 0,009	0,003	< 0,0001	0,23
Tb.N (1/mm)	1,61 ± 0,44	1,34 ± 0,29	1,06 ± 0,52 ^{c,ae}	1,62 ± 0,31	0,27	0,29	0,003
Tb.Sp (mm)	0,47 ± 0,19	0,54 ± 0,20	0,72 ± 0,28	0,54 ± 0,20	0,42	0,09	0,09
DA	2,68 ± 0,47	2,34 ± 0,26	2,63 ± 0,33	2,81 ± 0,69	0,60	0,16	0,08

Tableau 24 : Paramètres de microarchitecture trabéculaire du fémur.

BV/TV : volume occupé par l'os dans le volume de tissu étudié. BS/BV : rapport de la surface représentée par l'os dans le volume étudié. SMI : Structure Model Index.

Tb.Th : épaisseur des travées osseuses. Tb.N : nombre de travées osseuses. Tb.Sp : taille des espaces entre les travées osseuses. DA : degré d'anisotropie.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

Paramètres de microarchitecture trabéculaire

Le Tb.Th était inférieur dans le groupe A comparé aux groupes C, E et AE et supérieur dans le groupe E comparé à C. Ceci montre un effet positif de l'exercice sur Tb.Th et un effet négatif de l'alcool. Le Tb.N était inférieur dans le groupe E comparé aux groupes C et AE. Ces différences persistaient après ajustement au poids, à la masse maigre et à la masse grasse (Tableau 24).

D. Paramètres de macroarchitecture et microarchitecture corticale

Les Ct.Po et Po.N étaient significativement plus élevés dans le groupe A comparé à C, E et AE. Le Po.Sp était plus faible dans les groupes E et AE comparés au groupe C. L'épaisseur corticale était inférieure dans le groupe A comparé aux trois autres groupes, et ce dans les deux axes. Ces différences persistaient toujours après ajustement aux paramètres de composition corporelle (Tableau 25).

E. Paramètres biomécaniques

Il y avait un effet de l'exercice sur la contrainte maximale, qui était inférieure dans le groupe A comparé aux groupes E et AE. La CSA était plus faible dans les groupes A, E et AE comparés à C, et plus faible dans le groupe A comparé à E et AE. L'énergie maximale était inférieure dans le groupe E versus C (Tableau 26).

F. Paramètres biochimiques

La concentration de NTx était inférieure dans les trois groupes A, E et AE par rapport au groupe C, tandis que la concentration en OC était supérieure dans le groupe E comparé aux groupes C, A et AE. La concentration de leptine plasmatique était plus faible dans le groupe AE versus E (Tableau 27).

Paramètres de macroarchitecture et microarchitecture corticale

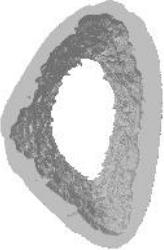
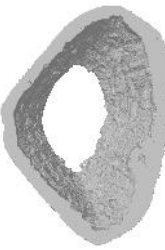
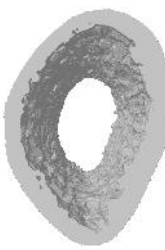
	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	p alcool	p exercice	P Interaction
							
Ct.Po (%)	1,01 ± 0,27	1,39 ± 0,33 ^{c,e,ae}	1,09 ± 0,17	1,06 ± 0,31	0,06	0,17	0,03
Po.Dm (mm)	0,042 ± 0,004	0,040 ± 0,002	0,041 ± 0,002	0,041 ± 0,004	0,52	0,99	0,35
Po.Sp (mm)	1,28 ± 0,12	1,17 ± 0,11	1,14 ± 0,11 ^c	1,17 ± 0,07 ^c	0,21	0,05	0,046
PoS/PoV (%)	168,91 ± 30,83	161,39 ± 20,71	168,97 ± 16,29	172,60 ± 27,04	0,81	0,48	0,48
Po.N (1/mm)	0,24 ± 0,05	0,34 ± 0,08 ^{c,e,ae}	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,06	0,02	0,09	0,003
Diamètre ext AP (mm)	3,53 ± 0,16	3,67 ± 0,20 ^e	3,34 ± 0,11	3,47 ± 0,26	0,03	0,003	0,93
Diamètre ext ML (mm)	5,28 ± 0,27	5,41 ± 0,18	4,91 ± 0,12 ^{c,a}	4,80 ± 0,46 ^{c,a}	0,89	< 0,0001	0,20
Diamètre int AP (mm)	1,97 ± 0,17	2,50 ± 0,20 ^{c,e,ae}	1,85 ± 0,11	1,93 ± 0,28	< 0,0001	< 0,0001	0,001
Diamètre int ML (mm)	3,72 ± 0,31	4,28 ± 0,25 ^{c,e,ae}	3,36 ± 0,16 ^c	3,31 ± 0,47 ^c	0,017	< 0,0001	0,005
Ct.Th AP(mm)	0,78 ± 0,07	0,59 ± 0,04 ^{c,e,ae}	0,75 ± 0,04	0,77 ± 0,05	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ct.Th ML (mm)	0,78 ± 0,06	0,57 ± 0,07 ^{c,e,ae}	0,77 ± 0,06	0,74 ± 0,06	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tableau 25 : Paramètres de microarchitecture et de macroarchitecture corticale du fémur.

Ct.Po : porosité corticale. Po.Dm : diamètre des pores. Po.Sp : taille des espaces entre les pores. PoS/PoV : rapport entre la surface occupée par les pores et le volume occupé par les pores. Po.N : nombre de pores. Ct.Th : épaisseur corticale. AP : antéro postérieur. ML : médio latéral.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

Paramètres biomécaniques

	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	p alcool	p exercice	p interaction
Force max (N)	184,46 ± 28,97	156,16 ± 30,30	171,28 ± 23,16	178,27 ± 19,72	0,21	0,59	0,04
Contrainte max (N/mm²)	163,07 ± 20,95	144,65 ± 18,02 ^{e,ae}	180,84 ± 25,16	182,73 ± 35,10	0,31	0,001	0,21
CSA (mm²)	8,87 ± 0,80	7,19 ± 0,57 ^{c,e,ae}	7,99 ± 0,43 ^c	8,04 ± 0,85 ^c	0,0007	0,93	0,0004
Module d'Young (Mpa)	5329,99 ± 829,58	4817,53 ± 1203,33	6230,29 ± 1379,66	6127,44 ± 2286,11	0,52	0,02	0,66
Rigidité (N/mm)	319,47 ± 58,51	282,05 ± 62,05	294,47 ± 58,71	298,46 ± 56,05	0,38	0,82	0,28
Energie max (N.mm)	118,39 ± 40,36	78,86 ± 23,94	80,77 ± 24,02 ^c	87,86 ± 32,63	0,14	0,19	0,04

Tableau 26 : Paramètres biomécanique du fémur.

CSA : Surface de la section corticale.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

Paramètres biochimiques

	C	A	E	AE	p alcool	p exercice	p interaction
NTx	156,66 ± 112,38	55,22 ± 34,98 ^c	48,89 ± 29,23 ^c	72,87 ± 49,92 ^c	0,07	0,11	0,018
OC	229,82 ± 50,42	232,98 ± 28,60	397,89 ± 163,01 ^{c,a,ae}	222,80 ± 98,67	0,04	0,06	0,03
Leptine	4,43 ± 0,86	3,28 ± 0,68	4,98 ± 1,62 ^{ae}	2,86 ± 1,09	0,004	0,96	0,32

Tableau 27 : Concentrations des marqueurs du remodelage osseux : ostéocalcine (OC), telopeptides du collagène (NTx) et de la leptine.

NTx : télopeptides N de collagène de type I. OC : ostéocalcine.

^c : différence significative avec le groupe C. ^a : différence significative avec le groupe A. ^e : différence significative avec le groupe E. ^{ae} : différence significative avec le groupe AE.

G. Apoptose des ostéocytes

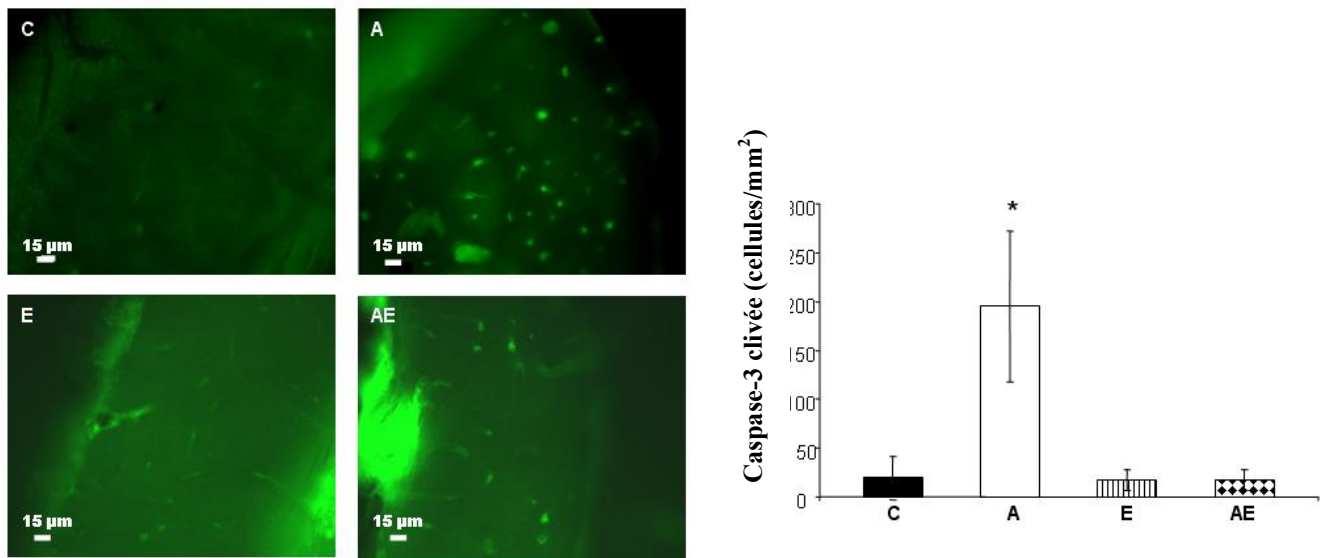


Figure 64 : Apoptose des ostéocytes révélée par un immunomarquage à la caspase-3.

Il y avait significativement plus de cellules marquées à la caspase-3 dans le groupe A comparé aux groupes C, E et AE. Le nombre de cellules apoptotiques était 10 fois plus important dans le groupe A comparé au groupe C, tandis qu'il était identique dans les groupes AE, E et C (Figure 64).

H. Corrélations

Il existait une corrélation entre le poids et la DMO au corps entier ($r = 0,71$, $p < 0,0001$). La masse maigre était fortement corrélée avec la DMO au fémur et au corps entier (respectivement $r = 0,80$, $p < 0,0001$ et $r = 0,79$, $p < 0,0001$). La corrélation entre la masse grasse et la DMO au fémur était plus faible ($r = 0,44$, $p = 0,006$). La contrainte maximale était également corrélée faiblement avec le Tb.Th ($r = 0,47$, $p = 0,003$); et inversement corrélée au Ct.Po ($r = -0,35$, $p = 0,03$) et au Po.N ($r = -0,37$, $p = 0,02$). Des corrélations inverses existaient entre la caspase-3 et la DMO au fémur ($r = -0,41$, $p = 0,01$) et entre la caspase-3 et le Tb.Th ($r = -0,42$, $p = 0,0087$). Des corrélations faibles existaient entre la caspase-3 et le Ct.Po ($r = 0,48$, $p = 0,0027$); la caspase-3 et le Po.N ($r = 0,51$, $p = 0,0014$); et la caspase-3 avec la contrainte maximale ($r = -0,50$, $p = 0,002$).

V. Discussion

Cette étude montre que les effets délétères d'une alcoolisation chronique sur les paramètres osseux sont limités par l'activité physique.

Nous avons observé dans cette étude un plus faible poids, et des gains de masses grasses, masses maigres et DMO plus faibles dans le groupe A comparé au groupe C, ce qui confirme que notre modèle a bien induit une ostéopénie. Les effets de l'alcool chronique sur ces paramètres sont connus, mais nous avons observé un effet protecteur de l'exercice sur la masse maigre et la DMO du fémur des rats alcoolisés et entraînés. Les différences de DMO observées étaient toujours significatives après ajustements au poids et à la masse maigre. Dans cette étude, tous les groupes ont consommé le même nombre de kilocalories.

La consommation d'alcool a diminué significativement le Tb.Th dans le groupe A, tandis que l'alcool combiné à l'exercice physique n'était pas associé à un plus faible Tb.Th. Dans l'os cortical le nombre de pores et la porosité corticale étaient supérieurs dans le groupe A comparé aux autres groupes. Ces données montrent que non seulement l'alcool a un effet délétère sur l'os cortical et la porosité, mais que l'exercice contrebalance ces effets, comme le montrent les plus faibles valeurs de Ct.Po et Po.N dans le groupe AE comparé au groupe A. L'épaisseur corticale était également diminuée suite au traitement alcoolisé, modification que nous n'avons pas observée quand l'alcool était combiné à un exercice régulier. Les fémurs des rats du groupe AE résistaient à une contrainte maximale supérieure comparés aux fémurs des animaux du groupe A. La contrainte maximale était corrélée avec les paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale (Tb.Th et Ct.Po). Nous avons observé une apoptose des ostéocytes plus élevée dans le groupe A comparé aux trois autres groupes. De plus, il existait des corrélations entre la caspase-3 et la DMO, le Tb.Th, le Ct.Po et le Po.N. L'exercice a prévenu l'augmentation de l'apoptose des ostéocytes.

En conclusion, une consommation excessive et chronique d'alcool diminue la DMO, l'épaisseur de l'os trabéculaire et cortical, et engendre une augmentation de la porosité corticale et de l'apoptose des ostéocytes. Quand un exercice régulier est associé à l'alcoolisation, la DMO du fémur est significativement supérieure à celle observée chez les rats alcoolisés sédentaires tandis que les paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale et l'apoptose des ostéocytes ne sont pas différents du groupe contrôle. De ce fait, une activité physique régulière prévient en partie les effets délétères de l'alcool dans ce modèle murin d'ostéoporose secondaire, phénomène lié en parti à la quantité d'apoptose des ostéocytes.

Article 5

REGULAR EXERCISE LIMITS ALCOHOL-INDUCED OSTEOPENIA IN THE RAT.

Delphine B. MAUREL¹, Nathalie BOISSEAU², Stéphane PALLU¹,
Gaël Y. ROCHEFORT¹, Claude-Laurent BENHAMOU^{1*}, Christelle JAFFRE^{1*}.

¹ INSERM Unit U658, Characterization of bone tissue by imagery, Orleans Regional Hospital, Orleans, France.

² Blaise Pascal Clermont University, EA 3533, Laboratory of Physical Activity and Sport Biology, Clermont-Ferrand, France.

* Both senior authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Nathalie Boisseau. Blaise Pascal Clermont University, EA 3533, Laboratory of Physical Activity and Sport Biology, Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: Nathalie.BOISSEAU@univ-bpclermont.fr. Phone number: (+0033) 473405519. Fax number: (+0033) 473405062.

Running title: Exercise limits alcohol-induced osteopenia.

Funding: This work was funded in part by IREB (French Institute of Scientific Research on the Alcoholic Beverages). No funding was received for this work from NIH, Wellcome Trust or HHMI.

Disclosure: Delphine B. Maurel declares she has no disclosure. Nathalie Boisseau discloses no professional relationships with companies or manufacturers who will benefit from the results of the present study. Stephane Pallu has no disclosure. Gael Y Rochefort has no

disclosure. Claude-Laurent Benhamou has no professional relationships with companies who will benefit from the results of the present study. Christelle Jaffre has no disclosure.

ABSTRACT

Introduction: Excessive alcohol consumption is known to be deleterious for bone tissue whereas physical activity has positive effects on bone. This study was designed to analyze the effects of regular physical exercise on bone parameters in chronic alcohol-fed rats.

Material and methods: 48 male Wistar rats were divided in 4 groups: Control(C), Alcohol(A), Exercise(E) and Alcohol+Exercise(AE). A and AE groups drank a solution composed of ethanol and water (35% volume/volume for 17 weeks). E and AE groups were submitted to treadmill training for 14 weeks (60min/day, 5times/week). Bone mineral density (BMD) was assessed by DXA, the trabecular and cortical microarchitectural parameters by microCT and serum osteocalcin, NTx and leptin concentrations by ELISA assays. Bone mechanical parameters were evaluated through mechanical testing. Osteocyte apoptosis in cortical bone was analyzed with cleaved caspase-3 immunostaining.

Results: Alcohol-fed rats had significantly decreased body weight, fat mass and lean mass compared to controls. BMD, trabecular and cortical thickness were significantly lower with alcohol whereas porosity and pore number were higher. Exercise combined to alcohol prevented the decreased μ CT parameters, as AE values were similar to C values, and significantly limited the BMD loss and low maximal stress compared to the A group. Osteocyte apoptosis was increased in A compared to C, while it was similar in AE and C. Cleaved caspase-3 staining was correlated with BMD, Tb.Th and Ct.Po.

Conclusion: Regular physical activity has beneficial effects on bone status in alcohol-fed rats. In parallel, exercise prevents osteocyte apoptosis in alcohol-fed animals while alcohol alone increases it dramatically.

Key words: alcohol, physical activity, micro architecture, bone density, osteocyte.

INTRODUCTION

Paragraph Number 1 The detrimental effects of alcohol abuse on the adult skeleton are well established. Excessive chronic alcohol consumption results in bone loss and increases the risk of osteoporosis (22). It also increases the risk of fracture and complications (11). Numerous studies have been conducted in animal models to further elucidate the impact of ethanol on bone. Lower total and vertebral bone mineral density (BMD) have been reported following chronic ethanol administration in male and female rats (15% and 36% of the total energy intake) (26). Peak bone mass in both trabecular and cortical bone was also decreased in young growing rats. Chronic alcohol consumption lowers tibia length, vertebral body height, bone growth, endosteal and periosteal formation, trabecular and cortical thickness (21). Several studies reported that chronic alcohol consumption decreases bone resistance which in turn increases the risk of fractures when bones are subject to large mechanical loadings (19). The mineralization and apposition rates were also negatively modified by alcohol (31). Animal models confirmed that the deleterious effects of alcohol observed on BMD and bone morphology is due to a decrease in bone formation, characterized by an inhibition of the osteoblastic proliferation and activity (13).

Paragraph Number 2 In contrast, exercise is generally known to induce beneficial effects on the musculoskeletal system. The impact of physical activity on bone density depends on the type of exercise, the intensity and frequency of training. The positive effects of weight-bearing physical activities on bone have been well documented in the literature (3) and exercise is recommended to prevent and as a treatment in primary osteoporosis in postmenopausal women (34). The beneficial effects of physical activity on bone mass and density have been shown to be long term (25).

Paragraph Number 3 The effects of alcohol or exercise have been assessed on bone remodeling, together with osteoblast and osteoclast activities. However, little is known about the effects of alcohol and exercise on the osteocyte. Osteocyte is the third bone cell, with osteoblast and osteoclast. It has been thought for a long time to be a passive cell and has not been studied extensively during the past because of its location inside the bone matrix (5). Recently it has been shown that osteocyte plays a role in bone, especially in the mechanotransduction (8). Indeed, the osteocyte senses the change of interstitial fluid flow through the lacunar-canalicular network of bone and adapt bone mass to the loads applied to bones (9). The osteocyte maintains bone mass by regulating osteoblast and osteoclast activity (30), which has been reported *in vitro*. It has been shown that exercise maintains osteocyte viability (15) while chronic alcohol consumption increases osteocyte apoptosis (24). To date, no data exists concerning the potential interaction between alcohol and exercise on osteocyte apoptosis.

Paragraph Number 4 In a previous study in our laboratory (23), we analyzed the combined effects of moderate alcohol consumption and moderate exercise on rats' skeleton. The moderate alcohol treatment induced higher trabecular thickness and BMD, while we observed a positive effect of exercise only on body composition (23). To date and to our knowledge, very few studies have assessed the effects of high alcohol consumption combined to regular physical activity on bone (28). The aim of this study was to point out the effects of regular prolonged physical activity on bone mass, density, microarchitecture, bone remodeling as well as on osteocyte apoptosis in a rat model of alcohol abuse, and to compare the evolution of these bone parameters with those of sedentary chronic alcohol-fed rats.

MATERIAL AND METHODS

Paragraph Number 5 Forty-eight male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, France) were acclimatized for 2 weeks and maintained under constant temperature ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) and under 12h/12h light-dark cycles during the experiment. Rats were housed in groups of two in standard cages and provided with a commercial standard diet (M20, Dietex, France). The rats were 8 weeks old at baseline. They were not skeletally mature but we wanted to apply our model of alcohol treatment to make a comparison with the young adult. The skeletal growth is known to occur until 30-35 years old in the adult.

Paragraph Number 6 At ten weeks of age, the rats were allocated to one of the following groups: Controls (C), Alcohol (A), Exercise (E) or Alcohol+Exercise (AE), in order to match the body weight of the rats between the groups at baseline. The protocol lasted 19 weeks. The quantities of food and drink ingested were controlled and recorded weekly for all groups. The weights of the rats were measured at 8 and 27 weeks of age. At the end of the study, all groups were anesthetized with pentobarbital and killed by a blood sample taking directly into the heart. Soon after death, the femurs and tibias were excised and cleared of fat and connective tissues. The left femur was placed in a soft tissue and frozen at -20°C for the microarchitectural and biomechanical tests. The right tibia was fixed in formalin 4% v/v and then demineralised (Osteosoft, Merck, Darmstadt, Germany) for epifluorescent microscopy. The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community standards on the care and use of laboratory animals (Ministère de l'agriculture, France, Authorisation INSERM45-001). It was also in adherence to ACSM animal care standards.

Alcohol treatment

Paragraph Number 7 The rats of the Alcohol (A) and Alcohol+Exercise (AE) groups drank *ad libitum* a solution composed of ethanol and water during 17 weeks. The percentage of ethanol in the solution was progressively increased during three weeks from 5 % to 35 % v/v. The food was given separately. The quantity of food eaten and beverage drank was weekly controlled in the alcohol-treated groups and the amount of total calorie intake was matched in the control and exercise groups having only the solid food as a caloric supply, in order for the two groups to be pair-fed, as described by Sampson *et al.* (33). We isolated randomly a pair of rats from each group each week by individually housing the rats in a cage and checking the consumption of each rat. If the consumption was too different, we changed the pair of rats in the cage and controlled them another time the following week.

Exercise protocol

Paragraph Number 8 Rats in the Exercise (E) and Alcohol+Exercise (AE) groups were trained 5 days a week on a treadmill for 14 weeks. During the first week, the treadmill speed and the duration of each running session were gradually increased from 5 m.min⁻¹ to 9 m.min⁻¹ and from 15 min to 45 min per day. The second week of training, the speed was increased from 10 m.min⁻¹ to 20 m.min⁻¹ and the duration of the training was 60 min per day. During the 7 last weeks of training, the speed was increased from 9 to 14 m.min⁻¹ during the first 30 minutes of the training session, and then the rats ran at a speed of 20 m.min⁻¹ for the last 30 minutes of the training session. Maximal aerobic speed was determined at the beginning of the training to confirm that our treadmill training corresponded to moderate intensity. The measurement protocol has been described previously by Boissiere *et al.* (4). The intensities of the exercise training sessions corresponded to 60 to 65% of the maximal aerobic speed of the rats.

Measurements

Body composition

Paragraph Number 9 Body weight, lean and fat mass were measured by Dual X-ray Absorptiometry (DXA, Discovery, Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) at baseline and at the end of the protocol, using a specific rat body composition mode. In order to perform the *in vivo* exam, the rats were anaesthetized with intra-peritoneal pentobarbital injection (CEVA Santé Animale, Libourne, France) diluted in sodium chloride (0.1 mL injected/100g of body weight).

BMC and BMD measurements

Paragraph Number 10 *In vivo* BMC and BMD of the whole body and the right femur were analyzed at baseline and at the end of the protocol by DXA using a Discovery Hologic apparatus adapted to small animals. This device has been validated in animals and is commonly used in the literature.

Microarchitecture of the trabecular bone

Paragraph Number 11 The microarchitecture of the distal femur metaphysis was studied using μ CT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium). We chose this subregion because it is rich in cancellous bone. The characteristics and methods used in our laboratory have already been described (6). The X-ray source was set at 80kV and 100 μ A, with a pixel size of 11.16 μ m. Four hundred projections were acquired over an angular range of 180° (angular step of 0.45°). The image slices were reconstructed using the cone-beam reconstruction software version 2.6 based on the Feldkamp algorithm. The registered data sets were segmented into binary images. Two hundred and twenty-five slices were selected. Simple global thresholding methods were used. The trabecular bone was extracted by drawing

ellipsoid contours with ‘CT analyzer’ software (Skyscan). The parameters analyzed were the bone volume to tissue volume (BV/TV), the bone surface on bone volume (BS/BV), the trabecular thickness (Tb.Th), the trabecular number (Tb.N), the trabecular spacing (Tb.Sp), the structure model index (SMI) and the degree of anisotropy (DA) which defines the preferred orientation of the trabeculae.

Morphological characteristics of cortical bone

Paragraph Number 12 Cortical bone was analyzed in the distal femur metaphysis using μ CT. The characteristics and methods used have already been described (6). The acquisition characteristics were the same as those used for the trabecular bone. After reconstruction, cortical bone was extracted by drawing polygonal contours with “CT analyzer” software. Before inversion of the image, simple global thresholding methods were applied, and the algorithms developed for trabecular bone analysis were used to characterize the porosity network. Porosity (Ct.Po) and pore number (Po.N) were measured with the MIL method. The pore diameter (Po.Dm) and the pore spacing (Po.Sp) were derived from the Hildebrand method and the total space occupied by the pores into the total volume (PoS/PoV) was derived from the triangulation method. At pixel size of 11 μ m, the pores are generally considered to be Haversian and Volkmann canals, as described by Zebaze *et al.* (40). The inner and outer diameters of the cortical bone in both axes (medio-lateral and antero-posterior) were assessed with the Image J software, as well as the cortical thickness (Ct.Th), using the reconstructed bone slices obtained by μ CT (Skyscan 1072, Skyscan, Aartselaar, Belgium).

Bone mechanical tests

Paragraph Number 13 Mechanical properties of the left femur were assessed by three-point bending tests. Four hours before mechanical testing, the bones were thawed at room temperature. Each bone was secured on the two lower supports of the anvil of a Universal Testing Machine (Instron 3343, Instron, Melbourne, Australia). The width of these supports was 8 mm, and the distance between the two supports was 20 mm. The cross-head speed for all tests was 1 mm/minute. Load-displacement curves were recorded using specialized software (Instron 3343 software). Biomechanical properties were calculated from these curves: ultimate force (the maximal force supported by the bone before fracture, N); energy to ultimate force (work energy required to fracture bone, N.mm) and stiffness (extrinsic rigidity of the femur, N/mm). Ultimate stress (N/mm^2) and Young's modulus (modulus of elasticity, MPa) were determined by the equations previously described by Turner and Burr (36). To ensure good reproducibility between measurements, the femur was always mounted in order to apply the cross-head in the middle of the bone.

