Thèse de Doctorat

Mention : Biologie, Médecine et Santé
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

présentée à ***l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)***

de l'Université du Littoral Côte d'Opale

par

Laura ENTZ

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

La matrice extracellulaire des adipocytes médullaires : caractérisation et impact sur l'ostéoblastogénèse et la minéralisation dans le contexte de l'ostéoporose

Soutenue le 14 Juin 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Mme. Valérie GEOFFROY, Directrice de Recherche, Univ. de Nantes	**Rapporteur**
M Alain GUIGNANDON, Maître de Conférences, Univ. Jean Monnet	**Rapporteur**
Mme Delphine LOGEART, Directrice de Recherche, Univ. Paris-Diderot	**Présidente du jury**
M. Arnaud SCHERBERICH, Research Group Leader, CHU de Bâle	**Examinateur**
M. Gilles PASQUIER, Professeur, Univ. De Lille	**Directeur de thèse**
Mme Stéphanie LUCAS, Maître de Conférences, Univ. du Littoral Côte d'Opale	**Co-encadrante**
Mr Christophe CHAUVEAU, Professeur, Univ. du Littoral Côte d'Opale	**Invité**

Tout ce que nous avons à décider, c'est ce que nous devons faire du temps qui nous est imparti.

Gandalf, Le seigneur des anneaux : la communauté de l'anneau

Le gras, c'est la vie.

Karadoc, Kaamelott

Remerciements

Je remercie le **Dr Valérie Geoffroy**, directrice de recherche à l'université de Nantes et le **Dr Alain Guignandon**, Maitre de conférences à l'université Jean Monnet de Saint-Etienne, de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie ensuite le **Dr Delphine Logeart-Avramoglou**, directrice de recherche à l'université Paris-Diderot, et le **Dr Arnaud Scherberich**, Research Groupe Leader, à l'hôpital universitaire de Bâle, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie également d'avoir fait partie de mon comité de suivi individuel de thèse et pour vos nombreux conseils et votre bienveillance au cours de ces échanges.

Je tiens à remercier le **Pr Christophe Chauveau**, directeur du laboratoire MABLab, de m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de son équipe de recherche. Je te remercie également pour ta disponibilité et ta bienveillance tout au long de ce travail.

Je remercie le **Pr Gilles Pasquier**, chirurgien-orthopédiste au CHU de Lille, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse. Merci pour vos conseils et votre bienveillance lors de nos échanges.

Je remercie chaleureusement le **Dr Stéphanie Lucas**, maître de conférences à l'université du Littoral Côte d'Opale, pour avoir dirigé cette thèse. Je te remercie pour ta grande disponibilité, ton écoute, ta grande bienveillance et ton aide indispensable tout au long de cette thèse. J'ai énormément appris à tes côtés au cours de ces années, scientifiquement et humainement. Je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité, à plusieurs reprises, de présenter mes travaux de recherche lors de divers congrès et rassemblements scientifiques.

Je remercie la fondation **MSDAvenir** pour leur soutien à la recherche et particulièrement durant ces 4 derniers mois.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont été impliquées dans ce travail de thèse : le Dr **Guillaume Falgayrac**, merci pour toutes ces analyses Raman !, pour ta disponibilité et ton grand sens de la pédagogie pour m'expliquer les rudiments de la technique ; **Véronique Gaultier et Flore Miellot**, merci pour nos échanges, vos conseils et votre aide à l'animalerie pour manipuler les souris lorsque j'étais encore traumatisée par ma morsure de renard (toujours sans exagération), **Séverine Delplace**, pour avoir toujours eu la réponse à toutes mes questions techniques. Je remercie également les autres membres du laboratoire, la **partie Boulonnaise** et la **partie Lilloise**, pour nos nombreux échanges et votre aide dans la préparation de diverses

présentations. Je remercie aussi les membres du laboratoire BPA avec qui nous partageons les locaux. J'envoie toute ma force aux étudiants en thèse : Amélie, Viktorija, Federica, Jean-Guillaume et Tiffanie, courage !

Je remercie aussi l'**ANSES** pour m'avoir permis d'utiliser le spectrofluorimètre, appareil indispensable pour de nombreux aspects de ma thèse. Merci **Jérome** de m'avoir appris à l'utiliser et pour la bonne humeur que tu as amené au laboratoire lorsque tu étais encore en thèse.

Je remercie particulièrement : **Damien Leterme**, qui a gentiment accepté de me faire une place dans son bureau, merci pour ta bonne humeur et pour nos petites discussions autour d'une bière ou d'un barbecue. Je compte sur toi pour continuer à prendre soin de LA plante, tu sais que nos destins sont liés ! ; **Jean-Guillaume**, mon binôme en ce début de thèse. Je te remercie pour l'ambiance symphonique que tu apportais au labo et pour toutes tes références cinématographiques, que nous seuls comprenions ; **Véro**, **Bruno** et **Amélie**, mes « potos » du labo : merci pour votre bonne humeur, votre soutien, nos discussions aux « pauses thés », nos sorties, et votre soutien sans faille lors de ma maladresse et de mes chutes en public ! Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans vous.

Je tiens ensuite à remercier mes nombreux amis que j'ai parfois un peu moins vu durant cette thèse et que je me ferais une joie de retrouver :

Mes amis Nancéens et d'ailleurs, mis sur ma route au moment du BTS, de la fac, des stages, notamment **Jordan** et **Quentin** alias les Kikis, **Chloé Supergreen** la meilleure des meilleures, **Hilel**, ma binôme de Master, **Julien,** alias le roux, et ceux que j'ai oublié de citer (sorry), vous avez contribués à qui je suis aujourd'hui et sans vous je n'aurais pas pu mener à bien cette thèse.

Mes (anciens) collègues rémois et (actuels) amis : **Aurélie**, **Marie**, **Léa**, **Camille**, merci pour ces soirées entre filles et nos nombreux vocaux, **Fred, Fabien**, **Marius, Laetitia** merci.

Félix (fils de Christian, fils de Jean), merci pour ton soutien lors des derniers mois de cette thèse. Merci d'être la personne originale que tu es.

Merci aux « garçons » : **Adrien**, **Nico**, **Mario**, **GG**, **Thibault** et **Lolo**, mon gang de toujours, pour avoir été là et pour être là encore aujourd'hui, vous êtes les meilleurs et je vous aime <3

Enfin, je tiens à remercier ma famille, pour son soutien sans faille, présente dans les bons comme dans les mauvais moments : **Mes parents** qui m'ont encouragé et m'ont permis d'entreprendre ce que je souhaitais et **ma petite sœur** qui a su jouer le rôle de grande sœur pour m'aider à avancer durant les moments difficiles.

Table des matières

Liste des abréviations 1
Liste des figures 3
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 5
I. PHYSIOLOGIE OSSEUSE 5
1. Généralités 5
2. Le tissu osseux 6
a) Les cellules osseuses 7
i. Les cellules ostéoblastiques 7
ii. Les cellules ostéoclastiques 11
iii. Le remodelage osseux 12
b) La matrice osseuse 14
3. La moelle osseuse 14
a) Composition et rôle 14
b) Développement physiologique 15
II. LES ADIPOCYTES MEDULLAIRES 17
1. Généralités sur les tissus adipeux 17
2. Les spécificités des adipocytes médullaires 18
3. Origine des adipocytes médullaires 19
4. Interaction des adipocytes médullaires avec les autres cellules médullaires 20
a) Adipocytes médullaires et Cellules Souches Hématopoïétiques 20
b) Adipocytes Médullaires et remodelage osseux 22
i. Adipocytes Médullaires et Ostéoclastes 22
ii. Adipocytes Médullaires et Ostéoblastes 24
5. Développement physiopathologique de l'adiposité médullaire 26
a) Ostéoporose 26
i. L'ostéoporose liée au vieillissement 27
ii. L'ostéoporose liée à la ménopause 27
iii. L'ostéoporose liée à l'anorexie mentale 29
b) Ostéoporose et pathologies métaboliques 29
III. LE GLUCOSE ET LES COMPOSANTS MEDULLAIRES / OSSEUX 32
1. Généralités sur le métabolisme glucidique 33
2. Impact du glucose sur les CSM issues de la moelle osseuse 34

3. Impact du glucose sur les ostéoblastes 37
4. Impact du glucose sur les adipocytes médullaires 39
IV. LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE DES CELLULES MEDULLAIRES 41
1. Généralités sur la MEC 41
a) Rôles et fonctions de la MEC 41
b) Les composants de la MEC 42
i. La famille des collagènes 42
ii. Les protéoglycanes et glycosaminoglycanes 43
iii. Les glycoprotéines non collagéniques 44
iv. Les protéases 44
2. Remodelage de la MEC au cours de la différenciation des CSM 46
a) La MEC des CSM médullaires 46
b) La MEC des ostéoblastes 46
i. La partie minérale 47
ii. La partie organique 48
c) La MEC des adipocytes médullaires 51
3. Impact des MEC médullaires sur l'adhésion, la prolifération, la différenciation ostéoblastique et la minéralisation 55
a) Adhésion et prolifération 56
b) Différenciation ostéoblastique et minéralisation 56
OBJECTIFS DE LA THESE 58
CHAPITRE 1 : IMPACT DES MATRICES EXTRA-CELLULAIRE ADIPOCYTAIRES SUR L'OSTEOBLASTOGENESE ET LA MINERALISATION 59
I. INTRODUCTION 59
II. MATERIELS ET METHODES 61
1. Culture des cellules primaires et différenciation adipocytaire 61
2. Dévitalisation des MEC adipocytaires 62
3. Mesure de l'adhésion et prolifération des CSM sur support plastique et matrices 63
4. Différenciation ostéoblastique des CSM sur matrices adipocytaires 64
5. Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR 64
6. Dosage des protéines et migration sur gel 65
7. Mesure de l'activité ALP 66
8. Evaluation du niveau de minéralisation cellulaire par mesure de l'hydroxyapatite 66
9. Spectroscopie Raman 67

10. Tests statistiques 68
III. RESULTATS & DISCUSSION 68
1. Effet de la concentration du glucose sur la prolifération et la différenciation des CSM *in vitro* 68
2. Mise au point et validation de la méthode de dévitalisation des adipocytes médullaires *in vitro* 72
3. Adhésion et prolifération des cellules sur matrices 75
4. Impact des matrices sur l'ostéoblastogénèse et l'activité ALP 78
5. Quantité et qualité de minéralisation 86
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 90
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES MATRICES EXTRA-CELLULAIRE DES ADIPOCYTES MEDULLAIRES 133
I. INTRODUCTION 133
II. MATERIELS ET METHODES 135
1. Partie *in vitro* sur cellules en culture 135
a) Culture et différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) 135
b) Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR 135
c) Dosage des protéines et Western-Blot 136
d) Spectroscopie Raman 137
2. Partie *ex vivo* sur cellules isolées du modèle murin 138
a) Description du modèle 138
b) Isolement des adipocytes médullaires et extra-médullaires 138
c) Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR 139
3. Partie clinique sur les échantillons issus de patientes 140
a) Description du modèle 140
b) Isolement des adipocytes médullaires et des autres types cellulaires 141
c) RT-qPCR 142
4. Tests statistiques 143
III. RESULTATS & DISCUSSION 143
1. Validation de la qualité des échantillons 143
a) CSM, Adipocytes médullaires et Ostéoblastes humains cultivés in vitro 143
b) Echantillons issus du modèle murin d'ovariectomie 143
c) Echantillons issus du modèle clinique 146
2. Composition matricielle des adipocytes médullaires 147

a) Les collagènes 148
b) Les composants non collagéniques 153
c) Glycosaminoglycanes et protéoglycanes 156
d) Les composants matriciels des cellules osseuses 161
IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES 165
CHAPITRE 3 : EFFET D'UN TRAITEMENT HYPOGLYCEMIANT SUR LE MODELE MURIN D'OVARIECTOMIE 167
I. INTRODUCTION 167
II. MATERIELS ET METHODES 168
1. Description du modèle murin 168
2. Test d'intolérance au glucose (IPGTT) 168
3. Traitement à la dapagliflozine 169
4. Analyse globale de la composante osseuse 169
5. Analyse de la micro-architecture osseuse 169
6. Analyse de l'adiposité médullaire 170
7. Extraction des ARN des cellules médullaires, rétro-transcription et RT-qPCR 170
8. Tests statistiques 171
III. RESULTATS & DISCUSSION 171
1. Validation de l'instauration d'une intolérance au glucose après ovariectomie 171
2. Impact du traitement à la DAPA sur les paramètres glycémiques 172
3. Impact du traitement à la DAPA sur le tissu osseux et sa microarchitecture 173
4. Impact du traitement à la DAPA sur les adipocytes médullaires 177
IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES 181
CONCLUSION GENERALE 182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 184
ANNEXES 207

Liste des abréviations

ADAM	*A Disintegrin And Metalloproteinases*
ADAMTS	ADAM contenant des répétitions de type thrombospondine de type 1
AdipoQ	Adiponectine
ADNc	ADN complémentaire
Ad Med	Adiposité Médullaire
AGE	Produit de glycation avancé
ALP	Phosphatase Alcaline
AM	Adipocytes Médullaires
ARNm	ARN messager
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAT	Tissu adipeux dit « brun » (*Brown Adipose Tissue)*
BGLAP	Ostéocalcine
BMP	*Bone morphogenic protein*
BMU	Unité multicellulaire de base (*Basic Multicellular Unit)*
BRITE	Tissu adipeux dit « beige » (*Beige Adipose Tissue)*
BSA	Sérum d'Albumine Bovine
BSP	Bone Sialo Protéine
BV/TV	Volume d'os trabéculaire / Volume de tissu analysé
C/EBP	*CCAAT/enhancer-binding protein*
COL	Collagène
cMAT	Adipocytes médullaires « constitutifs »
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM	Cellules Stromales Mésenchymateuses
DAPA	Dapagliflozine
DMEM	Milieu Essentiel Minimum Modifié par Dulbecco
DMO	Densité Minérale Osseuse
DMP-1	*Dentin Matrix protein 1*
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ESM	Erreur Standard de la Moyenne
FN	Fibronectine
GAG	Glycosaminoglycane
GLUT	Transporteurs du glucose
HA	Hydroxyapatite
HAS	Hyaluronane synthase
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HG	« *High-Glucose* » : Concentration à 25 mM de glucose
HOMA	HOmeostasis Model Assessment
IGF-1	*Insulin-like growth factor*
IHC	ImmunoHistoChimie
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IPGTT	Test de tolérance au glucose intrapéritonéal
ITG	Intégrine
LAMB1	Laminine
LDH	Lactate Déshydrogénase

LG	« *Low Glucose* » : Concentration à 5 mM de glucose
LGM	« *Low Glucose Mannitol* » : Concentration à 5 mM de glucose et 25 mM de mannitol
MCP-1	Protéine Chimio-attractive des monocytes de type 1
MEC	Matrice Extra-cellulaire
MEC_{AM} LG	MEC adipocytaire générée en LG
MEC_{AM} HG	MEC adipocytaire générée en HG
MEPE	*Matrix Extra-cellular Phosphoglycoprotein*
MGP	Matrix-Gla-Protéine
MMP	Métalloprotéase
OB	Ostéoblaste
OC	Ostéoclaste
OCN	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine
OVX	Ovariectomie
PBS	Tampon Phosphate Salin
PG	Protéoglycane
Pi	Phosphate inorganique
POSTN	Périostine
PPAR	Récepteurs Activés par les Prolifétateurs de Peroxysomes (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*)
PPi	PyroPhosphate inorganique
PTH	Hormone ParaThyroïdienne
RANKL	*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*
RECK	*REversion-inducing Cys-rich protein with Kazal motifs*
rMAT	Adipocytes médullaires « régulés »
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
SCAT	Tissu Adipeux Sous-Cutané
SGLT	co-transporteur glucose / sodium
SLRP	Petits PG riches en leucine (*Small Leucine-rich Proteoglycan)*
SPARC	Ostéonectine
SPOCK	Testicane
SPP1	Ostéopontine
SVF	Sérum de veau fœtal
T2D	Diabète de type 2
TA	Tissu adipeux
TGF-β1	*Transforming growth factor-β1*
TIMP	*Tissus Inhibitor of Metalloproteinases*
TRAP	Phosphatase Acide Tartrate-Résistante
UCP-1	Protéine découplante 1 (*Uncoupling protein 1)*
VAT	Tissu Adipeux Viscéral
VCAN	Versicane
WAT	*White Adipose Tissue*

Liste des figures

Figure 1 : Structure osseuse de l'os long : focus sur la structure des épiphyses et de la diaphyse 6
Figure 2 : Etapes de différenciation des ostéoblastes 7
Figure 3 : Action de l'ostéocalcine (OCN) au niveau de l'os et plus généralement au niveau de l'organisme 9
Figure 4 : Etapes de différenciation des ostéocytes 10
Figure 5 : Action de FGF-23 sécrétée par les ostéocytes en dehors du tissu osseux 11
Figure 6 : Différenciation des ostéoclastes 12
Figure 7 : Remodelage osseux 13
Figure 8 : Composants cellulaires de la moelle osseuse 15
Figure 9 : Evolution de la composition médullaire au cours de la croissance et du vieillissement 16
Figure 10 : Conversion de la moelle au niveau des os 16
Figure 11 : Rôle des adipocytes médullaires dans l'ostéoclastogénèse via l'expression de RANKL 22
Figure 12 : Impact des AM sur le remodelage osseux 25
Figure 13 : Evolution du volume adipocytaire (AV) et du volume osseux (BV) avec l'âge 27
Figure 14 : Ostéoporose liée à la diminution du taux d'œstrogènes 28
Figure 15 : Mécanismes cellulaires et moléculaires induisant une atteinte de l'architecture osseuse chez les patients diabétiques 31
Figure 16 : Corrélation entre l'adiposité médullaire et le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) chez les patients diabétiques (T2DM) et non diabétiques (non-T2DM) 32
Figure 17 : Rôle des transporteurs au niveau du rein 33
Figure 18 : Fonctions de la matrice extra-cellulaire 42
Figure 19 : Processus de minéralisation 47
Figure 20 : Diagramme de la mise en place de la matrice extra-cellulaire des ostéoblastes au cours des différentes étapes intervenant dans leur différenciation : la prolifération, la maturation de la MEC et la minéralisation (Col-1 : collagène de type I, ALP : phosphatase alcaline, BSP : Bone Sialo Protéine, OPN : ostéopontine, OSC : ostéocalcine) 48
Figure 21 : Mise en place des fibrilles de collagènes 49

Figure 22 : Composition de la matrice extra-cellulaire au niveau de la moelle osseuse d'un os long d'après des images d'immunofluorescence obtenues de modèles humain et murin 52
Figure 23 : Composition de la matrice extra-cellulaire au cours de la différenciation adipogénique de CSM issues de la moelle osseuse évaluée par IHC 53
Figure 24 : Impact de la matrice extra-cellulaire sur l'ostéogénèse 57

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. PHYSIOLOGIE OSSEUSE

1. Généralités

Le squelette assure plusieurs fonctions : il fournit un soutien structurel au reste du corps permettant la posture mais également le mouvement et la locomotion, tout en protégeant les organes. De plus, il maintient l'homéostasie minérale et l'équilibre acido-basique mais sert aussi de réservoir de facteurs de croissance et de cytokine. Il est le siège de l'hématopoïèse au sein de la moelle osseuse (Clarke, 2008) et assure un rôle endocrinien. Enfin, le squelette intervient dans la croissance et le vieillissement squelettiques.

Il est composé de 206 os au total, classés en 4 catégories en fonction de leur forme et de leur taille. On distingue : les os longs, les os courts, les os plats (ou larges) et les os sésamoïdes ou irréguliers. Les os longs, comme indiqué, sont plus longs que larges / épais. Ils se situent au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Les os courts, dont les trois dimensions sont de même ordre, se situent au niveau du carpe et du tarse. Les os plats, possédant 2 faces et des bords, se situent au niveau du crâne et de la cage thoracique. Enfin, les os irréguliers concernent principalement les vertèbres (Clarke, 2008).

Les os longs se décomposent en 3 parties : les épiphyses, les métaphyses et la diaphyse. Les extrémités, appelées épiphyses, possèdent des surfaces articulaires cartilagineuses qui permettent le mouvement et l'articulation. Elles sont constituées d'os spongieux / trabéculaires comparable à un véritable labyrinthe de travées osseuses qui délimitent des espaces inter communicants dans lesquels est retrouvée la moelle osseuse. Directement sous les épiphyses, les métaphyses servent de zone de jonction avec la diaphyse, la partie centrale de l'os long, constituée d'une fine couche d'os compact / cortical qui lui confère un maximum de résistance. En dehors des zones articulaires, l'os est tapissé d'une couche externe qu'on appelle le périoste. Il est principalement composé d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, permet l'insertion des tendons et des muscles et contribue à l'innervation, à la croissance et à la cicatrisation de l'os. Par opposition, l'endoste, couche interne de l'os, est composé d'une unique couche de cellules qui tapissent également les travées osseuses. La diaphyse renferme le canal médullaire dans lequel évolue la moelle osseuse (**Figure 1**).

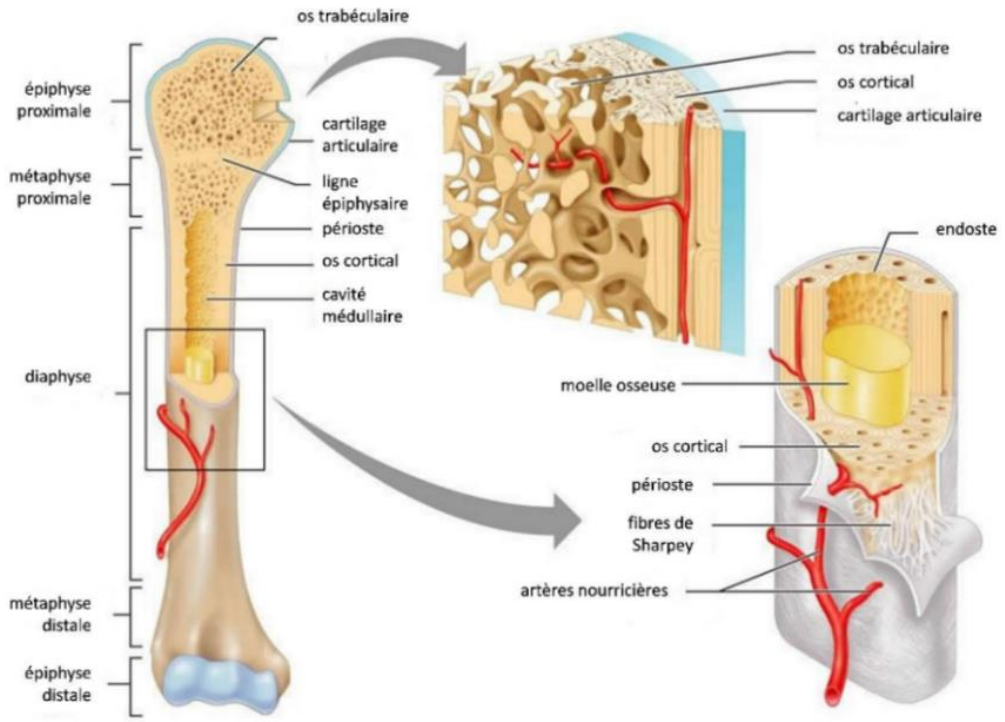


Figure 1 : Structure osseuse de l'os long : focus sur la structure des épiphyses et de la diaphyse

Comme déjà évoqué, on retrouve au sein des os, de l'os cortical et de l'os trabéculaire. L'os cortical représente 80 % de la masse osseuse squelettique tandis que l'os trabéculaire représente 20 % de la masse osseuse squelettique dont les 4/5ème sont situés au niveau des os longs, des vertèbres et des os plats (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

L'os cortical est composé d'unités cylindriques, parallèles à l'axe de l'os, appelées ostéons ou système de Havers. Au centre de ces unités se situe un canal central ou canal de Havers, relié perpendiculairement à des canaux de Volkmann. Ce réseau canaliculaire contient des nerfs et des vaisseaux qui permettent d'apporter des nutriments au tissu osseux. Ces canaux constituent la majorité de la porosité de l'os cortical qui est un os très compact. L'os trabéculaire à l'inverse est très poreux et est composé de travées osseuses entre lesquelles évolue la moelle osseuse.

2. Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé en perpétuel renouvellement grâce à l'action de plusieurs cellules.

a) Les cellules osseuses

Les cellules osseuses assurent le remodelage permanent du tissu. Il existe trois types de cellules ostéoformatrices et un type de cellules ostéorésorbantes.

i. Les cellules ostéoblastiques

Les cellules ostéoblastiques sont des cellules ostéoformatrices issues de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) présentes dans la moelle osseuse. La différenciation en ostéoblastes matures (OB) se déroulent en plusieurs phases : l'engagement dans la voie de différenciation (commitment) et la prolifération, la production et maturation de la matrice extra-cellulaire et enfin la minéralisation. Une étude transcriptomique réalisée sur des CSM humaines cultivées en milieu de différenciation ostéogénique met en évidence l'expression de divers gènes aux différents temps mesurés : 4 jours (phase de prolifération), 14 jours (phase de maturation) et 21 jours (phases de minéralisation). Parmi l'ensemble de ces gènes, on retrouve des marqueurs ostéoblastiques déjà bien décrits et des facteurs de transcription (Kulterer *et al.*, 2007) (**Figure 2**).

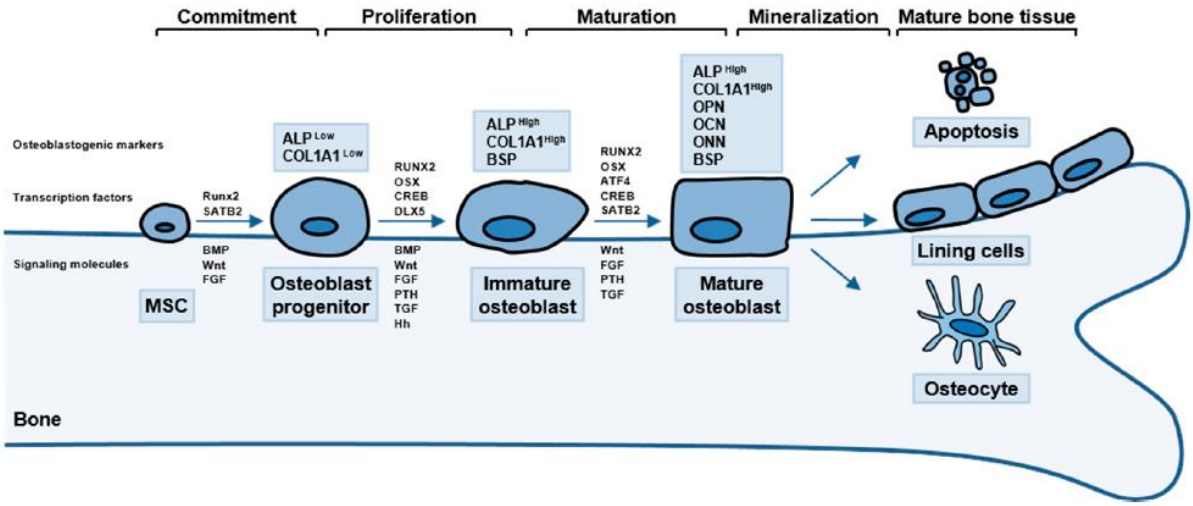


Figure 2 : Etapes de différenciation des ostéoblastes
(Amarasekara *et al*., 2021)

L'engagement des CSM dans la voie de différenciation ostéoblastique est principalement contrôlé par le facteur de transcription Runx2. Ce facteur de transcription est essentiel pour l'ossification (endochondrale et intramembranaire) qui ne peut pas se dérouler en son absence (Komori *et al.*, 1997). Après leur engagement, les cellules entrent dans une phase de prolifération durant laquelle elles expriment des ARNm de marqueurs ostéoblastiques tel que la phosphatase alcaline (ALP) et le collagène de type I. Lors de la phase de maturation, les

ostéoblastes sécrètent l'ALP et du collagène de type I. Durant ces phases, de l'engagement à la maturation, l'expression de Runx2 est nécessaire car il régule l'expression génique : de l'ostéopontine et de l'ostéonectine. Ces protéines sont sécrétées durant la phase de maturation et de minéralisation, de même que la BSP (Bone Sialo-Protein) et l'ostéocalcine. L'expression et l'action de ces molécules, qui seront plus précisément décrites dans la *partie IV.2.b), page 50*, aboutissent à la minéralisation de la matrice osseuse (Rutkovskiy *et al.*, 2016). Ces différentes protéines sont considérées comme des marqueurs de différenciation, précoces ou tardifs.

Plusieurs voies de signalisation interviennent dans la différenciation ostéoblastique. La voie de signalisation Wnt joue un rôle primordial dans le remodelage osseux. Wnt est une famille de glycoprotéines dont les membres activent trois cascades de signalisation : la voie canonique Wnt / β-caténine, la voie non canonique Wnt / Ca^{2+} et la voie non canonique Wnt / polarité plane. La voie de signalisation canonique joue un rôle capital dans la prolifération et la différenciation ostéoblastique. En effet, la fixation d'un ligand Wnt sur des récepteurs spécifiques permet l'expression de gènes essentiels pour l'ostéoblastogénèse, dont Runx2 et Osterix, grâce à la β-caténine (Sadie-Van Gijsen *et al.*, 2013). La voie non canonique Wnt / Ca^{2+} permet, entre autres, d'augmenter le niveau de calcium intracellulaire et d'activer divers facteurs de transcription. La voie non canonique Wnt / polarité plane module l'organisation du cytosquelette influant sur les mouvements et la polarité cellulaires (Westendorf *et al.*, 2004). On retrouve également des facteurs de croissance comme le TGF-β (Transforming Growth Factor β-1) et ceux de la famille des BMP (*Bone Morphogenic Protein*) ainsi que des hormones dont la vitamine D3 et l'hormone parathyroïdienne (PTH).

Au moment de la minéralisation, les ostéoblastes sont considérés comme **matures**. Ce sont alors des cellules mononucléées de formes cuboïdes qui possèdent de nombreux prolongements. Ils forment une monocouche à la surface du tissu osseux (Qiu *et al.*, 2019) et représentent 5% des cellules du tissu osseux (Capulli *et al.*, 2014). Ils ont trois fonctions principales : synthétiser la matrice osseuse organique, assurer sa minéralisation et communiquer avec les ostéoclastes afin de réguler le remodelage osseux (Capulli *et al.*, 2014). De plus, les ostéoblastes jouent un rôle endocrinien par la sécrétion de diverses hormones dont l'ostéocalcine (OCN) (**Figure 3**).

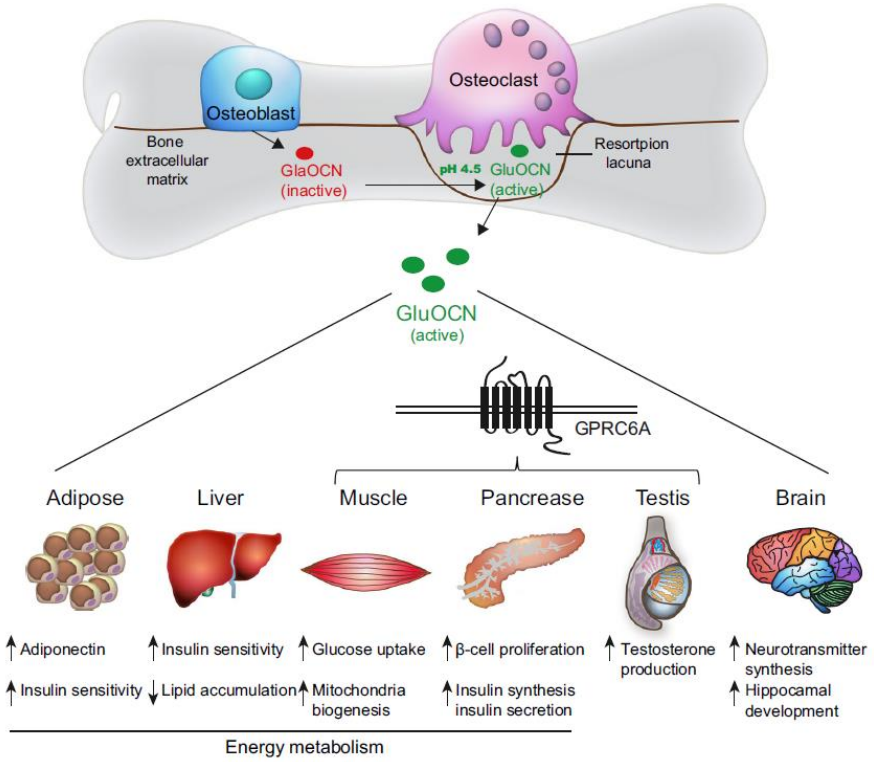


Figure 3 : Action de l'ostéocalcine (OCN) au niveau de l'os et plus généralement au niveau de l'organisme
(Y. Han *et al.*, 2018)

L'ostéocalcine est d'abord synthétisée comme une pro-hormone par les OB puis elle est carboxylée (GlaOCN) ce qui augmente son affinité pour les ions calciques Ca^{2+} et l'hydroxyapatite induisant son incorporation dans la matrice osseuse où elle représente la majorité des composants matriciels non-collagéniques. Au cours de sa sécrétion dans l'espace extra-cellulaire, elle peut être décarboxylée (GluOCN) par le faible pH généré par les ostéoclastes durant la résorption osseuse ce qui diminue son affinité pour la matrice osseuse et favorise son entrée dans la circulation sanguine (Y. Han *et al.*, 2018). Elle régule ensuite les activités métaboliques de plusieurs types cellulaires dont les adipocytes, les hépatocytes, les cellules musculaires et les cellules β du pancréas, comme démontré dans un modèle d'inactivation de l'ostéocalcine chez la souris (Lee *et al.*, 2007). Elle stimule notamment l'expression de l'adiponectine par les adipocytes, favorise la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose et a donc un rôle bénéfique sur le métabolisme énergétique. Chez l'Homme, en revanche, le rôle de l'ostéocalcine et ses bienfaits sur le métabolisme énergétique restent discuté (Mizokami *et al.*, 2017).

Les ostéoblastes matures ont trois devenirs différents : 1/ se faire totalement emmurer par la matrice qu'ils synthétisent et ainsi devenir des ostéocytes, 2/ se transformer en ostéoblastes

inactifs pour devenir des cellules bordantes ou 3/ entrer en apoptose (Amarasekara *et al.*, 2021; Franz-Odendaal *et al.*, 2006).

Les **ostéocytes** représentent 90 à 95% des cellules du tissu osseux (Boukhechba *et al.*, 2009; Capulli *et al.*, 2014) et proviennent de la différenciation des ostéoblastes matures emprisonnés dans la matrice qu'ils ont produite (Franz-Odendaal *et al.*, 2006) (**Figure 4**).

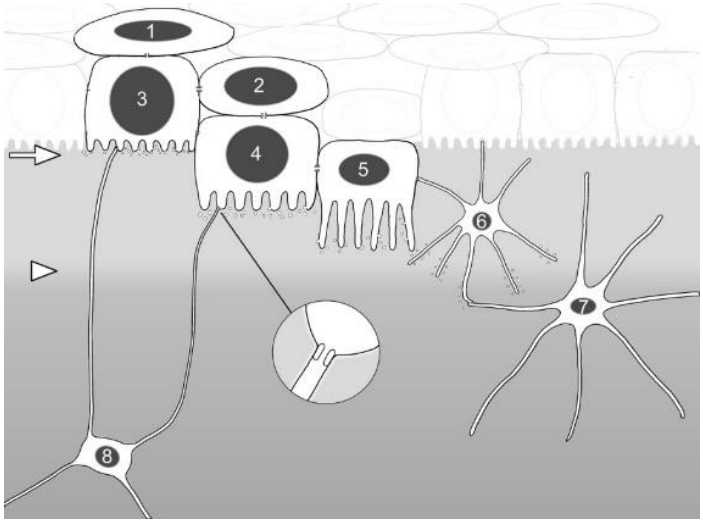


Figure 4 : Etapes de différenciation des ostéocytes
(Franz-Odendaal *et al.*, 2006)
1. Pré-ostéoblaste, 2. Ostéoblaste immature, 3. Ostéoblaste mature, 4. Ostéocyte ostéoblastique (pré-ostéocyte de type I), 5. Ostéocyte-ostéocyte (pré-ostéocyte de type II), 6. Pré-ostéocyte de type III, 7. Ostéocyte jeune, 8. Ostéocyte vieux.

Les ostéocytes, de forme ovale et allongée, se situent dans une logette appelée ostéoplaste. Ils émettent une multitude de prolongements leur permettant de communiquer entre eux et avec les autres types cellulaires (Amarasekara *et al.*, 2021; Capulli *et al.*, 2014). Parallèlement à leur changement de phénotype, ces ostéocytes expriment et produisent de nouveaux marqueurs, notamment DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1), MEPE (Matrix Extra-cellular Phosphoglycoprotein) et SOST (sclérostine). DMP-1 et MEPE sont décrits comme des inhibiteurs de la minéralisation tandis que la sclérostine inhibe la formation osseuse via l'inactivation de la voie Wnt (X. Lin *et al.*, 2020).

Les ostéocytes assurent plusieurs fonctions. D'une part, ils sont mécano-sensibles, c'est-à-dire qu'ils convertissent un signal mécanique en un signal chimique afin de réguler le remodelage osseux. Cette régulation découle de divers mécanismes et communications avec les ostéoblastes et les ostéoclastes (Capulli *et al.*, 2014). D'autre part, les ostéocytes participent à

l'homéostasie phospho-calcique et au maintien de la matrice osseuse via la résorption de l'os grâce à leur activité phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) (Bianco *et al.*, 1988), initialement décrite comme une enzyme ostéoclastique. Enfin, ces cellules possèdent des propriétés endocriniennes en intervenant notamment dans le métabolisme du phosphate en dehors du tissu osseux via la sécrétion de FGF-23 (**Figure 5**). Cette hormone inhibe la réabsorption du phosphate et la production de vitamine D3 au niveau rénal (Y. Han *et al.*, 2018).

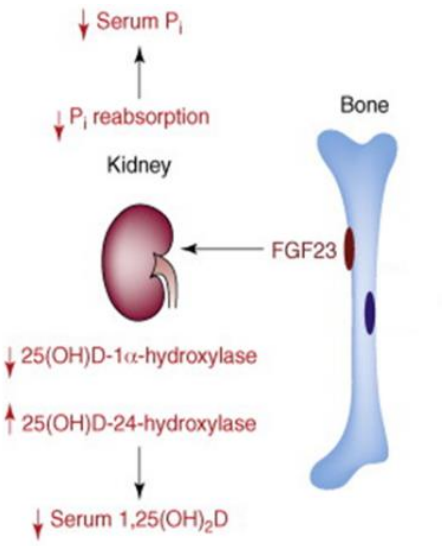


Figure 5 : Action de FGF-23 sécrétée par les ostéocytes en dehors du tissu osseux
D'après (Fukumoto & Martin, 2009)

Les **cellules bordantes** sont des ostéoblastes « au repos » de forme ovale, pauvres en organites (Miller & Jee, 1987). Ces cellules se situent à la surface du tissu osseux dans des zones non soumises au remodelage osseux. Elles communiquent entre elles et avec les ostéocytes via des jonctions communicantes et forment une barrière entre la moelle osseuse et le tissu calcifié. Elles interviennent dans le remodelage osseux de différentes façons : elles aident à la mise en place de l'activité ostéoclastique via la TRAP, elles compartimentent la zone de remodelage et peuvent, si besoin, se redifférencier en ostéoblastes pour assurer la formation osseuse (Miller & Jee, 1987). Cette différenciation est induite par des forces mécaniques ou par une stimulation à la PTH (Dobnig & Turner, 1995).

ii. Les cellules ostéoclastiques

Les ostéoclastes (OC) dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et plus précisément sont issus de la fusion de précurseurs myéloïdes mononucléés (**Figure 6**). Ces cellules, très volumineuses, possèdent plusieurs noyaux (Roodman, 1999). Elles se déplacent à la surface du tissu osseux et créent des sites de résorption participant au remodelage osseux.

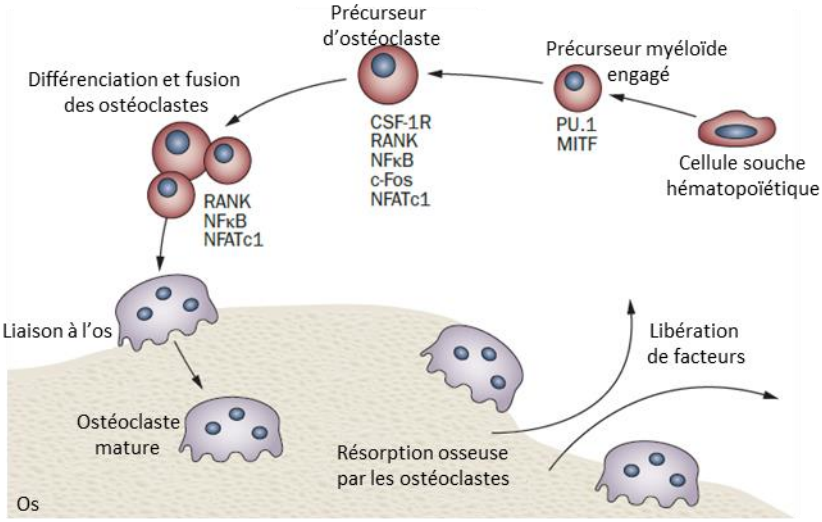


Figure 6 : Différenciation des ostéoclastes
D'après (Edwards & Mundy, 2011)

La résorption osseuse par l'ostéoclaste se déroule en plusieurs étapes : différenciation, liaison, acidification et production / activation de protéases. Brièvement, après sa différenciation complète, l'ostéoclaste se fixe à la surface osseuse grâce à des intégrines (ITG). Puis, ils libèrent des ions H^+ et Cl^- au niveau du futur site de résorption, entre l'ostéoclaste et la surface osseuse, pour y diminuer le pH. Cette acidification est nécessaire pour l'activité des enzymes ostéoclastiques qui vont dégrader la matrice osseuse. Parmi les enzymes les plus importantes on retrouve la cathepsine K, des métalloprotéases (MMP) et la TRAP, leurs rôles dans la résorption osseuse ne seront pas détaillés dans ce manuscrit (Edwards & Mundy, 2011).

iii. Le remodelage osseux

L'os est un tissu vivant et actif sensible aux forces mécaniques et à son micro-environnement qui peuvent altérer ses propriétés et son intégrité. Le remodelage osseux est important tout au long de la vie : il permet de remplacer l'os « âgé » et permet également d'assurer la réparation osseuse lors de fractures et ou de microfissures. Il est assuré par l'intervention séquentielle des ostéoclastes cellules ostéorésorbantes puis des ostéoblastes, cellules ostéoformatrices. En condition physiologique, il y a un équilibre entre la formation du tissu osseux et la résorption du tissu osseux. En condition physiopathologique, un déséquilibre de ces phases peut être observé comme dans le cas de l'ostéoporose par exemple, au cours de laquelle la résorption osseuse n'est pas compensée par la formation osseuse.

Le remodelage osseux consiste en une communication étroite entre les différents types cellulaires (**Figure 7**). Les cellules bordantes s'écartent de la zone à remodeler et sécrètent de la collagénase afin de digérer la matrice organique et non minéralisée. Les ostéoclastes et les ostéoblastes collaborent ensuite au niveau de la zone appelée unité multicellulaire de base (BMU, *Basic Multicellular Unit*). Durant ce remodelage, les cellules bordantes forment un « toit » au-dessus des cellules en action afin de compartimenter la zone de remodelage et l'isoler de la moelle osseuse. L'activité de cette BMU diffère entre l'os cortical et l'os trabéculaire, aboutissant à un remodelage plus actif dans l'os trabéculaire (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

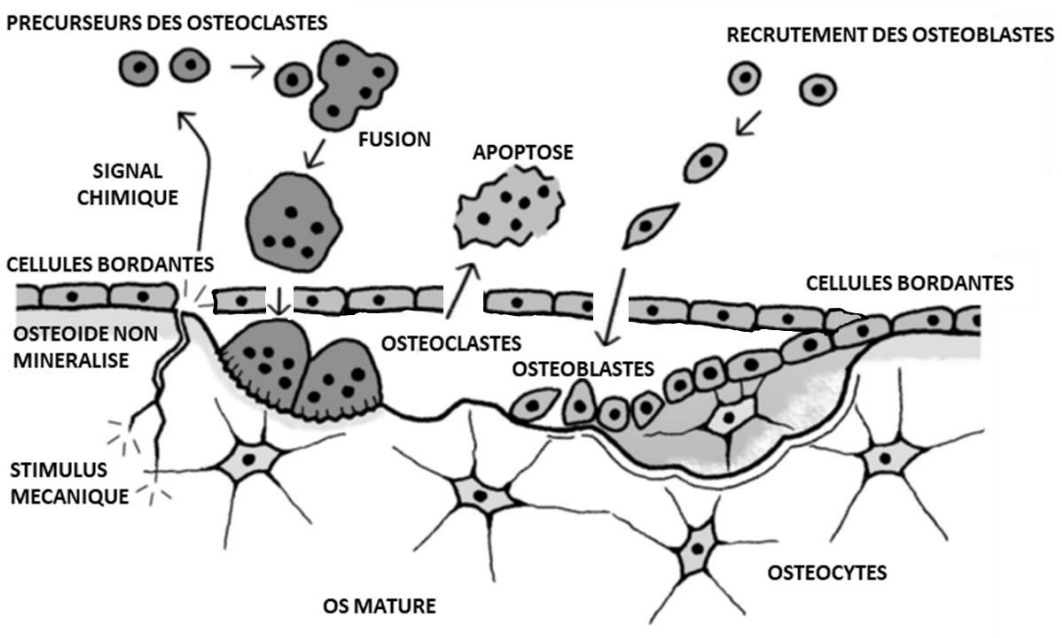


Figure 7 : Remodelage osseux
D'après (Ortner & Turner-Walker, 2003)

Cette phase de remodelage est contrôlée par des hormones et protéines sécrétées par les cellules osseuses et les CSH de la moelle osseuse. Il existe une régulation à la fois systémique et locale de la fonction des cellules osseuses.

La régulation locale est gérée par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont les acteurs majeurs du remodelage puisqu'ils régulent la différenciation et l'activité ostéoclastique via la production et libération de deux cytokines : M-CSF (Facteur de stimulation des colonies de monocytes) et RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*). Elles se fixent sur leur récepteur respectif, cFMS et RANK, à la surface des progéniteurs ostéoclastiques induisant la différenciation et la prolifération des ostéoclastes. À l'inverse, la

production d'ostéoprotégérine (OPG) par les ostéoblastes inhibe la différenciation et la prolifération des ostéoclastes en se liant à RANKL (Amarasekara *et al.*, 2021). Le ratio OPG / RANKL est un marqueur important de l'ostéoclastogénèse et permet de donner un indice sur l'état du remodelage dans certaines pathologies comme l'ostéoporose (Marie & Halbout, 2008).

La régulation systémique du remodelage est permise par la vascularisation de l'os. Ainsi, diverses molécules interviennent dont : la PTH qui régule l'homéostasie calcique et qui stimule la formation osseuse lorsque qu'elle est sécrétée de façon intermittente, alors qu'elle va stimuler la résorption osseuse lorsque qu'elle est sécrétée continuellement ; la vitamine D3 qui favorise la formation osseuse, les œstrogènes qui stimulent prolifération et la différenciation ostéoblastique ou encore le TGF-β qui stimule la formation osseuse (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

b) La matrice osseuse

La matrice osseuse, synthétisée par les ostéoblastes, est une structure organisée qui comporte une partie organique (20-30% de la masse osseuse) et une partie minérale (70-80 % de la masse osseuse). La partie organique confère une organisation et une élasticité à l'os tandis que la partie minérale lui apporte de la solidité et de la rigidité (Alford & Hankenson, 2006). La composition précise de cette matrice sera détaillée dans la *partie IV.2.b), page 46*, de ce manuscrit.

3. La moelle osseuse

a) Composition et rôle

La moelle osseuse est un tissu mou situé au sein des os. Elle est plus précisément retrouvée dans le canal médullaire de la diaphyse des os longs et entre les travées osseuses au niveau des épiphyses. Elle représente environ 5% du poids corporel (Hindorf *et al.*, 2010) et est considérée comme un des plus gros organes du corps humain.

Elle est composée : de CSH et de progéniteurs hématopoïétiques, qui ont la capacité de se différencier en cellules sanguines et en cellules immunitaires ; de cellules endothéliales et de CSM, capables de se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes ou en adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999) (**Figure 8**).

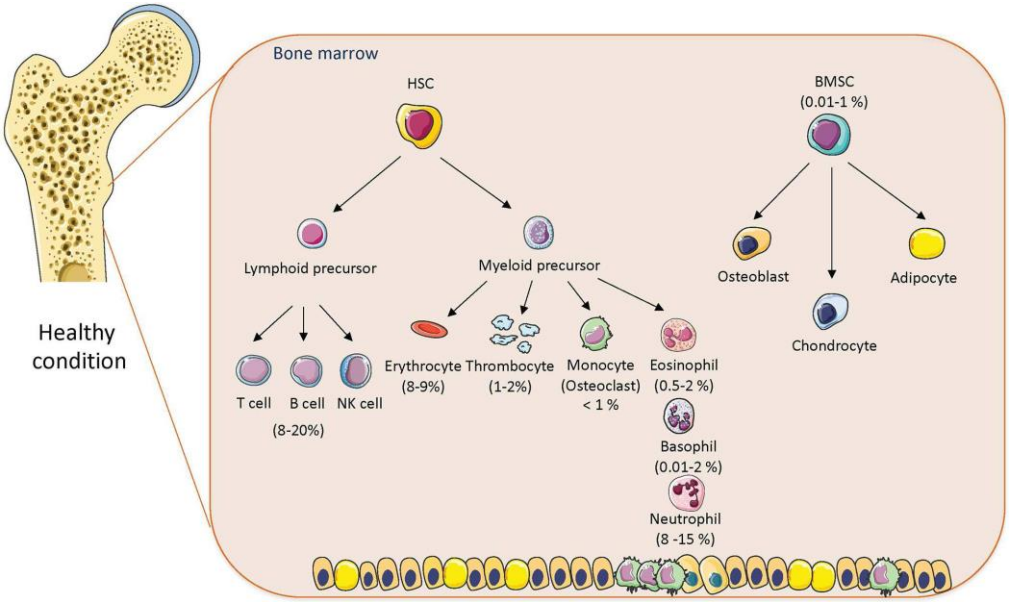


Figure 8 : Composants cellulaires de la moelle osseuse
(Benova & Tencerova, 2020)

Les CSH et les CSM partagent le même micro-environnement, appelé « niche », situé autour des vaisseaux sanguins et à la surface de l'endoste (Lee-Thedieck *et al.*, 2022). Ces niches garantissent le renouvellement des CSH et des CSM, leur prolifération et leur différenciation. Elles sont directement au contact d'autres cellules, dont les adipocytes médullaires et les ostéoblastes (Lee-Thedieck *et al.*, 2022)

La moelle osseuse était d'abord décrite comme un organe immunitaire (Zhao *et al.*, 2012). En effet, elle contient majoritairement des CSH, des cellules souches multipotentes capables d'auto-renouvellement, ce qui permet d'assurer le maintien du processus d'hématopoïèse tout au long de la vie (Osawa *et al.*, 1996). Par ailleurs, la moelle osseuse contient des CSM (0.1%), d'autres cellules souches multipotentes capables d'auto-renouvellement, qui ont des propriétés anti-inflammatoires par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Zhao *et al.*, 2012).

Depuis, d'autres rôles de la moelle osseuse sont décrits, comme son implication dans le remodelage osseux. En effet, les CSM sont capables de se différencier en ostéoblastes afin d'assurer la formation osseuse et les CSH se différencient en ostéoclastes pour assurer la résorption osseuse. Ces deux populations permettent d'établir une homéostasie osseuse.

b) Développement physiologique

La composition cellulaire de la moelle osseuse évolue tout au long de la vie. À la naissance, la moelle osseuse est composée à 60% de cellules hématopoïétiques et à 40% d'adipocytes, elle

est dite « rouge » en raison de sa couleur. La proportion d'adipocytes augmente durant la croissance et jusqu'à l'âge adulte (environ 25 ans). Ce processus correspond au remplacement de la moelle rouge par de la moelle osseuse jaune qui sera finalement composée à 95% d'adipocytes (Małkiewicz & Dziedzic, 2012) (**Figure 9**).

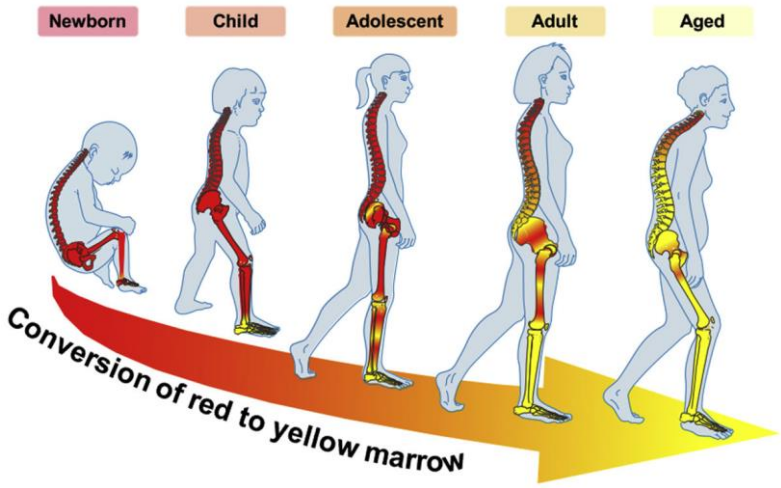


Figure 9 : Evolution de la composition médullaire au cours de la croissance et du vieillissement (Z. Li *et al.*, 2018)

La conversion débute dans la partie distale du squelette appendiculaire. Pour les os longs, la moelle rouge est d'abord remplacée au niveau des épiphyses puis au niveau de la diaphyse (Blebea *et al.*, 2007) (**Figure 10**). Au niveau du squelette axial, la conversion est plus tardive et la moelle jaune ne remplace pas intégralement la moelle rouge.

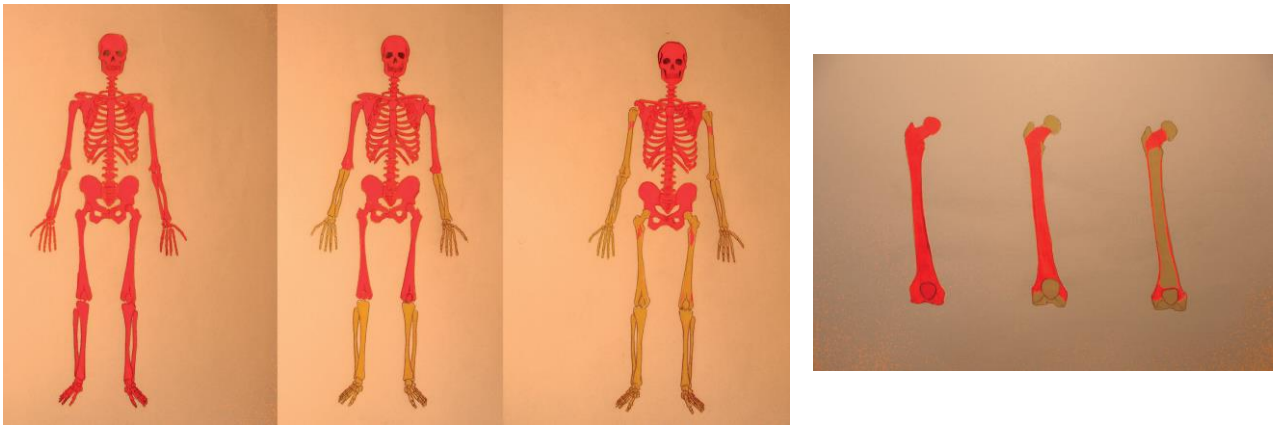


Figure 10 : Conversion de la moelle au niveau des os (Małkiewicz & Dziedzic, 2012)

II. LES ADIPOCYTES MEDULLAIRES

Initialement considéré comme un simple tissu de soutien, le rôle du tissu adipeux au sein de la moelle était peu étudié (Gimble *et al.*, 1996). Or, sa proximité avec les CSM et le tissu osseux, ainsi que son développement en font un nouveau tissu adipeux, appelé adiposité médullaire (Ad Med), d'intérêt pour la compréhension de pathologies osseuses.

1. Généralités sur les tissus adipeux

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif retrouvé chez tous les mammifères. Chez l'Homme, il représente environ 10 à 25 % de la masse d'une personne adulte, en fonction de l'âge, du sexe et de l'état de santé de l'individu (Gallagher *et al.*, 2000). On distingue différents dépôts de TA au sein de l'organisme qui diffèrent d'un point de vue morphologique et fonctionnel (Bukowska *et al.*, 2018) (**ANNEXE 1**).