Biochemical analysis

Paragraph Number 14 Bone turnover was analyzed from blood samples taken the day of the absorptiometry prior to sacrifice. At the time of the sacrifice (7 month old), bone remodeling becomes more predominant than bone modelling in bones of the posterior limbs in the rat (20). The blood was centrifuged and the plasma was frozen at -80°C . The markers studied to evaluate bone remodeling were osteocalcin (OC) for bone formation and the N-terminal collagen cross-links (NTx) for bone resorption. Serum samples were assayed in duplicate by ELISA. The osteocalcin concentration was measured with the Rat-MIDTM Osteocalcin EIA kit (IDS, France). Intra and inter-assay CV were respectively 5 and 5.5 %

and the detection limit was 50.0 ng.mL⁻¹. NTx assays were performed with the ELISA Osteomark® NTX Serum kit (TECOmedical, France). Intra and inter-assay CV were 4.6 and 6.9 % respectively and the detection limit was 3.2 nM BCE/L. Serum leptin was assessed by ELISA testing as well (m/r Leptin ELISA Kit, TECOmedical, France). The sensitivity of the detection of the assay was 10 pg/mL and intra and inter-assay variation coefficients were lower than 4.4% and 4.7% respectively.

Bone explants preparation for epifluorescence microscopy

Paragraph Number 15 After the sacrifice, the right tibia was placed in formalin 4% v/v for 4 days. Afterwards, it was rinsed in ethanol 50% for 1 week and then demineralised (Osteosoft, Merck, Darmstadt, Germany) for 24 hours. Tibia slice (thickness 400 µm) was cut transversally in the superior part of the tibia diaphysis with a high speed rotary tool (Dremel 300, Dremel, USA). The cortical bone slice was immunostained for epifluorescence microscopy with cleaved caspase-3 (1/400, Rabbit mAb Asp 175, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) which is a marker of apoptosis. This staining was revealed by secondary antibodies anti-rabbit Dylight™ 488 (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA), as described by Vatsa *et al.* (38). Knowing that 90 to 95% of cortical bone cells are osteocytes, we assumed that the cells stained with cleaved caspase-3 were osteocytes.

Image acquisition

Paragraph Number 16 Epifluorescence images of osteocytes were obtained by using a Motic AE21 video camera attached to a Microvision microscope (Evry, France). The objective magnification was 10x. Seven rats per group were analyzed. We imaged five regions of interest (ROI) around the cortical bone. The size of one ROI was 300000 µm² so that the total cortical area analysed was 1.5 mm². We acquired images of the cleaved caspase-

3 staining in each region of interest (ROI). The images were analysed with Image J software. The number of cells stained per mm² with cleaved caspase-3 in each ROI was calculated.

Statistical analysis

Paragraph Number 17 Data are presented as mean $\pm$ standard deviation for BMD, microarchitecture parameters and biomechanical parameters and as mean $\pm$ standard error of the mean for biochemical analysis, due to high inter-individual variability. To study the influence of chronic alcohol consumption and physical exercise on measured parameters, a two-way analysis of variance (Anova) was employed. The test of primary interest was the interaction between alcohol and exercise, followed by Newman-Keuls post hoc test when significant. Analysis of covariance were realised to deal with baseline differences. Correlations were performed using Spearman test. We used the Statview software version 5.0 with a significant level of difference set at $p < 0.05$.

RESULTS

Food and beverage consumption (Table 1)

Paragraph Number 18 The amount of beverage consumed was significantly lower in A, E and AE groups compared to the C group, and in A and AE compared to E. The percentage of calories from the ethanol consumption per day was higher in A and AE groups compared to C and E groups, and there was no difference between A and AE. The amount of food consumed per day was lower in A, E and AE groups compared to C group, and lower in A and AE versus E. However, the mean total amount of calories ingested per day was not significantly different between the groups.

Body composition (Table 2)

Paragraph Number 19 At baseline, lean mass was higher in A versus AE (respectively 361.23 ± 21.93 , 361.10 ± 15.88 , 338.19 ± 16.83 and 346.24 ± 22.98 for C, A, AE and E; $p_{\text{exe}}=0.005$; $p_{\text{alc}}=0.52$). Fat mass was lower in C versus AE and E, and lower in A versus E (respectively 42.48 ± 9.97 , 48.61 ± 6.13 , 54.24 ± 7.84 and 59.41 ± 10.17 for C, A, AE and E; $p_{\text{exe}}=0.0003$; $p_{\text{alc}}=0.86$). There was no difference in body weight (respectively 414.67 ± 25.37 , 421.22 ± 14.68 , 403.64 ± 20.44 and 416.89 ± 24.91 for C, A, AE and E; $p_{\text{exe}}=NS$; $p_{\text{alc}}=NS$).

At the end of the protocol, the body weight was significantly lower in A, E and AE groups compared to C, and significantly lower in A and AE versus E. The fat mass was significantly lower in A and AE groups versus C and E, indicating an alcohol effect on this parameter. These differences remained after adjustment to baseline values. The lean mass was lower in A, E and AE groups versus C, and lower in A versus E and AE. There were interactions between the effects of alcohol and exercise on body weight and lean mass (Table 2).

BMC and BMD measurements (Table 2)

Paragraph Number 20 At baseline, femur BMC was lower in the C group versus A and E, while there was no difference for the femur BMD (respectively 0.272 ± 0.013 , 0.279 ± 0.015 , 0.275 ± 0.010 and 0.281 ± 0.013 for C, A, AE and E), the whole body BMC and BMD (WB BMD: 0.154 ± 0.005 , 0.159 ± 0.004 , 0.157 ± 0.005 and 0.155 ± 0.005 respectively for C, A, AE and E; $p_{\text{exe}}=0.81$; $p_{\text{alc}}=0.0496$).

Paragraph Number 21 At the end of the protocol, whole body BMC was lower in A, E and AE groups versus C, and in A versus E. Whole body BMD was significantly lower in A, E and AE versus C. The femur BMC was significantly lower in A, E and AE groups versus C, as well as the femur BMD. The femur BMD was also lower in A versus E and AE. These

differences remained significant after adjustment for lean mass and fat mass. There were interactions between the effects of alcohol and exercise on whole body and femur BMC and BMD (Table 2).

Microarchitecture of the trabecular bone (Table 3)

Paragraph Number 22 BS/BV was significantly higher in the A group versus C, E and AE, while SMI was higher in E versus the three other groups. Tb.Th was significantly lower in A versus C, E and AE and higher in E versus C. There was a positive effect of exercise and a negative effect of alcohol on Tb.Th. Tb.N was lower in E versus C and AE. There were interactions between alcohol treatment and exercise on BV/TV, BS/BV and Tb.N (Table 3).

Characteristics of the cortical bone (Table 4)

Paragraph Number 23 Ct.Po and Po.N were significantly higher in the A group versus C, E and AE. Po.Dm was not different between the groups but Po.Sp was lower in E and AE versus C. The external AP diameter was higher in A versus E and the external ML diameter was lower in E and AE versus C and A. The internal AP diameter was higher in the A group versus C, E and AE, as for the internal ML diameter, which was also lower in E and AE versus C. We found a significantly lower cortical thickness in the A group versus C, E and AE in both AP and ML axis. There were interactions of exercise and alcohol effects on Ct.Po, Po.Sp, Po.N and Ct.Th.

Mechanical tests (Table 5)

Paragraph Number 24 We did not find any difference for ultimate force and stiffness between the four groups. There was an effect of exercise as the maximal stress was significantly lower in the A group versus E and AE. The CSA was significantly lower in A, E and AE groups versus C, and lower in A versus E and AE. The maximal energy to failure was lower in E versus C. There were interactions between the effects of exercise and alcohol treatment on the CSA and maximal energy.

Biochemical analysis

Paragraph Number 25 The NTx concentration was lower in A, E and AE versus C (respectively 55.22 ± 34.98 , 48.89 ± 29.23 , 72.87 ± 49.92 vs 156.66 ± 112.38 mM BCE/L for A, E, AE and C, $p_{\text{interaction}} = 0.018$) while the OC concentration was higher in E versus C, A and AE groups (respectively 397.89 ± 163.01 vs 229.82 ± 50.42 , 232.98 ± 28.60 , 222.80 ± 98.67 ng/mL for E, C, A and AE, $p_{\text{interaction}} = 0.03$). Leptin concentration was lower in AE versus E (respectively 4.43 ± 0.86 , 3.28 ± 0.68 , 4.98 ± 1.62 and 2.86 ± 1.09 pg/mL for C, A, E and AE, $p_{\text{alcohol}} = 0.004$). There were interactions between alcohol and exercise on the NTx and OC concentrations, while there was an effect of alcohol on leptin.

Osteocyte apoptosis (Figure 1)

Paragraph Number 26 There was significantly more cells stained with cleaved caspase-3 in the A group compared to C, E and AE groups (respectively 195.03 ± 77.23 vs 19.16 ± 22.25 , 17.60 ± 10.82 and 17.60 ± 10.72 cells per mm^2 for A, C, E and AE; $p < 0.0001$). The increase was ten fold higher in A versus C, while there was no difference in cleaved caspase-3 staining between AE, E and C ($p = \text{NS}$). The cleaved caspase-3 staining was significantly lower in AE versus A.

Correlations

Paragraph Number 27 There was a substantial correlation between body weight and whole body BMD ($r=0.71$, $p<0.0001$). The lean mass correlated highly with both whole body and femur BMD (respectively $r=0.80$, $p<0.0001$ and $r=0.79$, $p<0.0001$). The fat mass correlated weakly with the femur BMD ($r=0.44$, $p=0.006$). The maximal stress was weakly inversely correlated with Ct.Po ($r=-0.35$, $p=0.03$) and Po.N ($r=-0.37$, $p=0.02$). We found inverse correlation between cleaved caspase-3 staining and femur BMD ($r=-0.41$, $p=0.01$) and between cleaved caspase-3 and Tb.Th ($r=-0.42$, $p=0.0087$). We also found correlations between cleaved caspase-3 and respectively Ct.Po ($r=0.48$, $p=0.0027$), Po.N ($r=0.51$, $p=0.0014$) and maximal stress ($r=-0.50$, $p=0.002$).

DISCUSSION

Paragraph Number 28 Our data showed that the alcohol treatment decreased BMD, trabecular and cortical thickness, and maximal stress, whereas regular physical activity in alcohol-fed rats limited the deleterious effects of alcohol on bone density, trabecular and cortical bone thickness as well as maximal stress. Our results also indicated an increased osteocyte apoptosis with alcohol consumption, which was not observed when alcohol was combined to exercise.

Paragraph Number 29 We observed lower body weight, fat mass, lean mass and BMD gains in the A group compared to the C group, which confirms our alcohol model's effectiveness. These results confirm the literature data indicating that alcohol decreases body weight, lean and fat mass (27) as well as BMD (21) in human and in animal models. We observed an effect of alcohol on the fat mass, while there were interactions of alcohol and

exercise on the body weight, lean mass and BMD. We did not observe an increase of the whole body BMD gain with exercise alone, probably due to the moderate intensity. We wanted to mimic alcoholic subjects who have a professional activity that is energy-consuming and that can be compared to regular physical activity (2). For example, several studies have reported that seafarers and seamen have elevated alcohol consumption (16) and elevated alcohol-related diseases and deaths (29). We observed benefits of exercise in alcohol-fed rats on lean mass gain and on the femur BMD gain, which had never been reported before. In a previous study by our team, we showed a positive effect of moderate alcohol consumption on BMD gain in male Wistar rats (23). In this study, the rats received an increasing alcohol treatment from 8% v/v to 20% v/v over 8 weeks. The BMD gain was higher in both alcohol-fed groups, with and without exercise training, compared to the control group. We did not observe an effect of exercise alone on the BMD gain in that previous study. The present study shows for the first time that regular exercise can limit the negative effect of high alcohol consumption on BMD. We found a moderate correlation between body weight and BMD on one hand and a second one between lean mass and BMD. Body weight and lean mass accounted respectively for 49% and 64% of the BMD variation. The higher lean mass in the AE group as compared to the A group may have helped limiting the lower BMD gain. In the present study, the control and exercise groups consumed as much calories as the alcohol and alcohol-exercise groups. Therefore, the effects observed on body composition were not due to a calorie restriction, but could be due to decreased nutritive calories in combination to direct effects of alcohol on bone, as described by Maddalozzo *et al.* (21).

Paragraph Number 30 Alcohol consumption significantly lowered Tb.Th in the A group, while exercise alone led to higher Tb.Th and lower Tb.N. This reorganization of bone microarchitecture with exercise prevented low Tb.Th when exercise was combined with

alcohol (AE not different from C). The thinning of the trabeculae following alcohol treatment has been already described (32), while the benefits of exercise in the trabecular bone have been reported only in non alcohol-fed animals (18). In the previous study from our group, we observed higher trabecular thickness with moderate alcohol consumption in the two alcohol-fed groups (trained and untrained) compared to controls and the non alcohol-fed trained group (23). In this previous study, we did not observe any difference in Tb.Th between the two alcohol-fed groups, trained and untrained. Thus, regular exercise prevents the trabecular thinning in high alcohol consumption in the rat, but not in moderate alcohol consumption, when the effects of alcohol on bone are anabolic. In the present study, the pore number and the cortical porosity were higher in the A group compared to the other groups. These data demonstrate that alcohol consumption is associated with higher Ct.Po, higher Po.N but with similar Po.Dm. Regular exercise counterbalances these deleterious effects in alcohol-fed rats, as Ct.Po and Po.N were significantly lower in the AE group as compared to the A group, and not different between AE and C. The cortical thickness was significantly lower in the A group compared to the other groups (Table 4). The lower cortical thickness following alcohol consumption has been shown previously (17). Hogan *et al.* reported that chronic alcohol treatment changes the internal and external bone diameters in the femur diaphysis that expanded radially, to create a higher cross-sectional moment of inertia in order to maintain its rigidity (17). In our study, we observed an increase of the medullary cavity in the A group, but no change in the external diameter in the A group compared to C. Moreover, there was no difference of cortical thickness between AE and C. The present study shows that exercise prevents the cortical thinning and the increase of the porosity in the alcohol-fed animals.

Paragraph Number 31 The change in cortical parameters was inversely correlated with the maximal stress, as the higher the porosity was, the lower the maximal stress was. However, when exercise was combined to alcohol consumption, the maximal stress was higher

compared to untrained alcohol-fed animals, and not different from controls. Maximal stress is an intrinsic parameter, as it takes the geometry of bone into account. The higher stress in the AE group compared to the A group may be linked to the greater trabecular thickness in AE versus A, or to higher bone quality in AE (lower pore number reported in AE vs A), as shown by the correlations found between these parameters. These correlations showed that Ct.Po and Po.N explains 9% and 7% of the variation respectively (see results section).

Paragraph Number 32 Maximal stress was also correlated with osteocyte apoptosis. Cleaved caspase-3 is one of the key executioners of apoptosis. It is responsible of the cleavage of many key proteins. Increased osteocyte apoptosis has been shown to occur following ovariectomy in the rat (15) and following alcohol abuse in a rabbit model (39). In the present study, we found significantly more cells stained with cleaved caspase-3 in the A group compared to the other groups, while there was no difference between AE and C. In addition, we found correlations between caspase-3 staining with the femur BMD, Tb.Th, Ct.Po and Po.N: the osteocyte apoptosis explained more than 30% of the variation of these parameters. Previous studies have demonstrated that osteocyte apoptosis is associated with a decrease in bone strength (1). A study by Fonseca *et al.* (15) reported increased empty osteocyte lacunae and increased intra cortical porosity following ovariectomy. Osteocyte apoptosis has been shown to control the activation of intracortical resorption in response to bone fatigue (10). Thus there is a link between osteocyte apoptosis and intracortical porosity, as supported by the significant correlation between empty osteocyte lacunae and cortical porosity found in the study of Cardoso *et al.* (10). In our study, osteocyte apoptosis was lower in AE versus A, and this was associated with higher trabecular, cortical thickness and maximal stress. Fonseca *et al.* recently demonstrated a decrease of empty osteocyte lacunae and osteocyte apoptosis in female rats that have been trained following ovariectomy (15),

confirming the hypothesis that exercise may prevent bone loss by increasing osteocyte survival. The exercise used by Fonseca *et al.* was voluntary running wheel while it was treadmill training in our study, suggesting that both types of exercise may be efficient to limit bone loss and stimulate osteocyte survival in bone pathologies. This confirms the *in vitro* results with fluid flow and osteocyte survival (35).

Paragraph Number 33 We did not observe a decrease of bone formation marker and an increase of bone resorption marker in the alcohol-fed groups, as previously reported (7, 13). The literature data concerning bone turnover in rats after alcohol treatment is not homogeneous (37). The bone turnover process may vary according to several factors as calcium level and endocrine regulators linked to nutrition status (14). Moreover, there were interactions between the effects of alcohol treatment and exercise. We observed a lower leptin concentration in the AE group compared to the E group. This effect of alcohol has been previously reported (21). This may be due to the lower fat mass in the AE group compared to the E group, as leptin is a hormone produced by the adipocytes. Leptin has been shown to enhance the differentiation of the marrow stem cells in favour of osteogenesis (12). The higher leptin concentration in the E group could explain the higher serum osteocalcin concentration observed in this group.

Paragraph Number 34 In conclusion, chronic heavy alcohol consumption lowered BMD gain, trabecular and cortical thickness while promoting higher cortical porosity and osteocyte apoptosis. When regular exercise was combined to the alcohol treatment, the low femur BMD gain was limited compared to alcohol-fed untrained animals, whereas the trabecular and cortical thickness decreases and the cortical porosity and the osteocyte apoptosis increases were prevented (not different from the control group). Therefore, regular physical activity

limits the alcohol-induced bone damages in this rat model of secondary osteoporosis, which seems to be linked to the degree of osteocyte apoptosis. Regular physical activity could limit low BMD in excessive alcohol abuse by preserving bone thickness and preventing porosity. This lifestyle may help limiting the risk of osteoporosis, a well known complication in alcoholic subjects.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge Eric Dolleans for technical help during the dissection and Priscilla C Aveline for helping with the immunostaining. This work has been funded in part by IREB (Institut de Recherche scientifique sur les Boissons), France.

Disclosures: NONE.

REFERENCES

1. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, and Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006; 21:605-15.
2. Ainsworth BE, Haskell WL, Leon AS, Jacobs DR, Jr., Montoye HJ, Sallis JF, and Paffenbarger RS, Jr. Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25:71-80.
3. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, and De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33:507-11.
4. Boissiere J, Eder V, Machet MC, Courteix D, and Bonnet P. Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. *J Appl Physiol.* 2008; 104:321-7.
5. Bonewald LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab.* 2007; 5:410-1.
6. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, and Benhamou CL. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:578-88.
7. Broulik PD, Vondrova J, Ruzicka P, Sedlacek R, and Zima T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res.* 2010; 59:599-604.
8. Burger EH, and Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J.* 1999; 13 Suppl:S101-12.
9. Burger EH, and Klein-Nulend J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 1999; 13:93-8.
10. Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, and Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res.* 2009; 24:597-605.
11. Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29:2077-90.
12. Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 2002; 175:405-15.

13. Dyer SA, Buckendahl P, and Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol*. 1998; 16:337-41.
14. Evans RK, Antczak AJ, Lester M, Yanovich R, Israeli E, and Moran DS. Effects of a 4-month recruit training program on markers of bone metabolism. *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40:S660-70.
15. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, and Duarte JA. Voluntary Exercise has Long-Term In Vivo Protective Effects on Osteocyte Viability and Bone Strength Following Ovariectomy. *Calcif Tissue Int*. 2011.
16. Fort E, Massardier-Pilonchery A, and Bergeret A. Psychoactive substances consumption in French fishermen and merchant seamen. *Int Arch Occup Environ Health*. 2010; 83:497-509.
17. Hogan HA, Groves JA, and Sampson HW. Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999; 23:1825-33.
18. Joo YI, Sone T, Fukunaga M, Lim SG, and Onodera S. Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone*. 2003; 33:485-93.
19. Kusy RP, Hirsch PF, and Peng TC. Influence of ethanol on stiffness, toughness, and ductility of femurs of rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1989; 13:185-9.
20. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, and Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008; 58:424-30.
21. Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, and Iwaniec UT. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int*. 2009; 20:1529-38.
22. Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, and Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int*. 2011.
23. Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, and Jaffre C. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: study in a rat model. *Eur J Appl Physiol*. 2011.
24. Maurel DB, Jaffre C, Rochefort GY, et al. Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. *Bone*. 2011; 49:543-52.
25. Nordstrom A, Olsson T, and Nordstrom P. Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:2600-4.

26. Nyquist F, Duppe H, Obrant KJ, Bondeson L, and Nordsletten L. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol Alcohol*. 2002; 37:21-4.
27. Preedy VR, Reilly ME, Patel VB, Richardson PJ, and Peters TJ. Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body. *Nutrition*. 1999; 15:604-8.
28. Reed AH, McCarty HL, Evans GL, Turner RT, and Westerlind KC. The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002; 26:1269-74.
29. Roberts SE. Mortality from disease among seafarers in British merchant shipping (1976-1995). *Int Marit Health*. 2002; 53:43-58.
30. Rochefort GY, Pallu S, and Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010; 21:1457-69.
31. Sampson HW. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22:2029-34.
32. Sampson HW, Chaffin C, Lange J, and DeFee B, 2nd. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997; 21:352-9.
33. Sampson HW, Hebert VA, Booe HL, and Champney TH. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22:1746-53.
34. Sinaki M, Pfeifer M, Preisinger E, et al. The role of exercise in the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2010; 8:138-44.
35. Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, Kuijpers-Jagtman AM, and Klein-Nulend J. Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 369:1150-4.
36. Turner CH, and Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993; 14:595-608.
37. Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000; 24:1693-701.
38. Vatsa A, Semeins CM, Smit TH, and Klein-Nulend J. Paxillin localisation in osteocytes--is it determined by the direction of loading? *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 377:1019-24.

39. Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, and Wang GJ. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;213-24.
40. Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, et al. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet*. 2010; 375:1729-36.

Figure caption:

Fig. 1 Epifluorescence microscopy realised on tibia slices of control (C), alcohol-fed (A), exercised (E) and alcohol-fed exercised (AE) rats. Osteocytes were stained for cleaved caspase-3, a marker of apoptosis. We calculated the number of cells stained with cleaved caspase-3 per mm². There were significantly more cells stained with cleaved caspase-3 in the A group versus C, E and AE groups.

* indicates a significant difference with the other groups ($p < 0.05$). The objective magnification for imaging the markers was x100. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD)

	C	A	E	AE	p
Beverage intake /day (ml)	26.93 ± 2.35	18.23 ± 2.90 ^c	22.88 ± 2.71 ^{c,a,ae}	17.85 ± 2.14 ^c	0.0008
Food intake /day (g)	28.85 ± 1.11	18.15 ± 1.29 ^c	23.90 ± 3.03 ^{c,a,ae}	17.93 ± 2.27 ^c	<0.0001
Calories from ethanol /day (%)	0.00 ± 0.00	38.10 ± 3.07 ^c	0.00 ± 0.00 ^{a,ae}	38.13 ± 1.31 ^c	0.005
Total Calories intake /day (Kcal)	84.74 ± 3.26	86.36 ± 8.41	70.20 ± 8.92	85.03 ± 10.28	NS

Table 1 : Beverage and food intakes of the 4 groups. Control (C), Alcohol at 35 % v/v (A), Exercise (E) and Alcohol + Exercise (AE), at the end of the protocol. Values are ± SD. The degree of significance was p<0.05. ^c: significant difference with C group. ^a: significant difference with A group. ^{ae}: significant difference with AE group.

	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	P alcohol	P exercise	P interaction
WB BMC (g)	19.68 ± 0.98	15.61 ± 1.06 ^{c,e}	17.64 ± 0.98 ^c	16.67 ± 1.73 ^c	< 0.0001	0.21	0.0003
WB BMD (g/cm²)	0.205 ± 0.006	0.189 ± 0.006 ^c	0.194 ± 0.010 ^c	0.196 ± 0.010 ^c	0.0003	0.25	< 0.0001
Femur BMC (g)	0.88 ± 0.07	0.70 ± 0.05 ^c	0.74 ± 0.03 ^c	0.73 ± 0.08 ^c	< 0.0001	0.01	< 0.0001
Femur BMD (g/cm²)	0.389 ± 0.020	0.337 ± 0.019 ^{c,e,ae}	0.364 ± 0.013 ^c	0.359 ± 0.019 ^c	< 0.0001	0.81	0.0002
Body weight (g)	641.61 ± 56.34	460.20 ± 41.49 ^c	560.54 ± 38.63 ^{c,a,ae}	505.02 ± 59.40 ^c	< 0.0001	0.26	0.0004
Lean mass (g)	514.98 ± 30.83	386.66 ± 34.13 ^{c,e,ae}	450.18 ± 28.44 ^c	427.54 ± 51.05 ^c	< 0.0001	0.31	< 0.0001
Fat mass (g)	106.96 ± 35.68	57.93 ± 17.47 ^{c,e}	92.73 ± 18.05	60.82 ± 19.09 ^{c,e}	< 0.0001	0.48	0.29

Table 2 : Bone mass and density of the whole body and femur, and body composition for the 4 groups : Controls (C), Alcohol at 35 % v/v (A), Exercise (E) and Alcohol + Exercise (AE), at the end of the protocol. WB: Whole body. BMC: Bone mineral content. BMD: Bone mineral density. Values are ± SD. ^c: significant difference with C group. ^a: significant difference with A group. ^e: significant difference with E group. ^{ae}: significant difference with AE group. Pinteraction: statistical interaction between the effects of alcohol and exercise (<0.05). Palcohol: statistical degree of the influence of alcohol (<0.05). Pexercise: statistical degree of influence of exercise (<0.05).

The data presented are unadjusted.

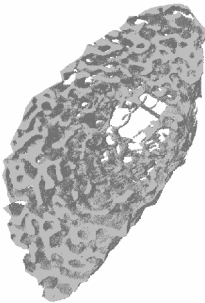
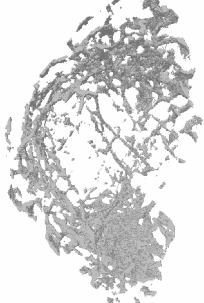
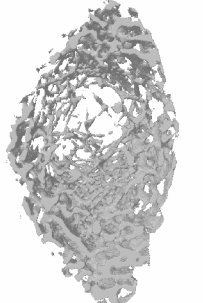
	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	P alcohol	P exercise	P interaction
							
BV/TV (%)	15.61 ± 5.49	11.28 ± 3.05	12.28 ± 4.37	16.43 ± 3.86	0.95	0.52	0.005
BS/BV (1/mm)	44.98 ± 7.75	54.46 ± 4.80 ^{c.e.ae}	40.38 ± 2.90	40.52 ± 4.26	0.009	< 0.0001	0.01
SMI	1.83 ± 0.24	2.04 ± 0.16	2.32 ± 0.31 ^{c.a.ae}	2.02 ± 0.23	0.54	0.004	0.003
Tb.Th (mm)	0.096 ± 0.012	0.084 ± 0.007 ^{c.e.ae}	0.106 ± 0.005 ^c	0.101 ± 0.009	0.003	< 0.0001	0.23
Tb.N (1/mm)	1.61 ± 0.44	1.34 ± 0.29	1.06 ± 0.52 ^{c.ae}	1.62 ± 0.31	0.27	0.29	0.003
Tb.Sp (mm)	0.47 ± 0.19	0.54 ± 0.20	0.72 ± 0.28	0.54 ± 0.20	0.42	0.09	0.09
DA	2.68 ± 0.47	2.34 ± 0.26	2.63 ± 0.33	2.81 ± 0.69	0.60	0.16	0.08

Table 3 : Microarchitectural parameters of the trabecular bone obtained *post mortem* by μ CT. Control (C), Alcohol at 35 % v/v (A), Exercise (E) and Alcohol + Exercise (AE) groups. Values are $\pm$ SD. BV/TV: Bone volume to tissue volume. BS/BV: Bone surface to bone volume. SMI: Structure model index. Tb.Th: Trabecular thickness. Tb.N: Trabecular number. Tb.Sp: Trabecular separation. DA: Degree of anisotropy. ^c: significant difference with C group. ^a: significant difference with A group. ^e: significant difference with E group. ^{ae}: significant difference with AE group. Pinteraction: statistical interaction between the effects of alcohol and exercise (<0.05). P alcohol: statistical degree of the influence of alcohol (<0.05). P exercise: statistical degree of influence of exercise (<0.05).