Le **tissu adipeux blanc** (WAT pour White Adipose Tissue) est le site majeur de stockage d'énergie sous la forme de triglycérides et se situe principalement au niveau sous-cutané (SCAT, 85% de la masse graisseuse (Hardouin *et al.*, 2016)) mais aussi au niveau des organes viscéraux (VAT, 10% de la masse graisseuse (Hardouin *et al.*, 2016)) et dans d'autres sites anatomiques (Gesta *et al.*, 2007). Ces adipocytes sécrètent de nombreuses hormones et jouent un rôle dans l'homéostasie métabolique, les processus inflammatoires et l'homéostasie vasculaire (Trayhurn & Beattie, 2001). Parmi ces hormones, on distingue les adipokines « vraies » qui sont spécifiques des adipocytes telles que la leptine et l'adiponectine, et les autres hormones retrouvées dans les adipocytes et dans d'autres types cellulaires tels que la résistine, la visfatine, le TNF-α ou encore diverses interleukines (IL). Le **tissu adipeux brun** (BAT pour Brown Adipose Tissue) est présent en faible proportion chez les adultes dans des zones très localisées et est le site de la thermogénèse sans frisson (Gesta *et al.*, 2007). Ce processus consiste en une libération d'énergie afin de produire de la chaleur et est médié par la protéine découplante UCP-1 (uncoupling protein 1), un marqueur des adipocytes bruns. De nouveaux types d'adipocytes ont été décrits au cours de ces dernières années : les adipocytes beiges, composants du tissu adipeux BRITE (BR pour BRown et ITE pour whITE), qui sont localisés au niveau du WAT et qui expriment UCP-1, permettant d'assurer des fonctions thermogéniques (Y. Chen *et al.*, 2016) ; et les adipocytes roses localisés au niveau de la glande mammaire (Cinti, 2018).

Les **adipocytes médullaires** (AM) se situent au niveau de la moelle osseuse et représentent 5 % de la masse graisseuse d'un adulte sain (Hardouin *et al.*, 2016). L'étude des AM dans des modèles de souris et rats a permis de mettre en évidence deux populations d'AM : les adipocytes dits « constitutifs » (cMAT), localisés au niveau de la partie distale des membres et des vertèbres caudales, qui se développent rapidement après la naissance et les adipocytes dits « régulés » (rMAT), qui se développent tout au long de la vie et qui sont situés au niveau de la moelle rouge de la partie proximale des membres, dans les vertèbres lombaires et thoraciques, la hanche et les côtes (Scheller *et al.*, 2016). La différence entre ces deux types d'AM ne se limite pas à leur localisation. Les rMAT sont de petite taille, contiennent principalement des acides gras saturés et expriment peu les facteurs de transcription *C/EBPα* et *C/EBPβ* tandis que les cMAT sont de taille plus importante, contiennent davantage des acides gras insaturés et expriment fortement *C/EBPα* et *C/EBPβ*. De plus, les rMAT sont sensibles à la température et diminuent en volume lors d'une exposition au froid contrairement aux cMAT dont le volume reste stable (Scheller *et al.*, 2015). La présence de ces deux populations chez l'Homme reste à confirmer.

2. Les spécificités des adipocytes médullaires

Les adipocytes médullaires sont des adipocytes uniloculaires de plus petite taille que les adipocytes extra-médullaires (Miggitsch *et al.*, 2019). Les AM présentent un contenu en acides gras différent de celui des adipocytes sous-cutanés chez des sujets âgés : en effet, ils possèdent davantage d'acides gras saturés et moins d'acide gras insaturés. Cependant, ce contenu diffère également en fonction de la localisation des AM (fémorale ou tibiale par exemple) (Griffith *et al.*, 2009). De façon surprenante, les AM sont peu capables de lipolyse, c'est-à-dire de libération des acides gras à partir des triglycérides. La voie β-adrénergique, qui est la voie prédominante stimulant la lipolyse des TA extra-médullaires, est bien présente dans les AM. Toutefois, sa stimulation dans les AM entraîne très peu de libération des acides gras et du glycérol comme démontré *in vitro* (S. Lucas *et al.*, 2013), chez la souris (Scheller *et al.*, 2019) et chez l'Homme (Attané *et al.*, 2020).

Le niveau d'expression des cytokines et des adipokines diffère entre les différents types d'adipocytes. Plusieurs études mettent ainsi en évidence un faible niveau de synthèse des adipokines typiques telles que l'adiponectine et la leptine par les AM en comparaison des adipocytes sous-cutanés chez l'Homme (Miggitsch *et al.*, 2019; Poloni *et al.*, 2013) et la souris

(L. F. Liu *et al.*, 2011; Tencerova *et al.*, 2018). Ces deux adipokines ont particulièrement retenu l'attention par leurs effets sur la masse osseuse : elles inhibent la formation osseuse par voie systémique, mais localement favorisent l'ostéoblastogénèse et régulent l'ostéoclastogénèse (Sadie-Van Gijsen *et al.*, 2013). Le profil de cytokines produit par les AM et les adipocytes extra-médullaires diverge également et semble dépendant du contexte physiopathologique. Ainsi, comparé aux adipocytes extra-médullaires, les AM présentent un profil plutôt pro-inflammatoire dans le contexte du vieillissement (Gasparrini *et al.*, 2009).

3. Origine des adipocytes médullaires

Les AM dérivent des CSM présentes dans la moelle osseuse (Pittenger *et al.*, 1999) qui expriment des marqueurs différents des progéniteurs des TA extra-médullaires (Okla & Kassem, 2021; Poloni *et al.*, 2013). Cependant, de nombreuses études mettent en évidence une grande hétérogénéité des CSM au sein de la moelle osseuse. En effet, plusieurs populations de CSM ont été identifiées en fonction de certains marqueurs et présentent des potentiels de différenciations différents et plus restreints (Tencerova & Kassem, 2016). Par exemple, les CSM exprimant le récepteur de la leptine ont la capacité de se différencier en adipocytes, tandis que les CSM exprimant la Gremline ne peuvent se différencier qu'en ostéoblastes et chondrocytes.

Comme pour les adipocytes extra-médullaires, les facteurs de transcription clés sont PPARγ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), surtout l'isoforme PPARγ2 qui est spécifique de l'adipocyte, et C/EBPα/β (*CCAAT/enhancer-binding protein*). L'expression de PPARγ, induite par C/EBPβ, est nécessaire pour l'initiation de l'adipogénèse et pour le maintien de la différenciation dans les adipocytes matures. Son rôle a été confirmé par le modèle murin dépourvu du gène PPARG. L'expression de PPARγ induit l'expression de C/EBPα qui permet de maintenir l'expression de PPARγ au cours du temps et qui active certains gènes impliqués dans l'assimilation du glucose stimulée par l'insuline. Ces facteurs constituent ainsi une boucle de régulation nécessaire à la différenciation et maturation adipogéniques (Sadie-Van Gijsen *et al.*, 2013).

La différenciation adipocytaire des CSM est régulée par divers facteurs. D'une part, des facteurs locaux, tels que des facteurs de la voie Wnt, inhibent l'adipogénèse. Cette voie de différenciation est également contrôlée par des hormones dont : les glucocorticoïdes qui, à forte concentration, induisent une augmentation de l'expression de PPARγ et de C/EBPα par la sous-

régulation de la voie Wnt (la dexaméthasone, glucocorticoïde de synthèse, est d'ailleurs essentielle pour la différenciation des CSM *in vitro*) et par la PTH, qui favorise l'ostéoblastogénèse et inhibe l'adipogénèse (Rharass & Lucas, 2018). D'autres facteurs interviennent également dans la régulation de la différenciation.

Concernant le rôle de ces AM, de nombreuses hypothèses ont été avancées au cours de ces 25 dernières années (Gimble *et al.*, 1996). Il se trouve que les adipocytes médullaires sont capables d'interagir avec leur environnement.

4. Interaction des adipocytes médullaires avec les autres cellules médullaires

Les adipocytes médullaires sont des cellules actives qui, par leur propriétés endocrines et paracrines, peuvent intervenir dans le remodelage osseux et l'hématopoïèse, exercer des effets systémiques sur le métabolisme et peuvent même moduler la croissance tumorale et les métastases osseuses (Cawthorn & Scheller, 2017).

a) Adipocytes médullaires et Cellules Souches Hématopoïétiques

Comme décrit précédemment, une augmentation physiologique de l'Ad Med au sein de la moelle osseuse est observée au cours du vieillissement. Cette évolution est associée à une baisse de l'hématopoïèse (Tuljapurkar *et al.*, 2011) laissant penser que les AM perturbent la différenciation et l'activité des CSH.

Naveira *et al.* décrivent une régulation négative de l'hématopoïèse par les AM. En effet, en comparant différentes régions osseuses chez la souris, ils démontrent que la quantité de CSH et de progéniteurs est diminuée quand la zone est enrichie en AM. De plus, la régénération des CSH après transplantation de moelle est améliorée chez les souris A-ZIP/F1 (modèle murin génétiquement modifié pour avoir très peu de tissu adipeux, y compris de l'adiposité médullaire (Moitra *et al.*, 1998)) et chez des souris traitées avec un inhibiteur de PPARγ (inhibant ainsi l'adipogénèse) par rapport aux souris contrôles (Naveiras *et al.*, 2009).

À l'inverse, d'autres études décrivent un effet positif des AM sur l'hématopoïèse, notamment, par la sécrétion de l'adiponectine, décrite comme pro-hématopoïétique. Parmi d'autres facteurs, les AM sécrètent de l'adiponectine et du SCF (le facteur de croissance des cellules souches), qui favorisent la restauration de l'hématopoïèse après irradiation chez les souris (DiMascio *et al.*, 2007; Masamoto *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017). Zhou *et al.* complètent les informations apportées par leur travaux en mettant en avant la différence d'impact des AM

en fonction de leur site d'étude, notamment lorsque sont comparés les AM retrouvés au niveau caudal de ceux retrouvés au niveau des vertèbres (Zhou *et al.*, 2017). Ces résultats peuvent expliquer la raison de travaux apportant des données contradictoires sur l'impact des AM sur l'hématopoïèse.

Afin de mieux évaluer l'impact des cellules de la moelle sur les CSH, des tests de culture de cellules souches hématopoïétiques primitives à long terme (LTC-IC : long-term culture initiating cell) se généralisent sur cellules humaines et animales. Ce test, fondé sur le système de culture à long terme de moelle osseuse (LTC), évalue les cellules souches hématopoïétiques primitives en fonction de leur capacité à produire une descendance myéloïde pendant au moins 5 semaines (M. Liu *et al.*, 2013). Mattiucci *et al.* démontrent que des AM humains isolés de la tête fémorale de patients masculins et féminins diminuent la capacité de prolifération et de différenciation des CSH mais maintiennent leur survie, tandis que les CSM favorisent leur survie, leur prolifération et leur différenciation. Une nouvelle hypothèse consiste à considérer que le maintien de l'hématopoïèse est dû à l'action conjointe des AM et des CSM. Ainsi, la diminution de l'hématopoïèse au cours du vieillissement est davantage liée à la diminution du nombre de CSM dans la moelle qu'à l'augmentation de l'adiposité médullaire (Mattiucci *et al.*, 2018).

De plus, les AM sécrètent un certains nombres de molécules pro-inflammatoires, et ce de façon plus importante que les adipocytes extra-médullaires, comme démontré chez l'Homme dans des AM humains *vs* des adipocytes sous-cutanés (Miggitsch *et al.*, 2019), et chez la souris en comparant des AM avec des adipocytes sous-cutanés (Gasparrini *et al.*, 2009), des adipocytes viscéraux (L. F. Liu *et al.*, 2011) ou encore des adipocytes des TA viscéral et brun (Tencerova *et al.*, 2018). L'évolution physiopathologique de ce profil inflammatoire est discutée : certains travaux démontrent une augmentation du profil pro-inflammatoire avec l'âge (Gasparrini *et al.*, 2009; L. F. Liu *et al.*, 2011) tandis que d'autres démontrent que l'obésité (Tencerova *et al.*, 2018) ou l'ovariectomie (S. Lucas, données personnelles) sur modèle murin n'impacte par ce profil. Ces activités influencent divers types cellulaires au sein de la moelle osseuse, notamment les ostéoclastes et les ostéoblastes, comme discuté dans la partie suivante.

Enfin, considérant l'effet des AM sur le potentiel de prolifération et de différenciation des CSH et considérant que les CSH sont les progéniteurs des ostéoclastes, les AM pourraient affecter de façon indirecte l'ostéoclastogénèse dans le remodelage osseux.

b) Adipocytes Médullaires et remodelage osseux

L'homéostasie osseuse implique un équilibre entre formation et résorption osseuse. Ces processus sont régis, respectivement, par les ostéoblastes et les ostéoclastes qui se régulent l'un l'autre par le biais de divers signaux. Au cours du vieillissement, on observe une diminution de la densité minérale osseuse associée à une augmentation de l'Ad Med (Justesen *et al.*, 2001).

i. Adipocytes Médullaires et Ostéoclastes

Contrairement aux adipocytes extra-médullaires, les AM sont une source de RANKL permettant ainsi d'induire l'ostéoclastogénèse (**Figure 11**). RANKL est initialement produit sous forme membranaire par les cellules osseuses, puis clivé par des protéases pour être diffusé sous forme soluble. Dans les adipocytes médullaires, RANKL reste sous sa forme membranaire. Cette production de RANKL par les AM a d'abord été démontrée chez l'Homme (Goto, Hozumi, *et al.*, 2011; Goto, Osaki, *et al.*, 2011) puis confirmée sur modèle murin (Fan *et al.*, 2017). Holt *et al.* mettent en évidence une expression différente de RANKL selon les populations adipocytaires différenciées de CSM humaines : les AM et les adipofibroblastes (cellules de types fibroblastiques ne contenant pas de gouttelettes lipidiques mais exprimant des marqueurs adipocytaires) (Holt *et al.*, 2014). Les études menées *in vitro* mettent en évidence une expression génique et protéique plus importante de RANKL par les adipocytes à un stade précoce de la différenciation. Aussi, la taille des adipocytes influe sur la balance OPG / RANKL. En effet, au cours de la différenciation et durant leur maturation, les adipocytes gagnent en volume et expriment davantage de marqueurs inflammatoires comme IL-6 et TNF-α que les adipocytes à un stade précoce. En outre, les adipocytes obtenus après 40 jours de culture en milieu de différenciation expriment davantage RANKL que ceux obtenus à 21 jours (W. Li *et al.*, 2018).

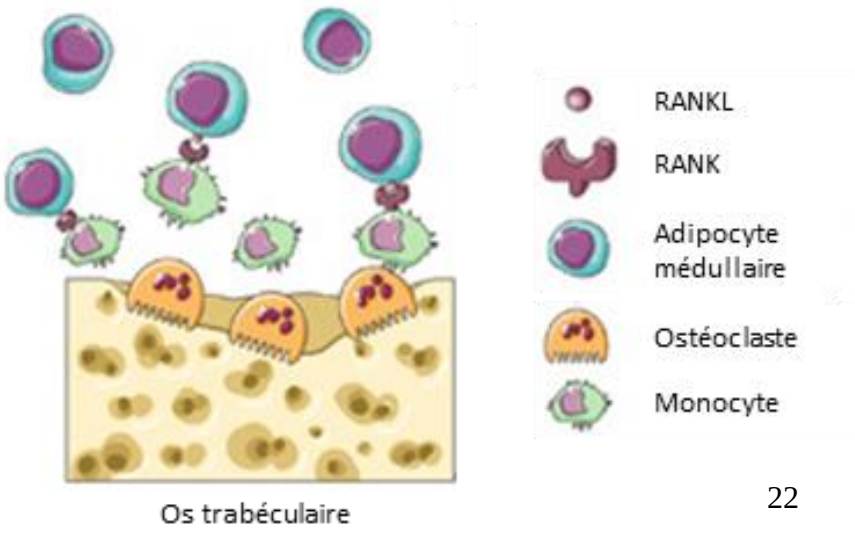


Figure 11 : Rôle des adipocytes médullaires dans l'ostéoclastogénèse via l'expression de RANKL
D'après (Hu *et al.*, 2021)

De plus, des travaux menés sur le modèle murin démontre une augmentation de l'expression de RANKL par les adipocytes médullaires au cours du vieillissement et après ovariectomie, qui est liée à l'expansion de l'adiposité médullaire et à la perte osseuse (Beekman *et al.*, 2019; Gasparrini *et al.*, 2009; Takeshita *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'expression de la protéase MMP-9, qui intervient dans le recrutement et l'activité des ostéoclastes, augmente au cours de l'adipogénèse des CSM humaines (Almalki & Agrawal, 2016). L'ensemble de ces observations supporte le rôle pro-ostéoclastogénique des AM.

De manière intéressante, il a été démontré chez la souris que les principaux médiateurs de l'adipogénèse PPARγ, C/EBPα et C/EBPβ, régissent l'ostéoclastogénèse. PPARγ agit à deux niveaux : il favorise d'une part l'engagement dans la voie de différenciation en activant la voie de transcription de facteurs ostéoclastiques et il intervient d'autre part dans la différenciation ostéoclastique en inhibant la voie de signalisation canonique Wnt / β-caténine et en agissant comme un co-activateur de gènes de transcription induisant l'expression de gènes ostéoclastiques (Muruganandan *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2007). C/EBPα agit aux mêmes niveaux que PPARγ : il favorise l'engagement dans la voie de différenciation via l'activation de la voie de transcription de facteurs ostéoclastiques et ce même en l'absence de RANKL et il peut agir directement sur la différenciation des ostéoclastes en agissant comme un co-activateur des facteurs de transcription permettant l'induction de gènes ostéoclastiques (Muruganandan *et al.*, 2020). De plus, C/EBPβ-LAP (isoforme de C/EBPβ) agit sur MafB, un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse (Muruganandan *et al.*, 2020).

De plus, les AM contiennent une forte proportion d'acides gras saturés dont l'effet sur l'ostéoclastogénèse est discuté (Hardouin *et al.*, 2016).

L'adiponectine impacte également les ostéoclastes qui possèdent des récepteurs à l'adiponectine sur leur surface. Des études *in vitro* sur précurseurs murins et humains démontrent une inhibition de l'ostéoclastogénèse par l'adiponectine (Oshima *et al.*, 2005) alors qu'*in vivo*, les résultats sont plus controversés (Madel *et al.*, 2021). En outre, la production d'adiponectine par les adipocytes médullaires est faible, et leur impact sur l'ostéoclastogénèse via cette hormone doit davantage être étudié.

De manière globale, les adipocytes médullaires sont considérés comme des cellules stimulant la résorption osseuse via la sécrétion de facteurs induisant l'ostéoclastogénèse (**Figure 12**).

ii. Adipocytes Médullaires et Ostéoblastes

Les adipocytes et les OB dérivent d'un progéniteur commun, les CSM (Pittenger *et al.*, 1999). La différenciation des CSM en ostéoblaste ou en adipocyte est régulée par diverses voies de signalisation et facteurs de transcriptions comme déjà détaillée précédemment (*Partie I.2.a.i., page 7 et Partie II.2., page 19*) (Q. Chen *et al.*, 2016). Le potentiel de différenciation des CSM dépend de sa source d'origine. Nous nous intéressons ici uniquement aux CSM isolées de la moelle osseuse qui présentent une capacité de différenciation adipogénique et ostéogénique équivalente par rapport à d'autres sources (Noël *et al.*, 2008).

PPARγ2 est un facteur transcriptionnel clé dans l'adipogénèse et le stockage des lipides dans les adipocytes matures. Une augmentation de ce facteur au sein de la moelle osseuse résulte en une augmentation de l'Ad Med et une diminution de l'ostéoblastogénèse, due entre autre à une diminution de l'expression du facteur de transcription Runx2 (Akune *et al.*, 2004). De plus, une étude menée sur la lignée 3T3-L1 démontre que l'expression de PPARγ induit une diminution de l'expression de la β-caténine, inhibant ainsi la voie de différenciation Wnt associée (Moldes *et al.*, 2003). Réciproquement, sur le même modèle *in vitro*, la voie de signalisation canonique Wnt / β-caténine, pro-ostéogénique, réduit l'expression de PPARγ2 et de C/EBPα (Ross *et al.*, 2000). Cette voie de signalisation Wnt est régulée par plusieurs inhibiteurs comme SFRP-1 ou DKK1 dont l'expression est retrouvée dans des AM (Taipaleenmäki *et al.*, 2011). Cette sécrétion par les AM pourrait donc perturber l'engagement des CSM dans la voie de différenciation ostéoblastique.

De plus, les AM peuvent libérer des acides gras qui perturbent la prolifération, différenciation et minéralisation des OB. Wang *et al.* démontrent que la libération de palmitate notamment par les AM humains différenciés est augmentée en présence de dexaméthasone. Or, le palmitate réduit le niveau de prolifération et de minéralisation des OB différenciés (D. Wang *et al.*, 2013). L'impact négatif du palmitate sur les OB est confirmé sur OB humains : l'expression d'ALP et de la BSP est affectée par le palmitate tandis que l'expression de Runx2 et de l'ostéocalcine n'est pas atteinte. De plus, ces OB présentent une formation de nodules de minéralisation plus faible que ceux cultivés dans des conditions classiques (Gunaratnam *et al.*, 2014).

Comme présentés précédemment, les AM sécrètent la leptine et l'adiponectine, qui au niveau local, peut stimuler l'ostéoblastogénèse, suggérant, à l'inverse, une régulation positive de l'ostéoblastogénèse par les AM (Cornish *et al.*, 2018).

D'autres molécules interviennent également dans cet équilibre entre adipogénèse et ostéogénèse, comme la chémérine par exemple. La chémérine a été démontréee sur cellules murines comme impliquée dans l'adipogénèse et régulant négativement l'ostéoblastogénèse et la minéralisation (Muruganandan *et al.*, 2010).

Ainsi, les AM sont des cellules actives qui sécrètent plusieurs facteurs impactant les cellules environnantes dont les précurseurs mésenchymateux et les ostéoblastes. À partir de ces études, il est souvent proposé qu'il existe une compétition de différenciation entre les deux lignées cellulaires conduisant à une inhibition de l'ostéoblastogénèse et une meilleure différenciation adipocytaire des CSM (**Figure 12**).

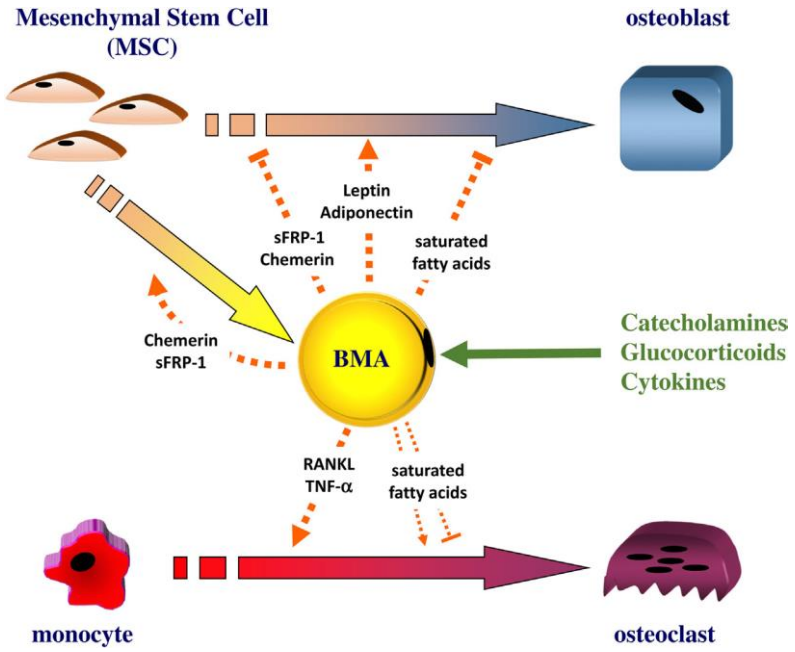


Figure 12 : Impact des AM sur le remodelage osseux
(Hardouin *et al.*, 2016)

D'autres études démontrent que les adipocytes médullaires et les ostéoblastes expriment des gènes communs qui exercent des fonctions différentes. Sont exprimés, par exemple, dans les OB comme dans les AM, le gène de l'ALP et de l'ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1). ENPP1 et l'ALP interviennent dans la minéralisation des OB en générant et en diminuant le niveau de pyrophosphate inorganique

(PPi) respectivement (Orimo, 2010). Dans les AM, l'expression de l'ALP augmente au cours de la différenciation et favorise l'accumulation de lipides au sein de la cellule comme démontré sur des modèles murins et humains (Ali *et al.*, 2006). Le rôle de l'ENPP1 dans l'AM n'est pas encore établi, mais pourrait intervenir dans les perturbations associées à l'obésité (Sadie-Van Gijsen *et al.*, 2013).

Ainsi, les adipocytes médullaires et les ostéoblastes sont issus du même progéniteur et partagent le même environnement. Leur différenciation est régulée par l'expression de facteurs spécifiques à chaque voie. Lorsqu'ils sont matures, les AM et les OB continuent à se réguler l'un l'autre via l'expression de divers facteurs dans la circulation systémique ou localement. Cette régulation doit être prise en compte dans l'expansion de l'adiposité médullaire observée dans certaines pathologies.

5. Développement physiopathologique de l'adiposité médullaire

En plus de son augmentation physiologique durant la croissance et le vieillissement, on observe une accumulation de l'Ad Med dans des situations pathologiques. En effet, une augmentation de la taille et/ou du nombre des adipocytes est rapportée dans l'ostéoporose liée au vieillissement, à la ménopause, à l'anorexie mentale, lors de contextes thérapeutiques comme des traitement aux glucocorticoïdes ou des radiothérapies (Green & Rubin, 2014), mais également dans des pathologies métaboliques tels que l'obésité et le diabète de type II (Hardouin *et al.*, 2016).

a) Ostéoporose

L'ostéoporose est une pathologie caractérisée par un dérèglement du remodelage osseux conduisant à une perte de quantité et/ou de qualité osseuse. Il en résulte une diminution de la résistance osseuse et donc une augmentation du risque fracturaire. Responsable de près de 400 000 fractures en France chaque année, l'ostéoporose constitue un réel problème de santé public (*Inserm, 2016*) pris en charge par la mise en place de traitements préventifs ou spécifiques. Les causes de l'ostéoporose sont multiples en raison des différentes formes de la maladie, ce qui en complique la compréhension et le développement de traitements adaptés. Or, il se trouve que dans la plupart des types d'ostéoporose, la quantité d'adipocytes médullaires est corrélée à la perte osseuse.

i. L’ostéoporose liée au vieillissement

L’ostéoporose est principalement liée au vieillissement. Le développement de cette fragilité osseuse s’explique par une diminution de la densité minérale osseuse (DMO), paramètre reflétant les propriétés mécaniques de l’os (le degré de minéralisation de la matrice osseuse et la densité osseuse). En effet, l’homéostasie osseuse est altérée au cours du vieillissement par une diminution de la formation osseuse due à une atteinte de la différenciation ostéoblastique (Kassem & Marie, 2011). De plus, l’évolution de la composition de la moelle osseuse au cours du vieillissement engendre une modification progressive de la composition cellulaire de la moelle avec le développement majeur de l’Ad Med par rapport aux autres types cellulaires, ce qui peut influer sur la différenciation des CSM. On observe une corrélation négative entre le volume d’Ad Med et le volume osseux avec l’âge (**Figure 13**).

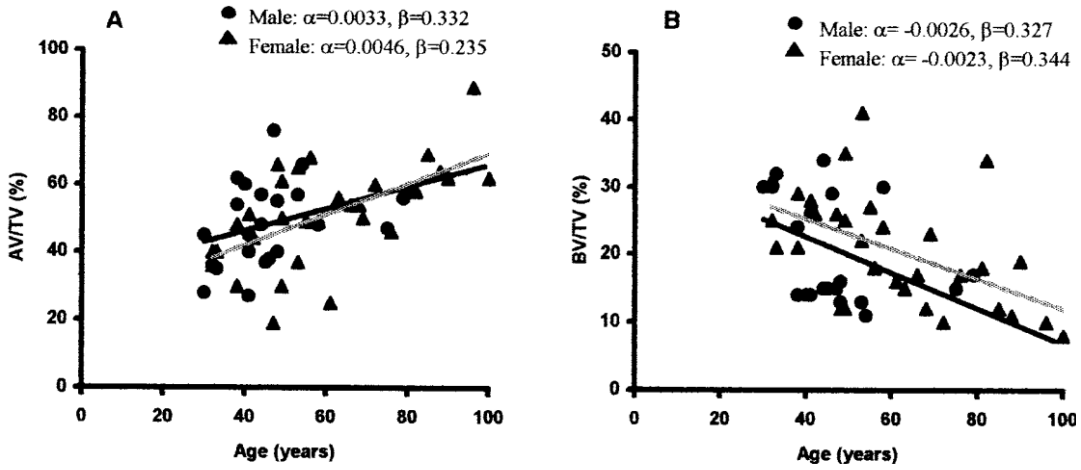


Figure 13 : Evolution du volume adipocytaire (AV) et du volume osseux (BV) avec l’âge (Justesen *et al.*, 2001)

Tous les patients âgés ne développent pas d’ostéoporose, cependant les patients âgés et ostéoporotiques présente une quantité d’Ad Med bien plus importante que les patients âgés sains (Justesen *et al.*, 2001).

ii. L’ostéoporose liée à la ménopause

Au cours du vieillissement, les femmes ont plus de risques de développer une ostéoporose en raison de la ménopause. Cette période de vie est caractérisée par une carence en œstrogènes en raison de la diminution progressive de la production des hormones sexuelles et peut induire le développement d’une obésité, d’une intolérance au glucose (S. I. Wu *et al.*, 2001) et d’une fragilité osseuse.