The data presented are unadjusted.

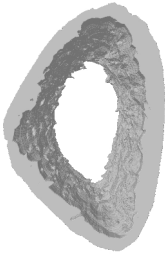
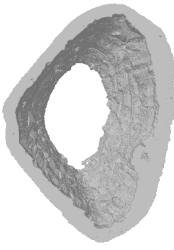
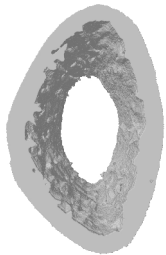
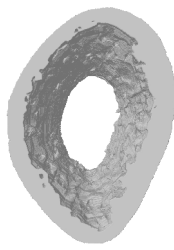
	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	P alcohol	P exercise	P interaction
							
Ct.Po (%)	1.01 ± 0.27	1.39 ± 0.33 ^{c.e.ae}	1.09 ± 0.17	1.06 ± 0.31	0.06	0.17	0.03
Po.Dm (mm)	0.042 ± 0.004	0.040 ± 0.002	0.041 ± 0.002	0.041 ± 0.004	0.52	0.99	0.35
Po.Sp (mm)	1.28 ± 0.12	1.17 ± 0.11	1.14 ± 0.11 ^c	1.17 ± 0.07 ^c	0.21	0.05	0.046
PoS/PoV (%)	168.91 ± 30.83	161.39 ± 20.71	168.97 ± 16.29	172.60 ± 27.04	0.81	0.48	0.48
Po.N (1/mm)	0.24 ± 0.05	0.34 ± 0.08 ^{c.e.ae}	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.02	0.09	0.003
Ext diam AP (mm)	3.53 ± 0.16	3.67 ± 0.20 ^e	3.34 ± 0.11	3.47 ± 0.26	0.03	0.003	0.93
Ext diam ML (mm)	5.28 ± 0.27	5.41 ± 0.18	4.91 ± 0.12 ^{c.a}	4.80 ± 0.46 ^{c.a}	0.89	< 0.0001	0.20
Int diam AP (mm)	1.97 ± 0.17	2.50 ± 0.20 ^{c.e.ae}	1.85 ± 0.11	1.93 ± 0.28	< 0.0001	< 0.0001	0.001
Int diam ML (mm)	3.72 ± 0.31	4.28 ± 0.25 ^{c.e.ae}	3.36 ± 0.16 ^c	3.31 ± 0.47 ^c	0.017	< 0.0001	0.005
Ct.Th AP(mm)	0.78 ± 0.07	0.59 ± 0.04 ^{c.e.ae}	0.75 ± 0.04	0.77 ± 0.05	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Ct.Th ML (mm)	0.78 ± 0.06	0.57 ± 0.07 ^{c.e.ae}	0.77 ± 0.06	0.74 ± 0.06	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Table 4 : Cortical microarchitecture parameters for the 4 groups. Control (C), Alcohol (A), Exercise (E) and Alcohol combined to Exercise (AE). These parameters have been assessed *post mortem* by microCT. Values are ± SD. Ct.Po: Cortical porosity. Po.Dm: Pore diameter. Po.Sp: Pore separation. PoS/PoV: Pore surface on pore volume. Po.N: Pore number. Ext diam AP: External antero posterior diameter. Ext diam ML: External medio lateral diameter. Int diam AP: Internal antero posterior diameter. Int diam ML: Internal medio lateral diameter. Ct.Th: Cortical thickness. ^c: significant difference with C group. ^a: significant difference with A group. ^e: significant difference with E group. ^{ae}: significant difference with AE group (p<0.05). Pinteraction: statistical interaction between the effects of alcohol and exercise (<0.05). P alcohol: statistical degree of the influence of alcohol (<0.05). P exercise: statistical degree of influence of exercise (<0.05).

The data presented are unadjusted.

	C (n=12)	A (n=9)	E (n=10)	AE (n=9)	P alcohol	P exercise	P interaction
Ultimate force (N)	184.46 ± 28.97	156.16 ± 30.30	171.28 ± 23.16	178.27 ± 19.72	0.21	0.59	0.04
Stress (N/mm²)	163.07 ± 20.95	144.65 ± 18.02 ^{e,ae}	180.84 ± 25.16	182.73 ± 35.10	0.31	0.001	0.21
CSA (mm²)	8.87 ± 0.80	7.19 ± 0.57 ^{c,e,ae}	7.99 ± 0.43 ^c	8.04 ± 0.85 ^c	0.0007	0.93	0.0004
Moment of inertia	10.08 ± 1.86	9.90 ± 1.58	7.95 ± 0.87	8.86 ± 2.47	0.52	0.008	0.34
Young modulus (Mpa)	5329.99 ± 829.58	4817.53 ± 1203.33	6230.29 ± 1379.66	6127.44 ± 2286.11	0.52	0.02	0.66
Stiffness (N/mm)	319.47 ± 58.51	282.05 ± 62.05	294.47 ± 58.71	298.46 ± 56.05	0.38	0.82	0.28
Energy max (N.mm)	118.39 ± 40.36	78.86 ± 23.94	80.77 ± 24.02 ^c	87.86 ± 32.63	0.14	0.19	0.04

Table 5 : Biomechanical parameters after realizing a three-point bending test on the femur *post mortem*. Control (C), Alcohol (A), Exercise (E), and Alcohol + Exercise (AE). Values are ± SD. CSA: Cross sectional area. ^c: significant difference with C group. ^e: significant difference with E group. ^{ae}: significant difference with AE group (p<0.05). Pinteraction: statistical interaction between the effects of alcohol and exercise (<0.05). Palcohol: statistical degree of the influence of alcohol (<0.05). Pexercise: statistical degree of influence of exercise (<0.05).

The data presented are unadjusted.

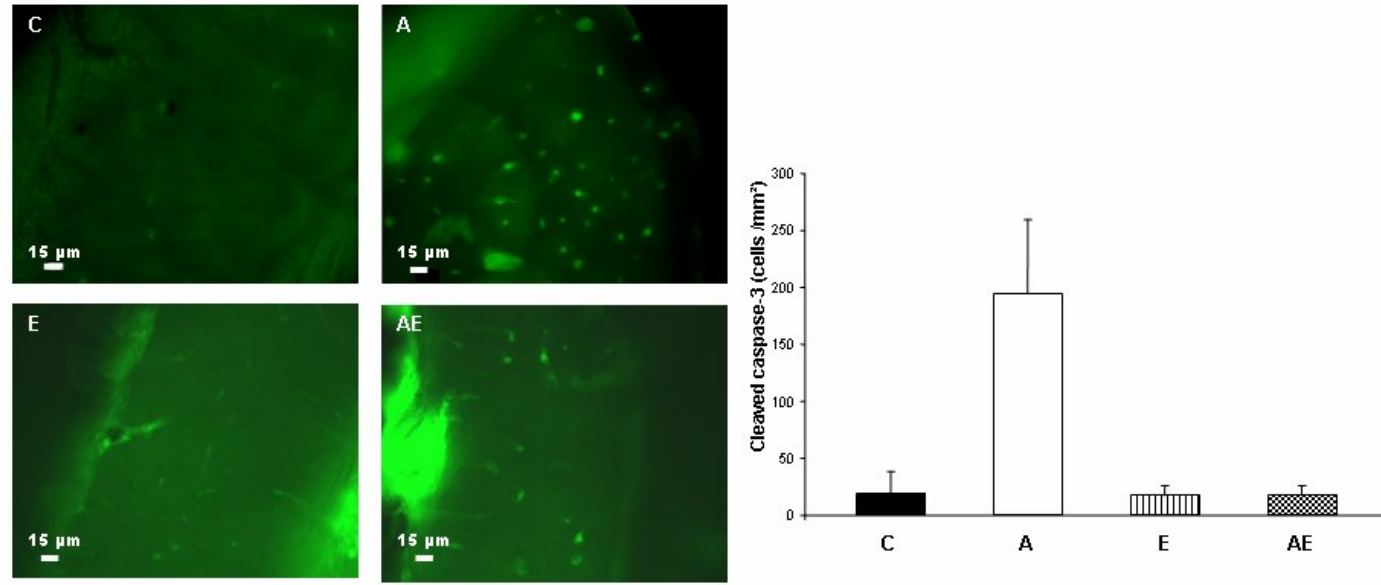


Figure 1

Discussion

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier les effets d'une consommation chronique d'alcool combinée ou non à une activité physique régulière sur les paramètres du tissu osseux chez le rat.

Modèle animal

Nos études ont porté sur des animaux d'environ 250g en début d'expérimentation, correspondant à de jeunes adultes. Le rat grandit toute sa vie, et particulièrement jusqu'à 10 mois, et se révèle donc être un bon modèle pour étudier les effets de l'alcool chez des jeunes adultes lors de l'acquisition du pic de masse osseuse. Ce modèle (rats entre 2 mois et 7/10 mois) se retrouve régulièrement dans la littérature traitant des effets de l'alcool sur le système osseux (Hogan *et al.* 1999; Sampson 1998).

Alcoolisation

Nous avons choisi un type d'alcoolisation qui se rapproche de l'alcoolisation humaine, en séparant la boisson alcoolisée et la nourriture, et en alcoolisant les rats par biberon. Ce type de protocole n'est pas nouveau (Baran *et al.* 1980; Broulik *et al.* 2010), mais est très peu utilisé dans la littérature. En effet, les animaux alcoolisés de cette façon subissent une diminution de la densité minérale osseuse associée à une modification de la composition corporelle, tout comme le sujet alcoolique humain. Cependant, il est difficile dans ce modèle de dissocier les effets directs des effets indirects de l'alcool (à travers la diminution de poids, de masse grasse, etc.). Cela explique pourquoi la plupart des études utilisent une solution nutritive alcoolisée, afin d'étudier les effets directs de l'alcool sur l'os (Chakkalakal *et al.* 2005; Hogan *et al.* 1997; Nishiguchi *et al.* 2000; Sampson et Spears 1999). Toutefois ces études ne permettent pas d'étudier la relation entre os, masse grasse et lipides, facteurs impliqués dans la régulation de la masse osseuse. Nous n'avons pas non plus souhaité alcooliser nos animaux par gavage ou par injections car ce sont des procédés stressants qui peuvent induire des modifications métaboliques. Les doses d'alcool utilisées dans les études 2 à 5 représentaient des doses d'alcool très élevées, mimant des alcoolisations chroniques sévères. Toutefois, nos animaux ont reçus respectivement 29%, 34% et 38% des calories qui provenaient de l'alcool durant le protocole, alors que chez les sujets alcooliques, le pourcentage de calories apportées par l'alcool peut atteindre 66% (Lopez *et al.* 1991; Manari *et al.* 2003).

Entraînement

Nous avons choisi d'entraîner nos animaux sur tapis roulant car c'est un exercice qui est comparable à une activité humaine. De plus, les effets de ce type d'exercice sur l'os ont été bien démontrés chez l'animal (Bonnet *et al.* 2007a; Lespessailles *et al.* 2009). Nous avons entraîné nos animaux à une intensité de 60 à 70% de la vitesse maximale aérobie, ce qui représente une intensité modérée, afin d'empêcher le surentraînement et les blessures. De plus, nous avons choisi d'entraîner nos animaux 40 à 45 min par jour dans l'étude 1, puis 1h par jour dans l'étude 5, car nous voulions mimer un entraînement modéré dans l'étude 1 et un entraînement plus long dans l'étude 5. Des protocoles similaires ont été testés auparavant dans la littérature (Bonnet *et al.* 2007b; Hagihara *et al.* 2005; Reed *et al.* 2002). Il a été démontré qu'il faut un minimum de 5 jours par semaine pour induire un effet ostéogénique, ce pourquoi nous avons entraîné nos animaux à cette fréquence. Cependant, il semble qu'un entraînement de 40 à 45 min par jour durant 8 semaines ne soit pas suffisant pour augmenter la DMO chez le rat.

Effet de l'alcool et de l'exercice physique sur les paramètres osseux

Nous avons pu mettre en évidence dans ce travail un effet bénéfique de la faible consommation d'alcool sur le tissu osseux (densité et épaisseur trabéculaire). La dose d'alcool administrée aux rats était progressivement augmentée durant 8 semaines afin de mimer une alcoolisation croissante chez l'humain. Si les effets positifs d'une faible consommation d'alcool ont été rapportés sur le tissu osseux (Ganry *et al.* 2000; Venkat *et al.* 2009), une dose modérée peut avoir des effets délétères, suivant l'âge, le sexe et le statut hormonal du sujet (Hernandez-Avila *et al.* 1991; Tucker *et al.* 2009). Les effets d'une augmentation progressive d'une consommation d'alcool sur le tissu osseux chez des jeunes sujets actifs ne sont pas documentés. Notre étude indique que ces effets ne sont pas délétères sur le tissu osseux à court terme (8 semaines) mais, compte tenu de l'évolution de la composition corporelle et du remodelage osseux, il est toutefois probable qu'une consommation à plus long terme entraînerait une diminution des paramètres de densité et de volume d'os trabéculaire.

C'est ce que nous avons mis en évidence, sur un protocole de 17 semaines. Nous avons observé un effet négatif de l'alcool consommé de façon chronique sur les paramètres osseux (DMO, épaisseur trabéculaire, énergie maximale), et sur l'os cortical (épaisseur et nombre de pores), ce qui n'avait jamais été montré auparavant. Nous avons montré qu'il existe un effet-dose sur les paramètres osseux. L'effet-dose avait été montré sur l'épaisseur trabéculaire et la

résorption osseuse par Turner *et al.* (Turner *et al.* 2001), et sur la réparation osseuse par Chakkalakal *et al.* (Chakkalakal *et al.* 2005). Nos travaux ont quant à eux permis de montrer un effet-dose de l'alcool sur la DMO, la porosité corticale, l'épaisseur corticale et la longueur du fémur, mais pas sur l'os trabéculaire. La dose 35% v/v apparaissait beaucoup plus délétère que les autres doses, ce qui confirme l'intérêt de ce dosage (35-38% de l'AETQ) souvent choisi dans la littérature pour juger sur des modèles animaux des effets de l'alcool sur l'os (Dyer *et al.* 1998; Hogan *et al.* 1999; Sampson *et al.* 1997; Turner *et al.* 1987; Wezeman *et al.* 2003).

Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'apoptose des ostéocytes dans l'os cortical, ainsi qu'une augmentation des lacunes ostéocytaires vides. Nous avons montré de plus qu'il y avait une augmentation des lipides dans la moelle. Celle-ci était corrélée avec l'hypoleptinémie présente dans le groupe alcoolisé, mais aussi avec l'apoptose des ostéocytes et avec la DMO. L'apoptose des ostéocytes était également inversement corrélée avec la DMO. De plus, la morphologie des ostéocytes était modifiée. Nos travaux ont aussi indiqué une relation entre le contenu lipidique de la moelle, le contenu lipidique des micro-vaisseaux, le contenu lipidique des ostéocytes et l'apoptose de ceux-ci. La présence de gouttelettes lipidiques dans les ostéocytes avait précédemment été décrite par Kawai et collaborateurs (Kawai *et al.* 1980; Kawai *et al.* 1985) dans des modèles d'ostéonécrose idiopathique et induite par les glucocorticoïdes, et par Wang et collaborateurs (Wang *et al.* 2003) dans un modèle d'ostéonécrose lié à l'alcool. Cependant, la présence de lipides dans les vaisseaux n'avait pas été rapportée, et aucune corrélation avec l'apoptose des ostéocytes n'avait été montrée.

Suite à ce travail, nous avons montré que l'exercice appliqué à notre modèle d'ostéoporose secondaire permet de limiter le faible gain de DMO, et permet de contrecarrer les effets délétères de l'alcool sur les paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale (Tb.Th, Ct.Po, Ct.Th) et la résistance osseuse (contrainte maximale). L'originalité de ce travail porte sur l'effet protecteur de l'exercice sur l'apoptose des ostéocytes, apoptose qui est corrélée avec la DMO, le Tb.Th et le Ct.Po. La pratique d'une activité physique régulière permet donc de pallier en partie les effets de la consommation d'alcool chronique et excessive chez le rat, probablement via une apoptose des ostéocytes normale, qui est corrélée avec les paramètres de masse osseuse. Une étude a récemment observé des résultats similaires en indiquant un effet protecteur de l'exercice sur l'apoptose des ostéocytes dans un modèle d'ostéoporose induite par une ovariectomie (Fonseca *et al.* 2011).

Répercussions possibles chez l'homme

La consommation chronique d'alcool est délétère sur le tissu osseux au-delà d'un certain seuil. Une fois ce seuil franchi, l'alcool mène à une diminution des paramètres osseux avec un effet-dose. L'os trabéculaire et l'os cortical sont diminués par l'alcool, ce qui implique que l'étude de ces deux types d'os est importante quant à l'analyse des effets de l'alcool sur le tissu osseux. Nous avons montré dans ce travail que la pratique d'une activité sportive prévient les effets de l'alcool sur l'épaisseur trabéculaire, corticale, l'énergie maximale et l'apoptose des ostéocytes.

Cependant chez le sportif, s'il n'a pas été montré d'effet additif de la pratique sportive associée à des faibles consommations d'alcool, bénéfiques pour le squelette, la densité minérale osseuse semble être diminuée par une alcoolisation excessive, même combinée à un exercice physique. De ce fait, combiner une alcoolisation régulière à une pratique physique chez les sportifs peut mener à une fragilisation du tissu osseux et à une augmentation du risque fracturaire sur du long terme.

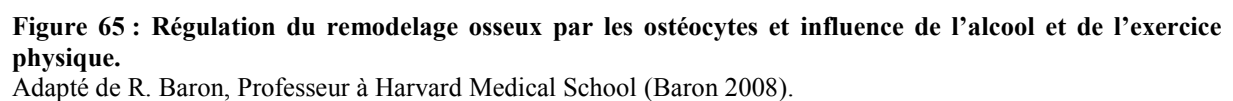
Limites de ce travail

Ce travail a toutefois quelques limites. Premièrement, les animaux alcoolisés ont subi, de par le modèle d'alcoolisation, une restriction nutritive. La diminution d'apport protéique et glucidique dans les groupes alcoolisés a pu avoir un effet sur les paramètres osseux, comme l'ont décrit Devlin *et al.* (Devlin *et al.* 2010). Dans cette optique, il aurait été intéressant d'avoir un groupe contrôle qui ait consommé de la nourriture à volonté, pour ainsi juger des effets de la restriction calorique sur les animaux alcoolisés ou non. Ce plan expérimental a déjà été appliqué par Maddalozzo *et al.* (Maddalozzo *et al.* 2009), qui ont montré que l'alcool a des effets sur l'os qui sont à la fois dépendants (composition corporelle) et indépendants (formation osseuse, leptine, contenu lipidique de la moelle) de la restriction énergétique.

Deuxièmement, nous avons étudié les effets d'une alcoolisation chronique chez des animaux en croissance, ce qui ne permet pas une comparaison avec l'homme adulte. Toutefois, ce modèle animal est validé et couramment utilisé dans la recherche sur l'ostéoporose (Lelovas *et al.* 2008).

Ensuite, nous n'avons pas réalisé de dosages pour quantifier les concentrations de RANKL et OPG (différenciation des ostéoclastes), de la GH et de l'Igf-1, qui nous auraient permis d'évaluer le fonctionnement métabolique du foie et d'évaluer ces marqueurs du fonctionnement des ostéoblastes et des ostéoclastes.

Dans un dernier temps, nous n'avons pas pu déterminer les mécanismes moléculaires responsables des modifications du tissu osseux (Figure 65).



Conclusion et perspectives

Ce travail a montré que la consommation d'alcool peut avoir un effet positif ou négatif sur le tissu osseux, et cela en fonction de la dose ingérée. Ainsi plus la dose est importante, plus les paramètres du tissu osseux sont affectés. La consommation chronique et excessive d'alcool diminue l'épaisseur de l'os trabéculaire et cortical, menant à une diminution de la DMO. Cette diminution de la DMO est également corrélée à une augmentation de l'apoptose des ostéocytes. Il semble que la modification du métabolisme osseux soit liée à une modification du métabolisme lipidique : concentration de leptine, et contenu lipidique des vaisseaux, de la moelle osseuse et des ostéocytes.

En revanche, la combinaison d'un exercice physique à la consommation d'alcool permet de limiter les effets sur la DMO et supprime les effets de l'alcool sur les autres paramètres du tissu osseux, entre autres l'augmentation de l'apoptose des ostéocytes.

Suite à ce travail, de nouvelles questions se posent. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose des ostéocytes, et quels signaux sont envoyés par les ostéocytes pour communiquer avec les ostéoblastes et les ostéoclastes ? De plus, quel est le rôle de l'exercice sur ces régulations ? Il semble que la voie Wnt avec ses récepteurs Lrp5/6 et ses inhibiteurs DKK1 et SOST soit impliquée dans la régulation de la formation osseuse par les ostéocytes (Bonewald 2011; Poole *et al.* 2005). Cependant, la régulation de ces cibles par l'exercice n'a pas été étudiée.

Callaci *et al.* (Callaci *et al.* 2009) ont évalué l'expression de différents gènes (ostéocalcine, phosphatase alcaline, sclérostine, Igf-I, RANKL, OPG) chez des animaux ayant subi un traitement mimant le binge drinking. Or, à notre connaissance, de telles analyses n'ont jamais été réalisées avec des consommations chroniques d'alcool chez l'animal ou chez l'homme. De ce fait, une PCR en temps réel et une quantification de l'expression des gènes spécifiques de la voie Wnt, sous traitement alcoolisé, en ajoutant ou non le facteur « exercice » seraient particulièrement intéressantes.

Les cibles à analyser sont celles spécifiques de la voie Wnt dans l'ostéocyte, et celles ayant un rôle dans la mécano-transduction et dans la différenciation des CSM en ostéoblastes ou en adipocytes (Tableau 28). En effet, il a été montré récemment que la voie Wnt est impliquée dans la formation osseuse, et qu'elle est régulée par l'ostéocyte (Bonewald et Johnson 2008). Or, la biologie de l'ostéocyte est modifiée par un traitement chronique

d'alcool. De plus, il a été montré que l'expression de la sclérostine (SOST) varie en fonction de la charge mécanique (Lin *et al.* 2009; Robling *et al.* 2008).

CIBLES	ROLES
SOST	Inhibiteur voie Wnt (formation osseuse)
DMP1	Fonction ostéocyte
DKK1	Inhibiteur voie Wnt (formation osseuse)
MEPE	Minéralisation
PPAR γ	Différenciation adipocytes
OC	Formation osseuse
Cbfa1/Runx2	Différenciation ostéoblastes
PTH	Maturation ostéoclastes
GH	Activation ostéoclastes, différenciation ostéoblastes
ALP	Formation osseuse
Cx 43	Forment les gap junctions
RANKL	Différenciation ostéoclastes
OPG	Différenciation ostéoclastes
IL-6	Ostéoclastogenèse
IL-1	Survie ostéoclastes

Tableau 28 : Cibles à quantifier en réponse à un traitement alcoolisé combiné ou non à une activité physique.

Il apparaît donc intéressant d'approfondir plus en détails la biologie de l'ostéocyte et la réponse moléculaire de celui-ci, lorsqu'il est soumis à un traitement alcoolique chronique, et endure des modifications de milieux semblables aux contraintes mécaniques. Ce dispositif permettrait d'analyser les mécanismes responsables de nos observations avec l'alcool et l'exercice, mais à une échelle plus petite : celle de la biologie moléculaire.

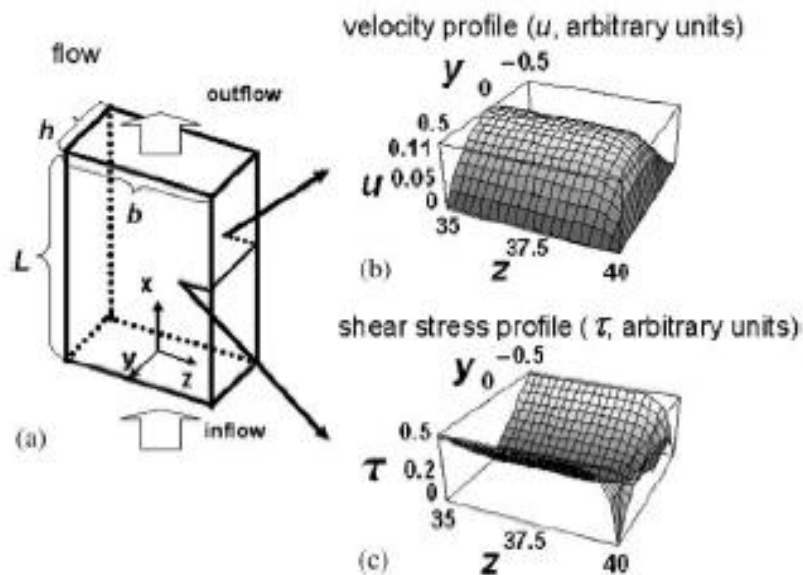


Figure 66 : Schéma de l'appareil permettant d'appliquer un mouvement de fluides aux cultures de cellules.

Le fluide pénètre dans la chambre selon l'axe des x (par en bas), grâce à un gradient de pression. Les caractéristiques de contrainte et de vélocité obtenues lors d'un flux constant appliqué entre les plaques parallèles de la chambre sont représentées ci-dessus. D'après Bacabac *et al.* (2005).

Pour cela, des expérimentations sur la capacité de mécano-transduction de l'ostéocyte *in vitro*, dans des cultures traitées à l'alcool, pourraient être menées en utilisant le protocole développé par Bakker et Klein-Nulend (Bakker *et al.* 2009). Dans ce protocole, des ostéocytes sont soumis à un mouvement de fluide mimant les pressions subies par les ostéocytes lors de contraintes mécaniques liées à l'exercice physique (Bacabac *et al.* 2005) (Figure 66).

Il apparaît de ce fait essentiel de comprendre comment l'exercice agit sur le tissu osseux au niveau moléculaire chez les populations alcoolisées. Dès lors, l'activité physique pourrait être utilisée comme complément aux thérapeutiques de lutte et de prévention de l'ostéoporose alcoolique.

Bibliographie

1. Aaron DJ, Dearwater SR, Anderson R, Olsen T, Kriska AM, Laporte RE (1995) Physical activity and the initiation of high-risk health behaviors in adolescents. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1639-1645

2. Agarwal DP (2001) Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathologie-biologie* 49: 703-709

3. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T (2006) Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 21: 605-615

4. Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, Tsang K, Guenther A, You L (2011) Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 112: 2412-2423

5. Aleksyniene R, Hvid I (2004) Parathyroid hormone--possible future drug for orthopedic surgery. *Medicina* 40: 842-849

6. Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB (1999) Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140: 4982-4987

7. Ammann P, Rizzoli R (2003) Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3: S13-18

8. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A (2001) Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 33: 507-511

9. Arvers P, Choquet M (1999) Regional variations in alcohol use among young people in France. Epidemiological approach to alcohol use and abuse by adolescents and conscripts. *Drug and alcohol dependence* 56: 145-155

10. Attlan E, Audran M, Basse-Cathalinat B, Benhamou CL, Bergot C, Chapuis L, Chapurlat R, Cortet B, Dargent-Molina P, De Vernejoul MC, Drapier-Faure E, Fardellone P, Fechtenbaum J, Feron JM, Garnero P, Jeandel C, Kotzki PO, Limouzin-Lamothe MA, Marchandise X, Maugars Y, Meunier PJ, Orcel P, Ribot C, Roux C, Sabattier JP, Thomas T, Tremolieres F, Sutter B, Weryha G (2005) *Ostéoporoses. Collection conduites*, Rueil-Malmaison

11. Aubin JE, Turksen K (1996) Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microscopy research and technique* 33: 128-140
12. Audran M, Legrand E, Chappard D (2004) Osteoporosis in men. *Rev Prat* 54: 2127-2131
13. Augat P, Schorlemmer S (2006) The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age and ageing* 35 Suppl 2: ii27-ii31
14. Bacabac RG, Smit TH, Cowin SC, Van Loon JJ, Nieuwstadt FT, Heethaar R, Klein-Nulend J (2005) Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. *Journal of biomechanics* 38: 159-167
15. Badawy AA (2002) Tryptophan metabolism in alcoholism. *Nutrition research reviews* 15: 123-152
16. Bailey CA, Brooke-Wavell K (2010) Association of body composition and muscle function with hip geometry and BMD in premenopausal women. *Annals of human biology* 37: 524-535
17. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA (1999) A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 14: 1672-1679
18. Baker MM (1998) Anterior cruciate ligament injuries in the female athlete. *Journal of women's health / the official publication of the Society for the Advancement of Women's Health Research* 7: 343-349
19. Bakker AD, Silva VC, Krishnan R, Bacabac RG, Blaauboer ME, Lin YC, Marcantonio RA, Cirelli JA, Klein-Nulend J (2009) Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta modulate calcium and nitric oxide signaling in mechanically stimulated osteocytes. *Arthritis and rheumatism* 60: 3336-3345
20. Baldock PA, Sainsbury A, Couzens M, Enriquez RF, Thomas GP, Gardiner EM, Herzog H (2002) Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *The Journal of clinical investigation* 109: 915-921
21. Ballenger JC, Goodwin FK, Major LF, Brown GL (1979) Alcohol and central serotonin metabolism in man. *Archives of general psychiatry* 36: 224-227
22. Barak MM, Weiner S, Shahar R (2010) The contribution of trabecular bone to the stiffness and strength of rat lumbar vertebrae. *Spine* 35: E1153-1159

23. Baran DT, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Parker G, Cruvant EM, Avioli LV (1980) Effect of alcohol ingestion on bone and mineral metabolism in rats. *The American journal of physiology* 238: E507-510
24. Baron R (2008) *Anatomy and ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling*. In: Arnold A (ed) *Diseases of Bone and Mineral Metabolism*. Endotext.com 2008
25. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ (1985) Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *The Journal of cell biology* 101: 2210-2222
26. Baudoin C, Fardellone P, Thelot B, Juvin R, Potard V, Bean K, Sebert JL (1996) Hip fractures in France: the magnitude and perspective of the problem. *Osteoporos Int* 6 Suppl 3: 1-10
27. Bauer JS, Link TM (2009) Advances in osteoporosis imaging. *European journal of radiology* 71: 440-449
28. Beaupied H, Dupuis A, Arlettaz A, Brunet-Imbault B, Bonnet N, Jaffre C, Benhamou CL, Courteix D (2006) The mode of bone conservation does not affect the architecture and the tensile properties of rat femurs. *Bio-medical materials and engineering* 16: 253-259
29. Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou CL (2007) Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* 74: 233-239
30. Bethell H, Jewell D, Burke P (1991) Medical hazards of a four-km fun run. *British journal of sports medicine* 25: 181-182
31. Bikle DD (1993) Alcohol-induced bone disease. *World review of nutrition and dietetics* 73: 53-79
32. Bikle DD, Wang Y (2011) Insulin Like Growth Factor-I: A Critical Mediator of the Skeletal Response to Parathyroid Hormone. *Current molecular pharmacology*
33. Bilezikian JP, Khosla S, Riggs BL (2002) Estrogen effects on bone in the male skeleton. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 1467-1476
34. Blair SN, Ellsworth NM, Haskell WL, Stern MP, Farquhar JW, Wood PD (1981) Comparison of nutrient intake in middle-aged men and women runners and controls. *Med Sci Sports Exerc* 13: 310-315

35. Bliziotis M, McLoughlin S, Gunness M, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG (2000) Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter gene. *Bone* 26: 15-19
36. Bloomfield SA (2010) Disuse osteopenia. *Current osteoporosis reports* 8: 91-97
37. Boissiere J, Eder V, Machet MC, Courteix D, Bonnet P (2008) Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. *J Appl Physiol* 104: 321-327
38. Bonewald LF (2007) Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell metabolism* 5: 410-411
39. Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238
40. Bonewald LF, Johnson ML (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42: 606-615
41. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R (2009) The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud publica de Mexico* 51 Suppl 1: S5-17
42. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, Benhamou CL (2007a) Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 22: 578-588
43. Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D (2007b) Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol* 102: 1502-1509
44. Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, Vico L, Collomp K, Courteix D (2005a) Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone* 37: 622-633
45. Bonnet N, Courteix D, Benhamou CL (2005b) Leptin, central nervous system, and bone: influence of physical activity. *Joint Bone Spine* 72: 477-480
46. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D (2006) Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318: 1118-1127
47. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL (2008) Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8: 94-104

48. Bono CM (2004) Low-back pain in athletes. *The Journal of bone and joint surgery* 86-A: 382-396
49. Borba VZ, Manas NC (2010) The use of PTH in the treatment of osteoporosis. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 54: 213-219
50. Bouassida A, Chamari K, Zaouali M, Feki Y, Zbidi A, Tabka Z (2010) Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. *British journal of sports medicine* 44: 620-630
51. Bourrin S, Ghaemmaghami F, Vico L, Chappard D, Gharib C, Alexandre C (1992) Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. *Calcified tissue international* 51: 137-142
52. Bousson V, Meunier A, Bergot C, Vicaud E, Rocha MA, Morais MH, Laval-Jeantet AM, Laredo JD (2001) Distribution of intracortical porosity in human midfemoral cortex by age and gender. *J Bone Miner Res* 16: 1308-1317
53. Buxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25: 1468-1486
54. Buxsein ML, Seeman E (2009) Quantifying the material and structural determinants of bone strength. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23: 741-753
55. Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics* 473: 139-146
56. Boyce BF, Xing L, Jilka RL, Bellido T, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC (2002) Apoptosis in bone cells. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 151-168
57. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342
58. Brahm H, Strom H, Piehl-Aulin K, Mallmin H, Ljunghall S (1997) Bone metabolism in endurance trained athletes: a comparison to population-based controls based on DXA, SXA, quantitative ultrasound, and biochemical markers. *Calcified tissue international* 61: 448-454
59. Breban S, Chappard C, Jaffre C, Khacef F, Briot K, Benhamou CL (2011) Positive influence of long-lasting and intensive weight-bearing physical activity on hip structure of young adults. *J Clin Densitom* 14: 129-137

60. Breban S, Padilla F, Fujisawa Y, Mano I, Matsukawa M, Benhamou CL, Otani T, Laugier P, Chappard C (2010) Trabecular and cortical bone separately assessed at radius with a new ultrasound device, in a young adult population with various physical activities. *Bone* 46: 1620-1625
61. Brenner J, Swanik K (2007) High-risk drinking characteristics in collegiate athletes. *J Am Coll Health* 56: 267-272
62. Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB (2004) Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacological reviews* 56: 231-248
63. Bronner F (1992) Bone and calcium homeostasis. *Neurotoxicology* 13: 775-782
64. Broulik PD, Vondrova J, Ruzicka P, Sedlacek R, Zima T (2010) The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 59: 599-604
65. Burger EH, Klein-Nulend J (1999) Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* 13 Suppl: S101-112
66. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ (1995) Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *The Journal of nutrition* 125: 2020S-2023S
67. Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K (2009) Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcified tissue international* 84: 474-484
68. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH (2004) The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcoholism, clinical and experimental research* 28: 182-191
69. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650
70. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV (1996) Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45: 1455-1462
71. Chakkalakal DA (2005) Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcoholism, clinical and experimental research* 29: 2077-2090
72. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL, McGuire MH, Donohue TM (2005) Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 36: 201-214

73. Chambers TJ (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *The Journal of pathology* 192: 4-13
74. Chambers TJ (2010) The birth of the osteoclast. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 19-26
75. Chappard D, Plantard B, Petitjean M, Alexandre C, Riffat G (1991) Alcoholic cirrhosis and osteoporosis in men: a light and scanning electron microscopy study. *Journal of studies on alcohol* 52: 269-274
76. Chavassieux P, Pastoureau P, Chapuy MC, Delmas PD, Meunier PJ (1993) Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporos Int* 3: 97-102
77. Chen FH, Tuan RS (2008) Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy* 10: 223
78. Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ (1995) Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone* 16: 143-147
79. Christakos S (2002) Vitamin D gene regulation. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 573-586
80. Cirmanova V, Bayer M, Starka L, Zajickova K (2008) The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57 Suppl 1: S143-151
81. Clarke BL, Khosla S (2010a) Female reproductive system and bone. *Archives of biochemistry and biophysics* 503: 118-128
82. Clarke BL, Khosla S (2010b) Physiology of bone loss. *Radiologic clinics of North America* 48: 483-495
83. Confavreux CB (2011) Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney international*: S14-19
84. Considine RV (2001) Regulation of leptin production. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2: 357-363
85. Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd (1992) Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res* 7: 221-227

86. Cooper DM, Thomas CD, Clement JG, Turinsky AL, Sensen CW, Hallgrimsson B (2007) Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. *Bone* 40: 957-965
87. Courtland HW, Elis S, Wu Y, Sun H, Rosen CJ, Jepsen KJ, Yakar S (2011) Serum IGF-1 affects skeletal acquisition in a temporal and compartment-specific manner. *PloS one* 6: e14762
88. Crewther BT, Cook C, Cardinale M, Weatherby RP, Lowe T (2011) Two emerging concepts for elite athletes: the short-term effects of testosterone and cortisol on the neuromuscular system and the dose-response training role of these endogenous hormones. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 41: 103-123
89. Curran D, Maravic M, Kiefer P, Tochon V, Fardellone P (2010) Epidemiology of osteoporosis-related fractures in France: a literature review. *Joint Bone Spine* 77: 546-551
90. Dallas SL, Bonewald LF (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 437-443
91. Dalle Carbonare L, Giannini S (2004) Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *Journal of endocrinological investigation* 27: 99-105
92. De Souza MJ, Miller BE, Loucks AB, Luciano AA, Pescatello LS, Campbell CG, Lasley BL (1998) High frequency of luteal phase deficiency and anovulation in recreational women runners: blunted elevation in follicle-stimulating hormone observed during luteal-follicular transition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83: 4220-4232
93. De Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M, Gueris J, Hott M, Modrowski D, Kuntz D, Miravet L, Ryckewaert A (1983) Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clinical orthopaedics and related research*: 107-115
94. Deftos LJ, First BP (1981) Calcitonin as a drug. *Annals of internal medicine* 95: 192-197
95. DeLuca HF (1988) The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *Faseb J* 2: 224-236
96. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML (2010) Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res* 25: 2078-2088
97. Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S (1989) Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *The American journal of medicine* 86: 282-288

98. Dietze PM, Fitzgerald JL, Jenkinson RA (2008) Drinking by professional Australian Football League (AFL) players: prevalence and correlates of risk. *The Medical journal of Australia* 189: 479-483
99. Donoso MA, Munoz-Calvo MT, Barrios V, Garrido G, Hawkins F, Argente J (2010) Increased circulating adiponectin levels and decreased leptin/soluble leptin receptor ratio throughout puberty in female ballet dancers: association with body composition and the delay in puberty. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 162: 905-911
100. Douchi T, Kuwahata R, Matsuo T, Uto H, Oki T, Nagata Y (2003) Relative contribution of lean and fat mass component to bone mineral density in males. *Journal of bone and mineral metabolism* 21: 17-21
101. Doyle-Lucas AF, Akers JD, Davy BM (2010) Energetic efficiency, menstrual irregularity, and bone mineral density in elite professional female ballet dancers. *J Dance Med Sci* 14: 146-154
102. Drake MT, Srinivasan B, Modder UI, Ng AC, Undale AH, Roforth MM, Peterson JM, McCready LK, Riggs BL, Khosla S (2011) Effects of intermittent parathyroid hormone treatment on osteoprogenitor cells in postmenopausal women. *Bone* 49: 349-355
103. Driessler F, Baldock PA (2010) Hypothalamic regulation of bone. *Journal of molecular endocrinology* 45: 175-181
104. Drissi H, Hott M, Marie PJ, Lasmoles F (1997) Expression of the CT/CGRP gene and its regulation by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate in human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 12: 1805-1814
105. Duclos M (2001) Effects of physical training on endocrine functions. *Annales d'endocrinologie* 62: 19-32
106. Ducy P, Karsenty G (2010) The two faces of serotonin in bone biology. *The Journal of cell biology* 191: 7-13
107. Dumas P, Sockalingum GD, Sule-Suso J (2007) Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in biotechnology* 25: 40-44
108. Dunlop JW, Hartmann MA, Brechet YJ, Fratzl P, Weinkamer R (2009) New suggestions for the mechanical control of bone remodeling. *Calcified tissue international* 85: 45-54

109. Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW (1998) Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* (Fayetteville, NY 16: 337-341
110. Ebeling PR (1998) Osteoporosis in men. New insights into aetiology, pathogenesis, prevention and management. *Drugs & aging* 13: 421-434
111. El Maghraoui A, Roux C (2008) DXA scanning in clinical practice. *Qjm* 101: 605-617
112. Elefteriou F (2005) Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 62: 2339-2349
113. Elefteriou F, Karsenty G (2004) Bone mass regulation by leptin: a hypothalamic control of bone formation. *Pathol Biol* 52: 148-153
114. Emanuele N, Emanuele MA (1997) The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol health and research world* 21: 53-64
115. Eriksen EF (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 11: 219-227
116. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002) The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17: 77-90
117. Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Cohen D, Malluche HH (1997) Moderately high consumption of ethanol suppresses bone resorption in ovariectomized but not in sexually intact adult female rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 21: 1150-1154
118. Faulkner KG, Gluer CC, Majumdar S, Lang P, Engelke K, Genant HK (1991) Noninvasive measurements of bone mass, structure, and strength: current methods and experimental techniques. *Ajr* 157: 1229-1237
119. Felsing NE, Brasel JA, Cooper DM (1992) Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 75: 157-162
120. Ferretti M, Muglia MA, Remaggi F, Cane V, Palumbo C (1999) Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. II. Parallel-fibered and lamellar bones. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* 104: 121-131

121. Fonseca H, Moreira-Goncalves D, Esteves JL, Viriato N, Vaz M, Mota MP, Duarte JA (2011) Voluntary Exercise has Long-Term In Vivo Protective Effects on Osteocyte Viability and Bone Strength Following Ovariectomy. *Calcified tissue international*
122. Ford JA (2007) Alcohol use among college students: a comparison of athletes and nonathletes. *Substance use & misuse* 42: 1367-1377
123. Friedenstein AJ (1990) Osteogenic stem cells in the bone marrow. *Bone Miner Res* 7: 243-272
124. Frost HM (1987) Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The Anatomical record* 219: 1-9
125. Galson DL, Goldring SR (2002) Structure and molecular biology of the calcitonin receptor. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 603-617
126. Ganry O, Baudoin C, Fardellone P (2000) Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study. *Epidemiologie de l'Osteoporose. American journal of epidemiology* 151: 773-780
127. Genaro PS, Pereira GA, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA (2010) Influence of body composition on bone mass in postmenopausal osteoporotic women. *Archives of gerontology and geriatrics* 51: 295-298
128. Georgopoulos NA, Rottstein L, Tsekouras A, Theodoropoulou A, Koukkou E, Mylonas P, Polykarpou G, Lampropoulou E, Iconomou G, Leglise M, Vagenakis AG, Markou KB (2011) Abolished circadian rhythm of salivary cortisol in elite artistic gymnasts. *Steroids* 76: 353-357
129. Gibney J, Healy ML, Sonksen PH (2007) The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in exercise and sport. *Endocrine reviews* 28: 603-624
130. Gilpin NW, Koob GF (2010) Effects of beta-adrenoceptor antagonists on alcohol drinking by alcohol-dependent rats. *Psychopharmacology* 212: 431-439
131. Ginty F, Rennie KL, Mills L, Stear S, Jones S, Prentice A (2005) Positive, site-specific associations between bone mineral status, fitness, and time spent at high-impact activities in 16- to 18-year-old boys. *Bone* 36: 101-110
132. Glaser DL, Kaplan FS (1997) Osteoporosis. Definition and clinical presentation. *Spine* 22: 12S-16S

133. Gokhale J, Robey P, Boskey A (eds) (2001) *The biochemistry of bone*, San Diego, Academic Press
134. Gong Z, Wezeman FH (2004) Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcoholism, clinical and experimental research* 28: 468-479
135. Griffiths HJ, Parantainen H, Olson P (1993) *Alcohol and Bone Disorders*. *Alcohol Health & Research World* 17: 299-304
136. Grimston SK, Tanguay KE, Gundberg CM, Hanley DA (1993) The calciotropic hormone response to changes in serum calcium during exercise in female long distance runners. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76: 867-872
137. Gross TS, Poliachik SL, Prasad J, Bain SD (2010) The effect of muscle dysfunction on bone mass and morphology. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 10: 25-34
138. Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JA (2009) Exercise and bone mass in adults. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 39: 439-468
139. Guo R, Ren J (2010) Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *International journal of environmental research and public health* 7: 1285-1301
140. Gutgesell M, Canterbury R (1999) Alcohol usage in sport and exercise. *Addiction biology* 4: 373-383
141. Gutgesell ME, Timmerman M, Keller A (1996) Reported alcohol use and behavior in long-distance runners. *Med Sci Sports Exerc* 28: 1063-1070
142. Gutgesell ME, Timmerman MG (1998) Alcohol use and behaviors in women long-distance race participants reporting a history of bulimia and/or anorexia nervosa. *The Journal of sports medicine and physical fitness* 38: 142-148
143. Gyamfi MA, Wan YJ (2010) Pathogenesis of alcoholic liver disease: the role of nuclear receptors. *Exp Biol Med* 235: 547-560
144. Hagihara Y, Fukuda S, Goto S, Iida H, Yamazaki M, Moriya H (2005) How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *Journal of bone and mineral metabolism* 23: 289-294
145. Hakkinen K, Pakarinen A (1993) Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. *J Appl Physiol* 74: 882-887

146. Hamilton CJ, Swan VJ, Jamal SA (2010) The effects of exercise and physical activity participation on bone mass and geometry in postmenopausal women: a systematic review of pQCT studies. *Osteoporos Int* 21: 11-23
147. Hannan MT, Felson DT, Dawson-Hughes B, Tucker KL, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP (2000) Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 15: 710-720
148. Hattner R, Epker BN, Frost HM (1965) Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 206: 489-490
149. Hefferan TE, Kennedy AM, Evans GL, Turner RT (2003) Disuse exaggerates the detrimental effects of alcohol on cortical bone. *Alcoholism, clinical and experimental research* 27: 111-117
150. Heinonen A, Kannus P, Sievanen H, Oja P, Pasanen M, Rinne M, Uusi-Rasi K, Vuori I (1996) Randomised controlled trial of effect of high-impact exercise on selected risk factors for osteoporotic fractures. *Lancet* 348: 1343-1347
151. Henriksen L, Feighery EC, Schleicher NC, Fortmann SP (2008) Receptivity to alcohol marketing predicts initiation of alcohol use. *J Adolesc Health* 42: 28-35
152. Hernandez-Avila M, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1991) Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition* 54: 157-163
153. Hernandez ER, Revilla M, Rico H (1991) Total body bone mineral and pelvis bone mineral content as parameters of bone mass in men. A dual-energy X-ray absorptiometry study. *Acta anatomica* 142: 227-230
154. Hetland ML, Haarbo J, Christiansen C (1993) Low bone mass and high bone turnover in male long distance runners. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77: 770-775
155. Hildebrand T, Ruegsegger P (1997) A new method for the model-independent assessment of thickness in the three-dimensional images. *J Microsc* 185: 67-75
156. Hinoi E, Takarada T, Yoneda Y (2004) Glutamate signaling system in bone. *Journal of pharmacological sciences* 94: 215-220
157. Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, Kirkland MA, Nicholson GC (2011) M-CSF Potently Augments RANKL-Induced Resorption Activation in Mature Human Osteoclasts. *PloS one* 6: e21462

158. Hodsman AB, Hanley DA, Watson PH, Fraher LJ (2002) Parathyroid hormone. Principles of Bone Biology. Academic Press, New York, pp. 1305-1324
159. Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ (2009) Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. Expert opinion on therapeutic targets 13: 485-496
160. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140: 4367-4370
161. Hofstetter W, Gillespie MT (2002) Colony-stimulating factors. Principles of Bone Biology. Academic Press, New York, pp. 943-959
162. Hogan HA, Groves JA, Sampson HW (1999) Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. Alcoholism, clinical and experimental research 23: 1825-1833
163. Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. Alcoholism, clinical and experimental research 21: 809-816
164. Hoidrup S, Gronbaek M, Gottschau A, Lauritzen JB, Schroll M (1999) Alcohol intake, beverage preference, and risk of hip fracture in men and women. Copenhagen Centre for Prospective Population Studies. American journal of epidemiology 149: 993-1001
165. Holroyd C, Harvey N, Dennison E, Cooper C (2011) Epigenetic influences in the developmental origins of osteoporosis. Osteoporos Int 22: 1175-1181
166. Horowitz MC, Lorenzo JA (2002) Local regulators of bone. Principles of Bone Biology. Academic Press, New York, pp. 961-977
167. Howe KS, Iwaniec UT, Turner RT (2011) The effects of low dose parathyroid hormone on lumbar vertebrae in a rat model for chronic alcohol abuse. Osteoporos Int 22: 1175-1181
168. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS (2003) Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol 95: 300-307
169. Hughes JM, Petit MA (2010) Biological underpinnings of Frost's mechanostat thresholds: the important role of osteocytes. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions 10: 128-135

170. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, Lakso M, Rauvala H (1998) Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *The Journal of cell biology* 143: 1113-1128
171. Imai S, Matsusue Y (2002) Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microscopy research and technique* 58: 61-69
172. Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN (1995) Tri-iodothyronine (T3) and dexamethasone interact to modulate osteoprogenitor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone* 16: 545-549
173. Iwaniec UT, Wronski TJ, Turner RT (2008) Histological analysis of bone. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 447: 325-341
174. Jacobson PC, Beaver W, Grubb SA, Taft TN, Talmage RV (1984) Bone density in women: college athletes and older athletic women. *J Orthop Res* 2: 328-332
175. Jahreis G, Kauf E, Frohner G, Schmidt HE (1991) Influence of intensive exercise on insulin-like growth factor I, thyroid and steroid hormones in female gymnasts. *Growth regulation* 1: 95-99
176. Jiang Y, Zhao J, Genant HK, Dequeker J, Geusens P (1997) Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats. *J Bone Miner Res* 12: 820-831
177. Jones KB, Mollano AV, Morcuende JA, Cooper RR, Saltzman CL (2004) Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. *The Iowa orthopaedic journal* 24: 123-132
178. Joo YI, Sone T, Fukunaga M, Lim SG, Onodera S (2003) Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* 33: 485-493
179. Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ (2006) Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. *The Proceedings of the Nutrition Society* 65: 291-310
180. Jurimae J, Purge P, Jurimae T (2005) Adiponectin is altered after maximal exercise in highly trained male rowers. *European journal of applied physiology* 93: 502-505

181. Kanaan RA, Kanaan LA (2006) Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit* 12: RA164-169
182. Kanehisa J, Heersche JN (1988) Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone* 9: 73-79
183. Kann PH (2004) Clinical effects of growth hormone on bone: a review. *Aging Male* 7: 290-296
184. Karlsson KM, Karlsson C, Ahlborg HG, Valdimarsson O, Ljunghall S (2003) The duration of exercise as a regulator of bone turnover. *Calcified tissue international* 73: 350-355
185. Kaufman JM, Goemaere S (2008) Osteoporosis in men. *Best practice & research* 22: 787-812
186. Kawai K, Maruno H, Watanabe Y, Hirohata K (1980) Fat necrosis of osteocytes as a causative factor in idiopathic osteonecrosis in heritable hyperlipemic rabbits. *Clinical orthopaedics and related research*: 273-282
187. Kawai K, Tamaki A, Hirohata K (1985) Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study. *The Journal of bone and joint surgery* 67: 755-763
188. Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 116: 2627-2634
189. Keila S, Kelner A, Weinreb M (2001) Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity in vivo and in vitro. *The Journal of endocrinology* 168: 131-139
190. Kemmler W, Stengel S (2011) Exercise and osteoporosis-related fractures: perspectives and recommendations of the sports and exercise scientist. *The Physician and sportsmedicine* 39: 142-157
191. Khanna D, Kan H, Fang Q, Xie Z, Underwood BL, Jain AC, Williams HJ, Finkel MS (2007) Inducible nitric oxide synthase attenuates adrenergic signaling in alcohol fed rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 50: 692-696
192. Kim HJ (2010) New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB reports* 43: 524-529

193. Kiyoshi A, Weihuan W, Mostofa J, Mitsuru K, Toyoshi I, Toshihiro K, Kyoko K, Keiichi N, Iwao I, Hiroshi K (2009) Ethanol metabolism in ALDH2 knockout mice--blood acetate levels. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 11 Suppl 1: S413-415
194. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG (2005) Mechanobiology of bone tissue. *Pathologie-biologie* 53: 576-580
195. Kontulainen S, Kannus P, Haapasalo H, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, Oja P, Vuori I (2001) Good maintenance of exercise-induced bone gain with decreased training of female tennis and squash players: a prospective 5-year follow-up study of young and old starters and controls. *J Bone Miner Res* 16: 195-201
196. Kosmacheva SM, Volk MV, Yeustratenka TA, Severin IN, Potapnev MP (2008) In vitro growth of human umbilical blood mesenchymal stem cells and their differentiation into chondrocytes and osteoblasts. *Bulletin of experimental biology and medicine* 145: 141-145
197. Kraemer RR, Castracane VD (2007) Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and adiponectin. *Exp Biol Med* 232: 184-194
198. Kraemer RR, Chu H, Castracane VD (2002) Leptin and exercise. *Exp Biol Med* 227: 701-708
199. Kraemer WJ, Marchitelli L, Gordon SE, Harman E, Dziados JE, Mello R, Frykman P, McCurry D, Fleck SJ (1990) Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. *J Appl Physiol* 69: 1442-1450
200. Kream BE, Lukert BP (2002) Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 723-740
201. Krug R, Burghardt AJ, Majumdar S, Link TM (2010) High-resolution imaging techniques for the assessment of osteoporosis. *Radiologic clinics of North America* 48: 601-621
202. Kulak CA, Dempster DW (2010) Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 54: 87-98
203. Kusec V, Virdi AS, Prince R, Triffitt JT (1998) Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83: 2421-2428

204. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews* 15: 49-60
205. Kwok S, Partridge NC, Srinivasan N, Nair SV, Selvamurugan N (2009) Mitogen activated protein kinase-dependent inhibition of osteocalcin gene expression by transforming growth factor-beta1. *Journal of cellular biochemistry* 106: 161-169
206. Kyle UG, Genton L, Gremion G, Slosman DO, Pichard C (2004) Aging, physical activity and height-normalized body composition parameters. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 23: 79-88
207. Laughlin GA, Yen SS (1996) Nutritional and endocrine-metabolic aberrations in amenorrheic athletes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81: 4301-4309
208. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ (2008) Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 42: 649-656
209. Leger L, Boucher R (1980) An indirect continuous running multistage field test: the Universite de Montreal track test. *Canadian journal of applied sport sciences* 5: 77-84
210. Leichliter JS, Meilman PW, Presley CA, Cashin JR (1998) Alcohol use and related consequences among students with varying levels of involvement in college athletics. *J Am Coll Health* 46: 257-262
211. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58: 424-430
212. Lerner UH (2002) Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2: 440-447
213. Lespessailles E, Jaffre C, Beaupied H, Nanyan P, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D (2009) Does exercise modify the effects of zoledronic acid on bone mass, microarchitecture, biomechanics, and turnover in ovariectomized rats? *Calcified tissue international* 85: 146-157
214. Lieber CS (1993) Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Bailliere's clinical gastroenterology* 7: 581-608
215. Lima I, Rocha MS, Lopes RT (2008) Ethanol bone evaluation using 3D microtomography. *Micron* 39: 617-622

216. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L (2009) Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 24: 1651-1661
217. Liu D, Jiang LS, Dai LY (2007) Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides* 41: 271-283
218. Lopez DG, Pumarino H, Bustamante E, Oviedo S, Rios M (1991) Nutritional study of alcoholics with specific reference to calcium and phosphorus. *Revista medica de Chile* 119: 652-658
219. Lorenz R, Janicke-Lorenz J (1983) Electron microscopic observation on osteocytes of chronically alcoholized rats. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery* 102: 118-122
220. Loucks AB, Verdun M, Heath EM (1998) Low energy availability, not stress of exercise, alters LH pulsatility in exercising women. *J Appl Physiol* 84: 37-46
221. Lucas EG (1987) Alcohol in industry. *British medical journal* 294: 460-461
222. Luger A, Deuster PA, Kyle SB, Gallucci WT, Montgomery LC, Gold PW, Loriaux DL, Chrousos GP (1987) Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. Physiologic adaptations to physical training. *The New England journal of medicine* 316: 1309-1315
223. Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, Iwaniec UT (2009) Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* 20: 1529-1538
224. Madsen SH, Andreassen KV, Christensen ST, Karsdal MA, Sverdrup FM, Bay-Jensen AC, Henriksen K (2011) Glucocorticoids exert context-dependent effects on cells of the joint in vitro. *Steroids*
225. Maffulli N, Longo UG, Gougoulas N, Caine D, Denaro V (2011a) Sport injuries: a review of outcomes. *British medical bulletin* 97: 47-80
226. Maffulli N, Longo UG, Spiezia F, Denaro V (2011b) Aetiology and prevention of injuries in elite young athletes. *Medicine and sport science* 56: 187-200
227. Maher A, Wilson N, Signal L, Thomson G (2006) Patterns of sports sponsorship by gambling, alcohol and food companies: an Internet survey. *BMC public health* 6: 95
228. Maimoun L, Sultan C (2009) Effect of physical activity on calcium homeostasis and calciotropic hormones: a review. *Calcified tissue international* 85: 277-286

229. Maimoun L, Sultan C (2011) Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism: clinical and experimental* 60: 373-388
230. Manari AP, Preedy VR, Peters TJ (2003) Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcoholics in the UK. *Addiction biology* 8: 201-210
231. Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A (2010) Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *International journal of environmental research and public health* 7: 4281-4304
232. Marcus R (2002) Mechanisms of exercise effects on bone. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 1477-1488
233. Marcus R, Cann C, Madvig P, Minkoff J, Goddard M, Bayer M, Martin M, Gaudiani L, Haskell W, Genant H (1985) Menstrual function and bone mass in elite women distance runners. Endocrine and metabolic features. *Annals of internal medicine* 102: 158-163
234. Marks SC, Hermey DC (1996) The structure and development of bone. . *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New-York, pp. 3-34
235. Marks SC, Odgren PR (2002) The structure and development of the skeleton. . *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New-York, pp. 3-34
236. Marques EA, Mota J, Machado L, Sousa F, Coelho M, Moreira P, Carvalho J (2011) Multicomponent training program with weight-bearing exercises elicits favorable bone density, muscle strength, and balance adaptations in older women. *Calcified tissue international* 88: 117-129
237. Martens MP, Dams-O'Connor K, Beck NC (2006) A systematic review of college student-athlete drinking: Prevalence rates, sport-related factors, and interventions. *J Subst Abuse Treat* 31: 305-316
238. Martin TJ, Ng KW (1994) Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *Journal of cellular biochemistry* 56: 357-366
239. Mason DJ (2004) The role of glutamate transporters in bone cell signalling. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 4: 128-131
240. Mauck KF, Clarke BL (2006) Diagnosis, screening, prevention, and treatment of osteoporosis. *Mayo Clinic proceedings* 81: 662-672
241. Maughan RJ (2006) Alcohol and football. *J Sports Sci* 24: 741-748

242. McCambridge J, McAlaney J, Rowe R (2011) Adult consequences of late adolescent alcohol consumption: a systematic review of cohort studies. *PLoS medicine* 8: e1000413
243. Mehta SS, Antich PP, Daphtary MM, Bronson DG, Richer E (2001) Bone material ultrasound velocity is predictive of whole bone strength. *Ultrasound in medicine & biology* 27: 861-867
244. Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Wahner HW, Riggs BL (1993) Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *J Bone Miner Res* 8: 1227-1233
245. Miller BA, Wilsnack SC, Cunradi CB (2000) Family violence and victimization: treatment issues for women with alcohol problems. *Alcoholism, clinical and experimental research* 24: 1287-1297
246. Miller JW, Naimi TS, Brewer RD, Jones SE (2007) Binge drinking and associated health risk behaviors among high school students. *Pediatrics* 119: 76-85
247. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS (1989) Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy* 3: 953-960; discussion 960-951
248. Milliken LA, Going SB, Houtkooper LB, Flint-Wagner HG, Figueroa A, Metcalfe LL, Blew RM, Sharp SC, Lohman TG (2003) Effects of exercise training on bone remodeling, insulin-like growth factors, and bone mineral density in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Calcified tissue international* 72: 478-484
249. Miron S, Refregiers M, Gilles AM, Maurizot JC (2005) New synchrotron radiation circular dichroism end-station on DISCO beamline at SOLEIL synchrotron for biomolecular analysis. *Biochimica et biophysica acta* 1724: 425-431
250. Modlesky CM, Majumdar S, Dudley GA (2008) Trabecular bone microarchitecture in female collegiate gymnasts. *Osteoporos Int* 19: 1011-1018
251. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL (2010) Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcified tissue international* 87: 99-107
252. Moore MJ, Werch CE (2005) Sport and physical activity participation and substance use among adolescents. *J Adolesc Health* 36: 486-493
253. Muller JM, Lelievre V, Becq-Giraudon L, Meunier AC (1995) VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. *Molecular neurobiology* 10: 115-134

254. Muller R (2009) Hierarchical microimaging of bone structure and function. *Nature reviews* 5: 373-381
255. Mulvihill BM, McNamara LM, Prendergast PJ (2008) Loss of trabeculae by mechano-biological means may explain rapid bone loss in osteoporosis. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 5: 1243-1253
256. Mundy GR (1996) Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clinical orthopaedics and related research*: 24-28
257. Nagy TR, Prince CW, Li J (2001) Validation of peripheral dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of bone mineral in intact and excised long bones of rats. *J Bone Miner Res* 16: 1682-1687
258. Nanes MS (2003) Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321: 1-15
259. Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M (1993) Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *The Journal of biological chemistry* 268: 16737-16745
260. Nesic J, Duka T (2008) Effects of stress on emotional reactivity in hostile heavy social drinkers following dietary tryptophan enhancement. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 43: 151-162
261. Nevill ME, Holmyard DJ, Hall GM, Allsop P, van Oosterhout A, Burrin JM, Nevill AM (1996) Growth hormone responses to treadmill sprinting in sprint- and endurance-trained athletes. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 72: 460-467
262. Newhall KM, Rodnick KJ, van der Meulen MC, Carter DR, Marcus R (1991) Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. *J Bone Miner Res* 6: 289-296
263. Newman JS, Newberg AH (2010) Basketball injuries. *Radiologic clinics of North America* 48: 1095-1111
264. Nichols JF, Rauh MJ, Lawson MJ, Ji M, Barkai HS (2006) Prevalence of the female athlete triad syndrome among high school athletes. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 160: 137-142
265. Nicoletta DP, Moravits DE, Gale AM, Bonewald LF, Lankford J (2006) Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *Journal of biomechanics* 39: 1735-1743

266. Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, Ochi H (2000) Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *Journal of bone and mineral metabolism* 18: 317-320
267. Nordstrom A, Olsson T, Nordstrom P (2006) Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91: 2600-2604
268. Norman AW (2002) $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D3. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 545-571
269. Notomi T, Okazaki Y, Okimoto N, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M (2002) Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in orchidectomized growing rats. *J Appl Physiol* 93: 1152-1158
270. Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M (2001) Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. *J Bone Miner Res* 16: 166-174
271. Nurmi-Lawton JA, Baxter-Jones AD, Mirwald RL, Bishop JA, Taylor P, Cooper C, New SA (2004) Evidence of sustained skeletal benefits from impact-loading exercise in young females: a 3-year longitudinal study. *J Bone Miner Res* 19: 314-322
272. Nyquist F, Duppe H, Obrant KJ, Bondeson L, Nordsletten L (2002) Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 37: 21-24
273. Nyquist F, Halvorsen V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ (1999) Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta orthopaedica Scandinavica* 70: 212-216
274. Nyquist F, Karlsson MK, Obrant KJ, Nilsson JA (1997) Osteopenia in alcoholics after tibia shaft fractures. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 32: 599-604
275. Nyquist F, Ljunghall S, Berglund M, Obrant K (1996) Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 19: 51-54
276. O'Brien KS, Blackie JM, Hunter JA (2005) Hazardous drinking in elite New Zealand sportspeople. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 40: 239-241
277. O'Donnell E, De Souza MJ (2011) Increased serum adiponectin concentrations in amenorrheic physically active women are associated with impaired bone health but not with estrogen exposure. *Bone* 48: 760-767

278. Olszynski WP, Shawn Davison K, Adachi JD, Brown JP, Cummings SR, Hanley DA, Harris SP, Hodsman AB, Kendler D, McClung MR, Miller PD, Yuen CK (2004) Osteoporosis in men: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Clinical therapeutics* 26: 15-28
279. Ostrowski MC (2010) A new role for OPG: putting RANKL in its place. *J Bone Miner Res* 25: 1905-1906
280. Ouchi N, Walsh K (2007) Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 380: 24-30
281. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC (1991) Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 129: 3313-3320
282. Pacifici R, Vannice JL, Rifas L, Kimble RB (1993) Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77: 1135-1141
283. Papapoulos SE (2011) Targeting sclerostin as potential treatment of osteoporosis. *Annals of the rheumatic diseases* 70 Suppl 1: i119-122
284. Parfitt AM (1990) Bone-forming cells in clinical conditions. In: Hall BK (ed) *Bone*. Telford Press and CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 351-429
285. Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of cellular biochemistry* 55: 273-286
286. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610
287. Patton AJ, Genever PG, Birch MA, Suva LJ, Skerry TM (1998) Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone* 22: 645-649
288. Peng TC, Kusy RP, Hirsch PF, Hagaman JR (1988) Ethanol-induced changes in morphology and strength of femurs of rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 12: 655-659

289. Peppersack T, Fuss M, Otero J, Bergmann P, Valsamis J, Corvilain J (1992) Longitudinal study of bone metabolism after ethanol withdrawal in alcoholic patients. *J Bone Miner Res* 7: 383-387
290. Perera B, Torabi M, Kay NS (2011) Alcohol use, related problems and psychological health in college students. *International journal of adolescent medicine and health* 23: 33-37
291. Peris P, Guanabens N, Monegal A, Suris X, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Hernandez MV, Munoz-Gomez J (1995) Aetiology and presenting symptoms in male osteoporosis. *British journal of rheumatology* 34: 936-941
292. Perney P, Rigole H, Blanc F (2008) Alcohol dependence: diagnosis and treatment. *La Revue de medecine interne / fondee* 29: 297-304
293. Peyrin F (2009) Investigation of bone with synchrotron radiation imaging: from micro to nano. *Osteoporos Int* 20: 1057-1063
294. Pollock N, Grogan C, Perry M, Pedlar C, Cooke K, Morrissey D, Dimitriou L (2010) Bone-mineral density and other features of the female athlete triad in elite endurance runners: a longitudinal and cross-sectional observational study. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 20: 418-426
295. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J (2005) Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* 19: 1842-1844
296. Power J, Noble BS, Loveridge N, Bell KL, Rushton N, Reeve J (2001) Osteocyte lacunar occupancy in the femoral neck cortex: an association with cortical remodeling in hip fracture cases and controls. *Calcified tissue international* 69: 13-19
297. Preedy VR, Reilly ME, Patel VB, Richardson PJ, Peters TJ (1999) Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 15: 604-608
298. Price PA, Baukol SA (1980) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *The Journal of biological chemistry* 255: 11660-11663
299. Prince CW, Butler WT (1987) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen and related research* 7: 305-313

300. Prouteau S, Benhamou L, Courteix D (2006) Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight, weight reduction and weight regain in male and female judoists. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 154: 389-395
301. Quarles LD (2008) Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation* 118: 3820-3828
302. Quarto N, Wan DC, Kwan MD, Panetta NJ, Li S, Longaker MT (2010) Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *J Bone Miner Res* 25: 1680-1694
303. Quertemont E, Didone V (2006) Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res Health* 29: 258-265
304. Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry* 285: 25103-25108
305. Rainey CJ, McKeown RE, Sargent RG, Valois RF (1996) Patterns of tobacco and alcohol use among sedentary, exercising, nonathletic, and athletic youth. *J Sch Health* 66: 27-32
306. Rasky E, Stronegger WJ, Freidl W (1996) Risk of osteoporosis in women in 4 different occupational groups. *Wiener klinische Wochenschrift* 108: 163-168
307. Rauh MJ, Nichols JF, Barrack MT (2010) Relationships among injury and disordered eating, menstrual dysfunction, and low bone mineral density in high school athletes: a prospective study. *Journal of athletic training* 45: 243-252
308. Reed AH, McCarty HL, Evans GL, Turner RT, Westerlind KC (2002) The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 26: 1269-1274
309. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989) The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *The New England journal of medicine* 320: 980-991
310. Reid IR (2008) Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int* 19: 595-606
311. Reid IR (2010) Fat and bone. *Archives of biochemistry and biophysics* 503: 20-27
312. Remes T, Vaisanen SB, Mahonen A, Huuskonen J, Kroger H, Jurvelin JS, Penttila IM, Rauramaa R (2004) The association of bone metabolism with bone mineral density, serum sex hormone concentrations, and regular exercise in middle-aged men. *Bone* 35: 439-447

313. Ren J (2007) Acetaldehyde and alcoholic cardiomyopathy: lessons from the ADH and ALDH2 transgenic models. *Novartis Foundation symposium* 285: 69-76; discussion 76-69, 198-199
314. Rey G, Boniol M, Jouglu E (2010) Estimating the number of alcohol-attributable deaths: methodological issues and illustration with French data for 2006. *Addiction* (Abingdon, England) 105: 1018-1029
315. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology* 17: 208-212
316. Rico H (1990) Alcohol and bone disease. *Alcohol and alcoholism* (Oxford, Oxfordshire) 25: 345-352
317. Rizzoli R, Bruyere O, Cannata-Andia JB, Devogelaer JP, Lyritis G, Ringe JD, Vellas B, Reginster JY (2009) Management of osteoporosis in the elderly. *Current medical research and opinion* 25: 2373-2387
318. Robey PG (2002) Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 225-237
319. Robling AG (2009) Is bone's response to mechanical signals dominated by muscle forces? *Med Sci Sports Exerc* 41: 2044-2049
320. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH (2008) Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of biological chemistry* 283: 5866-5875
321. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21: 1457-1469
322. Ronis MJ, Wands JR, Badger TM, de la Monte SM, Lang CH, Calissendorff J (2007) Alcohol-induced disruption of endocrine signaling. *Alcoholism, clinical and experimental research* 31: 1269-1285
323. Rosen CJ (2002) Growth hormone and insulin-like growth factor-I treatment for metabolic bone diseases. *Principles of Bone Biology*, New York, pp. 1441-1453
324. Russell M, Misra M (2010) Influence of ghrelin and adipocytokines on bone mineral density in adolescent female athletes with amenorrhea and eumenorrheic athletes. *Medicine and sport science* 55: 103-113

325. Russo CR, Lauretani F, Seeman E, Bartali B, Bandinelli S, Di Iorio A, Guralnik J, Ferrucci L (2006) Structural adaptations to bone loss in aging men and women. *Bone* 38: 112-118
326. Sakurama K (1998) Effects of long-term ethanol administration on the kidneys, bones and muscles of mice. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai zasshi* = Japanese journal of alcohol studies & drug dependence 33: 703-717
327. Salvesen H, Johansson AG, Foxdal P, Wide L, Piehl-Aulin K, Ljunghall S (1994) Intact serum parathyroid hormone levels increase during running exercise in well-trained men. *Calcified tissue international* 54: 256-261
328. Sampson HW (1998) Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. *Alcoholism, clinical and experimental research* 22: 2029-2034
329. Sampson HW (2002) Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. *Alcohol Res Health* 26: 292-298
330. Sampson HW, Chaffin C, Lange J, DeFee B, 2nd (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcoholism, clinical and experimental research* 21: 352-359
331. Sampson HW, Gallager S, Lange J, Chondra W, Hogan HA (1999) Binge drinking and bone metabolism in a young actively growing rat model. *Alcoholism, clinical and experimental research* 23: 1228-1231
332. Sampson HW, Hebert VA, Booe HL, Champney TH (1998) Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcoholism, clinical and experimental research* 22: 1746-1753
333. Sampson HW, Perks N, Champney TH, DeFee B, 2nd (1996) Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 20: 1375-1384
334. Sampson HW, Spears H (1999) Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats is not completely reversible. *Alcoholism, clinical and experimental research* 23: 324-327
335. Sartorio A, Agosti F, Marazzi N, Trecate L, Silvestri G, Lafortuna C, Cappa M, De Palo E, Faglia G, Corradini C, Cella S, Rigamonti A, Muller EE (2004a) Gender-, age-, body composition- and training workload-dependent differences of GH response to a discipline-specific training session in elite athletes: a study on the field. *Journal of endocrinological investigation* 27: 121-129

336. Sartorio A, Marazzi N, Agosti F, Faglia G, Corradini C, De Palo E, Cella S, Rigamonti A, Muller EE (2004b) Elite volunteer athletes of different sport disciplines may have elevated baseline GH levels divorced from unaltered levels of both IGF-I and GH-dependent bone and collagen markers: a study on-the-field. *Journal of endocrinological investigation* 27: 410-415
337. Sato N, Lindros KO, Baraona E, Ikejima K, Mezey E, Jarvelainen HA, Ramchandani VA (2001) Sex difference in alcohol-related organ injury. *Alcoholism, clinical and experimental research* 25: 40S-45S
338. Schmidt GP, Reiser MF, Baur-Melnyk A (2007) Whole-body imaging of the musculoskeletal system: the value of MR imaging. *Skeletal radiology* 36: 1109-1119
339. Schnatz PF, Marakovits KA, Dubois M, O'Sullivan DM (2011) Osteoporosis screening and treatment guidelines: are they being followed? *Menopause* (New York, NY)
340. Schnitzler CM, Mesquita JM, Shires R (2010) Cortical and trabecular bone microarchitecture and turnover in alcohol-induced chronic pancreatitis: a histomorphometric study. *Journal of bone and mineral metabolism* 28: 456-467
341. Schnitzler CM, Solomon L (1984) Bone changes after alcohol abuse. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 66: 730-734
342. Schoberl S, Nickel P, Schmutzer G, Siekmeyer W, Kiess W (2008) Acute ethanol intoxication among children and adolescents. A retrospective analysis of 173 patients admitted to a university children hospital. *Klinische Padiatrie* 220: 253-258
343. Schoutens A, Laurent E, Poortmans JR (1989) Effects of inactivity and exercise on bone. *Sports medicine* (Auckland, NZ) 7: 71-81
344. Scott JP, Sale C, Greeves JP, Casey A, Dutton J, Fraser WD (2011) The role of exercise intensity in the bone metabolic response to an acute bout of weight-bearing exercise. *J Appl Physiol* 110: 423-432
345. Seeman E (1997) Do men suffer with osteoporosis? *Australian family physician* 26: 135-143
346. Seeman E (2006) Osteocytes--martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos Int* 17: 1443-1448
347. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M (2009) Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine* 76: 514-518

348. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH (1998) Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2498-2502
349. Sievanen H (2010) Immobilization and bone structure in humans. *Archives of biochemistry and biophysics* 503: 146-152
350. Siller-Jackson AJ, Burra S, Gu S, Xia X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX (2008) Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *The Journal of biological chemistry* 283: 26374-26382
351. Silvain C, Chagneau-Derode C (2006) *Metabolisme de l'ethanol. Hépatologie*
352. Silvestrini G, Ballanti P, Sebastiani M, Leopizzi M, Di Vito M, Bonucci E (2008) OPG and RANKL mRNA and protein expressions in the primary and secondary metaphyseal trabecular bone of PTH-treated rats are independent of that of SOST. *Journal of molecular histology* 39: 237-242
353. Sinaki M, Pfeifer M, Preisinger E, Itoi E, Rizzoli R, Boonen S, Geusens P, Minne HW (2010) The role of exercise in the treatment of osteoporosis. *Current osteoporosis reports* 8: 138-144
354. Skerry TM (2006) One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 6: 122-127
355. Skerry TM (2008) The role of glutamate in the regulation of bone mass and architecture. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8: 166-173
356. Slutske WS (2005) Alcohol use disorders among US college students and their non-college-attending peers. *Archives of general psychiatry* 62: 321-327
357. Sorensen MG, Henriksen K, Schaller S, Karsdal MA (2007) Biochemical markers in preclinical models of osteoporosis. *Biomarkers* 12: 266-286
358. Sornay-Rendu E, Boutroy S, Munoz F, Buxsein ML (2009) Cortical and trabecular architecture are altered in postmenopausal women with fractures. *Osteoporos Int* 20: 1291-1297
359. Sowa H, Kaji H, Hendy GN, Canaff L, Komori T, Sugimoto T, Chihara K (2004) Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *The Journal of biological chemistry* 279: 40267-40275

360. Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Mander A, Davidson SL, Thompson RP, Powell JJ (2009) Moderate ingestion of alcohol is associated with acute ethanol-induced suppression of circulating CTX in a PTH-independent fashion. *J Bone Miner Res* 24: 1380-1388
361. Stahre M, Naimi T, Brewer R, Holt J (2006) Measuring average alcohol consumption: the impact of including binge drinks in quantity-frequency calculations. *Addiction* (Abingdon, England) 101: 1711-1718
362. Stern PH (2002) Thyroid hormone and bone. *Principles of bone biology*. Academic Press, New York, pp. 707-721
363. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews* 20: 345-357
364. Swift JM, Gasier HG, Swift SN, Wiggs MP, Hogan HA, Fluckey JD, Bloomfield SA (2010) Increased training loads do not magnify cancellous bone gains with rodent jump resistance exercise. *J Appl Physiol* 109: 1600-1607
365. Szulc P, Delmas PD (2002) Osteoporosis in the aged male. *Presse Med* 31: 1760-1769
366. Tajima O, Ashizawa N, Ishii T, Amagai H, Mashimo T, Liu LJ, Saitoh S, Tokuyama K, Suzuki M (2000) Interaction of the effects between vitamin D receptor polymorphism and exercise training on bone metabolism. *J Appl Physiol* 88: 1271-1276
367. Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Shionome M, Suda T (1991) Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res* 6: 977-985
368. Takarada-Iemata M, Takarada T, Nakamura Y, Nakatani E, Hori O, Yoneda Y (2011) Glutamate preferentially suppresses osteoblastogenesis than adipogenesis through the cystine/glutamate antiporter in mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology* 226: 652-665
369. Takeuchi F, Isono M, Nabika T, Katsuya T, Sugiyama T, Yamaguchi S, Kobayashi S, Ogihara T, Yamori Y, Fujioka A, Kato N (2011) Confirmation of ALDH2 as a Major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in a Japanese population. *Circ J* 75: 911-918
370. Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J (2007) Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone* 41: 745-751

371. Tao FB, Xu ML, Kim SD, Sun Y, Su PY, Huang K (2007) Physical activity might not be the protective factor for health risk behaviours and psychopathological symptoms in adolescents. *J Paediatr Child Health* 43: 762-767
372. 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
373. Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T (1990) Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 173: 246-251
374. Thorsen K, Kristoffersson A, Lorentzon R (1996) The effects of brisk walking on markers of bone and calcium metabolism in postmenopausal women. *Calcified tissue international* 58: 221-225
375. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998) The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13: 1243-1250
376. Torgerson DJ, Campbell MK, Reid DM (1995) Life-style, environmental and medical factors influencing peak bone mass in women. *British journal of rheumatology* 34: 620-624
377. Tortora GJ, Grabowski SR (1994) *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck Université, Anjou (Québec)
378. Trouvin AP, Goeb V (2010) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical interventions in aging* 5: 345-354
379. Trump BF, Smuckler EA, Benditt EP (1961) A method for staining epoxy sections for light microscopy. *Journal of ultrastructure research* 5: 343-348
380. Tucker KL, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Qiao N, Hannan MT, Sripanyakorn S, Cupples LA, Kiel DP (2009) Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. *The American journal of clinical nutrition* 89: 1188-1196
381. Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14: 595-608
382. Turner CH, Robling AG (2004) Exercise as an anabolic stimulus for bone. *Current pharmaceutical design* 10: 2629-2641

383. Turner CH, Robling AG (2005) Mechanisms by which exercise improves bone strength. *Journal of bone and mineral metabolism* 23 Suppl: 16-22
384. Turner RT (2000) Skeletal response to alcohol. *Alcoholism, clinical and experimental research* 24: 1693-1701
385. Turner RT, Greene VS, Bell NH (1987) Demonstration that ethanol inhibits bone matrix synthesis and mineralization in the rat. *J Bone Miner Res* 2: 61-66
386. Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD (2001) Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res* 16: 589-594
387. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999) Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25: 517-523
388. Ueland T (2005) GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 152: 327-332
389. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rueggsegger P (1999) The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 25: 55-60
390. Unger RH (2003) Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144: 5159-5165
391. Utkan T, Erden F, Yildiz F, Ozdemirci S, Ulak G, Gacar MN (2001) Chronic ethanol consumption impairs adrenoceptor- and purinoceptor-mediated relaxations of isolated rat detrusor smooth muscle. *BJU international* 88: 278-283
392. Uusi-Rasi K, Sievanen H, Vuori I, Pasanen M, Heinonen A, Oja P (1998) Associations of physical activity and calcium intake with bone mass and size in healthy women at different ages. *J Bone Miner Res* 13: 133-142
393. Väänänen K, Zhao H (2002) Osteoclast function. *Biology and mechanisms. Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York
394. Vainionpää A, Korpelainen R, Sievanen H, Vihriala E, Leppaluoto J, Jamsa T (2007) Effect of impact exercise and its intensity on bone geometry at weight-bearing tibia and femur. *Bone* 40: 604-611