Les œstrogènes participent au remodelage osseux via des interactions avec les OB, les OC et les ostéocytes qui possèdent tous des récepteurs de ces hormones. En effet, les œstrogènes activent la voie Wnt/β-caténine favorisant ainsi l'ostéoblastogénèse, induisent l'expression des BMP permettant aux CSM de s'engager dans la voie de différenciation ostéoblastique et stimulent la production d'IGF-1 et de TGF-β1, deux facteurs de croissance clé dans la formation osseuse. La production de TGF-β1 permet aussi de réguler négativement l'ostéoclastogénèse parallèlement à l'inhibition de l'action de RANKL par les œstrogènes. De plus, ces hormones permettent aux ostéocytes de jouer leur rôle mécano-senseur et d'assurer les communications inter-cellulaires. Ainsi, la carence en œstrogènes induit non seulement une perturbation de l'homéostasie osseuse mais également une réponse du système immunitaire via l'induction de différentes interleukines et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), délétères pour l'os (**Figure 14**) (Cheng *et al.*, 2022). La baisse de ces hormones entraine aussi une diminution de l'expression de la sirtuine 1 (SIRT-1), un inhibiteur de PPARγ2 (Elbaz *et al.*, 2009) et donc une augmentation de l'Ad Med. De fait, alors que les femmes présentent moins d'Ad Med que les hommes pour un même âge donné, l'apparition de la ménopause s'accompagne d'une augmentation marquée de l'Ad Med (Griffith *et al.*, 2012).

Les conséquences de la carence hormonale peuvent alors expliquer le développement d'une ostéoporose chez les patientes ménopausées et l'augmentation de l'Ad Med observée dans cette forme d'ostéoporose.

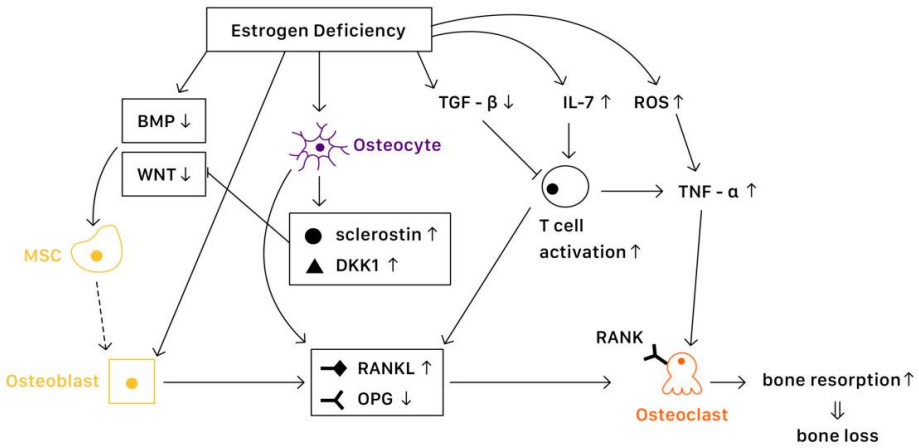


Figure 14 : Ostéoporose liée à la diminution du taux d'œstrogènes (Cheng *et al.*, 2022)

Ainsi, en plus de la diminution de la formation osseuse, l'ostéoporose liée à la ménopause est également caractérisée par une augmentation importante de la résorption osseuse (Kassem & Marie, 2011).

iii. L'ostéoporose liée à l'anorexie mentale

L'anorexie mentale est un trouble de l'alimentation aboutissant à une forte perte de poids, une fonte des graisses corporelles et de la masse musculaire et une diminution du taux d'hormones sexuelles (œstrogènes et/ou testostérone). Ce trouble entraine également une perte de DMO. Malgré l'effet « protecteur de l'os » des œstrogènes, l'administration de ces hormones aux patients ne permet pas de restaurer la BMD (Legroux-Gérot *et al.*, 2008). La baisse de la DMO est davantage associée au taux perturbé d'adiponectine et de leptine (Legroux-Gérot *et al.*, 2019).

L'anorexie mentale est majoritairement caractérisée par une diminution des graisses, mais de manière surprenante, l'adiposité médullaire ne diminue pas et peut même augmenter chez certains patients anorexiques (Ghali *et al.*, 2016).

b) Ostéoporose et pathologies métaboliques

Le **surpoids et l'obésité** sont définis comme une accumulation excessive de masse graisseuse engendrant une modification du tissu adipeux. Ils concernent respectivement 39% et 13% des individus et représentent à ce jour un réel problème de santé au niveau mondial. En effet, le surpoids et l'obésité sont considérés comme la 5ème cause de mortalité dans le monde avec le décès de 3 millions de personnes par an (*Inserm, 2019*). Ces décès sont dus aux nombreuses conséquences engendrées par la surcharge pondérale tant sur le plan physiologique que psychologique. En effet, les individus obèses ont un risque plus élevé de souffrir d'un mal-être, de complexes ou de dépression en raison de la mauvaise image que la société actuelle leur renvoie. Du point de vue physiologique, l'obésité augmente le risque d'hypertension artérielle, de dyslipidémie et d'athérosclérose pouvant induire des maladies cardiovasculaires. Aussi, elle entraîne des maladies respiratoires comme des apnées du sommeil ; augmente le risque de développer des néphro- et hépato-pathies ; et peut être associée au développement de cancers. La conséquence la plus importante de l'obésité reste tout de même le risque accru de développer un diabète de type 2.

Les personnes obèses ont davantage de risque de développer une résistance à l'insuline des principaux tissus métaboliques, dont le foie, que les personnes non-obèses. Pour compenser cette résistance à l'insuline, les cellules du pancréas produisent davantage d'insuline ce qui aboutit en une concentration plasmatique d'insuline très élevée. Cette compensation est suivie d'un arrêt de la production d'insuline par ces cellules, aboutissant à une hyperglycémie et ainsi à un **diabète de type 2** (T2D) (S. Klein *et al.*, 2022). Le risque de développer un T2D augmente avec l'âge mais il est retrouvé chez des patients de plus en plus jeunes en raison de l'augmentation du nombre d'individus concernés par le surpoids et l'obésité dans le monde. Il est aussi lié à l'augmentation de personnes souffrant d'intolérance au glucose, une affection à la frontière entre le métabolisme glucidique physiologique et le diabète, qui ont de fort risque de développer un T2D. Depuis 1980, le nombre de patients atteint de T2D a été multiplié par quatre (*OMS, 2021*). En 2016, 5% de la population française était touchée par le diabète dont 90% par le T2D (*Inserm, 2019*). D'ici 2030, cette pathologie pourrait devenir la 7ème cause de mortalité dans le monde.

L'obésité a longtemps été considérée comme une forme de protection aux fractures en raison d'une augmentation de la quantité osseuse (Villareal *et al.*, 2005). Or, une augmentation du risque fracturaire, à des sites osseux différents de ceux généralement retrouvés dans l'ostéoporose du vieillissement, a été démontrée chez les patients obèses et diabétiques (Schwartz, 2016) au cours de ces dernières années. Ce risque peut en partie être associé aux risques plus élevés de chutes chez les personnes diabétiques en raison des complications liées à la pathologie comme les neuropathies et les troubles de la vision (Schwartz, 2016). Il s'explique surtout par une atteinte de la micro- et macro-architecture osseuse, par divers mécanismes cellulaires et moléculaires, qui diminue la résistance aux contraintes mécaniques induisant une fragilité osseuse (Napoli *et al.*, 2017) (**Figure 15**). Cette fragilité osseuse n'est pas liée à une atteinte de la DMO qui n'est pas modifiée contrairement à ce qui est retrouvée dans le diabète de type 1. On observe en effet une augmentation de la porosité de l'os cortical compensée par une augmentation de la densité d'os trabéculaire (Burghardt *et al.*, 2010).

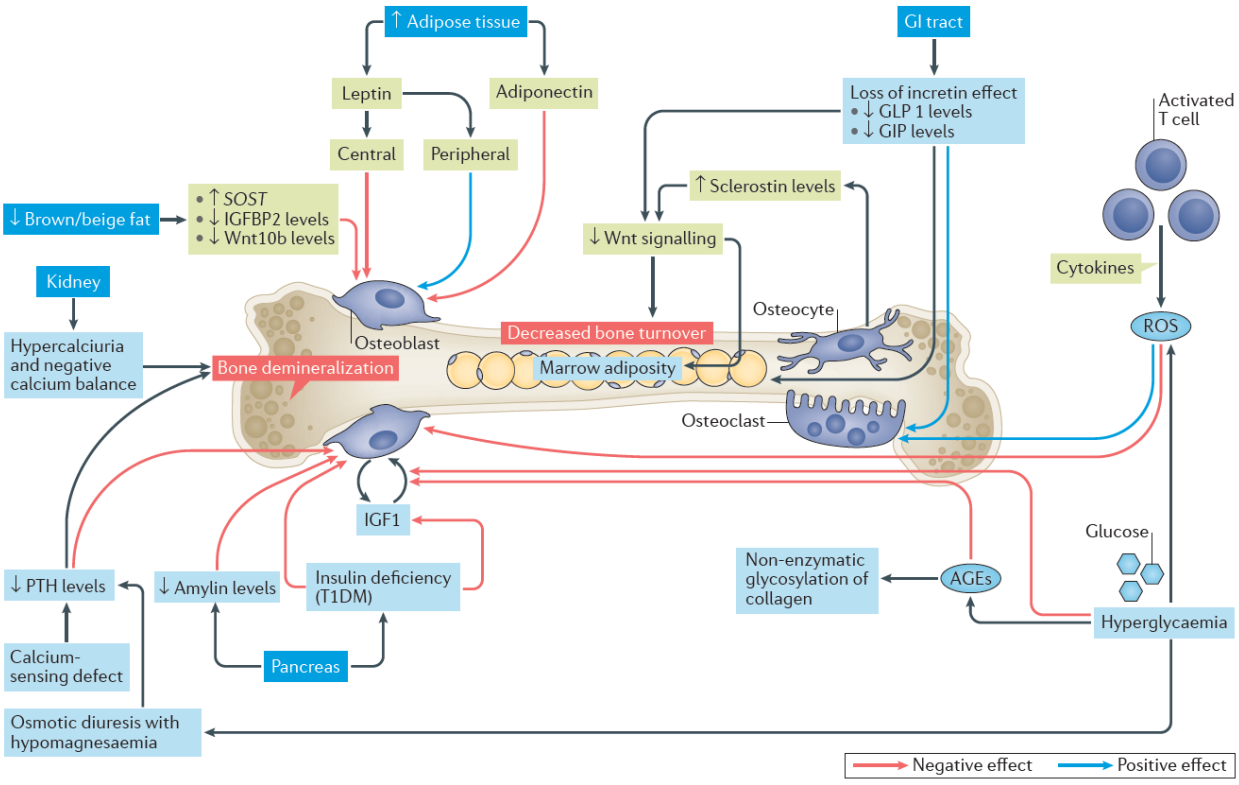


Figure 15 : Mécanismes cellulaires et moléculaires induisant une atteinte de l'architecture osseuse chez les patients diabétiques
(Napoli *et al.*, 2017)

Le turn-over osseux est considéré comme ralenti voire bas sur la base de mesures plasmatiques de marqueurs de formation et de résorption. Cependant, une atteinte du remodelage osseux a été mise en évidence chez des patients atteints de T2D : une diminution du nombre d'ostéoblastes et de leur production matricielle ainsi qu'une diminution de la minéralisation est rapportée au niveau de l'os cortical. L'atteinte du remodelage osseux peut s'expliquer par une mauvaise diffusion systémique de molécules clés en raison d'une atteinte vasculaire mais également par la sécrétion d'adipokines par les TA extra-médullaires, dont le volume augmente. Chez les patients diabétiques, un faible niveau d'adiponectine est retrouvé et pourrait ainsi avoir un effet délétère sur l'ostéoblastogénèse (Straub & Scherer, 2019). D'autres molécules interviennent également dans la formation osseuse, comme la sclérostine, un inhibiteur de la voie Wnt produit par les ostéocytes, qui inhibe l'ostéoblastogénèse : son niveau d'expression est retrouvé en plus grande quantité chez les patientes diabétiques que chez les patients non-diabétiques (Gaudio *et al.*, 2012). L'hyperglycémie et le stress oxydant induisent une augmentation de la formation de produits de glycation avancés (AGE), qui correspondent notamment à des modifications non-enzymatiques des fibres de collagène

présentes dans la matrice osseuse, qui vont ainsi fragiliser la structure osseuse (X. Wang *et al.*, 2002). L'augmentation de ces AGE induit l'activation de leur récepteur RAGE, qui vient stimuler la résorption osseuse et induire une inflammation chronique. Cette inflammation chronique est notamment due à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires qui participe également à une augmentation de la résorption osseuse et aussi à une inhibition de l'ostéoblastogénèse (Napoli *et al.*, 2017).

On observe également une augmentation de l'Ad Med (augmentation du nombre et de la taille des AM) (Ferland-McCollough *et al.*, 2018) qui pourrait perturber le remodelage osseux via la libération d'acides gras, l'augmentation de la production de ROS et ainsi contribuer à inhiber la formation osseuse. En outre, il se trouve que la quantité d'AM est corrélée au taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c), un marqueur plasmatique de l'hyperglycémie chronique chez les personnes diabétiques (De Araújo *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017) (**Figure 16**).

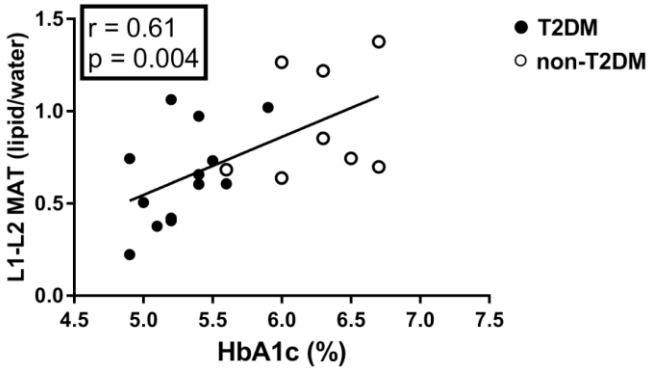


Figure 16 : Corrélation entre l'adiposité médullaire et le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) chez les patients diabétiques (T2DM) et non diabétiques (non-T2DM)
(Yu *et al.*, 2017)

Cette corrélation, ainsi que l'effet de l'hyperglycémie sur la composante osseuse, suggèrent que le développement et la fonction des adipocytes médullaires puissent être influencés par les paramètres glycémiques et contribuer à la fragilité osseuse dans ce contexte.

III. LE GLUCOSE ET LES COMPOSANTS MEDULLAIRES / OSSEUX

Le métabolisme énergétique est assuré par le glucose, les acides gras et les acides aminés qui permettent par diverses voies d'aboutir à la formation d'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Les CSM, OB et AM ont des besoins énergétiques différents mais sont tous les trois sensibles à la concentration en glucose, nécessaire pour leur métabolisme (Ning *et al.*, 2022; van Gastel & Carmeliet, 2021).

1. Généralités sur le métabolisme glucidique

Le glucose joue un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire. Il garantit un apport énergétique constant aux différents tissus, c'est pourquoi la glycémie est régulée précisément afin d'être maintenue à une concentration, dite physiologique, de 5,5 mmol/L. Divers organes interviennent dans ce processus dont le foie, le tissu adipeux, le muscle squelettique, le rein et l'intestin. Les échanges de glucose au sein de l'organisme sont gérés par des régulations nerveuses et hormonales.

Le glucose pénètre dans les cellules grâce à des transporteurs spécifiques : les co-transporteurs glucose / sodium (SGLT) et les transporteurs du glucose (GLUT).

Les SGLT transportent le glucose à l'intérieur des cellules contre son gradient de concentration en le couplant avec l'ion sodium Na^+ (Wright *et al.*, 2011). Le taux de sodium est régulé par une pompe Na^+ / K^+ ATPase présente sur la membrane. Ces co-transporteurs sont retrouvés au niveau des entérocytes (cellules épithéliales de l'intestin) et au niveau des cellules épithéliales du tubule proximal du rein. On distingue le SGLT1, retrouvé dans les deux organes, et le SGLT2, retrouvé au niveau rénal, qui y assure majoritairement l'absorption du glucose (**Figure 17**). Au niveau rénal, l'activité de SGLT2 est estimée contribuer à plus de 90 % de la réabsorption du glucose par rapport à l'inhibition de SGLT1 (Rieg & Vallon, 2018).

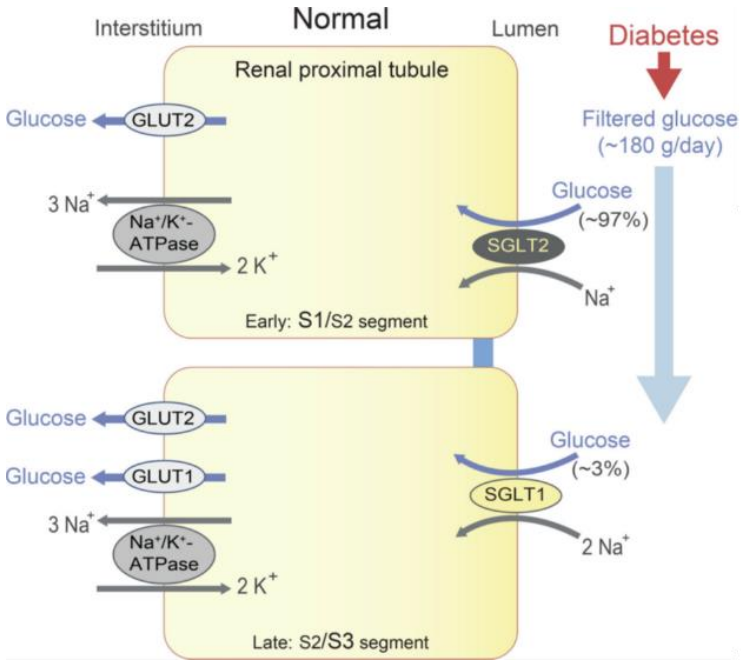


Figure 17 : Rôle des transporteurs au niveau du rein
D'après (Rieg & Vallon, 2018)

Des inhibiteurs de SGLT constituent une nouvelle classe d'antidiabétiques. En effet, l'inhibition de ces transporteurs au niveau rénal (et principalement les inhibiteurs de SGLT2) permet d'éliminer rapidement le glucose par voie urinaire et de diminuer l'hyperglycémie. Le *CHAPITRE 3* de ce manuscrit concerne l'utilisation d'une molécule inhibitrice de SGLT2 pour atténuer la glycémie dans un modèle murin et observer les effets sur les paramètres osseux et adipocytaires.

Les transporteurs GLUT acheminent le glucose en fonction de son gradient de concentration permettant donc de faire entrer ou sortir le glucose dans la cellule. Ces transporteurs, au nombre de 14, sont retrouvés dans de nombreux tissus et cellules : on retrouve par exemple les transporteurs GLUT-1, -3 et -4 dans les ostéoblastes, et le transporteur GLUT-4 dans les adipocytes. Le transporteur GLUT-4 est stimulé par l'action de l'insuline pour capter le glucose or son expression est diminuée dans les TA extra-médullaires en raison de l'insulino-résistance chez les patients diabétiques de type 2.

Après son entrée dans la cellule, le glucose est métabolisé pour produire de l'énergie via les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates, ou pour être stocké sous forme de glycogène (au niveau des muscles et du foie) par la voie de la glycogénèse, ou pour servir à la production de triglycérides par la lipogenèse (au niveau du TA).

L'homéostasie glucidique est contrôlée par 2 hormones : l'insuline (hormone hypoglycémiante) et le glucagon (hormone hyperglycémiante). L'insuline est sécrétée par les cellules β du pancréas et favorisent l'utilisation du glucose par les cellules du foie, les cellules adipeuses et les cellules musculaires.

Un dérèglement de l'homéostasie peut entrainer soit une hyperglycémie, soit une hypoglycémie. L'hyperglycémie, si elle est chronique, engendre le développement d'un diabète qui comme décrit précédemment, peut occasionner de nombreuses complications. C'est pourquoi de nombreux travaux cherchent à évaluer l'effet du glucose sur les différents types cellulaires de l'organisme. Nous nous intéressons dans ce manuscrit à son effet sur les CSM, ostéoblastes et adipocytes de la moelle osseuse.

2. Impact du glucose sur les CSM issues de la moelle osseuse

Des CSM humaines, en culture 2D, ont été exposées à différentes concentrations en glucose afin d'en évaluer l'impact sur la prolifération cellulaire : 5.5 mM de glucose,

correspondant à une concentration physiologique, et 25 mM mimant une hyperglycémie chronique. De manière globale, une prolifération moins importante est observée sur les cellules cultivées à 25 mM de glucose comme démontrée par de nombreux travaux : Keats *et al.*, démontrent une diminution de la prolifération dès le 1er jour de culture puis un niveau de prolifération égal à partir du 4ème jour ; Hankamolsiri *et al.* démontrent une atteinte de la prolifération à partir du 6ème jour de culture seulement, encore observable au 14ème jour ; Li *et al.* démontrent une atteinte de la prolifération au 3ème jour puis un niveau équivalent à la 4ème semaine de culture (Hankamolsiri *et al.*, 2016; E. Keats & Khan, 2012; Y. M. Li *et al.*, 2007). Cet impact négatif du glucose sur la prolifération pourrait s'expliquer par une toxicité due à la culture *in vitro* des CSM. En effet, les CSM s'appuient essentiellement sur un métabolisme glycolytique en raison de l'hypoxie retrouvée dans la moelle osseuse (1-2 % O_2). En culture *in vitro*, le niveau d'oxygène est de 20 % ce qui influe sur le métabolisme des cellules et ainsi leur prolifération (van Gastel & Carmeliet, 2021). D'autres travaux démontrent un niveau de prolifération équivalent à 48 heures qui peut s'expliquer par la forte densité d'ensemencement initiale des cellules qui limite le niveau de prolifération (Weil *et al.*, 2009). Cette observation est néanmoins confirmée sur modèle *in vitro* de CSM murines. La prolifération cellulaire n'y est pas différente entre les cellules cultivées à 5 et 25 mM de glucose, quel que soit le jour après l'ensemencement (2, 4 ou 6 jours). En revanche, le niveau de prolifération diffère entre les conditions à 0,5 et 1 mM par rapport à 5 et 25 mM de glucose (Deorosan & Nauman, 2011).

Rinker *et al.* ont développé un nouveau modèle de mono-, co-, et tri-culture 3D avec des CSM, des OB et des adipocytes humains dans des hydrogels. Ces modèles sont cultivés à 2 concentrations en glucose : 5.5 ou 22.3 mM. Au 1er et 7ème jour après ensemencement, le biomatériau est digéré et les cellules sont récupérées afin de les dénombrer. Sur mono-culture de CSM, le nombre de cellules obtenus à 5.5 et à 22.3 mM de glucose est identique. Au 7ème jour, le nombre de cellules retrouvées est plus faible, mais indépendamment de la concentration en glucose. La même observation est faite lorsque les CSM sont en co-culture avec des OB. En revanche, lorsque les CSM sont cultivées avec des adipocytes, le nombre de cellules à 7 jours est identique à celui obtenu au 1er jour suggérant un effet positif des adipocytes sur le maintien de la survie cellulaire. Ainsi, dans ces modèles 3D, les CSM sont davantage sensibles à leur environnement cellulaire qu'à la concentration en glucose (Rinker *et al.*, 2014).

Pour évaluer l'effet du glucose sur le potentiel de différenciation, Keats *et al.* cultivent des CSM humaines durant 7 jours à 5.5 ou 25 mM de glucose, puis les mettent à différencier dans des milieux spécifiques. En milieu adipogénique, les CSM préalablement cultivées à 25 mM de glucose expriment davantage PPARγ2 et se sont davantage différenciées en adipocytes que les CSM préalablement cultivées à 5.5 mM de glucose. En revanche, en milieu ostéogénique, les CSM préalablement cultivées à 25 mM de glucose expriment moins les facteurs de transcription Runx2 et Ostérix que les cellules préalablement cultivées à 5.5 mM de glucose (E. Keats & Khan, 2012). De plus, cette étude démontre que la production de différents types de collagènes et de fibronectine par les CSM diffèrent en fonction de la concentration de glucose, suggérant que la composition de la matrice extra-cellulaire participe aux différences observées sur l'engagement dans les deux voies de différenciations (E. Keats & Khan, 2012). Dans des conditions de concentration élevée de glucose, les CSM de rongeurs se différencient davantage vers la voie adipocytaire que vers la voie ostéoblastique (Chuang *et al.*, 2007; A. Wang *et al.*, 2014). Une élévation de la concentration de glucose s'accompagne également d'une augmentation de la libération de ROS dans des cellules pré-ostéoblastiques primaires de rongeurs ce qui inhibe la différenciation ostéoblastique et stimule l'adipogénèse (Atashi *et al.*, 2015; Y. Zhang & Yang, 2013).

Afin de mieux comprendre ce qu'il se passe *in vivo*, Moseley *et al.* ont cultivés des CSM médullaires humaines commercialisées, avec des sérums en provenance de patientes ménopausées avec différents statuts d'homéostasie glucidique (normal, intolérant au glucose, diabète de type 2). Ces essais démontrent que la capacité de prolifération, la différenciation ostéogénique et la minéralisation sont identiques pour les cellules cultivées avec des sérums obtenus de patientes diabétiques et pour ceux obtenus de patientes saines. En revanche, la capacité de différenciation adipogénique est augmentée (Moseley *et al.*, 2018) pour les cellules cultivées avec des sérums issues de femmes diabétiques par rapport aux autres sérums, ce qui est cohérent avec l'augmentation de l'Ad Med retrouvée chez les patients obèses et diabétiques. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Ferland-McCollough *et al.* qui démontrent une meilleure différenciation des CSM en AM lorsqu'elles sont différenciées en milieu adipogénique complété des surnageants de culture d'AM isolés de patients diabétiques : cet effet pro-adipogénique est associé à la libération de la protéine chimio-attractive des monocytes de type 1 (MCP-1). De plus, les CSM des patients diabétiques expriment moins certains facteurs anti-adipogéniques et davantage de facteurs pro-adipogéniques qui indiquent un pré-

conditionnement des CSM vers la voie adipocytaire. Aussi, le potentiel de différenciation ostéogénique, en milieu de différenciation ostéogénique complété avec un surnageant de culture d'adipocytes médullaires isolées de patients diabétiques, est diminué (Ferland-McCollough *et al.*, 2018).

Ces différentes études *in vitro* et *in vivo* s'accordent pour démontrer un impact de la concentration en glucose sur le potentiel de différenciation des CSM, tandis que l'impact sur leur niveau de prolifération reste discuté.

3. Impact du glucose sur les ostéoblastes

L'impact du glucose sur les OB est plus difficile à évaluer puisqu'il diffère en fonction du type de cellules étudiées (lignées *vs* primaires), du modèle (humain *vs* animal), du marqueur analysé et du moment d'analyse (analyse au cours de la différenciation ostéoblastique, au cours de la minéralisation ou sur des ostéoblastes matures, par exemple).

Une forte concentration en glucose semble altérer la prolifération des lignées cellulaires pré-ostéoblastique humaine MG-63 et murine MC3T3-E1 (Shao *et al.*, 2014; W. Wang *et al.*, 2010). Lors de la différenciation ostéoblastique, l'expression de certains facteurs tels que Runx2 est plus ou moins impactée selon les études publiées, rendant difficile la compréhension de l'effet du glucose sur la différenciation ostéogénique.

L'activité de la phosphatase alcaline est couramment mesurée dans des travaux s'intéressant à la différenciation ostéoblastique en guise de preuve de bonne différenciation, mais l'impact du glucose sur cette activité est contesté. Certains travaux mettent en évidence une augmentation de cette activité à forte concentration en glucose : sur cellules primaires de rat (Balint *et al.*, 2001), sur la lignée murine MC3T3-E1 (Botolin & McCabe, 2006), sur la lignée humaine MG-63 (W. Wang *et al.*, 2010), alors que d'autres démontrent au contraire une diminution de cette activité : sur cellules primaires de rats (Jiang *et al.*, 2019), sur cellules primaires humaines (García-Hernández *et al.*, 2012), sur la lignée humaine MG-63 (Shao *et al.*, 2014). Une autre étude sur modèle murin MC3T3-E1 démontre une diminution de l'expression génique de l'ALP, lorsque les cellules sont soumises à une forte concentration en glucose, qui est liée à l'osmolarité (Cunha *et al.*, 2014).