395. Valimaki MJ, Karkkainen M, Lamberg-Allardt C, Laitinen K, Alhava E, Heikkinen J, Impivaara O, Makela P, Palmgren J, Seppanen R, et al. (1994) Exercise, smoking, and calcium intake during adolescence and early adulthood as determinants of peak bone mass. Cardiovascular Risk in Young Finns Study Group. *BMJ (Clinical research ed)* 309: 230-235
396. Van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *Faseb J* 5: 2814-2823
397. Van Hove R, Nolte P, Vatsa A, Semeins C, Salmon P, Smit T, Klein-Nulend J (2009) Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density-Is there a role for mechanosensing? *Bone* 45(2): 321-329
398. Van Langendonck L, Lefevre J, Claessens AL, Thomis M, Philippaerts R, Delvaux K, Lysens R, Renson R, Vanreusel B, Vanden Eynde B, Dequeker J, Beunen G (2003) Influence of participation in high-impact sports during adolescence and adulthood on bone mineral density in middle-aged men: a 27-year follow-up study. *American journal of epidemiology* 158: 525-533
399. Vanderschueren D, Bouillon R (1995) Androgens and bone. *Calcified tissue international* 56: 341-346
400. Vantyghem MC, Danel T, Marcelli-Tourvieille S, Moriau J, Leclerc L, Cardot-Bauters C, Docao C, Carnaille B, Wemeau JL, D'Herbomez M (2007) Calcitonin levels do not decrease with weaning in chronic alcoholism. *Thyroid* 17: 213-217
401. Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, Klein-Nulend J (2008a) Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing? *Bone* 43: 452-458
402. Vatsa A, Semeins CM, Smit TH, Klein-Nulend J (2008b) Paxillin localisation in osteocytes--is it determined by the direction of loading? *Biochemical and biophysical research communications* 377: 1019-1024
403. Venkat KK, Arora MM, Singh P, Desai M, Khatkhatay I (2009) Effect of alcohol consumption on bone mineral density and hormonal parameters in physically active male soldiers. *Bone* 45: 449-454
404. Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D (2008) Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int* 19: 1517-1525
405. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB (2000) Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 15: 60-67

406. Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, Klein-Nulend J (2006) Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 348: 1082-1088
407. Visser M, Kiel DP, Langlois J, Hannan MT, Felson DT, Wilson PW, Harris TB (1998) Muscle mass and fat mass in relation to bone mineral density in very old men and women: the Framingham Heart Study. *Appl Radiat Isot* 49: 745-747
408. Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang GJ (2003) Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clinical orthopaedics and related research*: 213-224
409. Warren MP (1999) Health issues for women athletes: exercise-induced amenorrhea. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 1892-1896
410. Warren MP, Chua AT (2008) Exercise-induced amenorrhea and bone health in the adolescent athlete. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1135: 244-252
411. Warren MP, Perlroth NE (2001) The effects of intense exercise on the female reproductive system. *The Journal of endocrinology* 170: 3-11
412. Weiss M, Yogev R, Dolev E (1998) Occupational sitting and low hip mineral density. *Calcified tissue international* 62: 47-50
413. Welch JM, Turner CH, Devareddy L, Arjmandi BH, Weaver CM (2008) High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. *Bone* 42: 660-668
414. Westbroek I, van der Plas A, de Rooij KE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ (2001) Expression of serotonin receptors in bone. *The Journal of biological chemistry* 276: 28961-28968
415. Wezeman FH, Juknelis D, Frost N, Callaci JJ (2003) Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 31: 87-92
416. Williams FM, Cherkas LF, Spector TD, MacGregor AJ (2005) The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins. *Annals of the rheumatic diseases* 64: 309-310
417. Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB, Caston-Balderrama A, Cameron JL (2001) Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle

disturbances during strenuous exercise training. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 5184-5193

418. Windahl SH, Andersson N, Borjesson AE, Swanson C, Svensson J, Moverare-Skrtic S, Sjogren K, Shao R, Lagerquist MK, Ohlsson C (2011) Reduced bone mass and muscle strength in male 5alpha-reductase type 1 inactivated mice. *PloS one* 6: e21402

419. Wiren KM, Orwoll ES (2002) Androgens - Receptor expression and steroid action in bone. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 757-772

420. Wolff J (1892) *Das Gesetz der transformation der Knochen.*, Berlin

421. Wosje KS, Kalkwarf HJ (2007) Bone density in relation to alcohol intake among men and women in the United States. *Osteoporos Int* 18: 391-400

422. Wylie CD (2010) Setting a standard for a "silent" disease: defining osteoporosis in the 1980s and 1990s. *Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences* 41: 376-385

423. Yadav VK, Ducy P (2010) Lrp5 and bone formation : A serotonin-dependent pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 103-109

424. Yadav VK, Karsenty G (2009) Leptin-dependent co-regulation of bone and energy metabolism. *Aging* 1: 954-956

425. Yamaguchi T, Kanatani M, Yamauchi M, Kaji H, Sugishita T, Baylink DJ, Mohan S, Chihara K, Sugimoto T (2006) Serum levels of insulin-like growth factor (IGF); IGF-binding proteins-3, -4, and -5; and their relationships to bone mineral density and the risk of vertebral fractures in postmenopausal women. *Calcified tissue international* 78: 18-24

426. Yamamoto A, Sekino A, Tajima M, Nguyen VC, Ezawa I (1997) Effect of long-term alcohol administration on bone metabolism in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 43: 369-375

427. Yang GQ, Lu ZH, Gu WJ, Du J, Guo QH, Wang XL, Ba JM, Dou JT, Mu YM, Lu JM (2011) Recurrent autoimmune hypophysitis successfully treated with glucocorticoids plus azathioprine: a report of three cases. *Endocrine journal*

428. Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintz S (1993) Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: determined by dual energy X-ray absorptiometry. *Calcified tissue international* 52: 234-238

429. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S (1997) Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature genetics* 16: 391-396
430. Young CM, Weeks BK, Beck BR (2007) Simple, novel physical activity maintains proximal femur bone mineral density, and improves muscle strength and balance in sedentary, postmenopausal Caucasian women. *Osteoporos Int* 18: 1379-1387
431. Zanker CL, Swaine IL (1998) Bone turnover in amenorrhoeic and eumenorrhoeic women distance runners. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 8: 20-26
432. Zebaze RM, Ghasem-Zadeh A, Bohte A, Iuliano-Burns S, Mirams M, Price RI, Mackie EJ, Seeman E (2010) Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet* 375: 1729-1736
433. Zerath E, Holy X, Douce P, Guezennec CY, Chatard JC (1997) Effect of endurance training on postexercise parathyroid hormone levels in elderly men. *Med Sci Sports Exerc* 29: 1139-1145
434. Zhou S (2011) TGF-beta regulates beta-catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 112: 1651-1660

Annexe

Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms

D. B. Maurel · N. Boisseau · C. L. Benhamou · C. Jaffre

Received: 24 March 2011 / Accepted: 19 August 2011
© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2011

Abstract Alcohol is widely consumed across the world. It is consumed in both social and cultural settings. Until recently, two types of alcohol consumption were recognized: heavy chronic alcohol consumption or light consumption. Today, there is a new pattern of consumption among teenagers and young adults namely: binge drinking. Heavy alcohol consumption is detrimental to many organs and tissues, including bones, and is known to induce secondary osteoporosis. Some studies, however, have reported benefits from light alcohol consumption on bone parameters. To date, little is known regarding the effects of

binge drinking on bone health. Here, we review the effects of three different means of alcohol consumption: light, heavy, and binge drinking. We also review the detailed literature on the different mechanisms by which alcohol intake may decrease bone mass and strength. The effects of alcohol on bone are thought to be both direct and indirect. The decrease in bone mass and strength following alcohol consumption is mainly due to a bone remodeling imbalance, with a predominant decrease in bone formation. Recent studies, however, have reported new mechanisms by which alcohol may act on bone remodeling, including osteocyte apoptosis, oxidative stress, and Wnt signalling pathway modulation. The roles of reduced total fat mass, increased lipid content in bone marrow, and a hypoleptinemia are also discussed.

C.L. Benhamou and C. Jaffre equally contributed to this work.

D. B. Maurel · C. L. Benhamou
Unité INSERM U658: Caractérisation du Tissu Osseux
par Imagerie: Techniques et Applications, CHR Orléans,
45000 Orléans, France

N. Boisseau
Laboratoire de Biologie des Activités Physiques et Sportives,
Clermont Université, Université Blaise Pascal, EA 3533,
BP 10448,
63000 Clermont-Ferrand, France

C. Jaffre
Laboratoire Mouvement, Sport, Santé (M2S), EA 1274,
Université de Rennes 2,
35044 Rennes, France

D. B. Maurel (✉)
Unité INSERM U658, IPROS,
Hôpital Porte Madeleine, 1 rue porte Madeleine, BP2439,
45032 Orleans cedex 01, France
e-mail: db.maurel@gmail.com

Keywords Alcohol consumption · Binge drinking ·
Body composition · Bone density · Leptin · Osteocytes

Introduction

Alcohol is not an essential nutrient but is largely consumed around the world. Heavy alcohol consumption has detrimental effects on the brain, liver, muscles, and also the skeleton [1]. Chronic alcohol consumption is responsible for many deaths (75,000 Americans each year). In this review, we first assess the skeletal effects of alcohol with respect to various levels of alcohol consumption. There is speculation that low alcohol consumption may increase bone mass and density, while heavy alcohol doses are reported to damage bone at various levels. In the second part, we review the mechanisms responsible for these alcohol-induced skeletal effects.

Part I: alcohol and bone: which dose causes which effect?

Alcohol consumption spans a wide range of behaviors, from social and cultural pastimes to detrimental chronic alcoholism. The difficulty is to define what light, moderate, or heavy alcohol consumption is. There are several definitions of chronic alcohol consumption in the literature. Ganry et al. define light alcohol consumption as a consumption of 1–10 g of ethanol per day in humans, moderate alcohol consumption as 11–30 g of ethanol per day, and heavy alcohol consumption as more than 30 g of ethanol per day [2]. Gonzalez-Calvin define a moderate consumer as someone drinking 60–100 g ethanol per day [3] while Hoidrup et al. have integrated people consuming less than 40 g of ethanol per day in their control group [4]. In this review, we will use the definition of Ganry et al. to define light, moderate, or heavy alcohol consumption [2] for men and women.

Light and moderate alcohol consumption

Bone mineral density

The effect of alcohol consumption on bone may be controversial if we do not differentiate light alcohol consumption from moderate and heavy chronic alcohol consumption. Some reviews discuss the intriguing reports of improved bone mass with alcohol consumption [5–7] but if we consider the amount of alcohol consumed by the subjects, the consumption of alcohol is light (75 g or more of ethanol per week in the study of Feskanich et al. and about 5,000 drinks in a lifetime for 74-year-old women in the study of Orwoll et al.). The definition of a standard drink also differs between countries, though generally between 8 and 12 g of ethanol [6]. Recent studies have reported positive effects of light alcohol consumption on bone. For example, Ilich et al. found that light alcohol consumption (8 g alcohol/day), mostly wine, was positively associated with lumbar spine bone mineral density (BMD) and whole body BMD in postmenopausal women [8]. Similar results were reported in pre- and postmenopausal women drinking four beers per week [9], in female twins consuming eight drinks per week [10], in men consuming one beer or other alcoholic beverage per day [11], and in young male soldiers having between 24 and 105 g of alcohol per week [12]. In one study, Ganry et al. found that a consumption of 1–10 g/day did not increase BMD values in women aged 80 years old compared to nondrinkers [2]. The values were similar to controls. As shown in Table 1, one glass of alcohol has no effect or beneficial effects on bone, regardless of the type of alcohol consumed.

In regards to moderate alcohol consumption, however, the available data is even more contradictory. When two or three glasses are consumed per day, the effects on bone are dependent on the age and sex of the subject, their hormonal status (for example, beneficial effects are reported for postmenopausal women but not for premenopausal) and the type of beverage (some benefits are reported with wine although not with liquor; see Table 1). In the study of Ganry et al. [2], postmenopausal women who drank 11–29 g of alcohol per day had higher BMD values at the trochanteric site compared to nondrinkers, while a consumption of 5–24 g/day as beer or liquor increased the fracture risk in premenopausal women [13]. In the study of Tucker, an intake of two glasses per day increased BMD in men while more than two glasses of liquor was associated with lower hip and spine BMD in men [11]. This data suggests that moderate alcohol consumptions (1–3 glasses per day) may be associated with an increase of BMD in elderly women while it is not the case for men or premenopausal women (>2 glasses). Moreover, it seems that the different type of alcoholic beverages do not have the same effects on bone metabolism. This may be due to the various constituents present in wine and beer such as silicon or polyphenols [6].

Similar results have been observed in animals. Higher BMD and improved bone mechanical properties were reported in 4-week old female rats after low consumption (5% ethanol, 2 h per day) [14] while higher BMD and greater trabecular thickness have been found in alcohol-fed male rats compared to controls in our laboratory. The rats were fed with an increasing alcohol treatment from 5% volume/volume to 20% volume/volume over 8 weeks [15]. Unfortunately, there are very few animal models of light alcohol consumption in the literature.

Bone remodeling

The increased BMD observed following low alcohol consumption may be explained by lower overall bone remodeling as shown by decreased serum osteocalcin levels and lower serum levels of N and C terminal telopeptides of type I collagen (CTx and NTx) in subjects after light alcohol consumption [16, 17]. Very few studies have assessed bone remodeling markers in cases of light and moderate alcohol consumption. This is not surprising considering most of the studies in light alcohol subjects were analyses of the mean daily lifetime alcohol consumption from self-reported questionnaires. Furthermore, most of the human data obtained in alcoholics come from hospital reports, whereas light alcohol consumption does not generally lead to hospital stays, meaning the data are rare and there is no study reporting the blood alcohol concentration (BAC) in light alcohol consumption. It should also be noted that bone biomarker levels are known

Table 1 Summary table of the effects of different alcohol consumptions on bone (human, animal, and cell models; acute, chronic, light, excessive alcohol consumption, and binge drinking)

Model	Consumption	Details consumption	Effects	Study	Drinks
 Men soldiers	Chronic—Light	More than 24g/week whisky/rum	Higher femur BMD	<i>Venkat et al. 2009</i>	
Post menop women		8 g/alcohol/day—wine	Higher lumbar, whole body BMD	<i>Ilich et al. 2002</i>	
Post menop women		Between 28–57 g/week	Higher spine, whole body, radius BMD	<i>Rapuri et al. 2000</i>	
 Post menop women	Chronic—Moderate	11–29 g alcohol/day—wine	Higher trochanter BMD	<i>Ganry et al. 2000</i>	
Post menop women		More than 2 drinks /day—wine	Higher hip and spine BMD	<i>Tucker et al. 2009</i>	
Men		1–2 drinks/day	Higher hip BMD	<i>Tucker et al. 2009</i>	
Men		More than 2 drinks/day—Liquor	Lower hip and spine BMD	<i>Tucker et al. 2009</i>	
Women 30–55 years old		5–24 g/day—beer, liquor	Increased hip, forearm fracture risk	<i>Hernandez-Avila et al. 1991</i>	
 Men	Chronic—Excessive	More than 28 drinks per week	Increased risk of hip fracture	<i>Hoidrup et al. 1999</i>	
Men		drinkers: 60–100 g Eth/day drinkers: >100 g Eth/day	60/100g/day: low osteocalcin, osteopenia >100g/day: low BGP, osteopenia, low BMD	<i>Gonzalez-Calvin et al. 1993</i>	
Men Women		204 g ethanol/day for 28 years	Lower BMD, BMC, osteocalcin	<i>Alvisa-Negrin et al. 2009</i>	
Men Women 27–50 years old		17–21 drinks/day for 11–15 years	Low lumbar, neck and hip BMD in men Normal BMD in women, high estradiol	<i>Malik et al. 2009</i>	
Black men 41 years old		170 g/day for 7–26 years, pancreatitis	Low cortical and trabecular thickness Low BFR, MAR, more eroded surface	<i>Schnitzler et al. 2010</i>	
 Healthy men		0.6 g/kg body weight once	Lower PTH, OC, higher urinary Ca	<i>Garcia-Sanchez et al. 1995</i>	
 Female rats	Binge	2 g/kg body weight	Decreased osteoid surface by osteoblasts Decreased osteoclast number	<i>Diez et al. 1997</i>	
Female rats 3 weeks		5% alcohol by gavage, 2 days/week	Increased bone length, BMD	<i>Sampson et al. 1999</i>	
 Male adult rats		IP 20%v/v, 3 g/kg, 1/day for 3 weeks BAC 308 mg/dL	Lower BV/TV, vertebral strength, Lower femur/spine BMD, higher serum Dpd	<i>Callaci et al. 2004</i>	
 Cell culture MSC	Chronic—Excessive	cells from patients undergoing hip replacement (alcohol osteonecrosis)	Less ability to differentiate in osteogenic lineage	<i>Suh et al. 2005</i>	
 Cell culture Osteoclasts	Acute	cells cultured for 24 h with different ethanol doses: 0.001%, 0.01%, 0.1%	Increase pit number and area with low concentrations	<i>Cheung et al. 1995</i>	

to have high intra- and inter-individual variation, and to be sensitive to sex hormone levels, diet, the time of day, and even the season [6].

Fanti et al. found decreased bone resorption with no change in bone formation in ovariectomized female rats compared to SHAM rats following low alcohol consumption (2.5% of the diet) [18]. This is consistent with a protective effect of low alcohol consumption reported in female rats [14].

To summarize, low alcohol consumption (one glass per day) is generally beneficial to bone tissue; however, when this is increased to two or three glasses per day, the effects can be positive or negative, depending on the sex, age, hormonal status of the patient, and the type of beverage consumed (see Table 1).

Chronic heavy alcohol consumption

Human studies on chronic heavy alcohol consumption are usually based on patients admitted to hospital for health

problems linked to alcohol abuse, meaning the subjects are consuming high amounts of alcohol (100–200 g of ethanol per day, depending on the study).

Bone mineral density and content

It has been observed that long-term chronic heavy alcohol consumption decreases bone mass (BMC) as well as BMD in men [19]. The decrease in BMD has been observed at different skeletal sites including forearm, spine, iliac crest, and trochanter with alcohol consumption between 100 and 200 g of ethanol per day for many years [20, 21] (Table 1). Some studies, however, contain notable bias. For example, in the study of Diamond et al. [21], the control subjects had a consumption of up to 40 g of ethanol per day. These controls may have an altered bone status as, mentioned above, it has been reported that more than two glasses of alcohol per day is associated with lower hip and spine BMD in men [11] and 5–24 g per day as beer or liquor constitutes a major risk factor for osteoporosis for premen-

opausal women [13]. Malik et al. showed a lower BMD in the lumbar region and in the proximal femur in males (21 glasses per day for 15 years), but not in premenopausal females (17 glasses per day for 11 years) [22] (Table 1). Differences due to sex and hormonal profile on the effects of alcohol on bone have also been reported in the study of Hannan et al. [23] and it is likely that estrogen protection in premenopausal women is involved.

The effect of alcohol on BMD has been reported in rats of both sexes at different ages and with different alcohol doses [24–26]. BMD was found to be lower in adult rats [27] and peak bone mass was reduced in adolescent alcohol-fed rats at both the cortical and cancellous bone compartments [26]. The rat has been reported to be a valuable model for osteoporosis research [28]. Researchers have to take the differences of skeletal maturity of the rat into account to adapt the rat model to reflect human osteoporosis.

Comparisons of the effects of alcohol on humans and animals are difficult because the alcohol doses, percentages of calories represented by alcohol in the diet, and BAC were not often matched with human ranges. Nowadays, most models use a liquid diet containing 35% of the calories as ethanol [29], which is what is generally found in human alcoholics (percentage of calories provided by ethanol between 40% and 60%) [28, 30, 31]. This technique of alcoholization is used because it results in a higher ethanol intake than with other approaches and allows for the study of secondary complications of alcoholism such as fatty liver, liver fibrosis, as well as facilitating the comparison with control pair-fed animals [29] and achieving BACs close to that of human alcoholics. Rats achieve a BAC of 200–300 mg/dL with this diet. The BAC is not often reported in human studies but it would be between 1 and 4 g/L (100–400 mg/dL) in chronic alcoholics according to various authors [32, 33]. Another difficulty for the interpretation of rat studies is that rats continue to grow until 10 months of age [28]. Therefore, the model using 3- or 5-month-old rats to mimic human adults may generate interpretation issues because the BMD will not be decreased as in humans, but rather a lower peak bone mass will be achieved compared with controls (i.e., a lower increase) [28]. These models would be more directly suited to study the effects of alcohol on teenagers or young adults.

Microarchitecture

Bone microarchitecture is an important determinant of bone strength, bone quality, and bone mechanical properties [34], but it is quite difficult to assess in humans. The first studies of alcohol abuse reported reduced trabecular bone volume and thickness in humans [35, 36] and were later confirmed [21, 37]. A recent study reported decreased cortical thickness, decreased trabecular thickness and volume, as

well as a decreased bone formation rate and mineral apposition rate and increased eroded surface in black male patients suffering from alcohol-induced bone disease and pancreatitis [38, 39]. There is a lack of data in the literature concerning the microarchitectural changes due to alcohol consumption in humans. Various new techniques, recently developed to assess microarchitecture in humans will likely help to assess these effects in the near future.

Animal models have allowed for the assessment of microarchitecture more specifically than has been done in humans. Reductions in cortical thickness and trabecular bone volume have been described in rats with 36% ethanol diets (BAC=150–210 mg/dL) [27, 40] while bone atrophy, thinning of both the trabeculae and cortical bone, and increased cortical porosity have been found in Sake-fed mice (16% ethanol for 472 days) [39]. Similar data on decreased Tb.N, Tb.Th, connective density, and decreased cancellous bone volume per total tissue volume (BV/TV) were reported in rats after 35% ethanol liquid diet treatments [41, 42] (Fig. 1). The decline was more marked in the trabecular bone compared to the cortical bone (36% liquid diet for 45 days, BAC=175–190 mg/dL) [43, 44].

Bone remodeling

Most of the articles report an uncoupling between bone formation and resorption in chronic alcoholics, where bone formation is generally decreased while bone resorption may be increased in drinkers (120–150 g of ethanol/day) vs. nondrinkers [3, 20, 45]. Low osteocalcin serum level has been observed in heavy drinkers consuming 60–100 g of ethanol per day [3]. The decreased bone formation observed in human seems to be due to an inhibition of osteoblastic proliferation and activity [21, 46]. Bone resorption markers are increased in some studies but not

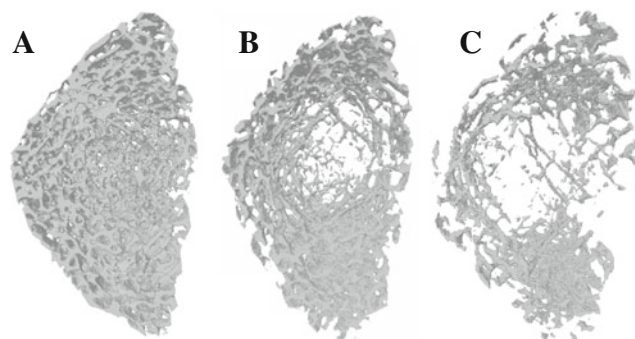


Fig. 1 Images of trabecular bone from male Wistar rats reconstructed in 3D after acquisition with micro-computed tomography. The images are respectively from control rat (**a**), rat fed with 25% alcohol volume/volume for 17 weeks (**b**), and rat fed with 35% alcohol volume/volume for 17 weeks (**c**). These cases are demonstrative of the thinning of trabeculae and decreased trabecular bone volume

all [19]. Bone remodeling marker concentrations may differ depending on the age of the subjects [47], the chronic or acute alcohol consumption [17], and also the presence or absence of abstinence before the blood sampling [48]. Other parameters may influence bone remodeling markers in alcoholics, such as tobacco use; vitamin D, calcium, and parathyroid hormone (PTH) impairment; and diseases such as pancreatitis or cirrhosis [19].

Almost all animal studies have also shown a decrease in bone formation with chronic alcohol consumption, for instance 7.6 g ethanol/kg [49] or 35% ethanol-derived calories [50]. Sampson et al. reported no change in serum osteocalcin levels between controls and alcohol-fed young growing female rats (4 weeks old, 35% liquid diet for 2–8 weeks) despite a reduced bone density and peak bone mass [26]. The inhibitory effects of alcohol on bone formation seem to be dose-dependent, as do the effects on bone resorption [51]. Interpretation of the results from rat experiments must take into account the fact that the rat is growing at least until 10 months old [28]. The modeling process leading to skeletal growth is considered predominant before 6 months, and the remodeling process predominant between 6 and 12 months [28]. This may complicate the interpretation of the effects of alcohol, particularly when using the data to generalize to the effects in humans. This may also explain differences between animal studies following the age of the rats at the time of investigation.

Fractures and bone strength

While light and moderate alcohol consumption are not associated with increased fracture risks (<27 drinks/week for men and <13 drinks/week for women) [4, 52], a consumption of more than four glasses per day in men and more than two glasses per day for women constitutes a major risk factor for fractures [4]. In some human studies, however, the subject range is wide (for example, from 20 to 90 years old in the study of Hoidrup et al. [4]) and the interpretation does not regularly take into account this heterogeneity. Fractures are globally four times as common in chronic alcoholics compared to age-matched controls [19, 53]. The low bone mass frequently found in alcoholics is associated with increased fracture incidence [19, 54]. Moreover, alcohol creates conditions that favor accident falls, independently of bone alterations [55]. For example, Cawthon et al. found an increased fall risk in moderate to heavy intake subjects (>14 glasses per week) compared to abstainers [56]. As Turner underlines [19], hospital records fail to distinguish high energy from low energy fractures. It would be useful to know if the increased fracture number in alcoholics is due to a lower bone density or to frequent falls [19]. Heavy drinkers (100–460 g/day) frequently have skeletal trauma and vertebral fractures despite having a normal lumbar BMD

and only in exceptional circumstances are the patients aware of a previous episode of traumatic vertebral fracture [57]. Two studies have reported more associations of fractures in alcoholic subjects with a particular lifestyle (that also includes tobacco, irregular feeding habits) than with bone alterations (BMD) [54, 58]. Therefore, lifestyle factors and trauma may contribute to the high fracture incidence in alcohol abusers independently of BMD. In addition, alcohol increases the time to heal bone fractures [59] and increases the risk of healing complications [60].

The fracture occurrence is difficult to assess in animal models. Therefore, most of the animal studies have thus far concentrated on bone strength, which is a direct determinant of bone fractures in humans [61]. A decrease in the maximal force required to break bone was found in male and female rats fed an ethanol liquid diet (8%, BAC=150–300 mg/dL) for 4 and 6 weeks [62]. There was also an inverse relationship between the strength required to break the femur and the dose of ethanol ingested [62]. Bone stiffness, strength, and energy absorbed to fracture were significantly lower in 4-week-old female rats (35% calories as ethanol for 6 weeks, BAC=210 mg/dL) compared to pair-fed animals in a study by Hogan et al. [63]. In that study, the cortical area of alcohol-fed rats was not different from chow-fed rats, suggesting that alcohol decreased bone strength by diminishing the quality of bone tissue.

A 36% ethanol-derived caloric dose (37–49 mmol) resulted in deficient bone repair when compared with pair-fed animals (26% less rigidity, 41% less intrinsic stiffness, 24% less intrinsic strength) in an experiment drawn by Chakkalakal et al. [64]. No such effect was observed with the 26% caloric ethanol dose (1–2 mmol). Numerous studies have shown that alcohol may inhibit new bone formation in a fracture site when bone formation is necessary for bone repair [42, 64, 65]. The effects of alcohol consumption on fracture healing seem to be dose-dependent as 26% caloric alcohol consumption has no effect on fracture healing compared to 36% consumption.