Balint *et al.* et García-Hernández *et al.* se sont focalisés plus précisément sur l'impact d'une forte concentration en glucose sur le processus de minéralisation. Balint *et al.*

s'intéressent aux cellules pré-ostéoblastiques murines de la lignée MC3T3-E1 cultivées en milieu à 5.5 *vs* 15 mM de glucose. Ils démontrent une diminution du nombre de nodules de minéralisation et de la quantité de calcium dans les cultures cellulaires lorsque la concentration en glucose est forte (Balint *et al.*, 2001). García-Hernández *et al.* s'intéressent aux ostéoblastes humains issus de l'os alvéolaire cultivés à différentes concentrations en glucose. Ils démontrent une augmentation de la quantité de calcium mesurée, contrairement aux résultats de Balint *et al.*, associée à une augmentation de l'activité ALP, de l'expression de RANKL, et une altération de la qualité de minéralisation (García-Hernández *et al.*, 2012). Ces travaux ont été les premiers à suggérer qu'une concentration élevée en glucose puisse altérer le processus de minéralisation des ostéoblastes.

La fragilité osseuse observée chez les patients diabétiques est associée à une inhibition de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH). Jiang *et al.* démontrent que les CSM primaires de rat cultivées à 25 mM de glucose présentent une faible expression génique et protéique de SHH par rapport aux cellules cultivées à 5.5 mM de glucose. Ils observent aussi une diminution de l'activité ALP, du nombre de nodules de minéralisation et de l'expression de marqueurs ostéogéniques (ostéopontine, BSP, SMO et BMP-4), permettant de valider l'impact d'une forte concentration en glucose sur cette voie de signalisation et ainsi sur la capacité de différenciation et de minéralisation des ostéoblastes (Jiang *et al.*, 2019).

Une forte concentration en glucose durant la différenciation ostéoblastique induit également à long terme une augmentation de l'expression de marqueurs adipocytaires tels que PPARγ et de C/EBPα et conduit à la production de gouttelettes lipidiques par rapport à une faible concentration en glucose. Aussi, les ostéoblastes expriment davantage la hyaluronane synthase 2, isoforme majoritairement responsable de la production d'acide hyaluronique, traduisant une matrice riche en acide hyaluronique. Ces travaux réalisés par Wang *et al.* suggèrent une altération de la maturation des ostéoblastes au profit du développement d'un phénotype adipocytaire (A. Wang *et al.*, 2014) et également une modification de la composition de la matrice extra-cellulaire osseuse. Ces résultats sont confortés par l'expression plus faible d'ARNm de collagène de type I dans des cellules de souris et de rat cultivées à 25 mM de glucose (W. Wang *et al.*, 2010; Y. Zhang & Yang, 2013). Une mesure protéique dans ces deux études confirme cette expression plus faible, qui suggère une altération de la matrice extra-cellulaire des cellules ostéoblastiques.

Ces travaux se sont surtout focalisés sur l'effet d'une forte concentration en glucose sur les cellules osseuses dans le contexte du diabète de type 1 où une diminution de la DMO, et donc de la quantité osseuse, est rapportée. Comme décrit précédemment, le diabète de type 2 est davantage caractérisé par une atteinte de la qualité osseuse en raison de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires, c'est pourquoi une étude plus approfondie des effets de la concentration de glucose doit être menée notamment sur l'aspect qualitatif de la minéralisation.

La difficulté de l'évaluation de l'impact du glucose sur les ostéoblastes est également complexe en raison de la concentration de glucose testée et du choix des inducteurs employés dans le milieu de différenciation ostéogénique. En effet, les inducteurs optimisent la différenciation et peuvent neutraliser les effets induits par d'autres facteurs.

4. Impact du glucose sur les adipocytes médullaires

Dans le diabète de type 2, une modification des TA extra-médullaires est observée et liée notamment à une expansion de ces tissus et au développement d'une inflammation, aboutissant à des fibroses. Cette modification concerne le profil d'expression des adipocytes et leur matrice extracellulaire (D. Lin *et al.*, 2016).

Parallèlement, une augmentation de l'Ad Med a été mise en évidence dans le T2D et suggère un impact de ces cellules sur les perturbations osseuses observées. Cette hypothèse est notamment confortée par Ferland-McCollough *et al.* qui ont réalisé une comparaison du potentiel sécrétoire des adipocytes médullaires isolés de patients diabétiques *vs* patients non diabétiques. Ils démontrent notamment une diminution de l'expression génique et protéique de l'adiponectine dans les AM isolés de patients diabétiques et une augmentation de l'expression génique et protéique de la métalloprotéase-2, de la leptine, et de MCP-1 (Ferland-McCollough *et al.*, 2018).

De nombreux travaux se sont intéressés à l'impact d'une forte concentration en glucose sur des adipocytes extra-médullaires. Des travaux sur lignée murine 3T3-L1, par exemple, démontrent une meilleure différenciation des adipocytes en présence d'une forte concentration en glucose. Ces adipocytes présentent moins de gouttelettes lipidiques que ceux obtenus à plus faible concentration en glucose, mais ils présentent un diamètre plus important suggérant un impact sur le stockage des triglycérides. De plus, l'expression de l'adiponectine est diminuée tandis que celle de cytokines pro-inflammatoires est augmentée à forte concentration en glucose. Enfin, cette concentration induit une augmentation de la production des ROS (Y. Lin

et al., 2005) et une inhibition des voies de signalisation liées à l'insuline (Gagnon & Sorisky, 1998).

Comme déjà décrit précédemment, les AM diffèrent des adipocytes extra-médullaires à différents niveaux ainsi que par leur sensibilité au glucose. En effet, l'entrée du glucose dans les AM ne semble pas stimulée par l'insuline et leur niveau de capture basale est plus important que dans les adipocytes extra-médullaires et même les cellules osseuses (Suchacki *et al.*, 2020).

Afin de mieux cerner l'impact du glucose sur les AM humains, des études menées au laboratoire MABLab ont démontré qu'une forte concentration en glucose mimant une hyperglycémie (25 mM de glucose) n'impacte ni l'adipogénèse ni l'obtention d'adipocytes matures (après 14 jours de culture) (Rharass & Lucas, 2019). Ces résultats diffèrent de Keats *et al.* qui, après 7 jours de différenciation, observent une meilleure expression de C/EBPα et de PPARγ2 (E. C. Keats *et al.*, 2014). En revanche, les expressions géniques de ces marqueurs, nécessaires au maintien des fonctions adipocytaires, et de l'adiponectine sont diminuées dans les adipocytes au 21ème jour du culture, suggérant un dysfonctionnement des adipocytes matures en lien avec une production plus exacerbée de ROS, notamment de peroxyde d'oxygène, observée lors de l'exposition chronique à des concentrations élevées de glucose (Rharass & Lucas, 2019). Une autre étude en cours montre un changement d'expression de certaines MMP indiquant un remaniement de la matrice extra-cellulaire (MEC) en réponse à une concentration élevée en glucose. De plus, la libération augmentée des ROS peut directement ou indirectement impacter la structure et la fonctionnalité des protéines en favorisant la production de AGE. Les produits de type AGEs sont en effet générés suite à une réaction non enzymatique des sucres réducteurs et plus particulièrement du glucose comme fréquemment observé dans le cas de diabète (Negre-Salvayre *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014). Ces études suggèrent que les adipocytes médullaires pourraient influencer leur micro-environnement par un remaniement de la MEC et être impliqués dans l'altération du tissu osseux notamment en situation de diabète.

IV. LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE DES CELLULES MEDULLAIRES

1. Généralités sur la MEC

a) Rôles et fonctions de la MEC

La matrice extra-cellulaire (MEC) est une structure dynamique tri-dimensionnelle présente dans tous les tissus du corps humain. Elle est générée par les différents composants cellulaires du tissu et en est ainsi spécifique (Frantz *et al.*, 2010). Au sein d'un même tissu, on distingue deux types de MEC, différentes par leur fonction et par leur localisation spécifique : la membrane basale et la matrice interstitielle (Kular *et al.*, 2014). La membrane basale, composée majoritairement par du collagène de type IV, des laminines et de la fibronectine, est une structure très dense qui possède une certaine résistance à la traction. Elle se situe directement au contact des cellules (Bonnans *et al.*, 2015) et ses composants matriciels communiquent sur la forme et la motilité des cellules via les intégrines. La matrice interstitielle entoure les cellules de manière plus globale et structure le tissu (Bonnans *et al.*, 2015). Ses composants principaux sont les collagènes, l'élastine et la fibronectine formant une structure plus lâche (Kular *et al.*, 2014).

La MEC assure plusieurs fonctions qui dépendent de ses propriétés physiques, biochimiques et biomécaniques, propres aux cellules et aux tissus auxquels elle appartient. Son premier rôle consiste à fournir une charpente pour l'organisation des cellules dans le tissu. De plus, elle possède des sites d'ancrages sur la membrane basale qui permettent non seulement aux cellules d'adhérer et de s'organiser mais aussi à divers processus biologiques de se dérouler, comme la division cellulaire ou le maintien de la polarité cellulaire (**Figure 18**.1). Elle contrôle également la migration des cellules en la favorisant ou en se comportant comme une barrière pour la bloquer (**Figure 18**.2 & 3).

Elle sert également de réservoir de facteurs de croissance qui se lient à différents composants matriciels, empêchant ainsi leur diffusion et générant un gradient de concentration (**Figure 18**.4). Ces facteurs de croissance peuvent également se lier à certains composants matriciels comme les protéoglycanes (PG) qui agissent comme des corécepteurs de signaux (**Figure 18**.5) ou des présentateurs (**Figure 18.**6) intervenant dans la communication entre les cellules. De plus, ces facteurs de croissances peuvent être libérés par l'action de protéases comme les MMP (**Figure 18**.7) qui ont également la capacité de fragmenter d'autres

composants matriciels pour les dégrader ou favoriser leur maturation. Enfin, la MEC possède des propriétés biomécaniques (rigidité, élasticité) détectées par les cellules qui adaptent leurs activités, leur prolifération et leur différenciation en conséquence (**Figure 18**.8) (Frantz *et al.*, 2010; Kular *et al.*, 2014; Rozario & DeSimone, 2010).

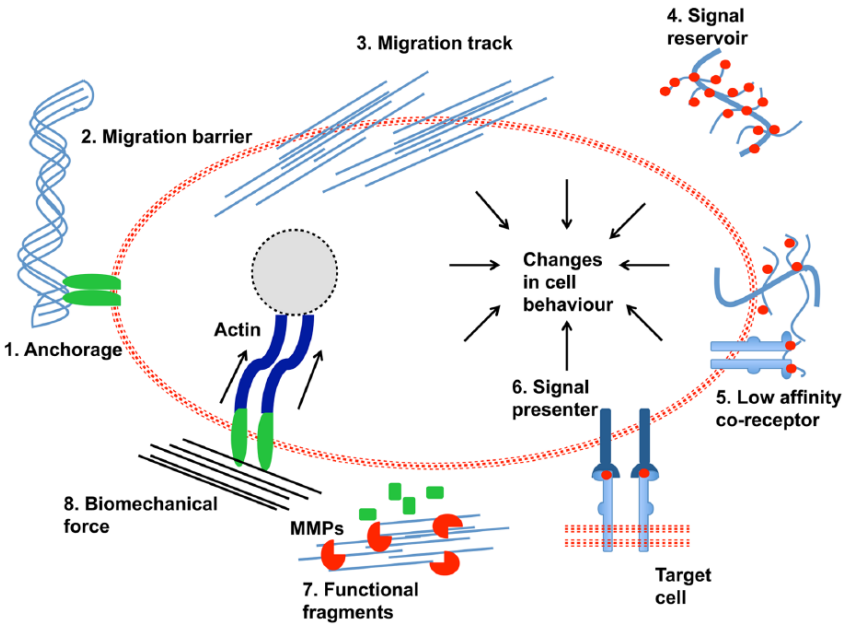


Figure 18 : Fonctions de la matrice extra-cellulaire (Kular *et al.*, 2014)

b) Les composants de la MEC

La MEC est une structure complexe variant d'un tissu à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre. À ce jour, 300 molécules ont été identifiées et classées en différentes familles.

i. La famille des collagènes

Les collagènes (COL) sont les protéines les plus abondantes du corps humain avec 27 types de collagènes au total (classées par chiffre romain). Les collagènes sont composés par 3 chaînes dites « alpha » et sont homo- ou hétéro-trimériques. Les chaînes alpha consistent en la répétition d'un triplet peptidique composé de glycine et de deux autres acides aminées X et Y tels que : Gly-X-Y. Le plus souvent, X et Y correspondent à la proline et l'hydroxyproline (Gordon & Hahn, 2010). Les chaînes alpha s'agencent en triple hélice et peuvent par la suite s'organiser en différentes structures, permettant de répartir les collagènes en différentes classes (Mouw *et al.*, 2014) (**ANNEXE 2**).

Les collagènes procurent un support structural à la MEC et se lient aux cellules. Ils ont la possibilité de s'auto-assembler mais également de se lier à d'autres molécules comme des récepteurs cellulaires de surfaces ou des glycosaminoglycanes par exemple (Mouw *et al.*, 2014).

Afin d'améliorer la régénération tissulaire dans des contextes cliniques, des biomatériaux à base de collagènes ou de revêtement collagénique sont employés. Cette composition collagénique permet d'améliorer l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire afin d'obtenir un produit d'ingénierie tissulaire. Le collagène de type I est notamment employé pour la reconstruction de tissu osseux ou de tendons (Caplan, 2005; Yunus Basha *et al.*, 2015)

ii. Les protéoglycanes et glycosaminoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont des glycoprotéines formées par un noyau protéique spécifique auquel sont liées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) (Frantz *et al.*, 2010). Ils sont classés en quatre grandes familles en fonction de leur localisation (Iozzo & Schaefer, 2015) (**ANNEXE 3**) :

- Les PG intra-cellulaires dits à granules sécrétoires,
- Les PG à la surface cellulaire : les PG transmembranaires et le glypican,
- Les PG de la membrane basale,
- Les PG extra-cellulaires :
    - les petits PG riches en leucine (SLRP : Small Leucine-Rich Proteoglycanes),
    - les hyalectanes / lecticanes, auquel appartient le versicane entre autres,
    - les SPOCK.

Ces PG sont liés à des chaînes de GAG, dont il existe également quatre familles : les sulfates de chondroïtine et de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane et le hyaluronane.

Les PG extra-cellulaires interviennent dans la stabilité et l'organisation des fibres de collagènes et assurent un rôle de remplissage d'espace et de lubrification. En effet, ils sont chargés négativement, par la présence de GAG, ce qui leur permet de capter l'eau et les cations divalents comme le calcium, pour former une sorte de gel qui permet de résister aux contraintes mécaniques. Les PG extra-cellulaires ont également la capacité de lier d'autres facteurs, comme des facteurs de croissance dont ils modulent l'activité (Hynes & Naba, 2012).

Les propriétés physiques liées à la présence des protéoglycanes et glycosaminoglycanes sont très importantes pour la spécificité des tissus. Au cours de l'adipogénèse par exemple, la MEC adapte ses propriétés viscoélastiques et sécrète de l'acide hyaluronique (qui est un GAG), et des protéoglycanes à motif sulfate de chondroïtine comme le versicane (Zizola *et al.*, 2007). Dans le domaine de la régénération osseuse, des biomatériaux à base d'acide hyaluronique sont régulièrement mis au point pour leur propriété pro-ostéogénique. En effet, cette molécule, en association avec d'autres, promeut l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (Zhai *et al.*, 2020).

iii. Les glycoprotéines non collagéniques

Outre les collagènes et les protéoglycanes, la MEC contient d'autres molécules regroupées dans la famille des glycoprotéines non collagéniques. Ces molécules ont diverses fonctions dont la mise en place de la MEC, l'adhésion cellulaire, la liaison de facteurs de croissance et l'activation de différentes voies de signalisation (Hynes & Naba, 2012). Parmi ces molécules, les laminines et la fibronectine sont les plus étudiées.

Les laminines représentent une famille de protéines hétéro-trimériques formées par l'assemblage d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'une chaîne γ. Les laminines sont localisées dans la membrane basale et établissent un lien entre les cellules via les récepteurs cellulaires et la MEC via ses composants, des cytokines et des facteurs de croissance. Elles jouent ainsi un rôle dans la différenciation et la migration cellulaire (Kular *et al.*, 2014).

La fibronectine est une glycoprotéine dimérique qui existe sous deux formes : plasmatique et cellulaire. Cette dernière est située dans la MEC et se lie aux cellules via des intégrines (Schwarzbauer & DeSimone, 2011). La fibronectine a la capacité de se lier à divers composants et possède un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire et l'organisation de la matrice. C'est pourquoi des revêtements à base de fibronectine sont également employés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse pour améliorer l'adhésion des cellules aux biomatériaux employés (Caplan, 2005).

iv. Les protéases

Afin de maintenir une homéostasie du tissu et son bon développement, la MEC contient également des protéases capables de cliver les autres composants matriciels induisant ainsi un remodelage de la MEC. En effet, les remodelages sont importants notamment au cours de la

différenciation cellulaire ou de la cicatrisation tissulaire. Les clivages permettent donc de dégrader ces composants matriciels pour les éliminer mais ils induisent aussi la maturation des collagènes ou encore la libération de facteurs de croissance par exemple.

Il existe différentes familles de protéases.

Les **métalloprotéases** (MMP) sont les enzymes majoritaires qui interviennent dans l'homéostasie tissulaire. Leur activité est faible en absence de sollicitation mais elle devient forte durant le remodelage et la réparation tissulaire ou dans certaines pathologies. À ce jour, 23 MMP ont été identifiées. Elles ont chacune la capacité de reconnaître plusieurs composants matriciels pour les cliver. Collectivement, elles peuvent dégrader l'intégralité de la matrice (Bonnans *et al.,* 2015).

Les protéases « *A Disintegrin And Metalloproteinases* » (**ADAM**) sont classées en deux catégories : les ADAM et les ADAMTS. Les ADAM, dont 22 membres ont été identifiés, clivent les parties extra-cellulaires des protéines transmembranaires libérant ainsi les ectodomaines des cytokines, des facteurs de croissances, des récepteurs et des molécules d'adhésion. Certains ADAM peuvent également cliver des collagènes. Les ADAMTS sont des protéases contenant des répétitions de type thrombospondine de type 1 dans leur séquences carboxy-terminales. On distingue des ADAMTS capable de cliver des PG, d'autres clivant des collagènes (et intervenant dans la maturation des collagènes), d'autres encore dont le rôle n'a toujours pas été établi (Bonnans *et al.,* 2015).

Les **méprines** jouent divers rôles. Elles clivent des composants comme le COL IV, le nidogène et la fibronectine. Elles interviennent également dans la maturation du collagène au moment de l'organisation en fibrilles. De plus, elles peuvent activer les MMP (Bonnans *et al.,* 2015).

D'autres types d'enzymes n'appartenant pas aux familles citées ci-dessus existent, telles que les élastases, les cathépsines ou encore les protéases à sérine, chacune étant spécifique à un composant matriciel.

Pour réguler l'activité des protéases, il existe différents types d'**inhibiteurs**. La famille des TIMP (tissus inhibitor of metalloproteinases) concerne 4 membres qui sont capables de bloquer l'action de certaines MMP et ADAM/ADAMTS mais pas celle des méprines. Le ratio MMP / TIMP permet d'évaluer l'activité protéolytique. La protéine membranaire RECK (REversion-

inducing Cys-rich protein with Kazal motifs) est également capable d'inhiber des MMP et des ADAM/ADAMTS. Les méprines sont inhibées par d'autres molécules telles que la cystatine C, l'élafine et la fétuine A (Bonnans *et al.*, 2015).

Une bonne régulation de l'activité des protéases et de leur inhibiteur est essentielle pour la dynamique de la MEC dans l'homéostasie tissulaire et le développement. Un dérèglement de leur activité peut être responsable de la survenue de diverses pathologies.

2. Remodelage de la MEC au cours de la différenciation des CSM

Les CSM sont les précurseurs mésenchymateux des ostéoblastes et des adipocytes médullaires au sein de la moelle osseuse (Pittenger *et al.*, 1999). Elles permettent une homéostasie et une régénération tissulaire constante. Elles sont situées au sein d'un micro-environnement, majoritairement composé de matrice extra-cellulaire, dont la composition diffère en fonction du tissu où elle se trouve (Gattazzo *et al.*, 2014). Nous nous intéressons ici uniquement aux CSM situées dans la moelle osseuse.

a) La MEC des CSM médullaires

La MEC des CSM issues de la moelle osseuse est majoritairement composée de fibronectine. Elle contient également de nombreux collagènes : le collagène de type VI est prédominant, viennent ensuite le collagène de type I et de type V, et les collagènes de type III, IV, VIII et XVI en plus faible proportion (Marinkovic *et al.*, 2020). On retrouve aussi d'autres types de composants comme des protéoglycanes ou encore la tenascine-C, connue pour influencer la prolifération des CSH (Rolandsson Enes *et al.*, 2017).

Au cours de leur différenciation, la MEC est remodelée par les protéases pour devenir spécifiques des cellules différenciées et assurer leur fonction (Almalki & Agrawal, 2016; Assis-Ribas *et al.*, 2018).

b) La MEC des ostéoblastes

Les OB produisent des protéines qui composent la partie organique de la matrice osseuse. Cette matrice est ensuite minéralisée, conférant au tissu osseux ses propriétés mécaniques.

i. La partie minérale

La partie minérale est composée majoritairement d'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (HA) et de petites quantités de carbonates de calcium, de phosphate et de magnésium. L'HA est un phosphate de calcium en forme de cristal, plat et de taille variable, qui se localise entre les fibrilles de collagène de type I (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Le dépôt de ces cristaux intervient durant le processus de biominéralisation, qui se déroule en 2 étapes.

Au préalable, les OB, en plus de leur production de composants organiques, sécrètent des ions calcique et phosphate. Ceux-ci sont extraits de la cellule par des bourgeonnements de vésicules extra-cellulaires chargées en ions, encore appelées vésicules matricielles. Le processus de minéralisation est ensuite initié par la formation de cristaux d'HA au sein des vésicules. La seconde étape consiste à relarguer ces cristaux, au travers de la membrane des vésicules, dans l'espace extra-cellulaire. Pour cela, une concentration adéquate d'ions calciques, de phosphate inorganique (Pi) et de PyroPhospate Inorganique (PPi) dans le milieu est nécessaire.

Le PPi est un inhibiteur de la minéralisation produit à partir d'ATP par la métalloenzyme ENPP1 (NPP1 sur la figure), située à la surface des OB et des vésicules. Le PPi est également exporté dans l'espace extra-cellulaire par l'ankyrin H (ANK sur la figure) située à la surface des OB uniquement. Pour contrer son effet, l'ALP (TNAP sur la figure), située à la surface des OB et des vésicules, hydrolyse PPi en Pi. Le Pi, dont la présence est nécessaire pour la seconde étape de minéralisation (Orimo, 2010), est ensuite transporté à l'intérieur des microvésicules par les co-transporteurs sodium/phosphate (Na/Pi transporter sur la figure) (**Figure 19**). Après libération, les cristaux d'HA se déposent entre les fibrilles de collagènes.

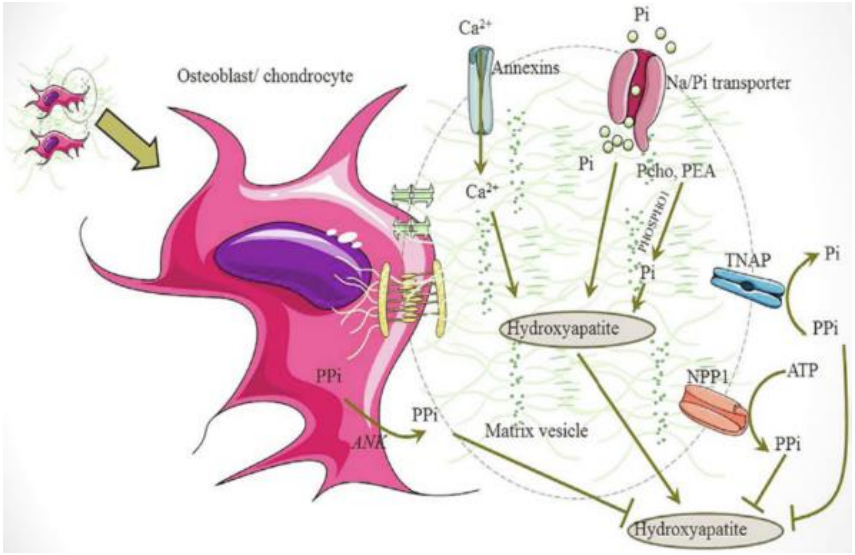


Figure 19 : Processus de minéralisation
D'après (Vimalraj, 2020)

Au cours du temps, les cristaux d'hydroxyapatite s'élargissent sous l'effet de substitutions ioniques au sein des cristaux. En effet, les ions carbonates remplacent les ions phosphates (carbonatation de type B) ou les ions hydroxydes (carbonatation de type A) entraînant des modifications des propriétés physiques et mécaniques du tissu osseux (Bala & Seeman, 2015).

ii. La partie organique

La partie organique est composée de collagènes, de protéoglycanes, de glycoprotéines, de gla-protéines et de lipides (Bonucci, 2012). La mise en place de la matrice se fait progressivement au cours de l'engagement des CSM, de leur prolifération et différenciation des ostéoblastiques, comme démontrée sur la **Figure 20** ci-dessous établie à partir d'une lignée pré-ostéoblastique murine.

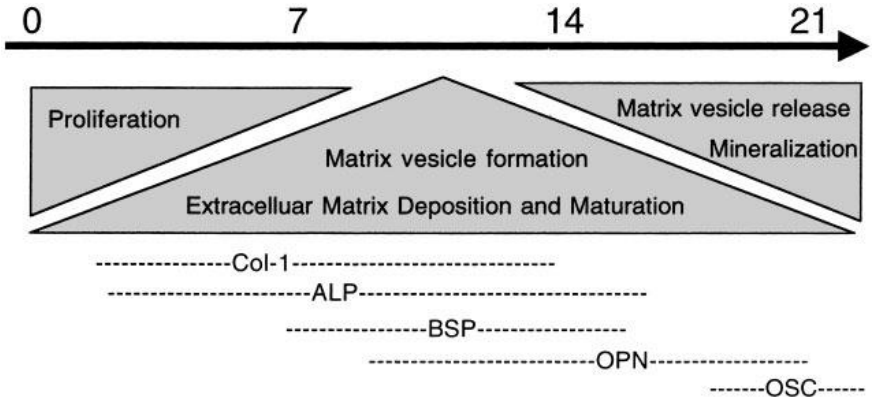


Figure 20 : Diagramme de la mise en place de la matrice extra-cellulaire des ostéoblastes au cours des différentes étapes intervenant dans leur différenciation : la prolifération, la maturation de la MEC et la minéralisation (Col-1 : collagène de type I, ALP : phosphatase alcaline, BSP : Bone Sialo Protéine, OPN : ostéopontine, OSC : ostéocalcine)
(Beck, 2003)

- Famille des collagènes

La partie organique est composée à 90% de collagènes : majoritairement du collagène de type I et de faibles quantités de collagènes de type V et XII.

Les OB sont à l'origine du collagène de type I, un collagène fibrillaire, obtenu après différentes étapes de maturation. Tout d'abord, les OB expriment les gènes spécifiques des chaînes alpha du collagène de type I (**Figure 21**.1), dont ils existent plusieurs isoformes. Après traduction, trois chaînes alpha s'associent en triple hélice pour former une molécule de procollagène stabilisée par des ponts disulfures (**Figure 21**.2). Puis, les extrémités C-terminale et N-terminale du procollagène sont clivées aboutissant enfin à une molécule de collagène (ou tropocollagène (**Figure 21**.3)). Le dosage sérique de l'extrémité N-terminale du procollagène

de type I (PINP, en anglais) est utilisé en tant que marqueur de la formation osseuse chez les patients ostéoporotiques par exemple. Plusieurs molécules de collagènes forment ensuite une fibrille (**Figure 21**.4) qui s'associe à d'autres pour former des fibres de collagènes. Ces différentes étapes constituent la maturation du collagène (Lefevre, 2016).

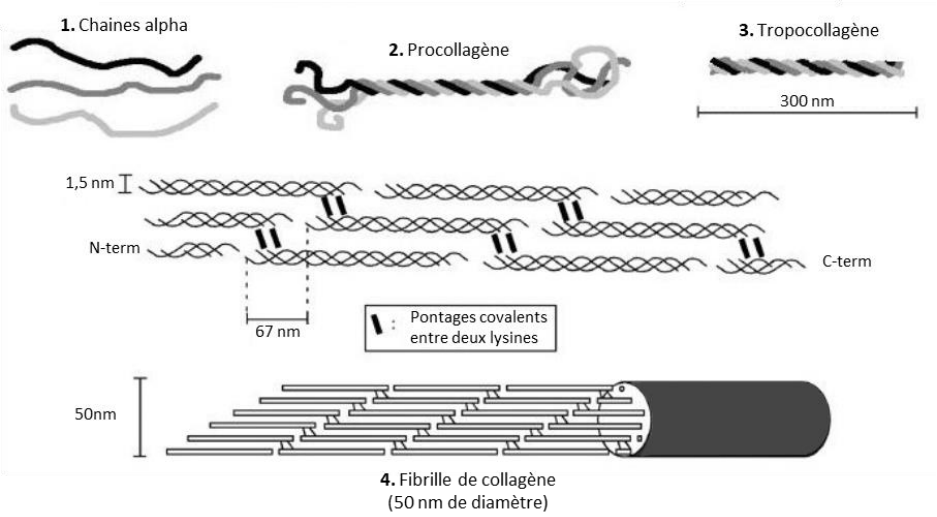


Figure 21 : Mise en place des fibrilles de collagènes (Lefevre, 2016)

Les fibrilles sont reliées entre elles par des molécules de pontage, appelées « cross-links ». On distingue deux types de cross-links : - les cross-links formés enzymatiquement par l'action de la lysil oxydase et - des AGE formés par des glycations non-enzymatiques ou des réactions d'oxydations. Les cross-links enzymatiques se forment en deux temps : l'action de la lysil oxydase permet l'obtention de cross-links divalents réductibles immatures (telles que la déhydro-dihydroxy-lysino-norleucine, la déhydro-hydroxy-lysino-norleucine et la déhydro-lysino-norleucine), puis ces derniers sont modifiés pour devenir des cross-links trivalents matures (telles que la pyridinoline (PYD), le deoxypyridinoline (DPD) et le pyrrole) permettant aux collagènes de fournir des propriétés de résistance et de bonne fonctionnalité à l'environnement osseux. Les cross-links immatures ont la capacité de se transformer en cross-links matures qui sont plus stables, aboutissant à des fibres de collagènes matures au sein de la matrice organique. Les AGE en revanche altèrent les propriétés mécaniques de l'os notamment en fragilisant les fibres de collagènes. Au cours du vieillissement, la quantité de cross-links enzymatiques diminue tandis que la quantité de AGE augmente. Ainsi, la mesure de ces différents cross-links (enzymatiques et non-enzymatiques) permet d'estimer *in vivo* le niveau de qualité de la matrice organique (Saito & Marumo, 2010).

Les fibres de collagènes présentent une organisation particulière. Dans l'os trabéculaire, elles sont parallèles les unes tandis qu'elles sont concentriques dans l'os cortical et entourent un vaisseau sanguin. L'organisation des fibres de collagènes confère une structure à la MEC osseuse à l'intérieur de laquelle s'insèrent les cristaux d'hydroxyapatite lors de la minéralisation. L'expression et la mise en place du collagène de type I intervient dès les premières phases de différenciation ostéoblastique.

- Famille des protéines non collagéniques

La MEC des ostéoblastes est également composée de glycoprotéines telles que l'ostéonectine et des protéines de la classe des **SIBLING** : la BSP, l'ostéopontine, la DMP-1, la sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP) et la MEPE (ces trois dernières sont spécifiques de la dentine et des ostéocytes et ne seront pas détaillées). L'**ostéonectine**, par sa capacité de liaison aux fibres de collagène et aux cristaux d'hydroxyapatite, régule l'assemblage de la matrice collagénique et l'insertion des cristaux. Elle est retrouvée dans d'autres types de tissus et de manière variable dans le tissu osseux. En effet, elle est présente en plus forte quantité dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical où l'organisation des collagènes diffèrent (Bonucci, 2012). La **BSP** et l'**ostéopontine** ont des fonctions antagonistes dans la régulation de la minéralisation. La BSP est nécessaire à la formation des nouveaux cristaux (nucléation) tandis que l'ostéopontine bloque le développement de ces derniers (Bonucci, 2012). De plus l'ostéopontine intervient dans la résorption osseuse via des interactions avec les ostéoclastes (Kahles *et al.*, 2014).

L'ostéocalcine, la Matrix-Gla-Protéine et la périostine sont regroupées dans la classe des Gla-protéines. Ces protéines contiennent un domaine riche en résidus glutamate qui est carboxylé de manière dépendante de la vitamine K. Ce domaine présente une grande affinité pour les ions calcium. L'**ostéocalcine** participe au métabolisme calcique ainsi qu'au dépôt de la substance minérale dans la matrice ; elle est aussi considérée comme un marqueur tardif de la différenciation des ostéoblastes. La **Matrix-Gla-protéine** (MGP) est également présente dans d'autres tissus et intervient dans des processus de calcifications. Au sein des tissus osseux elle agit comme un inhibiteur de la minéralisation. Récemment, une nouvelle étude sur les tissus osseux, suggèrent un rôle pro-minéralisant de la MGP via l'activation de la voie Wnt / β-caténine (J. Zhang *et al.*, 2019). La **périostine**, n'est pas considérée comme un marqueur ostéogénique, puisqu'elle est exprimée par différents types cellulaires. Au niveau du tissu

osseux, elle est surtout exprimée par les ostéocytes et intervient dans le clivage des pro-collagènes jouant donc un rôle dans la mise en place de la matrice osseuse. Elle intervient dans la stimulation de la voie Wnt-β-caténine nécessaire à la formation osseuse (Bonnet *et al.*, 2016) et favorise l'ostéoblastogénèse via l'inhibition de la sclérostine (Bonnet *et al.*, 2009) et pourrait réguler la minéralisation (Merle & Garnero, 2012).

- Famille des protéoglycanes et glycosaminoglycanes

La décorine et le biglycane font partie de la famille des SLRP liés à des sulfates de chondroïtine. Ils sont tous deux présents dans la matrice osseuse et se lient au collagène et à l'hydroxyapatite, intervenant ainsi dans l'organisation des fibres de collagènes et dans la régulation de la minéralisation (Morgan *et al.*, 2015; Waddington *et al.*, 2003).

Le versicane, un protéoglycane à motifs sulfate de chondroïtine, fait également partie de la matrice osseuse et intervient tardivement dans le développement osseux. Il interagit notamment avec le CD44 et la tenascine-C (une glycoprotéine matricielle) pour réguler la prolifération cellulaire (Foster *et al.*, 2005).

De plus, la partie organique contient de nombreux facteurs de croissance, des hormones et des cytokines (Al-Qtaitat & Aldalaen, 2014). Tous ces composants jouent un rôle clé dans les interactions cellules – matrice extra-cellulaire et dans le processus de minéralisation.

c) La MEC des adipocytes médullaires

Au cours de la différenciation des adipocytes extra-médullaires, de nombreuses protéases interviennent pour remanier la MEC. Parmi ces dernières, MMP-2, -9, et -13 dont l'expression augmente au cours de la différenciation des CSM en adipocytes. D'autres MMP interviennent mais à des stades bien précis, supposant un processus complexe dans l'intervention des protéases. L'expression des 4 TIMP est augmentée ou diminuée au cours des différents stades de différenciation dans les adipocytes. En revanche, l'expression de RECK, qui inhibe des MMP clé dans l'adipogénèse, diminue au cours de la différenciation (Almalki & Agrawal, 2016; Assis-Ribas *et al.*, 2018). Bien que l'activité des MMP soit bien décrite dans les adipocytes extra-médullaires, la composition exacte de la matrice extra-cellulaire des adipocytes médullaires est peu connue.

Craft & Scheller, dans leur revue, réunissent les informations obtenues par différentes approches pour décrire la matrice extra-cellulaire des adipocytes médullaires. Ces informations proviennent 1/ d'analyse de la MEC de la totalité de la moelle osseuse chez l'Homme et la souris et 2/ des connaissances de composition matricielle des adipocytes extra-médullaires (Craft & Scheller, 2017) (**Figure 22**).

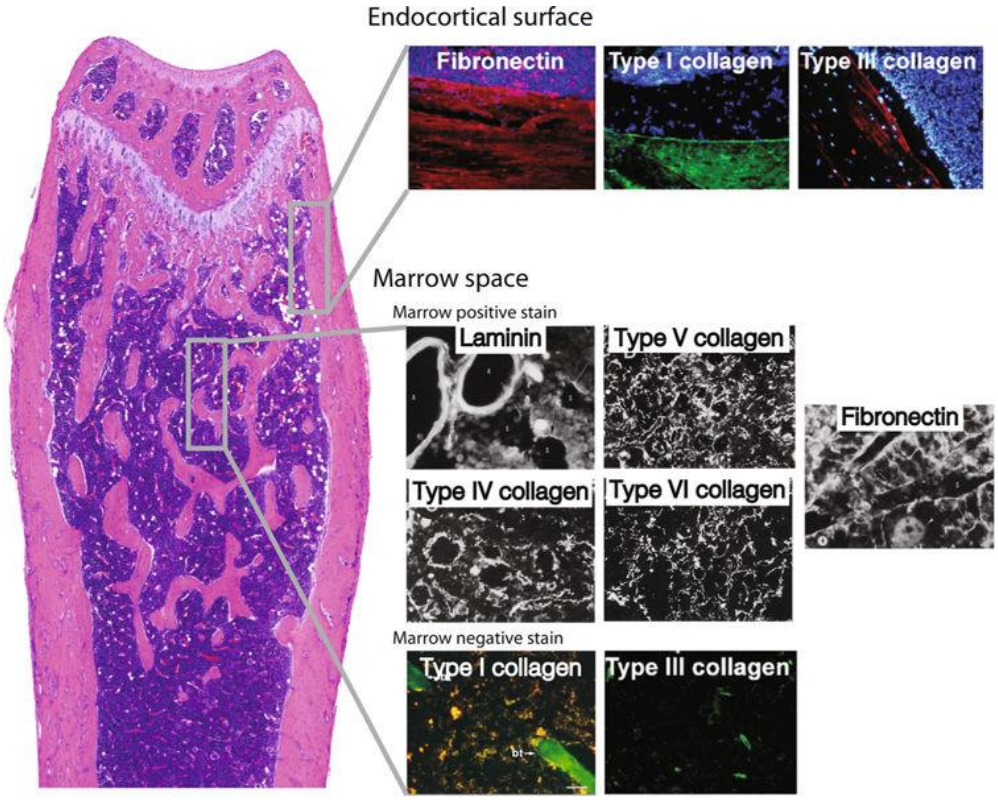


Figure 22 : Composition de la matrice extra-cellulaire au niveau de la moelle osseuse d'un os long d'après des images d'immunofluorescence obtenues de modèles humain et murin (Craft & Scheller, 2017)

Il est ainsi suggéré que la composition matricielle des AM diffère en fonction de leur localisation dans l'os long. En effet, au niveau de la surface endo-corticale, des analyses d'immunofluorescence mettent en évidence la présence de fibronectine et de collagènes de type I et III. Au niveau des travées osseuses, ces mêmes analyses révèlent la présence de fibronectine, de laminine et de collagènes de type IV, V et VI. Les collagènes de types I et III ne sont en revanche pas retrouvés.

La composition de la MEC des AM a également été explorée *in vitro* par immunohistochimie (IHC) par Hoshiba *et al.* à des temps précoces lors de la différenciation adipogénique de CSM humaines (Hoshiba *et al.*, 2010) (**Figure 23**).

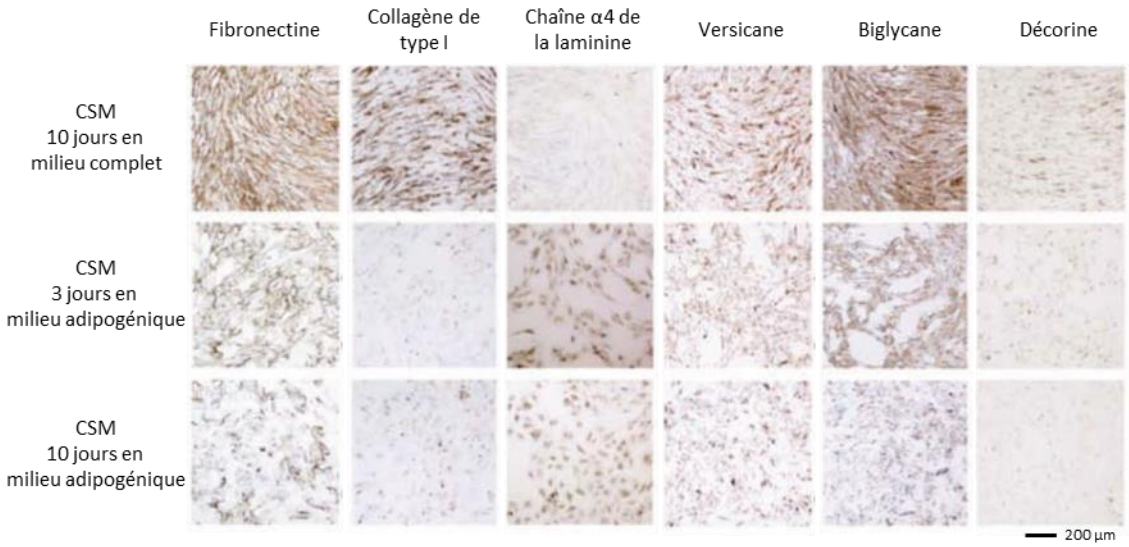


Figure 23 : Composition de la matrice extra-cellulaire au cours de la différenciation adipogénique de CSM issues de la moelle osseuse évaluée par IHC
D'après (Hoshiba *et al.*, 2010)

La fibronectine, le collagène de type I et le versicane sont bien retrouvés dans les MEC de CSM indifférenciées. Leur présence est en revanche très faible dans les matrices des CSM à 3 et 10 jours de différenciation adipogénique. La chaîne alpha 4 de la laminine est absente de la culture des CSM mais fortement présente dans les deux matrices adipocytaires. Le biglycane est présent dans la MEC des CSM, et sa quantité diminue progressivement au cours de la différenciation adipocytaire. Enfin, la décorine est faiblement retrouvée que ce soit dans la MEC des CSM ou dans celle des MEC adipocytaires. Ces résultats confirment bien le remaniement de la MEC au cours de la différenciation des CSM.

- Laminine et Fibronectine

La première étape du remodelage de la MEC au cours de la différenciation adipocytaire concerne la conversion de la membrane basale riche en **fibronectine** en une membrane basale riche en **laminine**. En effet, la fibronectine, décrite comme entravant le processus de différenciation dans les adipocytes extra-médullaires (Kamiya *et al.*, 2002), est dégradée au cours de la différenciation, notamment par la légumaine, une nouvelle protéase décrite dans les CSM, dont l'expression augmente au cours de la différenciation adipocytaire (Jafari *et al.*, 2017).

Noro *et al.* confirment *in vitro* cette évolution de la fibronectine et de la laminine dans les AM, avec une augmentation de l'expression génique de la laminine au cours de la différenciation des CSM issues de la moelle osseuse associées à une diminution de l'expression

génique de la fibronectine (Noro *et al.*, 2013). De plus, Cai *et al.* et Hoshiba *et al.* démontrent la présence de laminine et l'absence de fibronectine dans des MEC dévitalisées d'adipocytes différenciés *in vitro* (**Figure 23**) (Cai *et al.*, 2016; Hoshiba *et al.*, 2010). La présence de fibronectine au niveau des images présentées par Craft *et al.* serait davantage liée à la matrice des autres composants médullaires, comme les CSM, qui expriment bien ce composant.

- Famille des collagènes

L'absence de collagène de **type I** rapportée par Craft & Scheller est confirmée par la faible présence de collagène de type I retrouvée par Hoshiba *et al.* et Cai *et al.* après 3 et 10 jours de culture en milieu adipogénique (Cai *et al.*, 2016; Hoshiba *et al.*, 2010). En effet, la densité de collagène y est trente fois plus faible que celle mesurée dans les MEC dévitalisées de CSM indifférenciées (Cai *et al.*, 2016). Il semble donc que le collagène de type I ne fasse pas partie des composants matriciels majeurs de la MEC des adipocytes médullaires. De plus, après seulement trois jours de différenciation, les cellules ont déjà remanié leur MEC en éliminant le collagène de type I. Ce collagène est davantage retrouvé au niveau de la matrice osseuse dans laquelle il joue un rôle crucial. Sa présence au niveau de la surface endo-corticale doit davantage être liée à la présence des cellules ostéoformatrices qu'aux AM (Craft & Scheller, 2017).

Le collagène de **type IV** fait partie de la membrane basale des adipocytes extra-médullaires. Sa présence dans la MEC des AM est démontrée *in vitro* par Noro *et al.* sur des adipocytes issus de CSM issues de la moelle osseuse cultivées en milieu de différenciation adipogénique durant 28 jours (Noro *et al.*, 2013). On peut alors considérer que ce collagène fait partie de la MEC des adipocytes matures. Les collagènes de **type III** et **V** sont modulés durant la différenciation adipogénique mais aucune donnée ne confirme leur présence dans les AM à ce jour (Huang & Greenspan, 2012). Le collagène de **type VI**, est retrouvée dans de nombreux types cellulaires mais est décrit comme un marqueur spécifique des adipocytes extra-médullaires où son expression est augmentée dans un contexte d'obésité (Dankel *et al.*, 2014). Klein *et al.* a mis en évidence sa présence dans la moelle osseuse, suggérant qu'il puisse être également un des composants de la MEC des AM (G. Klein *et al.*, 1995). De plus, il a la capacité de se lier fortement au collagène de type IV (Mariman & Wang, 2010) déjà présent dans la MEC des AM.

- Famille des protéoglycanes

Les **protéoglycanes** sont des composants essentiels de la MEC. Les travaux de Cai *et al.* et Hoshiba *et al.* (**Figure 23**) montrent une composition différente en termes de PG entre les CSM, les ostéoblastes différenciés et les adipocytes différenciés. En effet, ils mettent en évidence la présence de biglycane, mais aussi l'absence de décorine et de versicane dans les matrices adipocytaires dévitalisées contrairement aux matrices ostéoblastiques dévitalisées (Cai *et al.*, 2016) et aux matrices de CSM indifférenciées (Hoshiba *et al.*, 2010).

Ainsi, la MEC des AM a été peu explorée jusqu'à présent et consiste essentiellement en des analyses *in vitro* réalisées sur des CSM différenciées en adipocytes. Or, l'augmentation de l'adiposité médullaire dans diverses pathologies peut induire un remaniement de la matrice extra-cellulaire pouvant impacter les cellules environnantes. C'est pourquoi, cette matrice doit être davantage caractérisée.

3. Impact des MEC médullaires sur l'adhésion, la prolifération, la différenciation ostéoblastique et la minéralisation

La MEC est une structure complexe qui influe sur le comportement cellulaire. La moelle osseuse, avec ses divers types cellulaires qui produisent chacun une matrice extra-cellulaire spécifique, représente un micro-environnement médullaire d'autant plus riche et complexe. Afin de mieux comprendre l'évolution de chaque type cellulaire dans la moelle osseuse, et l'impact du micro-environnement sur leurs prolifération et différenciations, de nombreuses équipes ont réalisés des cultures *in vitro* de CSM avec des matrices extra-cellulaires de diverses origines (issues de CSM, d'ostéoblastes ou d'adipocytes) afin d'évaluer leur comportement et évolution.

Une des stratégies courantes consiste à ensemencer des CSM sur des MEC dévitalisées. La dévitalisation consiste à éliminer les cellules et débris cellulaires d'un organe, d'un tissu ou d'un tapis cellulaire tout en préservant la composition de la MEC, son contenu en facteurs de croissance et ses propriétés mécaniques. Dans le domaine de l'ingénierie et de la reconstruction tissulaire, la dévitalisation permet de se servir de la MEC et de ses propriétés comme d'un biomatériau sur lequel des cellules sont ensemencées afin de reconstituer un tissu ou un organe.

De nombreux travaux portent sur la caractérisation et l'impact des matrices de CSM et d'ostéoblastes sur l'adhésion, la prolifération et la capacité de différenciation cellulaire. Les données concernant les adipocytes médullaires sont plus limitées.

a) Adhésion et prolifération

L'impact des MEC isolées de CSM indifférenciées sur l'**adhésion** et la **prolifération** des CSM varient d'une étude à l'autre. Par rapport au support plastique, elle peut être meilleure (Baroncelli *et al.*, 2018), identique (Hoshiba *et al.*, 2010), ou moins bonne (Hoshiba *et al.*, 2009). Shakouri-Motlagh *et al.* relient ces résultats à l'âge du donneur de CSM, au nombre de passage des CSM et à la technique de dévitalisation employée pour récupérer la MEC. De plus, l'origine des CSM doit être prise en compte, puisque l'environnement et les signaux reçus par les cellules diffèrent. Tous ces paramètres doivent ainsi être pris en compte et optimisés afin de favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire.

De la même façon, les MEC de cellules différenciées peuvent avoir un impact différent sur l'adhésion et la prolifération des CSM, en fonction de leur niveau de maturité puisque la MEC est remaniée au cours de la différenciation, ce qui peut modifier ses propriétés. Hoshiba *et al.* ont démontré que des MEC issues d'adipocytes ou d'ostéoblastes à différents stades de différenciation adipocytaire et ostéogénique présentent des propriétés différentes. Ils démontrent notamment que le niveau de prolifération est plus faible sur MEC issues d'adipocytes et d'ostéoblastes obtenus à des temps précoces (3 jours et 1 semaine en milieu spécifique, respectivement) que sur MEC issues de CSM indifférenciées ou d'adipocytes et d'ostéoblastes obtenus à des temps plus tardifs (10 jours et 3 semaines en milieu spécifique, respectivement) (Hoshiba *et al.*, 2009, 2010). Ces résultats sont confirmés par Baroncelli *et al.* qui démontrent une meilleure prolifération des CSM sur des MEC issues d'ostéoblastes obtenus après 11 jours que sur des MEC issues de CSM indifférenciées (Baroncelli *et al.*, 2018).

b) Différenciation ostéoblastique et minéralisation

La différenciation ostéoblastique peut aussi être modifiée selon la MEC produite par différents types cellulaires. Baroncelli *et al.* démontrent par exemple une meilleure différenciation ostéoblastique et minéralisation des CSM sur MEC issues d'OB que sur MEC issues de CSM indifférenciées (Baroncelli *et al.*, 2018). Hoshiba *et al.* démontrent une meilleure

efficacité de différenciation sur MEC issues d'ostéoblastes obtenus à des temps précoces (Hoshiba *et al.*, 2009).

Seule l'équipe de Hoshiba *et al.* s'est intéressée aux matrices adipocytaires, qui ne semblent pas entraver la différenciation ostéogénique au regard de l'expression génique de Runx2. En effet, le niveau d'expression de Runx2 est équivalent sur MEC issues d'ostéoblastes et d'adipocytes obtenus à des temps précoces et tardifs. En revanche, l'expression de PPARγ, qui peut réduire l'ostéoblastogénèse, est plus importante sur MEC issues d'adipocytes obtenus à des temps précoces et tardifs et sur des MEC issues d'ostéoblastes obtenus à des temps tardifs que sur MEC issues de CSM et d'ostéoblastes obtenus à des temps précoces (Hoshiba *et al.*, 2012) (**Figure 24**).

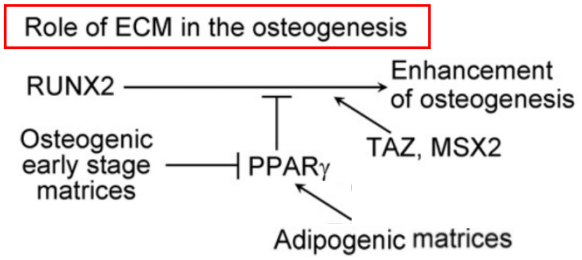


Figure 24 : Impact de la matrice extra-cellulaire sur l'ostéogénèse
D'après (Hoshiba *et al.*, 2012)

Les auteurs expliquent cette expression de PPARγ par le contenu en PG des différentes matrices. En effet, les matrices d'ostéoblastes obtenus à des temps précoces contiennent des PG à sulfate de chondroïtine qui se lient avec les ligands de la voie Wnt permettant l'inactivation de l'expression de PPARγ. Ces PG ne sont pas retrouvés dans les matrices d'ostéoblastes obtenus à des temps tardifs et sont faiblement exprimés dans les MEC issues d'adipocytes, ce qui sous-tendrait l'expression de PPARγ (Hoshiba *et al.*, 2012).

D'après ces études *in vitro*, la matrice des AM, peu caractérisée jusqu'à présent, semble pouvoir impacter les CSM en voie de différenciation ostéoblastique. De plus, les travaux précédents au laboratoire MABLab démontrent un potentiel remaniement de la matrice à la suite d'une exposition à une forte concentration en glucose.

Ainsi, il apparaît intéressant de compléter ces données en évaluant l'effet d'une forte concentration de glucose sur la composition des MEC adipocytaires et leur effet sur la différenciation ostéoblastique et la minéralisation, pour mieux évaluer la conséquence d'une augmentation de l'adiposité médullaire sur la composante osseuse dans le contexte du diabète de type 2.

OBJECTIFS DE LA THESE

Dans un premier projet, des MEC d'adipocytes médullaires dits « matures » sont générées *in vitro* afin d'évaluer leur impact **sur la prolifération des CSM, le processus de différenciation ostéoblastique et la minéralisation.** Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux initiés par Hoshiba *et al.* et Cai *et al.* qui se sont intéressés à l'impact de matrices d'adipocytes non matures. De plus, les MEC adipocytaires sont obtenues à deux concentrations en glucose différentes : une mimant la normoglycémie et l'autre mimant une hyperglycémie sévère, permettant d'évaluer l'effet du glucose en parallèle de l'effet des matrices. Ce travail permettra de mieux comprendre l'implication des adipocytes médullaires dans les altérations osseuses observées dans l'ostéoporose et le diabète de type 2. (*CHAPITRE 1*).

Dans un second projet, la **composition des MEC adipocytaires générées aux deux concentrations de glucose est évaluée**. Cette caractérisation est réalisée en fonction des résultats obtenus pour le *CHAPITRE 1* et concerne des composants matriciels mais aussi des facteurs impliqués dans le processus de minéralisation. Cette étude est encore en cours de réalisation et consiste essentiellement en des mesures d'expressions géniques. Dans un premier temps, l'expression génique de divers composants est mesurée dans des adipocytes médullaires obtenus *in vitro* aux deux concentrations en glucose et comparés à l'expression dans les CSM et les ostéoblastes. Cette première caractérisation est complétée par la mesure d'expression génique des mêmes composants dans des AM isolés *ex vivo* des os longs d'un modèle murin mimant la ménopause et dans des AM isolés *ex vivo* des os longs de patientes post-ménopausées inclues dans une étude clinique. La ménopause peut aussi constituer un bon modèle d'étude dans le cadre de l'obésité et du diabète de type 2, puisqu'elle induit le développement d'une obésité, une perte de l'homéostasie glycémique, une augmentation de l'adiposité médullaire ainsi qu'une atteinte de la quantité et/ou qualité osseuses. Ces trois approches permettent ainsi d'évaluer plus spécifiquement la composition de la MEC adipocytaire dans le contexte de l'ostéoporose associée ou non à un diabète de type 2 (*CHAPITRE 2*).

Enfin, un dernier projet consiste à évaluer l'**effet d'un traitement hypoglycémiant sur l'adiposité médullaire de souris ovariectomisées**. Ce projet complète les données obtenues au niveau de la caractérisation des adipocytes médullaires et permet de mieux cerner l'impact du tissu adipocytaire sur la composante osseuse dans ce modèle murin (*CHAPITRE 3*).

CHAPITRE 1 : IMPACT DES MATRICES EXTRA-CELLULAIRE ADIPOCYTAIRES SUR L'OSTEOBLASTOGENESE ET LA MINERALISATION

I. INTRODUCTION

La quantité d'adipocytes médullaires est corrélée négativement à la densité osseuse dans différentes formes d'ostéoporose, dont celles du vieillissement et de la ménopause (Justesen *et al.*, 2001). Dans le diabète de type 2, l'adiposité médullaire est augmentée (Ferland-McCollough *et al.*, 2018) et associée à une hyperglycémie mal contrôlée (G. Wu *et al.*, 2011) tandis que la masse osseuse est souvent rapportée non modifiée suggérant une fragilité osseuse (Schwartz, 2016). L'emploi de techniques spectroscopiques vibrationnelles, comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectroscopie Raman, ont permis d'identifier plusieurs types d'altérations dans différents modèles de rongeurs de diabète de type 2 ou dans des prélèvements cliniques de patients (Lekkala *et al.*, 2019). Ces altérations apparaissent au niveau de la qualité de la matrice organique avec des modifications des cross-links des collagènes (Viguet-Carrin *et al.*, 2006), réalisés par des réactions enzymatiques ou suite à des réactions non enzymatique avec la formation de produits avancés de glycation (AGE) sous l'effet conjoint du stress oxydant et de la forte concentration de glucose. Par ailleurs, des altérations de la qualité de minéralisation, comme le niveau de minéral par rapport à l'organique, le niveau de substitution ionique et la cristallinité (taille et organisation) des cristaux d'apatites ont été aussi rapportées dans ce contexte.