Withdrawal

In 77 alcoholic patients (204 g of ethanol per day for 28 years), an abstinence of 6 months was associated with an increase in bone mass (arm, pelvis) and pronounced increases in osteocalcin and vitamin D serum concentrations [20]. The abstainers either increased their bone mass or encountered no bone loss in contrast to non-abstainers who lost more bone. A rapid increase of osteocalcin after 2 weeks of withdrawal was found by Peppersack et al. [66]. However, other factors may positively impact bone mass during withdrawal such as increased physical activity and improved eating habits. Overall, there is evidence that abstinence increases bone mass and improves bone formation markers in heavy alcohol

consumers, however, bone turnover may remain higher than normal until 5 years postwithdrawal [45].

In one study, abstinence for 90 days following ethanol consumption (36% alcohol consumption for 60 days) led to an increase in femoral BMD in male adolescent rats, and mechanical parameters returned to normal values [67]. Similar results have been demonstrated in other studies confirming the reversibility of alcohol-induced bone changes [68, 69].

Animal versus human studies

Most of the studies on the effects of heavy chronic alcoholic behavior on bone encounter bias as there are often confounders and comorbidity factors among the patients. The consumptions vary, the history of alcohol abuse and type of alcohol may also differ. Moreover, there may be age, ethnicity, sex, and hormonal status differences. The comorbidity factors in men include tobacco smoke, sedentary lifestyles, impaired nutritional status, liver insufficiency, depression, and drug association among others. The presence of liver disease may alter hormonal levels, rendering comparisons quite difficult. It is also difficult to assess an accurate report of the lifetime ethanol consumption in humans. Animal models have been developed as they allow for the assessment of the effects of alcohol without confounders and comorbidity factors. Animal models are useful because they offer access to certain parameters, such as microarchitecture, and allow for studies involving microscopy of bone cells and histomorphometry, which are difficult to obtain in human beings. Animal models are also easy to handle and allow for quick results, for example, after only several months, compared to years in human patients. On the other hand, the metabolic effects in animals (and it should be noted that almost all animal studies are in rodents) may differ from metabolic effects in human [28]. For example, sexual maturity occurs early in the rat while the onset of skeletal maturity occurs late with long-lasting growth.

In summary, heavy alcohol consumption leads to increased risk of fracture via decreased BMD, alongside poor lifestyle habits. The bone alterations involve impairment in both trabecular and cortical bone and are related to the uncoupling of bone remodeling.

Binge drinking

Animal models also have the benefit of permitting the analysis of atypical consumption such as binge drinking, whereas this specific data is not yet available for human bone.

Alcohol consumption is qualified as binge drinking when five or more standard drinks are ingested consecutively by men and four or more drinks consecutively by women. Binge

drinking is not a new pattern of consumption. It is known to occur among adults, but may be masked when self-reporting of alcohol consumption is the means of data collection [70]. There is a lack of data concerning blood alcohol levels achieved with binge drinking. In hospital admissions or in mortuary reports, blood alcohol levels in adults admitted for acute alcohol intoxication are between 2 and 4.6 g/L [71–73]. It is uncertain, however, if these values are due to binge drinking, and they may not reflect the mean BAC in binge drinkers as the cases in these reports were severe. In a study by Savola et al., the BAC of 30-year-old men and women, admitted to hospital for trauma, ranged between 1 and 2 g/L for frequent binge drinkers [33], which is similar to BAC observed in dependent drinkers. While binge drinking is not a new phenomenon in adults, there has been a steady rise in binge drinking among adolescents over the last decade. These drinking episodes are responsible for many hospital presentations of adolescents with acute alcohol intoxication (+171% between 1998 and 2003 in Leipzig hospital) [74]. Unfortunately, there is a notable lack of data on the BAC attained by children and teenagers following binge drinking. One estimation posits a BAC of between 0.8 and 1.39 g/L in boys aged 9–13 and girls aged 9–17 after only three drinks [75]. The effects of binge drinking on the human skeleton is not yet clear, since in adults it is masked by daily consumption and it is a relatively new pattern of consumption in teenagers.

Different models have been developed in the rat to mimic binge drinking in humans. They consist of bolus oral doses of alcohol given by gavage or injections for several days per week. The advantage of these forms of administration is that they allow the investigators to control the exact dosing of alcohol and to match volumes administered across all rats in all testing groups. Administering alcohol to rodents using these methods appears to accurately mimic levels of high alcohol consumption such as those observed in alcoholics in a near-coma (2.8 g/L) [76]. The first model developed by Sampson et al. (5% alcohol by gavage, 2 days per week for 7 weeks) in growing female rats (4 weeks old) increased bone length, bone weight, and BMD [77]. The dose given by Sampson et al. to the rats was considered equivalent to six beers consumed in a single day by a 63-kg woman (1.14 g of ethanol/kg of body weight). A binge drinking alcohol model was developed by Callaci et al. using intraperitoneal injections to administer 20% volume/volume alcohol/saline solution (3 g/kg, once daily) on four consecutive days for 1, 2, or 3 weeks. A dose of 3 g/kg represents 16–18 drinks for a 60-kg man. No effects were observed after 1 and 2 weeks of binge treatment but after 3 weeks, lumbar spine and distal femoral BMD were significantly reduced, as was vertebral compressive strength. There was a decrease in BV/TV, bone area, and an increase of trabecular separation [78]. Serum deoxyypyridi-

noline (a bone resorption marker) was significantly increased compared to controls (205%). These results suggest that binge drinking in rats may affect bone integrity by increasing bone resorption. Another model of binge alcohol consumption tested by Callaci et al. (3 g/kg, i.p., 3 consecutive days/week, for 1 or 4 weeks) in adult male rats confirmed these results [76]. The expression of bone formation marker genes (osteocalcin and alkaline phosphatase) was also reduced after acute binge alcohol exposure [79]. Abstinence after a binge period in male adolescent rats increased tibia cancellous BMD which returned to normal values while vertebral BMD remained at 15% below control values [80].

These data show that binge drinking may trigger both short-term and long-term damages on the rat skeleton, in particular, impairment of microarchitecture and BMD via a change of bone remodeling (increased resorption and decreased formation). As a consequence, teenagers who engage in binge drinking may decrease their peak bone mass and be at risk for later skeletal pathophysiology.

Experimental design of alcoholization

Intraperitoneal injections and gavage are efficient methods for achieving high blood alcohol concentrations. However, these techniques are stressful for the animals and may lead to inflammation and necrosis of tissues (i.p. injections). It is difficult to alcoholise the rats with these techniques for a long time (several months) [29]. Moreover, the absorption of alcohol with intraperitoneal injections is different from that in humans. Ethanol may be absorbed by peripheral tissue before it reaches the blood and it may be problematic to compare this method with human consumption. The technique whereby ethanol is provided in a liquid diet allows the researchers to control the percentage of ethanol contained in the diet and also the amount of nutrients in the diet. This technique is less stressful for the animals and is used by many researchers as it limits the risk of dehydration among the ethanol-fed rats. It is also useful to analyze only the effects of ethanol and not those of weight loss since the rats fed with this diet do not incur weight loss compared to controls. The drawback of employing this technique is that it does not mimic the human consumption pattern as the liquid and the food are mixed. Another model is a bottle with water and alcohol, separated from the food [81]. This is the oldest technique of alcoholization [29]. The advantage of this technique is that it is easy to do and it mimics the human drinking pattern. The rats encounter physiologic changes under alcohol that are comparable to those in human physiology (in particular, weight loss). The disadvantages are that the rats may refrain from drinking and therefore suffer from dehydration and achieve lower blood

alcohol levels [29]. Furthermore, the weight loss resulting may hide the direct effects of ethanol on bone, when the mechanism of action of ethanol on the skeleton is the primary aim of the study.

Part II: mechanisms of action of chronic heavy alcohol consumption on bone

The effects of ethanol on bone are well-known: it decreases BMD and BMC in both cortical and trabecular bone, mainly via a decrease of bone formation. Overall, alcoholism is a major cause of secondary osteoporosis in men and is well-known to increase fracture risk. Despite the fact that the mechanisms of action of ethanol on bone are not completely understood, they are thought to be both direct and indirect.

Indirect mechanisms of action

Body composition

Fat mass and lean mass are both decreased in alcohol abuse [41, 82]. This is likely due to caloric restriction [41]. Both fat mass and lean mass are positively correlated with BMD [83, 84], although their contribution to BMD is different in men and women [85]. Muscle forces play a role in generating the mechanical stimulus in exercise-induced bone gain [86], while the relationship of fat tissue to bone is mediated by bone active hormones secreted by adipocytes, in particular, leptin [87]. This may be an indirect pathway by which alcohol leads to a decrease in BMD.

Leptin

Leptin is a 13-kDa protein secreted mainly by white adipose tissue that is involved in regulating food intake and body weight. Leptin has been reported to be a regulator of bone mass. Leptin is able to affect the central nervous system (CNS) as well as peripheral tissues: it decreases bone mass through the CNS while also having an anabolic effect on bone by driving stem cell differentiation to the osteoblastic cell lineage [88, 89]. Alcohol consumption decreases leptin concentrations in men and rats [41, 90, 91], as well as decreasing osteoblastogenesis and increasing adipogenesis concomitantly in the bone marrow, modifying the balance between osteogenesis and adipogenesis [92, 93]. Consistent with this, an increase of the adipogenesis indicator PPARgamma and a decrease in osteocalcin have been observed in vitro on cloned bone marrow stem cells from mice and on human mesenchymal stem cells cultured with ethanol [94, 95]. These studies have also been confirmed by Ronis et al. [96].

Growth hormone and insulin-like growth factor I

Growth hormone (GH) is a hormone that is an important physiologic regulator of bone growth. It also plays a role in the regulation of bone remodeling in adults. GH treatment of osteoblasts and chondrocytes leads to an increase in cell proliferation and differentiation *in vitro* [97] and suppresses bone marrow lipid accumulation [97]. Many of the actions of GH on cells are mediated through insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-I is often decreased following chronic alcohol consumption [41, 98]. It is likely that the effects of alcohol on GH lead to a change in the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. It has been reported that alcohol impairs the effects of GH on tibial growth and trabecular bone formation [99].

Cell differentiation

Giuliani et al. reported that alcohol (at concentrations of 0.04–0.6%) and acetaldehyde (at concentrations of 0.004% and 0.02%) induce suppression in the recruitment of cells committed to the osteoblast lineage in bone marrow cultures from alcoholics compared with age-matched healthy controls [100]. These concentrations are consistent with the serum ethanol concentrations observed in humans (0.02–0.3%; Table 2). It has also been shown that alcohol treatment on bone marrow stem cells lines decreases osteogenesis and increases adipogenesis at concentrations of 0.09, 0.15, and 0.21 mol/L in a study by Cui et al. [94] and at concentrations of 0.03, 0.09, and 0.15 mol/L in a study by Wang et al. [93]. Despite the fact that the doses used by Cui et al. are lethal for humans (Table 2), an inverse relationship between osteogenesis and adipogenesis has been observed in rat stromal cultures [101]. Gong and Wezeman observed that alcohol (50 mmol alcohol in the culture medium) alters osteogenic differentiation in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cell (MSC) cultures during lineage progression [102] which was confirmed by Rosa et al. with ethanol doses of between 0.85 and 3.43 mmol [103]. This result provides further insight into alcohol-induced reduced bone formation. Similarly, a reduced ability of the MSC to differentiate into the osteogenic lineage has been observed in cells from patients with alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head compared to patients with femoral neck fractures with no history of alcohol consumption [104]. The human MSC had a significantly longer doubling time, less ability to differentiate into osteoblasts but no greater adipogenic capacity than controls.

Vitamin D and PTH

Some abnormalities in the hormonal levels have been reported with alcoholism. These changes may indirectly

interfere with bone metabolism. For example, an insufficiency in vitamin D [20, 22, 38] and a lower PTH levels [105] have been observed in some studies but not in others [17, 48]. Very recently, PTH injections in alcohol-fed rats have been shown to increase the mineralizing perimeter/bone perimeter [106]. The anabolic actions of PTH on bone requires IGF-I [107, 108], which is decreased by heavy alcohol consumption. PTH is involved in the activation of vitamin D and vitamin D has a positive effect on osteoblast function and differentiation [109]. Chronic alcohol consumption can lead to a decrease in serum vitamin D levels resulting in malabsorption of calcium from the intestine and leading to low levels of circulating serum calcium [110]. Since bone resorption is source of calcium acquisition, it may be increased; explaining why some studies reported increased resorption in severe alcoholics [3]. Low vitamin D levels in alcoholism may be related to reduced sunlight exposure, which is the main cause of vitamin D deficiency [22] or to liver lesions [111]. For example, in the case of hepato-cellular deficiency, the hydroxylation of 25-vitamin D is impaired, and this impairment could worsen the effects of vitamin D insufficiency (Fig. 2).

Calcitonin

Moderate alcohol consumption may increase calcitonin, which is a thyroid hormone that inhibits bone resorption [112]. This may explain the beneficial effects of moderate alcohol consumption sometimes observed in women [110] (Fig. 2). However, some studies reported no change in calcitonin with alcohol [17].

Sex steroids

The level of testosterone has been reported to decrease with alcohol consumption in some studies [21, 113, 114] but not in others [115]. A decrease of serum estradiol has been reported in female alcoholics [116] and female rats treated with alcohol [117]. Low serum estradiol has been shown to be a major factor of ethanol-induced bone loss via an increase in receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) expression [118]. In contrast, an increase in estrogen level has been observed in women drinking small amounts of alcohol [6, 119] and an increase in estradiol has been reported in males with low alcohol consumption [12]. This may in part explain the increased BMD observed in light drinkers.

Ions

Low levels of serum magnesium and phosphate have been reported in heavy drinkers and could also contribute to bone loss [19, 110]. A change in calcium, magnesium, and phosphate, however, is not regularly reported in all the

Table 2 Average equivalence between the number of glasses ingested, the blood ethanol concentration, and the clinical effects observed in humans. It should be noted that blood alcohol concentrations result in various clinical effects due to the wide variation and physiological differences among people

Number drinks	Ethanol dose	Blood alcohol concentrations			Clinical effects
	g/kg	mmol/L	mg/dL	g/L (‰)	
	0.25	4–10	20–50	0.2–0.5	Decreased motricity
	0.51	10–20	50–100	0.5–1	Coordination affected
	0.76	20–30	100–150	1–1.5	Difficulty walking
	1.01	30–50	150–250	1.5–2.5	Lethargy
	1.90	60	300	3	Coma
	2.28	80	400	4	Respiratory insufficiency

studies [26, 49]. The decrease in magnesium could modify the PTH levels or impair the bone response to PTH [38].

There are numerous comorbidity factors associated with alcoholism, i.e., nutritional status, smoking, absence of physical activity, lifestyle (drug use), and presence and severity of liver disease that may influence metabolism and lead to vitamin and mineral deficiencies [60]. Alcoholics are often smokers, caffeine drinkers, and often have deficiencies in vitamin and mineral amounts [13].

Oxidative stress

Reactive oxygen species (ROS) are widely considered to be a causal factor in aging and in many pathologies [120, 121]. The ROS (hydrogen peroxide, anion superoxide, and hydroxyl radical) damage the membrane lipids, some proteins (receptor and enzyme alteration), and nucleic acids [122]. Increased nitric oxide concentrations and decreased enzymatic antioxidant systems (glutathione reductase and glutathione peroxidase) were reported in alcoholics [113] as in osteoporotic women [123]. Therefore, oxidative stress may be linked to the osteoporotic disease observed in alcohol abuse.

Chen et al. report that ethanol induces NOX expression (NADPH oxidase enzymes that are important sources of ROS) and activity, which leads to the production of ROS in osteoblasts and increases the expression of RANKL, an osteoclastogenic factor [124]. Ethanol-induced oxidative stress has been shown to accelerate the activation of senescence pathways in osteoblasts [119] while the admin-

istration of antioxidant *N*-acetylcysteine was able to block bone loss in postlactational female rats alcoholised intragastrically [92]. In that study, the bone loss induced by oxidative stress seemed to be mediated by the Wnt signalling pathway. Nitric oxide has also been reported to be linked to osteocyte apoptosis [125].

Direct effects of alcohol on bone

Most of the studies show that some effects of ethanol on bone are direct rather than indirect [19, 22, 26]. Several studies have shown a deleterious effect of alcohol consumption on bone formation, BMC, or BMD without liver disease and in the absence of calciotropic and anabolic hormonal changes [27, 41].

Osteoblasts and osteoclasts

Animal studies are useful to assess the effects of ethanol on the whole body to understand the interactions between the different organs. However, cell cultures offer the advantage of allowing for the assessment of the direct effect of ethanol on bone cells. It is sometimes difficult to make a comparison between cells in culture and in the human patient. Yet most of the cell culture studies use ethanol amounts that are close to those observed in alcoholic patients (see Table 2).

Alcohol has been reported to decrease indices of osteoblast activity and differentiation in human osteoblast cells [126].

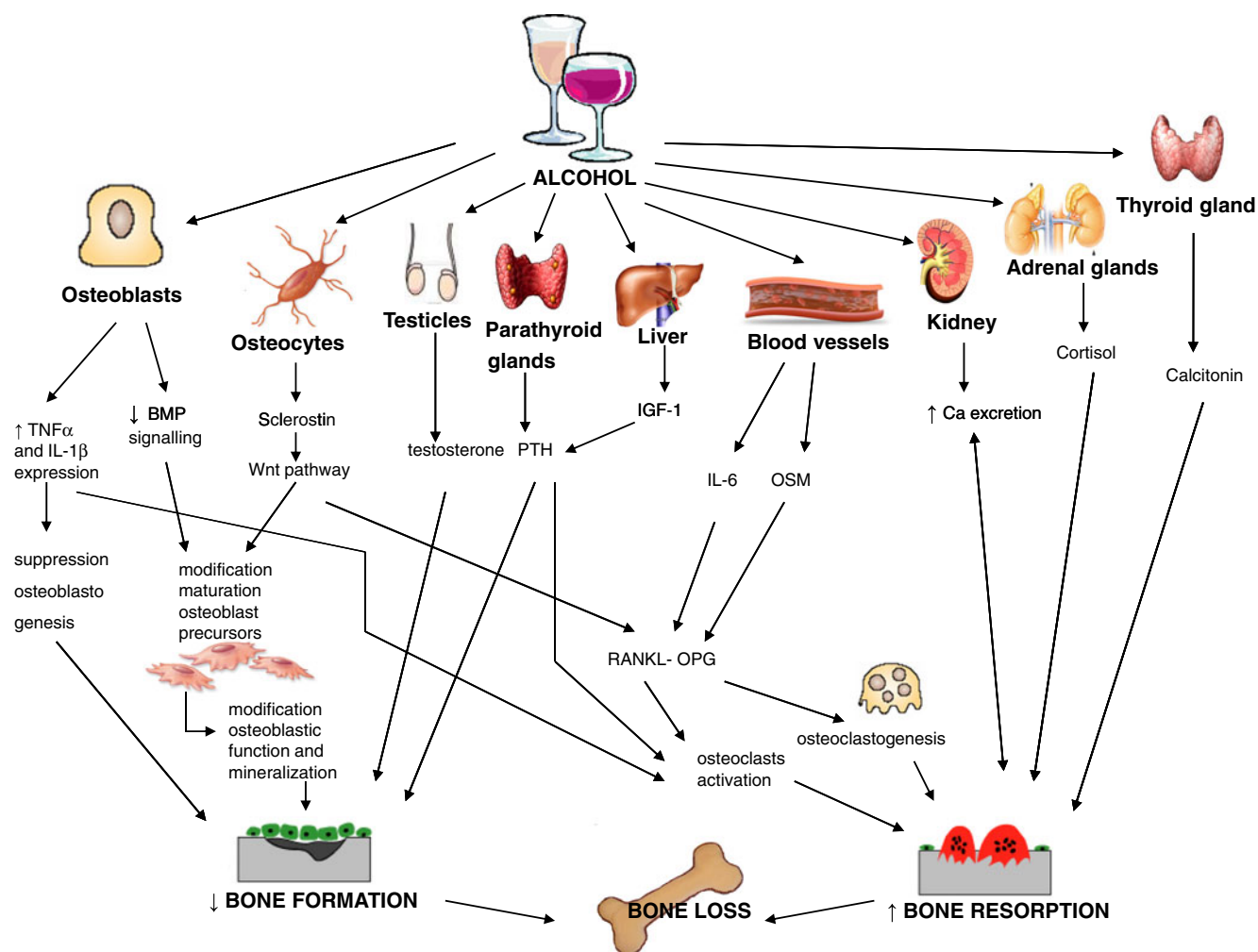


Fig. 2 Mechanisms which may be implicated in bone loss due to heavy chronic alcohol consumption

The ethanol doses used were 0.01–5 g/L in the study of Chavassieux et al. [126], which are doses that are close to those found in humans during alcohol consumption (see Table 2). Sun et al. showed that ethanol (100 mmol/L) can inhibit osteoblast proliferation and function. However, this dose would be lethal in humans (see Table 2). Sun et al. also found that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) can prevent the inhibition of osteoblasts and counteract the ethanol-induced inhibition of proliferation [127]. In a study by Torricelli et al. on osteoblasts isolated from trabecular bone of rats previously exposed to 7-week intermittent ethanol vapor (17 h/day; BAC, 150–350 mg/dL), it was reported that ethanol affects the osteoblast proliferation rate more than menopause does [128].

To date and to our knowledge, only one study has investigated the direct effects of ethanol on bone resorption in vitro [129]. Osteoclasts from the long bones of prehatched chicks were cultured with different percentages of ethanol (0.001%, 0.01%, and 0.1%). Bone resorption by

osteoclasts was increased with ethanol as revealed by increased pit numbers, pit area, and volume/area ratio. This study showed that even at blood concentrations experienced by the social drinker (1–2 glasses per day), ethanol has a direct effect on osteoclasts in vitro resulting in increased bone resorption [129]. This is consistent with findings obtained from heavy alcoholics [47, 130] but not with what has been observed with light consumption [16, 17]. These results need to be interpreted with caution as in the body, bone resorption is coupled with bone formation and they are influenced by other factors. An increase of bone resorption observed alone in vitro does not mean that light alcohol consumption increases only bone resorption with no change of bone formation in vivo. Moreover, there is no in vitro study assessing the effects of high alcohol exposure on the osteoclasts. The increase in osteoclastogenesis by alcohol may be mediated by cytokines as shown by the increased IL-6 and RANKL expression in mice fed with a liquid diet [131].

Ethanol seems to have a direct toxic effect on both osteoclasts and osteoblasts. Unfortunately, as underlined by Turner, there are no established *in vitro* models to study the effects of ethanol on the coupling between bone formation and resorption [19] and the studies on the effects of alcohol on osteoclasts are rare. Secondly, there are no studies on the effects of alcohol on osteoclast and osteoblast apoptosis. Osteoblast apoptosis has been observed *in vivo* in femoral head osteonecrosis due to alcohol [132] but to date, no study has shown a direct effect of alcohol on this cell apoptosis *in vitro*.

Acetaldehyde is the main ethanol metabolite. Literature searches reveal that studies on the effects of acetaldehyde on bone tissue are limited. However, the few data that are available have shown an inhibition of osteoblastic proliferation and activity *in vitro* on rat bone cultures (0.01% and 0.03% of acetaldehyde) [133], which has been confirmed in human bone marrow cell culture with acetaldehyde concentrations of 0.004–0.06% [100].

Osteocytes

Osteocytes constitute the third bone cell type and the most abundant cell in bone tissue. The osteocyte was not studied in cell culture until 1995 because it is difficult to isolate as it is embedded in mineralized tissue. Thus, for a long time, the osteocyte was thought to be a passive cell [134]. It has now been reported that osteocytes play major role in orchestrating bone remodeling and in regulating the skeletal responses to mechanical loading [135, 136]. Other researchers support the suggestion that viable osteocytes prevent

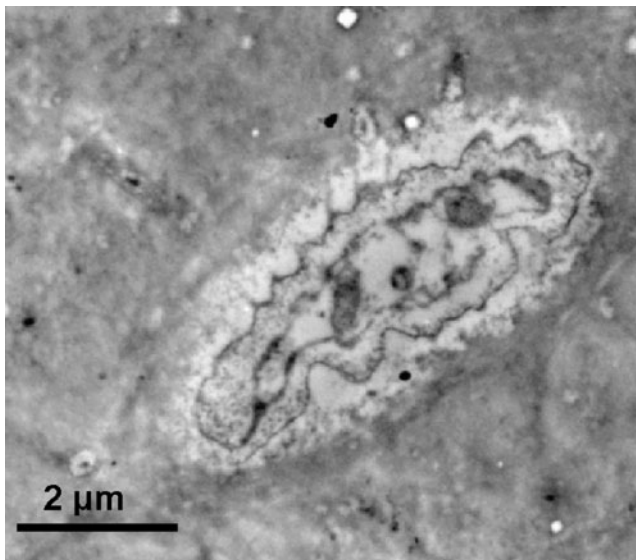


Fig. 3 An osteocyte from an alcohol-fed male Wistar rat (35% volume/volume for 17 weeks). The cell is clearly damaged; the organelles and nucleus are no longer visible

osteoclast activation [137] while dying or apoptotic osteocytes send signals to recruit osteoclasts [134, 138].

Some laboratories have investigated the effects of ethanol on osteocytes and report that osteocytes are modified by ethanol. The morphology and number of apoptotic cells are changed with alcohol consumption [93, 139]. Lorenz and Lorenz revealed a change in osteocyte morphology in rats fed for 10 months with ethanol (5–20%), as shown by the increase of vesicle number, cell fragmentation, modification of organelles, and cytolysis [139]. Wang et al. reported osteocyte changes in alcoholised rabbits (10 mL/kg/day for 1–6 months). They observed deposits of triglycerides in the osteocytes, which became pyknotic [93]. The percentage of empty osteocyte lacunae was also increased suggesting that ethanol increases osteocyte apoptosis. This data has been confirmed recently by our group: we observed increased osteocyte apoptosis and osteocyte 2D and 3D morphology change in an alcohol-induced model of osteopenia (Fig. 3). The increase in osteocyte apoptosis was correlated with decreased BMD [91].

Wnt pathway/DKK1

Wnts are secreted glycoproteins which act through four different pathways. The most commonly studied pathway is called the canonical pathway and designated as the Wnt/ β -catenin pathway. The Wnt/ β -catenin pathway is activated by the binding of the appropriate Wnt to a coreceptor

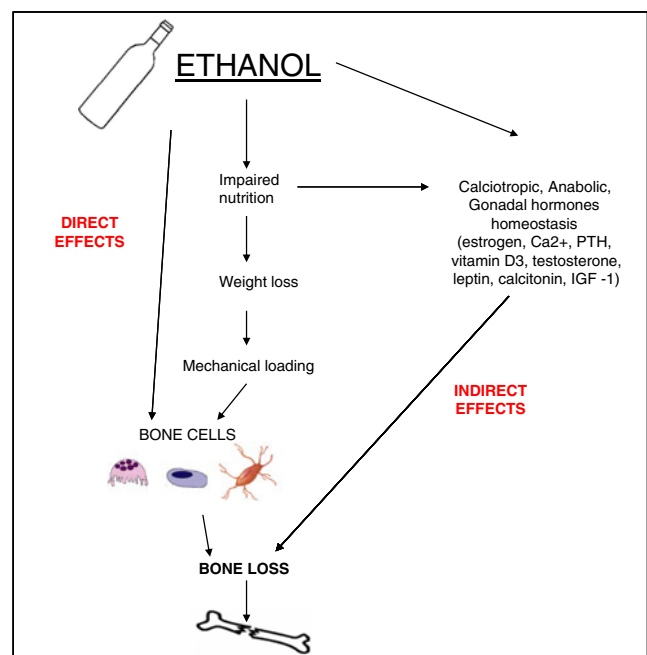


Fig. 4 Synthesis diagram. Ethanol has both direct and indirect effects on bone cells, resulting in bone loss. Indirect effects are mainly linked to impaired nutrition, which leads to weight loss, decreased fat and lean mass, and to hormone alterations, which may change bone cells activity

complex involving Lrp5 or Lrp6 [140]. β -catenin has the ability to accumulate in the cytoplasm and to translocate into the nucleus to affect gene transcription. Therefore, it can regulate a number of genes important in the differentiation, proliferation, apoptosis, and functionality of bone cells [140]. New emerging data identifies the Wnt/ β -catenin pathway as a regulator of osteocyte biology, related to bone responsiveness to mechanical loading [140].