L'impact négatif des adipocytes médullaires vis-à-vis de la perte osseuse peut s'expliquer par 2 hypothèses : - la mise en place d'une compétition de différenciation, en raison de leur progéniteur commun que sont les cellules stromales mésenchymateuses et - la sécrétion de facteurs influençant l'homéostasie osseuse via l'inhibition de l'ostéoblastogénèse et la stimulation de l'ostéoclastogénèse. Toutefois, le rôle de l'adiposité médullaire vis-à-vis de la qualité osseuse n'a pas encore été exploré.

Le diabète de type 2 est caractérisé par une perte de l'homéostasie du glucose au niveau systémique. Or, la quantité d'adipocytes médullaires est corrélée au taux d'hémoglobine glyquée, un marqueur plasmatique d'une hyperglycémie mal contrôlée (Yu *et al.*, 2017) et certaines de leur activités sont régulés par le glucose (Ferland-McCollough *et al.*, 2018). Une première étude au laboratoire a ainsi mis en évidence une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Rharass & Lucas, 2019) et de l'expression de MMP dans des

adipocytes matures cultivés à forte concentration en glucose (données non publiées), suggérant que les adipocytes médullaires puissent modifier la matrice extra-cellulaire dans ce contexte. Ainsi, une troisième hypothèse expliquant l'impact négatif des adipocytes médullaires sur les cellules environnantes est ici examinée : une action délétère des matrices extra-cellulaires adipocytaires sur l'ostéoblastogénèse et la minéralisation.

La matrice extra-cellulaire est une structure dynamique et cruciale pour l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires et participe donc à l'homéostasie tissulaire (Frantz *et al.*, 2010). La culture de CSM indifférenciées sur des matrices extra-cellulaires produites par des CSM ou des ostéoblastes améliore leur prolifération, leur différenciation ostéoblastique et leur minéralisation. Les matrices extra-cellulaires des adipocytes médullaires en revanche sont peu étudiées et leur impact sur les cellules environnantes est peu documenté. Hoshiba *et al.* ont démontré que les matrices extra-cellulaires produites par des CSM après 3 jours en milieu de différenciation adipocytaire, améliorent la différenciation adipocytaire mais n'inhibent pas la différenciation ostéoblastique (Hoshiba *et al.,* 2012). Ces travaux concernent des matrices adipocytaires précoces obtenus par des cellules en cours de différenciation et notre étude, sur des matrices extra-cellulaires produites pas des adipocytes médullaires matures, obtenues après 21 jours de culture en milieu de différenciation adipocytaire, vient compléter leurs travaux dans le contexte d'une exposition à une hyperglycémie chronique.

Pour mener à bien ce projet, des CSM indifférenciées sont ensemencées sur des matrices extra-cellulaires produites par des adipocytes médullaires cultivées à 2 concentrations de glucose : 5.5 mM et 25 mM pour mimer des conditions normoglycémiques et hyperglycémiques. Il a donc été vérifié la bonne différenciation des cellules en adipocytes et testé plusieurs méthodes pour dévitaliser les MEC adipocytaires.

L'impact de ces deux matrices sur la prolifération est évalué et comparé à une condition contrôle, un support sans matrice. Afin de n'employer qu'une seule concentration de glucose lors de l'amplification des CSM avant différenciation, l'impact du milieu à 25 mM de glucose sur la prolifération et la viabilité des CSM a été comparé au milieu à 5 mM de glucose.

Enfin, les CSM sont mises à différencier, à différentes concentrations en glucose, sur les différents supports afin d'évaluer leur impact sur la différenciation ostéoblastique et la minéralisation par plusieurs tests fonctionnels et une analyse par spectroscopie Raman.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Culture des cellules primaires et différenciation adipocytaire

Des CSM issues de la moelle osseuse humaine, commercialisées par RoosterBio, sont utilisées : ce modèle cellulaire est plus physiologique que les lignées établies. Les expériences sont répétées sur différents donneurs : 2 donneurs féminins (âgées de 20 ans et 26 ans) et 2 donneurs masculins (âgés chacun de 25 ans), dont la capacité de différenciation adipogénique et ostéogénique a été vérifiée par RoosterBio et validée au laboratoire lors de la réception des échantillons cellulaires.

Les CSM sont cultivées dans un milieu à 1 g/L de glucose (5.5 mM) avec du DMEM, dit « complet », contenant 10 % de SVF, 1 % de glutamine (PanBiotech), et 1 % de pénicilline / streptomycine (PanBiotech). Pour la **différenciation adipogénique**, les CSM sont ensemencées à une densité de 1.1 x 10^4 cellules/cm² et mises à proliférer afin d'obtenir une densité cellulaire équivalente à 80 % de confluence. Ce niveau atteint, la différenciation adipocytaire est induite par l'ajout de 6,25 µg/mL d'insuline (PanBiotech), 0.5 µM de dexaméthasone (Sigma), 0,5 mM de 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) et 50 µM d'indométhacine (Sigma) dans le milieu de culture. Deux milieux de différenciation adipogénique sont préparés :

- Un milieu à une concentration de **5.5 mM de glucose (LG)**, pour mimer une glycémie classiquement retrouvée dans l'organisme
- Un milieu à une concentration de **25 mM de glucose (HG)**, pour mimer une hyperglycémie sévère

Les CSM sont cultivées dans ces milieux durant 21 jours, avec un renouvellement de milieu tous les 3 jours. Ce temps correspond à l'obtention d'adipocytes pleinement différenciés et matures en train d'accumuler les triglycérides (Rharass & Lucas, 2019). Par ailleurs, dans une première série d'expériences, les cellules sont aussi récupérées avant différenciation et après 3, 7, 14 et 21 jours en milieu de différenciation pour le suivi de la différenciation adipocytaire.

2. Dévitalisation des MEC adipocytaires

Après 21 jours de culture en milieu de différenciation adipogénique LG ou HG, les MEC sont récupérées par dévitalisation. Cette méthode consiste à éliminer les composants cellulaires pour ne récupérer que la MEC produite.

De nombreuses techniques de dévitalisations sont décrites dans la littérature et sont adaptées au type de culture (2D ou 3D), au type d'échantillons (cellules ou tissus) et enfin au type cellulaire (adipocytes, fibroblastes, ostéoblastes, etc.). On retrouve ainsi des méthodes chimiques (Akbari Zahmati *et al.*, 2017; Gilpin & Yang, 2017); des méthodes physiques consistant à alterner des cycles de congélation / décongélation (Gilpin & Yang, 2017) ou des méthodes hypotoniques qui jouent sur les propriétés osmotiques des cellules pour les faire éclater (Gilpin & Yang, 2017; Rossi *et al.*, 2018).

Ces méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients, notamment au niveau de la durée de la méthode et surtout de l'intégrité des MEC récupérées à l'issue de la dévitalisation. Afin, de choisir la méthode la plus adaptée aux adipocytes, 3 méthodes ont été testées sur la base du travail de Sano *et al.* qui ont comparé différentes techniques de dévitalisation du tissu adipeux (Sano *et al.*, 2014) :

- La méthode chimique : Dévitalisation par ajout d'une solution Triton à 0,5% et de NH_4OH à 20 mM durant 5 minutes à température ambiante.
- La méthode physique : Dévitalisation par répétition de cycle de congélation à -80 °C durant 20 minutes puis décongélation à 37 °C durant 20 minutes à sec. Chaque cycle est répété 5 fois et est complété par un lavage au Tampon Phosphate Salin (PBS) 1X entre chaque cycle.
- La méthode hypotonique : Dévitalisation par ajout d'eau distillée. Cinq traitements à l'eau distillée de 7 minutes à température ambiante sont réalisés.

A l'issue de chaque méthode, un traitement à la DNAse (10 U/mL, Roche) est réalisé afin d'éliminer les résidus d'acides nucléiques. Ce traitement dure 30 minutes et est réalisé à 37 °C.

Pour juger de l'efficacité de chaque méthode, les MEC obtenues sont fixées avec 2 % de formaldéhyde puis incubées avec la sonde nucléaire 4,6-diamidino-2-phenylindole DAPI (1,2 µg/mL, InVitrogen™) et avec la sonde 4,4-difluoro-3a,4a diaza-s-indacene BODIPY® (1 : 200, InVitrogen™) durant 30 minutes. Ces marquages permettent de visualiser, respectivement, les

acides nucléiques (marquage bleu) et les triglycérides (marquage vert) au microscope à fluorescence Axioskop50 (Carl Zeiss). Les images sont obtenues via le logiciel Histolab (Microvision Instrument).

Après validation de la dévitalisation sur des échantillons contrôles, les matrices sont congelées à sec à -80 °C jusqu'à utilisation.

3. Mesure de l'adhésion et prolifération des CSM sur support plastique et matrices

L'effet de la concentration de glucose sur la prolifération est évalué sur des CSM ensemencées sur plastique par comptage des cellules, après fixation au paraformaldéhyde 2% et marquage avec la sonde nucléaire DAPI. Le nombre de cellules comptées est ensuite normalisés au nombre de cellules ensemencées pour évaluer le niveau de prolifération. Les surnageants de culture des CSM sont aussi récupérés afin de doser la Lactate Déshydrogénase (LDH) libérée, avec le kit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, et estimer le niveau de cytotoxicité que pourrait induire une forte concentration de glucose.

Après avoir déterminé la concentration de glucose la plus adaptée, l'adhésion des CSM (4 donneurs) est d'abord évaluée au microscope optique dans les heures qui suivent l'ensemencement par observation de « l'étalement » des cellules sur les supports. Le nombre de cellules adhérentes au bout de 24h est évalué par la mesure de la quantité d'ADN (CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen^{TM}). Brièvement, les échantillons sont récupérés en ajoutant 0,5 ml de tampon de lyse 1X (du kit) par échantillon et stockés à -80 °C jusqu'à utilisation. Puis, 100 µL d'échantillon sont ajoutés à 100 µL de colorant CyQUANT GR 2X/Tampon de lyse 1X et incubés pendant 2 à 5 minutes à température ambiante à l'obscurité. La fluorescence est ensuite mesurée à 500 et 530 nm et la quantité d'ADN est calculée à partir d'une courbe standard. Après obtention de la quantité d'ADN, celle-ci est convertie en nombre de cellules en calculant le rapport : $\frac{Quantité\ d'ADN\ (ng)}{0.242}$ (la valeur de 0.242 correspondant à la masse d'ADN en ng dans une cellule (Bhartiya *et al.*, 2021)).

Le niveau de prolifération des cellules est évalué en appliquant la même méthodologie 48h et 96h après ensemencement des cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules obtenues par rapport au premier jour après ensemencement sur plastique. Le résultat final correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque donneur (4 en tout).

4. Différenciation ostéoblastique des CSM sur matrices adipocytaires

Les CSM sont ensemencées en milieu complet à une densité de 8.3 x 10^3 cellules/cm^2 sur les MEC adipocytaires générées à 5.5 mM (**MEC$_{AM}$ LG**) et 25 mM de glucose (**MEC$_{AM}$ HG**) ainsi que sur plastique, servant de condition contrôle. Les cellules sont mises à proliférer jusqu'à atteindre un niveau de 60 % de confluence, puis la différenciation ostéogénique est induite par l'ajout de 10 mM de β-glycérophosphate (Sigma), de 50 µM d'acide ascorbique (Sigma), de 0,1 µM de vitamine D3 (Sigma) et de 10 nM de dexaméthasone (Sigma). De la même façon que pour la différenciation adipocytaire, plusieurs milieux de différenciation ostéogénique sont préparés :

- Un milieu à une concentration de 5.5 mM de glucose (**LG**),
- Un milieu à une concentration de 25 mM de glucose (**HG**),
- Un milieu à une concentration de 5.5 mM de glucose et 20 mM de mannitol (**LGM**), pour mimer l'osmolarité induite par 25 mM de glucose qui ne modifie pas l'adipogénèse mais pourrait altérer l'activité des ostéoblastes (A. Wang *et al.*, 2014).

Les CSM sont cultivées durant 7 et 16 jours avec un renouvellement de milieu tous les 3 jours.

5. Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR

Les ARN messagers (ARNm) sont extraits : 1) de CSM indifférenciées ; 2) d'adipocytes à différents temps de culture en milieu adipogénique ; 3) d'ostéoblastes après 7 jours de culture en milieu LG, HG et LGM et 4) d'ostéoblastes différenciés après 16 jours de culture en milieu LG, HG et LGM, en utilisant le réactif Extract-All®. Après dosage, un traitement à la DNAse est effectué (DNAse I, Roche) puis la transcription inverse est réalisée sur 250 ng d'ARNm à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific™) afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Puis, les échantillons sont analysés par qPCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en utilisant le master mix SYBRgreen (Applied Biosystems). Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le **Tableau I** et le gène de référence utilisé est le RPL13A.

Tableau I. Couples d'amorces PCR utilisées pour l'amplification des ARNm humains
Séquence sens : F, Séquence anti-sens : R

Gènes	Séquences 5'-3'	Numéros d'accession GenBank
RPL13A	F : GCGGATGAACACCAACCCTT R : GCAGCATACCTCGCACGG	NM_012423.3
ADIPOQ	F : GCCTGCACAGGTTGGAT R : ACCGATGTGTCCCTTAGGAC	NM_004797
ALP	F : CAAAGGCTTCTTCTTGCTGGT R : AAGGGCTTCTTGTCCGTGTC	NM_000478.6
BGLAP	F : ATGAGAGCCCTCACACTCCTC R : GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	NM_199173
COL1A1	F : GGCGAACAGGGCGACAGA R : GGCCAGGGAGACCGTTGAGT	NM_000088.4
Cycline B1	F : TACTGCCTCTCCAAGCCCAA R : TGTTTCCAGTGACTTCCCGA	NM_031966
ENPP1	F : CTCTCGCTGGTATTGTCAGT R : GTTCTGGTTCTATGCACGTC	NM_006208
ITGAV	F : TGTGCAGCCAATACCCATCTCAAT R : CGTTCAAACCAGCCAACCAACA	NM_002210,5
MGP	F : GCCTTAGCGGTAGTAACTTT R : CTGCTGAGGGGATATGA	NM_001190839.3
PIT1	F : GTTCTGCTGTGTGGCAACTC R : GGACACGAACCAAGACATCA	AF102059
POSTN	F : GAGCTTTACAACGGGCAAAT R : TGATGATCTCGCGGAATATG	NM_006475
PPARG	F : GCTTCTGGATTTCACTATGG R : AAACCTGATGGCATTATGAG	NM_015869
RUNX2	F : GCGCTGCAACAAGACCCT R : CCGCCATGACAGTAACCACA	NM_001024630.4
SPARC	F : GTGCAGAGGAAACCGAAGAG R : TCTCATCCAGCTCGCACA	NM_003118.4
SPP1	F : CCTGCCAGCAACCGAAGTTT R : ACTGTCCTTCCCACGGCTGT	NM_001040058.2

6. Dosage des protéines et migration sur gel

Les 1) CSM, 2) adipocytes, 3) MEC dévitalisées de CSM, 4) MEC dévitalisées d'adipocytes et 5) OB, qui ont été cultivés et/ou différenciés en LG, HG ou LGM sont récupérés dans du tampon RIPA, composé de 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0.5 % de désoxycholate de sodium, 0.1 % de SDS et 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, et contenant des anti-protéases (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, ThermoScientific™). Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Lowry avec le kit *DC*™ protein (BioRad) et du sérum d'albumine bovine (BSA) en guise de standard.

Une migration sur gel de polyacrylamide est réalisée avec 4 µg de protéines suivie d'une coloration au nitrate d'argent.

7. Mesure de l'activité ALP

Au 16ème jour de culture en milieu ostéogénique sur plastique et sur matrices adipocytaires, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées au PBS (Dutscher) et congelées à sec à -80 °C.

Après décongélation, les cellules sont récupérées dans du tampon Nonidet P40 à 0,2 % et lysées au sonicateur durant 30 secondes (amplitude 50 % et cycle 0.5) afin de libérer les protéines et autres molécules biologiques. Après une centrifugation de 10 minutes à 3000 rpm à 4 °C, les surnageants sont récupérés. Pour induire la réaction enzymatique, 10 µL de chaque échantillon sont déposés en microplaque auxquels sont ajoutés 90 µL d'une solution contenant 10 nM de p-nitrophényl phosphate, 0,56 M de 2-amino-2-méthyl-1-propanol pH 10,3 et 1 mM de $MgCl_2$. Après 4 minutes d'incubation à 37 °C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 40 µL de NaOH à 1 M. Enfin, la microplaque est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm. L'activité ALP est obtenue par la formule :

$$\frac{Absorbance\ x\ 1000}{18{,}182\ x\ minutes\ d'incubation\ x\ 10\mu L} = nmol\ Pi\ /\ \mathrm{min}/\ mL$$

Cette activité est ensuite rapportée à la concentration en protéines. Le résultat final correspond à :

$$\frac{Activité\ ALP}{[protéines]} = nmol\ Pi/\ \mathrm{min}/\ mL/\ mg\ protéines$$

8. Evaluation du niveau de minéralisation cellulaire par mesure de l'hydroxyapatite

Pour quantifier le niveau de minéralisation par cellule, le taux d'hydroxyapatite est mesuré avec le kit Osteoimage™ Mineralization Assay (Lonza). Ce kit se base sur la liaison spécifique d'un fluorochrome à l'hydroxyapatite des nodules osseux formés. Cette méthode est plus spécifique et quantitative que la méthode Von Kossa, qui réagit avec les phosphates, les carbonates et autres sels, et la coloration à l'Alizarine rouge qui réagit avec le calcium (Bonewald *et al.*, 2003; Y. H. Wang *et al.*, 2006).

Ainsi, au 16ème jour de culture en milieu de différenciation, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 2 %. Après trois rinçages avec la solution de lavage, les cellules sont incubées avec le fluorochrome durant 30 minutes à l'obscurité. Après un dernier rinçage, la quantité d'hydroxyapatite dans les cellules est évaluée 1) qualitativement au microscope à

fluorescence ou 2) quantitativement au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco) avec excitation des échantillons à 492 nm et récupération de la fluorescence à 500 nm.

Le niveau de minéralisation est évalué en établissant le rapport de la valeur de fluorescence sur le nombre de cellules (déterminé après mesure de la quantité d'ADN avec le Kit CyQUANT®, comme décrit dans le *paragraphe II.3*, et conversion en nombre de cellules).

9. Spectroscopie Raman

Des CSM sont ensemencées en milieu complet à une densité de 1.1 x 10^4 cellules/cm² sur des lamelles de CaF_2 de 13 x 1 mm (Crystran, Poole, UK) et différenciées durant 21 jours en milieu de différenciation adipogénique LG et HG. Au 21ème jour de différenciation, les cellules sont fixées au formaldéhyde 2% ou dévitalisées avec la méthode adaptée puis fixées au formaldéhyde 2 % afin de valider la méthode de dévitalisation et l'intégrité de la MEC récupérée. D'autres lamelles de CaF_2, avec ou sans MEC (en guise de contrôle), sont utilisées pour y ensemencer des CSM et les cultiver en milieu de différenciation ostéogénique. Après 16 jours en milieu de différenciation, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 2 % pour mesurer divers paramètres de minéralisation.

Les échantillons sont analysés avec l'instrument LabRAM HR 800 (HORIBA; Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) avec un laser à diode (λ = 785 nm) et un objectif à immersion dans l'eau (Nikon, ×100, NA = 1.25). Le temps d'acquisition est fixé à 30 secondes. Le **rapport minéral / organique** est défini par le rapport de la bande à 960 cm^{-1} (υ_1PO_4) sur la bande à 1002 cm^{-1} qui correspond à la phénylalanine. Ce rapport correspond à la quantité de minéral rapportée à la quantité de matière organique. La **maturité du collagène** est évaluée par le rapport des bandes à 1660 et 1690 cm^{-1} qui correspondent aux cross-links enzymatiques des collagènes. Les substitutions de l'ion phosphate de l'apatite par un groupement **carbonates (substitutions dites de type B)** sont définies par le rapport de la bande à 1070 cm^{-1} (υ_1CO_3) sur la bande à 960 cm^{-1} (υ_1PO_4). Ce rapport correspond à la quantité de carbonates de type B par rapport à la quantité de minéral. Enfin, la **cristallinité** est définie par l'inverse de la largeur à mi-hauteur de la bande υ_1PO_4. Elle reflète la taille et l'organisation des cristaux d'hydroxyapatite.

10. Tests statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (ESM). Le seuil de $p < 0.05$ est établi pour déterminer les données significatives. Une analyse de la variance à deux facteurs (Two-Way ANOVA) est réalisée sur les échantillons de la cinétique de différenciation adipocytaire. L'analyse de l'adhésion et de la prolifération des CSM sur MEC adipocytaires est réalisée avec test de Student (unpaired t-test). Les autres échantillons sont comparés selon le test non paramétrique et non apparié de Mann-Whitney. L'ensemble des tests statistiques est réalisé avec le logiciel Prism5 (GraphPad).

III. RESULTATS & DISCUSSION

1. Effet de la concentration du glucose sur la prolifération et la différenciation des CSM *in vitro*

L'effet de la concentration du glucose sur la prolifération et la différenciation des CSM humaines est discuté. Certains travaux démontrent que la forte concentration en glucose n'impacte pas la prolifération des CSM (Weil *et al.*, 2009) tandis que d'autres démontrent une diminution de ce potentiel (Hankamolsiri *et al.*, 2016; E. Keats & Khan, 2012; Y. M. Li *et al.*, 2007). Dans notre modèle d'étude, les cellules passent par une étape de prolifération avant leur différenciation en adipocytes et en ostéoblastes sur les matrices, pour atteindre une densité cellulaire adéquate (estimée visuellement à 80 % et à 60 % de confluence, respectivement). Afin de ne choisir qu'une seule concentration en glucose lors de cette amplification (notamment sur matrices), l'impact de la concentration en glucose sur la prolifération des CSM est testé à 5.5 mM de glucose (LG) ou à 25 mM de glucose (HG) pendant 48h.

Le niveau de prolifération des CSM est estimé par comptage des noyaux marqués au DAPI (4 expériences indépendantes, 4 donneurs différents). La cytotoxicité est évaluée par la mesure de la Lactate Déshydrogénase (LDH) qui est libérée lors d'altérations de la membrane plasmique (4 expériences indépendantes, 4 donneurs différents) (**Figure 25**).

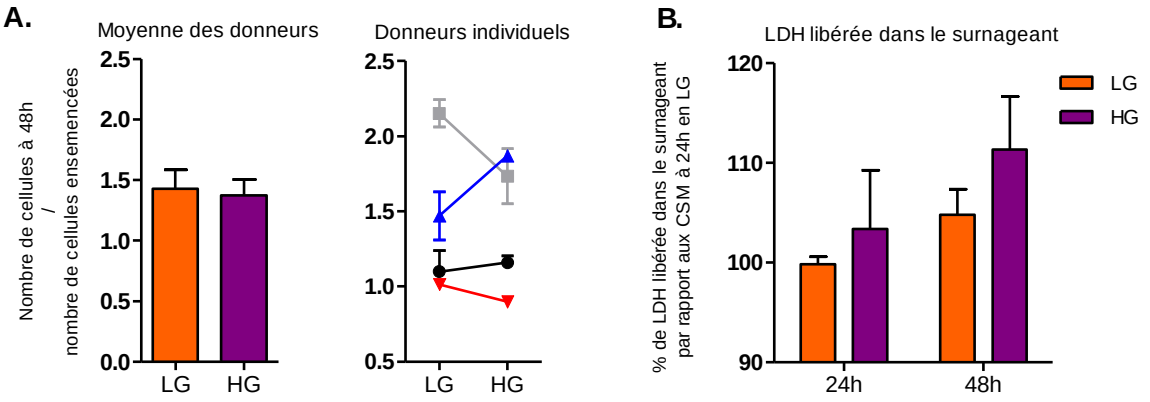


Figure 25 : Effet du glucose sur la prolifération des CSM **A.** Comptage à 48h du nombre de noyaux marqués au DAPI sur CSM cultivées en LG et HG. Les résultats sont rapportés au nombre de cellules ensemencées. La moyenne des résultats des 4 donneurs est présentée (Test de Mann-Whitney) ainsi que les résultats obtenus pour chaque donneur (Two-way ANOVA) **B.** Mesure de la LDH libérée dans le surnageant à 24h et 48h de culture en milieu LG et HG

Après 2 jours de prolifération, le nombre de cellules obtenues pour les quatre donneurs est équivalent pour les deux conditions de glucose. En revanche, en regardant le profil de chaque donneur individuellement, on constate une variation entre les donneurs : les donneuses femmes présentent un nombre équivalent de cellules dans les deux conditions (droites rouge et noire) tandis que les donneurs hommes présentent des profils différents (droites grise et bleue) ($p < 0.0001$, Two-way ANOVA) (**Figure 25.A**). Tout comme le nombre de cellules, le taux de LDH libérée dans le surnageant à 24 et 48 heures pour chaque condition ne varie pas pour l'ensemble des donneurs (**Figure 25.B**). En revanche, certains donneurs présentent une libération plus importante en condition HG qu'en condition LG, ce qui peut indiquer un effet cytotoxique du glucose.

Nous choisissons donc d'ensemencer et de cultiver les CSM à une concentration unique de glucose, 5.5 mM, avant de lancer leur différenciation. Cette concentration est physiologique contrairement à la concentration de 25 mM qui correspond à la concentration de glucose retrouvée dans le cadre d'une hyperglycémie sévère. Ainsi, afin de mieux évaluer l'impact du glucose sur la matrice extra-cellulaire des adipocytes médullaires, la condition à 5.5 mM nous sert de condition contrôle et les cellules basculent soit vers un milieu de différenciation à la même concentration, soit vers un milieu de différenciation enrichie en glucose.

Après culture des CSM en milieu complet à 5.5 mM de glucose, les cellules sont mises à différencier en milieu adipogénique. L'effet du glucose sur l'adipogénèse est évalué par la mesure d'expression génique de PPARγ, facteur de transcription clé dans la différenciation adipogénique, et de l'adiponectine (*ADIPOQ*), autre marqueur précoce de la différenciation. Des mesures sont réalisées à différents temps de culture en milieu de différenciation adipocytaire : 0, 3, 7, 14 et 21 jours (**Figure 26**) (3 donneurs, n = 9). Les résultats sont normalisés à l'expression génique des cellules au 3ème jour en condition LG.

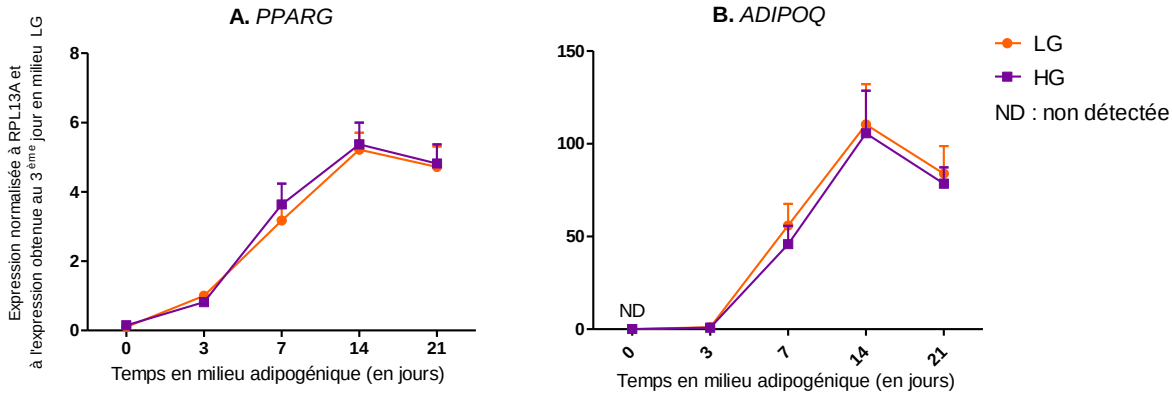


Figure 26 : Expression de **A.** *PPARG* et **B.** d'*ADIPOQ* au cours de la différenciation et maturation adipocytaire en milieux LG (orange) et HG (violet) (ND : expression non détectée).

L'expression de PPARγ est retrouvée dans les CSM avant leur mise en milieu de différenciation (**Figure 26.A**). Ce résultat n'est pas surprenant puisque PPARγ possède deux isoformes protéiques : PPARγ1, retrouvée dans plusieurs types cellulaires dont les CSM, et PPARγ2, spécifique des adipocytes (Aprile *et al.*, 2014). Le couple d'amorces utilisé reconnait les deux isoformes, c'est pourquoi une faible expression de PPARγ est retrouvée dans les CSM. L'expression de l'adiponectine, spécifique des adipocytes, n'est en revanche pas détectée dans les CSM (**Figure 26.B**). L'expression de ces deux gènes augmente jusqu'au 14ème jour et se stabilise au 21ème jour pour PPARγ tandis qu'elle diminue pour l'adiponectine. Le profil d'expression est identique pour les deux concentrations en glucose ($p < 0.0001$, two-way ANOVA). Ces résultats confirment la bonne différenciation adipocytaire et sont identiques pour les trois donneurs analysés, indiquant que la différence de prolifération observée précédemment pour un donneur n'impacte pas le processus de différenciation.