Chen et al. observed a decrease of BMD in postlactational female rats following ethanol ingestion (12 g/kg/day). In parallel, the major components of the Wnt signalling pathway were downregulated and osteoblastogenesis was suppressed while enhanced adipogenesis was observed [92]. All these actions of ethanol were blocked by the antioxidant *N*-acetylcysteine. These results indicate that the effects of ethanol on bone mass may be due to a suppression of the Wnt signalling pathway, through the stimulation of oxidative stress [92]. These data have been confirmed by Callaci et al. [76].

DKK1 is an antagonist of the Wnt pathway. It has been shown to be upregulated by alcohol, which confirms that a decrease of the Wnt pathway may be linked to the suppression of bone formation observed with alcohol [92]. Increased DKK1 expression also seems to be associated to bone cell apoptosis [141].

Conclusion

The effects of alcohol consumption on bone are linked to the dose ingested and the duration of consumption. A consumption of one drink per day for women and two for men is not deleterious for bone tissue whereas higher consumption levels (2–4 drinks per day) can damage bone tissue, although the exact effects depend on the age, sex, and hormonal status of the consumer as well as the type of alcoholic beverage. When more than four glasses per day are consumed, the effects of alcohol on bone are deleterious. Different mechanisms may be responsible for the effects of ethanol on bone. First, the effects are thought to be direct with changes on the number and activity of the osteoblasts and osteoclasts as well as an increase in osteocyte apoptosis. Secondly, the changes observed may be modulated in part by the Wnt/DKK1 signalling pathway due to increased oxidative stress. Thirdly, the changes to cell differentiation may be responsible for low bone mass and is associated with an increase of fat accumulation in the bone marrow. Lastly, the effects of alcohol consumption on bone may also be indirect via a decrease of calorie intake and a change of body composition (Fig. 4). Further investigation is necessary as alcohol may change osteocyte function but the effects of alcohol on osteocyte markers and differentiation genes such as *Sost* are almost unknown, as

the impact of alcohol consumption on osteoblast and osteoclast apoptosis.

As a public health message, the dose that should serve as a limit for bone health is one glass per day for women and two for men. More than two glasses per day may induce the negative effects of alcohol on bone tissue.

Acknowledgments We would like to acknowledge Pr N.L. Fazzalari from the Bone and Joint Research Laboratory, SA Pathology in Adelaide, Australia for the advice on the English corrections. We also want to thank Pr Rustem Uzbekov, from the Departement des Microscopies, at Tours University, France, for imaging our bones by transmission electron microscopy.

Conflicts of interest None.

References

- Schuckit MA (2009) Alcohol-use disorders. *Lancet* 373:492–501
- Ganry O, Baudoin C, Fardellone P (2000) Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: the EPIDOS Study. *Epidemiologie de l'Osteoporose*. *Am J Epidemiol* 151:773–780
- Gonzalez-Calvin JL, Garcia-Sanchez A, Bellot V, Munoz-Torres M, Raya-Alvarez E, Salvatierra-Rios D (1993) Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol* 28:571–579
- Hoidrup S, Gronbaek M, Gottschau A, Lauritzen JB, Schroll M (1999) Alcohol intake, beverage preference, and risk of hip fracture in men and women. Copenhagen Centre for Prospective Population Studies. *Am J Epidemiol* 149:993–1001
- Feskanich D, Korrick SA, Greenspan SL, Rosen HN, Colditz GA (1999) Moderate alcohol consumption and bone density among postmenopausal women. *J Womens Health* 8:65–73
- Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ (2006) Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. *Proc Nutr Soc* 65:291–310
- Orwoll ES, Bauer DC, Vogt TM, Fox KM (1996) Axial bone mass in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 124:187–196
- Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z (2002) To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 21:536–544
- Pedraza-Zamorano JD, Lavado-Garcia JM, Roncero-Martin R, Calderon-Garcia JF, Rodriguez-Dominguez T, Canal-Macias ML (2009) Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women. *Nutrition* 25:1057–1063
- Williams FM, Cherkas LF, Spector TD, MacGregor AJ (2005) The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins. *Ann Rheum Dis* 64:309–310
- Tucker KL, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Qiao N, Hannan MT, Sripanyakorn S, Cupples LA, Kiel DP (2009) Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr* 89:1188–1196
- Venkat KK, Arora MM, Singh P, Desai M, Khatkhatay I (2009) Effect of alcohol consumption on bone mineral density and hormonal parameters in physically active male soldiers. *Bone* 45:449–454
- Hernandez ER, Revilla M, Rico H (1991) Total body bone mineral and pelvis bone mineral content as parameters of bone

- mass in men. A dual-energy X-ray absorptiometry study. *Acta Anat* 142:227–230
14. Yamamoto A, Sekino A, Tajima M, Nguyen VC, Ezawa I (1997) Effect of long-term alcohol administration on bone metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 43:369–375
 15. Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffre C (2011) Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health. Study in a rat model. *Eur J Appl Physiol* Ahead Publ. doi:10.1007/s00421-011-1916-1
 16. Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, Ryschon KL (2000) Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *Am J Clin Nutr* 72:1206–1213
 17. Sripanyakorn S, Juggaohsingh R, Mander A, Davidson SL, Thompson RP, Powell JJ (2009) Moderate ingestion of alcohol is associated with acute ethanol-induced suppression of circulating CTX in a PTH-independent fashion. *J Bone Miner Res* 24:1380–1388
 18. Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Cohen D, Malluche HH (1997) Moderately high consumption of ethanol suppresses bone resorption in ovariectomized but not in sexually intact adult female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1150–1154
 19. Turner RT (2000) Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1693–1701
 20. Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-Gonzalez R, Duran-Castellon MC, de Los Angeles Gomez-Rodriguez M (2009) Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 44:468–475
 21. Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S (1989) Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med* 86:282–288
 22. Malik P, Gasser RW, Kemmler G, Moncayo R, Finkenstedt G, Kurz M, Fleischhacker WW (2009) Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. *Alcohol Clin Exp Res* 33:375–381
 23. Hannan MT, Felson DT, Dawson-Hughes B, Tucker KL, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP (2000) Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 15:710–720
 24. Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, Ochi H (2000) Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Metab* 18:317–320
 25. Nyquist F, Halvorsen V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ (1999) Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta Orthop Scand* 70:212–216
 26. Sampson HW, Perks N, Champney TH, DeFee B 2nd (1996) Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1375–1384
 27. Sampson HW, Hebert VA, Booe HL, Champney TH (1998) Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1746–1753
 28. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58:424–430
 29. Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF (1989) Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 10:501–510
 30. Addolorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarini G (1997) Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin Exp Res* 21:962–967
 31. Bunout D, Gattas V, Iturriaga H, Perez C, Pereda T, Ugarte G (1983) Nutritional status of alcoholic patients: it's possible relationship to alcoholic liver damage. *Am J Clin Nutr* 38:469–473
 32. Hernandez-Munoz R, Ma XL, Baraona E, Lieber CS (1992) Method of acetaldehyde measurement with minimal artifactual formation in red blood cells and plasma of actively drinking subjects with alcoholism. *J Lab Clin Med* 120:35–41
 33. Savola O, Niemela O, Hillbom M (2004) Blood alcohol is the best indicator of hazardous alcohol drinking in young adults and working-age patients with trauma. *Alcohol Alcohol* 39:340–345
 34. Ammann P, Rizzoli R (2003) Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 14(Suppl 3):S13–18
 35. de Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M, Gueris J, Hott M, Modrowski D, Kuntz D, Miravet L, Ryckewaert A (1983) Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Orthop Relat Res* 179:107–115
 36. Schnitzler CM, Solomon L (1984) Bone changes after alcohol abuse. *S Afr Med J* 66:730–734
 37. Chappard D, Plantard B, Petitjean M, Alexandre C, Riffat G (1991) Alcoholic cirrhosis and osteoporosis in men: a light and scanning electron microscopy study. *J Stud Alcohol* 52:269–274
 38. Schnitzler CM, Mesquita JM, Shires R (2010) Cortical and trabecular bone microarchitecture and turnover in alcohol-induced chronic pancreatitis: a histomorphometric study. *J Bone Miner Metab* 28:456–467
 39. Sakurama K (1998) Effects of long-term ethanol administration on the kidneys, bones and muscles of mice. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 33:703–717
 40. Sampson HW, Chaffin C, Lange J, DeFee B 2nd (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res* 21:352–359
 41. Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, Iwaniec UT (2009) Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int* 20:1529–1538
 42. Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, Ho E, Iwaniec UT (2007) Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone* 41:175–180
 43. Chakkalakal DA, Strates BS, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McGuire MH (2001) Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair. *Tissue Eng* 7:161–177
 44. Wézman FH, Juknelis D, Frost N, Callaci JJ (2003) Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. *Alcohol* 31:87–92
 45. Nyquist F, Ljunghall S, Berglund M, Obrant K (1996) Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 19:51–54
 46. Sampson HW (1998) Alcohol's harmful effects on bone. *Alcohol Health Res World* 22:190–194
 47. Bikle DD (1993) Alcohol-induced bone disease. *World Rev Nutr Diet* 73:53–79
 48. Laitinen K, Lamberg-Allardt C, Tunninen R, Harkonen M, Valimäki M (1992) Bone mineral density and abstinence-induced changes in bone and mineral metabolism in noncirrhotic male alcoholics. *Am J Med* 93:642–650
 49. Broulik PD, Vondrova J, Ruzicka P, Sedlacek R, Zima T (2010) The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res* 59:599–604
 50. Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW (1998) Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 16:337–341
 51. Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD (2001) Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res* 16:589–594
 52. Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA Jr, Malik R, Arnsten JH (2008) Association between alcohol

- consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med* 121:406–418
53. Kanis JA, Johansson H, Oden A, McCloskey EV (2009) Assessment of fracture risk. *Eur J Radiol* 71:392–397
 54. Santori C, Ceccanti M, Diacinti D, Attilia ML, Toppo L, D'Erasmo E, Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Prastaro A, Carnevale V, Minisola S (2008) Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic abusers of alcohol. *J Endocrinol Invest* 31:321–326
 55. Lucas EG (1987) Alcohol in industry. *Br Med J* 294:460–461
 56. Cawthon PM, Harrison SL, Barrett-Connor E, Fink HA, Cauley JA, Lewis CE, Orwoll ES, Cummings SR (2006) Alcohol intake and its relationship with bone mineral density, falls, and fracture risk in older men. *J Am Geriatr Soc* 54:1649–1657
 57. Peris P, Guanabens N, Monegal A, Suris X, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Hernandez MV, Munoz-Gomez J (1995) Aetiology and presenting symptoms in male osteoporosis. *Br J Rheumatol* 34:936–941
 58. Gonzalez-Reimers E, Garcia-Váldecasas-Campelo E, Santolaria-Fernandez F, Milena-Abril A, Rodríguez-Rodríguez E, Martínez-Riera A, Perez-Ramírez A, Aleman-Valls MR (2005) Rib fractures in chronic alcoholic men: relationship with feeding habits, social problems, malnutrition, bone alterations, and liver dysfunction. *Alcohol* 37:113–117
 59. Nyquist F, Karlsson MK, Obrant KJ, Nilsson JA (1997) Osteopenia in alcoholics after tibia shaft fractures. *Alcohol Alcohol* 32:599–604
 60. Chakkalakal DA (2005) Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res* 29:2077–2090
 61. Melton LJ 3rd, Christen D, Riggs BL, Achenbach SJ, Muller R, van Lenthe GH, Amin S, Atkinson EJ, Khosla S (2010) Assessing forearm fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 21:1161–1169
 62. Peng TC, Kusy RP, Hirsch PF, Hagaman JR (1988) Ethanol-induced changes in morphology and strength of femurs of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 12:655–659
 63. Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N (1997) Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 21:809–816
 64. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL, McGuire MH, Donohue TM (2005) Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol* 36:201–214
 65. Brown EC, Perrien DS, Fletcher TW, Irby DJ, Aronson J, Gao GG, Hogue WJ, Skinner RA, Suva LJ, Ronis MJ, Hakkak R, Badger TM, Lumpkin CK Jr (2002) Skeletal toxicity associated with chronic ethanol exposure in a rat model using total enteral nutrition. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1132–1138
 66. Peppersack T, Fuss M, Otero J, Bergmann P, Valsamis J, Corvilain J (1992) Longitudinal study of bone metabolism after ethanol withdrawal in alcoholic patients. *J Bone Miner Res* 7:383–387
 67. Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF 2nd, Woods M, Suri M, Steiner J, LaPaglia N (1999) Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1534–1542
 68. Sampson HW, Spears H (1999) Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats is not completely reversible. *Alcohol Clin Exp Res* 23:324–327
 69. Sibonga JD, Iwaniec UT, Shogren KL, Rosen CJ, Turner RT (2007) Effects of parathyroid hormone (1–34) on tibia in an adult rat model for chronic alcohol abuse. *Bone* 40:1013–1020
 70. Stahre M, Naimi T, Brewer R, Holt J (2006) Measuring average alcohol consumption: the impact of including binge drinks in quantity-frequency calculations. *Addiction* 101:1711–1718
 71. Lamminpää A (1991) Hospitalizations due to poisonings in Finland—1978–1984. *J Toxicol Clin Toxicol* 29:111–129
 72. Menecier P, Girard A, Badila P, Rotheval L, Lefranc D, Menecier-Ossia L (2009) Acute alcoholic intoxication at the hospital: a clinical stake. A prospective study of 1 year in a general hospital. *Rev Med Interne* 30:316–321
 73. Poikolainen K (1984) Estimated lethal ethanol concentrations in relation to age, aspiration, and drugs. *Alcohol Clin Exp Res* 8:223–225
 74. Schoberl S, Nickel P, Schmutz G, Siekmeyer W, Kiess W (2008) Acute ethanol intoxication among children and adolescents. A retrospective analysis of 173 patients admitted to a university children hospital. *Klin Padiatr* 220:253–258
 75. Donovan JE (2009) Estimated blood alcohol concentrations for child and adolescent drinking and their implications for screening instruments. *Pediatrics* 123:e975–981
 76. Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K (2009) Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int* 84:474–484
 77. Sampson HW, Gallagher S, Lange J, Chondra W, Hogan HA (1999) Binge drinking and bone metabolism in a young actively growing rat model. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1228–1231
 78. Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH (2004) The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 28:182–191
 79. Wezeman FH, Juknelis D, Himes R, Callaci JJ (2007) Vitamin D and ibandronate prevent cancellous bone loss associated with binge alcohol treatment in male rats. *Bone* 41:639–645
 80. Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, Callaci JJ (2008) Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol* 42:649–656
 81. Gil-Martin E, Calvo P, Fernandez-Briera A (1998) Chronic alcoholization in rats by free-choice ingestion of a hydroalcoholic solution. *Food Chem Toxicol* 36:941–946
 82. Gonzalez-Reimers E, Garcia-Váldecasas-Campelo E, Santolaria-Fernandez F, Sanchez-Perez MJ, Rodríguez-Rodríguez E, Gomez-Rodríguez MA, Vina-Rodríguez J (2008) Prognostic value of nutritional status in alcoholics, assessed by double-energy X-ray absorptiometry. *Alcohol Alcohol* 43:314–319
 83. Khosla S, Atkinson EJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd (1996) Relationship between body composition and bone mass in women. *J Bone Miner Res* 11:857–863
 84. Pluijm SM, Visser M, Smit JH, Popp-Snijders C, Roos JC, Lips P (2001) Determinants of bone mineral density in older men and women: body composition as mediator. *J Bone Miner Res* 16:2142–2151
 85. Visser M, Kiel DP, Langlois J, Hannan MT, Felson DT, Wilson PW, Harris TB (1998) Muscle mass and fat mass in relation to bone mineral density in very old men and women: the Framingham Heart Study. *Appl Radiat Isot* 49:745–747
 86. Robling AG (2009) Is bone's response to mechanical signals dominated by muscle forces? *Med Sci Sports Exerc* 41:2044–2049
 87. Reid IR (2008) Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int* 19:595–606
 88. Cirmanova V, Bayer M, Starka L, Zajickova K (2008) The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* 57 (Suppl 1):S143–151
 89. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL (1999) Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140:1630–1638

90. Otaka M, Konishi N, Odashima M, Jin M, Wada I, Matsushashi T, Ohba R, Watanabe S (2007) Effect of alcohol consumption on leptin level in serum, adipose tissue, and gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 52:3066–3069
91. Maurel DB, Jaffre C, Rochefort GY, Aveline PC, Boisseau N, Uzbekov R, Gosset D, Pichon C, Fazzalari NL, Pallu S, Benhamou CL (2011) Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. *Bone Ahead of Publ*. doi:10.1016/j.bone.2011.06.001
92. Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ (2010) A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 25:1117–1127
93. Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang GJ (2003) Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 410:213–224
94. Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, Wang GJ, Balian G (2006) Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. *J Bone Joint Surg Am* 88(Suppl 3):148–154
95. Wezeman FH, Gong Z (2004) Adipogenic effect of alcohol on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1091–1101
96. Ronis MJ, Mercer K, Chen JR (2011) Effects of nutrition and alcohol consumption on bone loss. *Curr Osteoporos Rep* 9(2):53–59
97. Menagh PJ, Turner RT, Jump DB, Wong CP, Lowry MB, Yakar S, Rosen CJ, Iwaniec UT (2010) Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. *J Bone Miner Res* 25:757–768
98. Wezeman FH, Gong Z (2001) Bone marrow triglyceride accumulation and hormonal changes during long-term alcohol intake in male and female rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1515–1522
99. Turner RT, Rosen CJ, Iwaniec UT (2010) Effects of alcohol on skeletal response to growth hormone in hypophysectomized rats. *Bone* 46:806–812
100. Giuliani N, Girasole G, Vescovi PP, Passeri G, Pedrazzoni M (1999) Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 23:381–385
101. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102(Pt 2):341–351
102. Gong Z, Wezeman FH (2004) Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res* 28:468–479
103. Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RH, de Oliveira PT, Rosa AL (2008) Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol* 28:205–211
104. Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS (2005) Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 431:220–225
105. Lindholm J, Steiniche T, Rasmussen E, Thamsborg G, Nielsen IO, Brockstedt-Rasmussen H, Storm T, Hyldstrup L, Schou C (1991) Bone disorder in men with chronic alcoholism: a reversible disease? *J Clin Endocrinol Metab* 73:118–124
106. Howe KS, Iwaniec UT, Turner RT (2011) The effects of low dose parathyroid hormone on lumbar vertebrae in a rat model for chronic alcohol abuse. *Osteoporos Int* 22:1175–1181
107. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, Halloran BP (2002) Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 17:1570–1578
108. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, Majumdar S, Halloran BP, Clemens TL, Bikle DD (2007) IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 22:1329–1337
109. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, O'Loughlin PD, Morris HA (2007) Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 40:1517–1528
110. Griffiths HJ, Parantainen H, Olson P (1993) Alcohol and bone disorders. *Alcohol Health Res World* 17:299–304
111. Rico H (1990) Alcohol and bone disease. *Alcohol Alcohol* 25:345–352
112. Ványtghem MC, Danel T, Marcelli-Tourvieille S, Moriau J, Leclerc L, Cardot-Bauters C, Docao C, Carnaille B, Wemeau JL, D'Herbomez M (2007) Calcitonin levels do not decrease with weaning in chronic alcoholism. *Thyroid* 17:213–217
113. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM (2006) Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol* 50:291–296
114. Tentler JJ, LaPaglia N, Steiner J, Williams D, Castelli M, Kelley MR, Emanuele NV, Emanuele MA (1997) Ethanol, growth hormone and testosterone in peripubertal rats. *J Endocrinol* 152:477–487
115. Baran DT, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Parker G, Cruvant EM, Avioli LV (1980) Effect of alcohol ingestion on bone and mineral metabolism in rats. *Am J Physiol* 238:E507–510
116. Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, Brown C, Longcope C, Schatzkin A, Campbell WS, Franz C, Kahle L, Taylor PR (1994) The relation of reported alcohol ingestion to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women (Maryland, United States). *Cancer Causes Control* 5:53–60
117. Shankar K, Hidestrand M, Haley R, Skinner RA, Hogue W, Jo CH, Simpson P, Lumpkin CK Jr, Aronson J, Badger TM, Ronis MJ (2006) Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. *Endocrinology* 147:166–178
118. Ronis MJ, Wands JR, Badger TM, de la Monte SM, Lang CH, Calissendorff J (2007) Alcohol-induced disruption of endocrine signaling. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1269–1285
119. Chen JR, Lazarenko OP, Haley RL, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ (2009) Ethanol impairs estrogen receptor signaling resulting in accelerated activation of senescence pathways, whereas estradiol attenuates the effects of ethanol in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 24:221–230
120. Banfi G, Iorio EL, Corsi MM (2008) Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* 46:1550–1555
121. Syed FA, Ng AC (2010) The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep* 8:235–240
122. Silvain C, Chagneau-Derrode C (2006) *Metabolisme de l'éthanol. Hépatologie*
123. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M (2009) Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine* 76:514–518
124. Chen JR, Shankar K, Nagarajan S, Badger TM, Ronis MJ (2008) Protective effects of estradiol on ethanol-induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal-regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling cascade. *J Pharmacol Exp Ther* 324:50–59
125. Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, Kuijpers-Jagtman AM, Klein-Nulend J (2008) Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 369:1150–1154

126. Chavassieux P, Serre CM, Vergnaud P, Delmas PD, Meunier PJ (1993) In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone Miner* 22:95–103
127. Sun T, Deng Z, Zhu Y (2007) Effects of insulin-like growth factor 1 on inhibition of osteoblastic proliferation and function by ethanol. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 21:1338–1341
128. Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Borsari V, Rimondini L, Rimondini R, Carrassi A, Giardino R (2007) Intermittent exposure to ethanol vapor affects osteoblast behaviour more severely than estrogen deficiency does in vitro study on rat osteoblasts. *Toxicology* 237:168–176
129. Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ (1995) Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone* 16:143–147
130. Diez A, Puig J, Serrano S, Marinoso ML, Bosch J, Marrugat J, Mellibovsky L, Nogues X, Knobel H, Aubia J (1994) Alcohol-induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. *J Bone Miner Res* 9:825–831
131. Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, Fu Z, Yao Z, Qi Y, Keller ET (2000) Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest* 106:887–895
132. Calder JD, Buttery L, Revell PA, Pearse M, Polak JM (2004) Apoptosis—a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 86:1209–1213
133. Hurley MM, Martin DL, Kream BE, Raisz LG (1990) Effects of ethanol and acetaldehyde on collagen synthesis, prostaglandin release and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Bone* 11:47–51
134. Bonewald LF (2011) The amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 26:229–238
135. Burger EH, Klein-Nulend J (1999) Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res* 13:93–98
136. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21:1457–1469
137. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS (1998) The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13:1243–1250
138. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB (2002) Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 17:907–914
139. Lorenz R, Janicke-Lorenz J (1983) Electron microscopic observation on osteocytes of chronically alcoholized rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 102:118–122
140. Bonewald LF, Johnson ML (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42:606–615
141. Ko JY, Wang FS, Wang CJ, Wong T, Chou WY, Tseng SL (2010) Increased Dickkopf-1 expression accelerates bone cell apoptosis in femoral head osteonecrosis. *Bone* 46:584–591

Delphine MAUREL

Consommation chronique d'alcool, exercice physique et tissu osseux : modifications densitométriques, architecturales, biomécaniques et métaboliques chez le rat.

Résumé :

La consommation d'alcool a des effets sur le tissu osseux. L'alcoolisme est une des causes d'ostéoporose secondaire chez l'homme. Dans ce travail nous avons mené différentes expérimentations chez le rat afin d'étudier les effets d'une consommation chronique d'alcool combinée ou non à un entraînement aérobie sur le tissu osseux. Nous avons montré qu'une faible dose d'alcool administrée pendant une période courte peut avoir un effet positif sur la densité minérale osseuse et l'épaisseur trabéculaire. En revanche, la combinaison activité physique et consommation modérée d'alcool n'a pas d'effet additif sur la potentialisation du tissu osseux. Nous avons également démontré un effet dose de l'alcool indiquant des effets délétères majorés sur la densité minérale osseuse (DMO), la microarchitecture corticale et la résistance osseuse avec des apports croissants (25%, 30% et 35% v/v). La modification de DMO s'accompagne d'un changement de composition corporelle et d'une diminution de la leptine systémique. Cependant, le nombre d'adipocytes augmente dans la moelle osseuse. Nous avons mis en évidence dans ce modèle d'ostéoporose secondaire due à l'alcool une augmentation de l'apoptose des ostéocytes, corrélée à la diminution de la DMO et à l'augmentation de l'adiposité médullaire. Nous avons de plus mis en évidence une incorporation de lipides dans les ostéocytes, incorporation fortement corrélée à l'apoptose de ces cellules. Enfin, nos résultats montrent qu'un exercice physique régulier combiné à une consommation chronique et excessive d'alcool permet de prévenir les effets délétères de l'alcool sur les paramètres osseux (porosité corticale, épaisseur corticale) et limite la diminution de la DMO. Cette diminution est associée à une régulation de l'apoptose des ostéocytes.

Mots clés: consommation chronique d'alcool, exercice physique, densité minérale osseuse, microarchitecture osseuse, résistance osseuse, composition corporelle, leptine, lipides, ostéocyte.

Chronic alcohol consumption, physical exercise and bone tissue: densitometric, microarchitectural, biomechanic and metabolic changes in the rat.

Summary:

Heavy chronic alcohol consumption has deleterious effects on bone tissue. It is one of the major causes of secondary osteoporosis in men. In this work, we draw several experimentations to assess the effects of chronic alcohol consumption on bone, combined or not to an aerobic training in the rat. We showed that light to moderate chronic alcohol consumption during a short time lead to an increase of bone mineral density (BMD) and trabecular thickness, with no additive effects of physical exercise on bone tissue. When the alcohol doses were increased, we showed deleterious effects on BMD, microarchitecture, bone resistance with a dose effect with increasing alcohol doses (25%, 30% and 35% v/v): the more alcohol was concentrated and the more the bone parameters were decreased. The BMD decrease was associated with a change in body composition, and with a decrease in serum leptin. However, the number of lipid droplets in the bone marrow was increased dramatically. We demonstrated that there was a huge increase in osteocyte apoptosis with alcohol (35% v/v) in this alcohol-induced osteoporosis model, which was correlated with BMD and bone marrow adiposity. We have also shown that there was lipid incorporation in bone micro vessels and in osteocytes, which was correlated with osteocyte apoptosis. Lastly, we showed that when regular exercise was associated with heavy chronic alcohol consumption, the bone parameters were normal (trabecular, cortical thickness, femur length) and the BMD was less decreased compared to alcohol-fed and sedentary rats. These effects were associated with a regulation of osteocyte apoptosis.

Keywords: alcohol consumption, physical exercise, bone mineral density, bone microarchitecture, bone strength, body composition, leptin, fat, osteocyte.