Ces résultats diffèrent d'autres travaux démontrant des impacts du glucose sur la différenciation des adipocytes : Keats *et al.* démontrent une expression de PPARγ plus élevée en HG qu'en LG au 7ème jour de différenciation (E. Keats & Khan, 2012), et Rharass & Lucas démontrent une expression plus faible de PPARγ et de l'adiponectine en condition HG qu'en

condition LG au 21ème jour de culture consécutive à l'élévation des ROS (Rharass & Lucas, 2019).

Indépendamment de la concentration en glucose, nous savons que toutes les cellules ne se différencieront pas. En effet, après la différenciation adipocytaire, la culture obtenue est composée d'une part d'adipocytes matures et d'autre part d'adipofibroblastes, des cellules non chargées en lipides mais exprimant des facteurs adipocytaires (Holt *et al.*, 2014). Néanmoins, ces adipofibroblastes expriment très peu PPARγ et l'adiponectine(Rharass & Lucas, 2019). Pour évaluer la quantité d'adipocytes « vrais » obtenus, les tapis cellulaires sont marqués à 21 jours avec les fluorochromes DAPI et HCS LipidToxTM afin de visualiser respectivement les noyaux cellulaires (en bleu) et les triglycérides (en vert) au microscope à fluorescence (**Figure 27**).

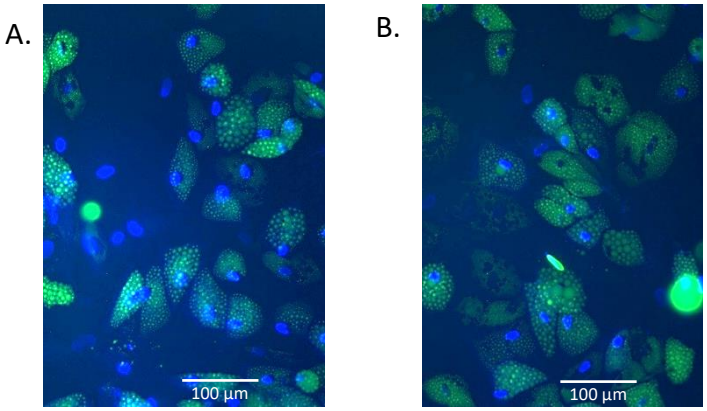


Figure 27 : Observation des adipocytes obtenus à 21 jours en **A.** LG et **B.** HG après marquages des noyaux au DAPI (bleu) et des triglycérides avec le HCS LipidTox™ (vert)

On observe lors de la visualisation à différents temps au microscope optique et après marquage des gouttelettes lipidiques à 21 jours (**Figure 27**), que le nombre d'adipocytes pleinement différenciés obtenus semble identique dans les deux conditions en glucose, sans modification évidente de la taille des gouttelettes lipidiques, à la différence du modèle 3T3-L1, correspondant à des adipocytes extra-médullaires (Y. Lin *et al.*, 2005). Chaque donneur utilisé dans ce travail a été choisi pour sa bonne capacité de différenciation adipocytaire estimée à plus de 50 %.

Ainsi, la forte concentration de glucose n'impacte pas le processus de différenciation adipocytaire des CSM humaines utilisées.

2. Mise au point et validation de la méthode de dévitalisation des adipocytes médullaires *in vitro*

Après validation de la bonne différenciation adipocytaire des CSM aux deux concentrations en glucose, les cultures cellulaires sont dévitalisées au 21ème jour afin de ne conserver que la matrice extra-cellulaire produite.

De nombreuses méthodes de dévitalisation sont disponibles dans la littérature et sont spécifiques des types cellulaires et tissus étudiés. Comme peu de méthodes concernent des adipocytes cultivés en 2D, nous avons choisi de tester 3 méthodes déjà utilisées sur des tissus adipeux en 3D (Flynn, 2010; L. Wang *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2011) : une méthode chimique, une méthode physique et une méthode hypotonique, toutes trois complétées par un traitement à la DNAse. Après dévitalisation, les MEC sont marquées (DAPI et HCS LipidTox™) afin de vérifier l'élimination des divers composants cellulaires : les acides nucléiques apparaissent en bleu et les triglycérides apparaissent en vert (**Figure 28**).

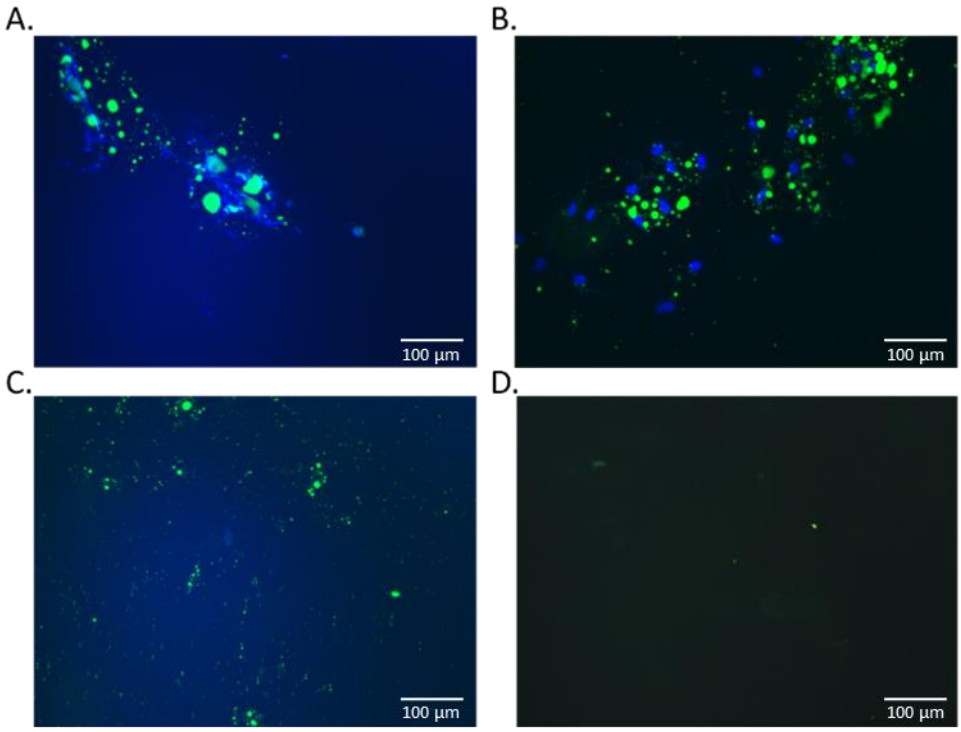


Figure 28 : Comparaison des méthodes de dévitalisation sur adipocytes cultivés durant 21 jours à 25 mM de glucose avec traitement à la DNAse et marquages DAPI (bleu) et HCS LipidTox™ (vert) : **A.** Méthode chimique, **B.** Méthode Physique et **C.** Méthode hypotonique sans traitement à la lipase **D.** Méthode hypotonique avec traitement à la lipase

La méthode chimique semble très efficace à l'œil nu, en raison du décollement immédiat de lambeaux cellulaires après l'ajout de détergents. Cette méthode ne nécessite que quelques

minutes de traitement contrairement aux autres. En revanche, lors de l'observation au microscope à fluorescence, nous constatons la présence résiduelle d'acides nucléiques associés à des débris membranaires persistants ainsi que la présence de triglycérides correspondant à des gouttelettes lipidiques non éliminées (**Figure 28.A**). Cette méthode ne permet donc pas de dévitaliser l'intégralité de la culture cellulaire. La méthode physique consiste à alterner des cycles congélations / décongélations. Cette méthode nécessite davantage de temps mais permet de visualiser des décollements cellulaires à l'œil nu lors de sa réalisation. Cependant, la visualisation des MEC au microscope à fluorescence présente des résultats similaires à la méthode chimique : présence de résidus d'acide nucléiques et de noyaux entiers, de débris membranaires et de gouttelettes lipidiques (**Figure 28.B**).

Ces observations, identiques quelle que soit la concentration en glucose d'obtention des matrices, montrent la persistance de cellules entières non éliminées. Ces deux méthodes ne permettent ainsi pas d'obtenir efficacement des MEC adipocytaires dévitalisées. De plus, le décollement de lambeaux cellulaires suggère la perte de composants cellulaires comme décrit dans la littérature (Gilbert *et al.*, 2006).

La méthode hypotonique consiste à réaliser plusieurs cycles d'ajout d'eau distillée et de rinçage au PBS sur les cellules. Lors de ces cycles, on peut observer au microscope optique l'arrondissement des adipocytes qui se gorgent d'eau puis éclatent, libérant ainsi leurs gouttelettes lipidiques et composants cellulaires. Cette méthode est visuellement plus douce pour dévitaliser les tapis cellulaires. Lors de l'observation au microscope à fluorescence, on constate, par l'absence de marquage DAPI, une élimination homogène du matériel génique. Cependant des résidus de gouttelettes de triglycérides libérées, probablement fixées de manière non spécifique au support, persistent (**Figure 28.C**). Au regard de l'efficacité de cette méthode par rapport aux autres, il est décidé de compléter le protocole avec un traitement à la lipase afin d'éliminer les derniers triglycérides présents.

Pour cela, divers tests doses / efficacités sont réalisés avec de la lipase (Sigma). Parmi les différentes doses testées, la condition à 40 U/mL a permis d'éliminer le plus efficacement les derniers résidus de triglycérides. Associée au traitement à la DNAse, on peut constater de l'élimination des acides nucléiques ainsi que des derniers triglycérides (**Figure 28.D**).

Ces marquages fluorescents ont certes permis de constater de l'absence de composants cellulaires mais pas de la présence de matrice à la suite de la dévitalisation. Pour s'en assurer,

les protéines des MEC dévitalisées sont récupérées et un dosage est effectué (n = 2). La concentration mesurée est comparée à la concentration obtenue sur des cultures d'adipocytes médullaires non dévitalisés (n = 2), des cultures de CSM non dévitalisées (n = 4) et des cultures de CSM dévitalisées (n = 4). Ces mesures permettent de comparer la quantité de MEC récupérée dans les adipocytes par rapport aux MEC de CSM qui sont déjà bien étudiées (**Figure 29.A**). De plus, une migration sur gel de polyacrylamide est réalisée (**Figure 29.B**). Enfin, une analyse par spectroscopie Raman est réalisée sur les MEC adipocytaires ainsi que sur culture d'adipocytes médullaires non dévitalisées afin d'évaluer l'intégrité de la MEC après dévitalisation (**Figure 29.C**).

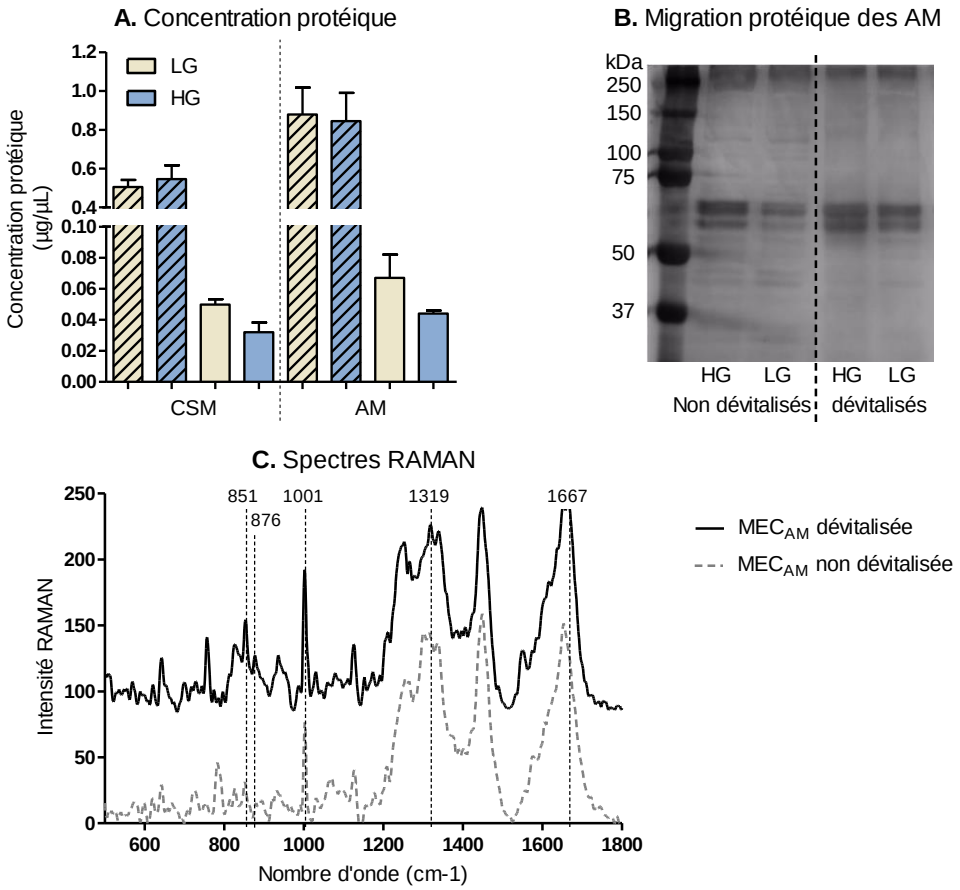


Figure 29 : **A.** Concentration protéique (en µg/µL) dans les CSM et les adipocytes médullaires (AM) non dévitalisés (histogrammes hachurés) et dans les matrices de CSM et d'AM dévitalisés par choc hypotonique (histogrammes pleins). Les CSM et les AM cultivés en LG sont présentés en beige et ceux cultivés en HG sont présentés en bleu. **B.** Migration sur gel d'échantillons protéiques des AM cultivés en LG ou HG et non dévitalisés et des AM cultivés en LG ou HG puis dévitalisés. **C.** Comparaison de la moyenne des spectres obtenus par spectroscopie Raman pour les matrices adipocytaire (tracé plein) et pour les adipocytes non dévitalisés obtenu en milieu LG (tracé interrompu)

Ces deux approches, quantification protéique et analyse Raman, mettent en évidence la présence de matrice après la dévitalisation. Après dévitalisation par choc hypotonique, la concentration protéique mesurée est environ 10 fois plus faible que la concentration protéique initiale pour chaque type cellulaire (**Figure 29.A**). Toutefois, cette quantité de protéines correspond à celle retrouvée notamment après dévitalisation de CSM humaines (données personnelles de Bram van der Eerden, Department of Internal Medicine, Erasmus University Medical Center Rotterdam). De plus, les quantités récupérées de protéines matricielles adipocytaires sont équivalentes à celles des CSM pour lesquelles des effets sur l'ostéoblastogénèse ont déjà été rapportées (Baroncelli *et al.*, 2018).

La présence de protéines dans les MEC dévitalisées est également confirmée après migration des échantillons sur gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au nitrate d'argent (**Figure 29.B**). Ce gel met en évidence des bandes protéiques dans les échantillons matriciels ce qui confirme la présence de matrices suite à la dévitalisation des adipocytes en culture.

L'analyse par spectroscopie Raman démontre que le profil de la moyenne des spectres de matrices ne diffère pas de celui des cellules non dévitalisées (4 donneurs), quelle que soit la concentration en glucose : ce résultat montre que la composition des matrices adipocytaires n'est pas altérée et assure de la bonne intégrité des MEC récupérées après dévitalisation (**Figure 29.C**).

Ainsi, après avoir testé différentes méthodes de dévitalisation, **la méthode par choc hypotonique** suivie d'un traitement DNAse / lipase **s'est révélée être la plus efficace pour éliminer les adipocytes médullaires, obtenus *in vitro* et en 2D, sans altérer la matrice.** Cette méthode est donc choisie pour isoler les MEC et évaluer leur impact sur la prolifération et différenciation des CSM.

3. Adhésion et prolifération des cellules sur matrices

Avant la mise en différenciation ostéogénique, les cellules passent par une étape de prolifération. Il s'agit donc dans un premier temps d'évaluer l'impact que peuvent avoir les matrices adipocytaires sur l'adhésion et la prolifération des cellules, puisque les CSM sont sensibles à leur support qui peut modifier leur capacité d'adhésion et de prolifération. Les cellules sont ensemencées en condition LG sur les matrices adipocytaires obtenues en LG (MEC_{AM} LG) et HG (MEC_{AM} HG) ainsi que sur support plastique en guise de contrôle. Un comptage cellulaire est réalisé à 24h, 48h et 96h après marquage des noyaux (DAPI) et

observation au microscope à fluorescence. L'expression génique de la Cycline B1, protéine régulatrice du cycle cellulaire, et de certaines intégrines clés (Frith *et al.*, 2012) ;, protéines intervenant dans l'adhérence et la prolifération des cellules, est mesurée à 48h, juste avant la mise en différenciation ostéogénique. Les résultats sont normalisés aux données obtenus à 24h sur support plastique en LG et sont présentés en **Figure 30**.

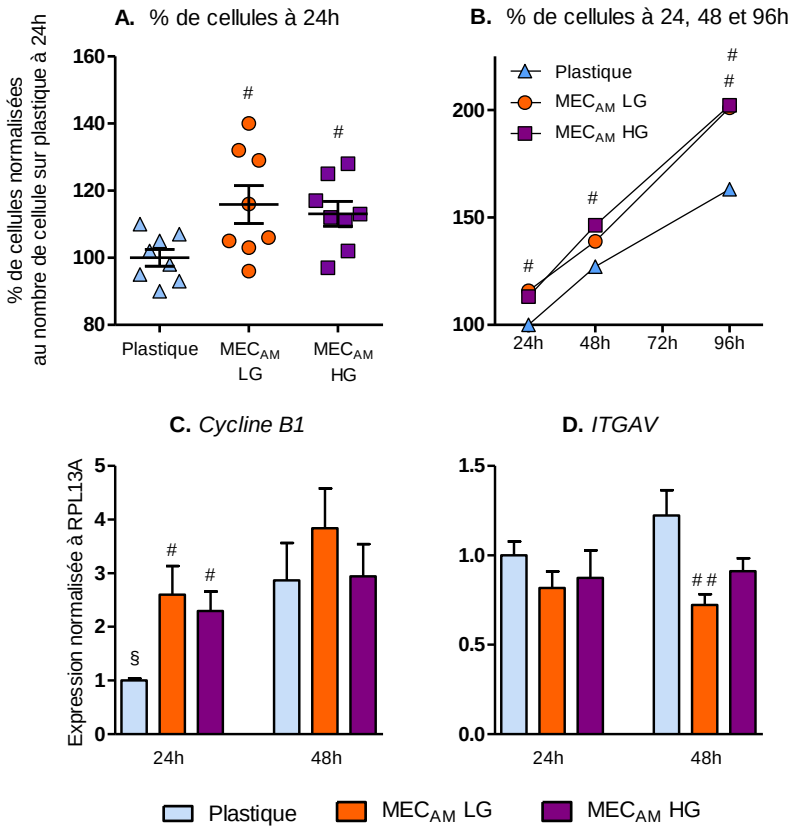


Figure 30 : **A.** Adhésion et **B.** Prolifération des cellules. Pourcentage du nombre de cellules sur les différents supports et à différents temps par rapport au nombre de cellules sur plastique au 1er jour d'ensemencement ($^{\#}$ $p < 0.05$ *vs* plastique dans les mêmes temps, unpaired t-test). Expressions géniques à 24 et 48h de **C.** la Cycline B1 et **D.** l'intégrine alpha V (ITGAV) dans les CSM ensemencées sur plastique (bleu), sur matrices obtenues en LG (orange) et sur matrice obtenue en HG (violet). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression génique mesurée sur plastique ($^{\#}$ $p <$ 0.05, $^{\#\#}$ $p < 0.01$, *vs* plastique ; § $p < 0.05$, *vs* 48h pour le même support, Test de Mann-Whitney).

Après ensemencement, les cellules ont bien adhéré quel que soit le support : plastique ou matrices adipocytaires. On dénombre environ 15% de cellules en plus sur les matrices que sur le support plastique. ($^{\#}$ $p = 0.02$ sur MEC_{AM} LG et $^{\#}$ $p = 0.01$ sur MEC_{AM} HG) (**Figure 30.A**). Par la suite, les cellules prolifèrent quel que soit le support : à 48h, la quantité de cellules dénombrées est supérieure à celle retrouvée à 24h, que cela soit sur plastique ($p = 0.0003$), sur MEC_{AM} HG ($p = 0.0008$) ou sur MEC_{AM} LG ($p = 0.07$). À 96h, le nombre de cellules dénombrées est plus élevée que celui retrouvée à 48h pour tous les supports ($p = 0.004$ sur

plastique, p = 0.003 sur MEC_{AM} LG et p = 0.0004 sur MEC_{AM} HG). On observe encore une fois une différence entre le nombre de cellules dénombrées sur plastique et sur matrices (p = 0.06 sur MEC_{AM} LG et $^{\#}$ p = 0.01 sur MEC_{AM} HG) (**Figure 30.B**). Ainsi, les cellules ont davantage adhéré sur matrices que sur plastique et on observe une meilleure prolifération sur matrices aboutissant à un nombre cellulaire plus important aux différents temps d'analyses.

L'expression de la cycline B1, qui régule la transition de la phase G2 à la phase de mitose, est plus importante sur les matrices à 24h que sur plastique (p = 0.01 pour les deux types de matrices) (**Figure 30.C**). À 48h, l'expression de la cycline B1 sur plastique est trois fois plus importante qu'à 24h (p = 0.03). Cette augmentation de l'expression n'est pas retrouvée dans les cellules cultivées sur matrices. De plus, il n'y a pas de différence entre les deux types de matrices. Ce résultat suggère que les cellules prolifèrent moins sur matrices que sur plastique entre 24h et 48h, ce qui n'est pas le cas au vu du nombre de cellules mesurées à 48h (Figure A).

Le niveau d'expression des intégrines alpha 5 et beta 1 est identique quel que soit le support et le temps d'analyse (*cf. Article, supplementary data 2, page 118*). En revanche, l'expression de l'intégrine alpha V, identique à 24h entre les différents supports, est plus faible à 48h dans les cellules cultivées sur matrices adipocytaires sur plastique ($^{\#\#}$ p = 0.005 sur MEC_{AM} LG et p = 0.09 sur MEC_{AM} HG) (**Figure 30.D**). La diminution de l'intégrine alpha V peut être liée à une diminution de la prolifération en raison d'un pré-engagement dans la voie de différenciation adipogénique (Morandi *et al.*, 2016). Cette hypothèse est écartée par la mesure de l'expression de PPARG qui n'est pas modifiée par les différentes conditions (*cf. Article, supplementary data 2, page 118*).

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Hoshiba *et al.* sur matrices adipocytaires obtenues à 3 et 10 jours de différenciation adipogénique. En effet, dans leurs travaux, le niveau de prolifération à 24h et 48h était identique entre le plastique et les matrices générées à des temps précoces de différenciation adipocytaire (3 et 10 jours). En revanche, à 96h, le niveau de prolifération était moins important sur les matrices générées après 3 jours en milieu de différenciation, suggérant un effet inhibiteur de ces matrices sur la prolifération (Hoshiba *et al.*, 2010). Il semble alors que les CSM prolifèrent davantage sur des MEC issues d'adipocytes matures. Par ailleurs, une telle augmentation de la prolifération a déjà été observée sur des MEC issues de CSM et d'ostéoblastes (Baroncelli *et al.*, 2018; Shakouri-Motlagh *et al.*, 2017). Il faut, au-delà de la composition des MEC, tenir compte des propriétés physiques de la MEC, telle que la rugosité qu'elle induit sur le support, qui est connu pour améliorer l'adhésion et la

prolifération cellulaire. Cette sensibilité des CSM est d'ailleurs exploitée dans la régénération osseuse où des revêtements à base de divers composants matriciels (fibronectine, laminine, collagènes, acide hyaluronique) sont utilisés pour améliorer l'adhésion et prolifération des CSM (Caplan, 2005; Zhai *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces résultats indique que les MEC adipocytaires, quelle que soit la concentration en glucose, favorisent l'adhésion et même la prolifération des CSM. Les cellules sont ensuite mises à différencier en milieu ostéogénique 48h après l'ensemencement, temps correspondant à un niveau de confluence de 60 %.

4. Impact des matrices sur l'ostéoblastogénèse et l'activité ALP

Les cellules sont mises en milieu de différenciation ostéogénique en condition LG, HG ou LGM sur support plastique, sur matrice adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et sur matrice adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG). Les travaux de Hoshiba *et al.* démontraient une diminution de l'expression de Runx2, un facteur de transcription crucial dans les premières phases de différenciation ostéoblastique, lorsque les cellules sont cultivées sur des MEC obtenues à des temps précoces de différentiation adipocytaire (Hoshiba *et al.*, 2010). Nous choisissons ici de compléter ces travaux en étudiant l'impact de matrices obtenues d'adipocytes matures et en étudiant si la concentration de glucose peut interférer la différenciation ostéoblastique.

Ainsi, le profil d'expression génique de marqueurs ostéogéniques est mesuré par RT-qPCR à 7 jours, lorsque l'engagement des cellules et leur différenciation est établie, et à 16 jours, lorsque les cellules sont dans l'étape de maturation et de minéralisation (3 donneurs, n = 6) (Beck, 2003). Les marqueurs mesurés sont : le facteur de transcription Runx2 ; l'ostéocalcine, qui intervient dans la maturation des ostéoblastes ; et le collagène de type I, composant essentiel de la matrice extra-cellulaire osseuse. Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à l'expression génique des cellules obtenues au 7ème jour en LG sur support plastique (**Figure 31**).

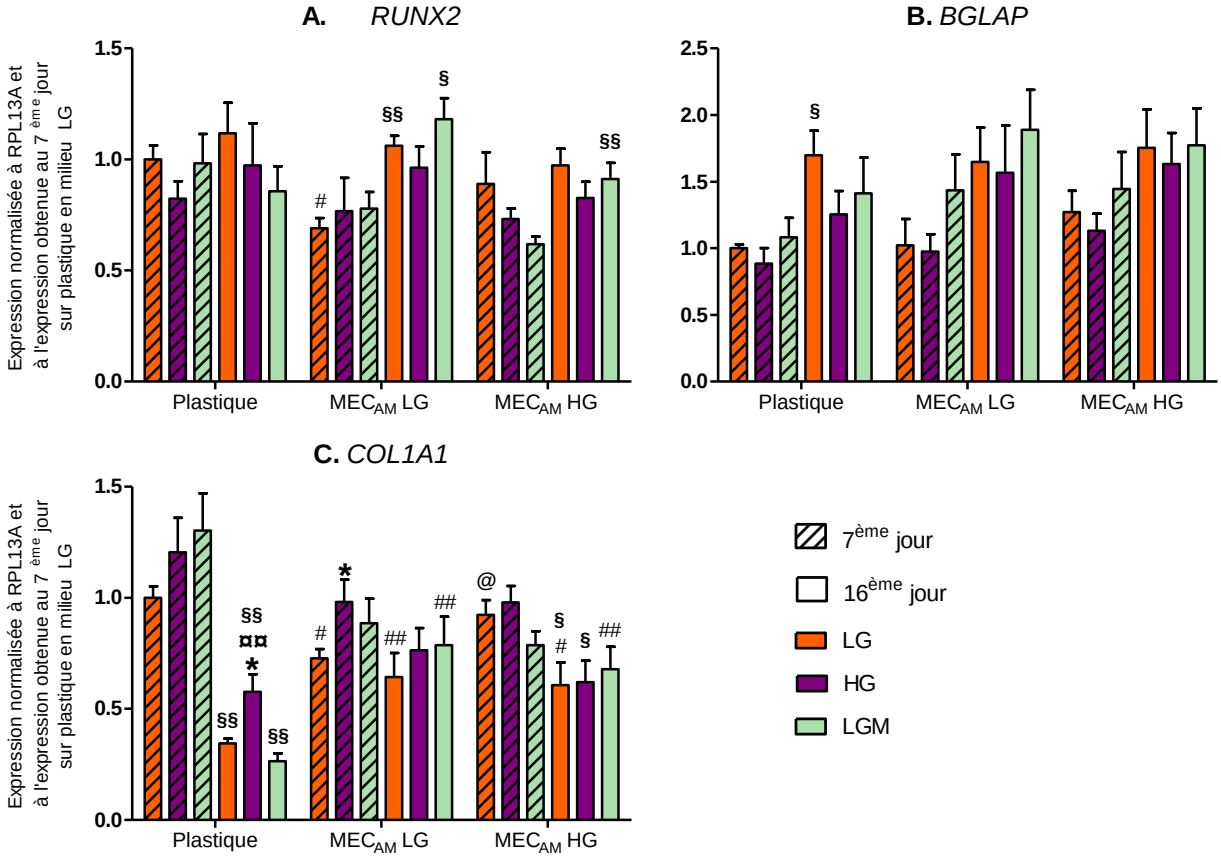


Figure 31 : Expression génique de **A.** *RUNX2*, **B.** de l'ostéocalcine (*BGLAP*), et **C.** de la chaine α1 du collagène de type I (*COL1A1*) à 7 (histogrammes hachurés) et 16 jours (histogrammes pleins). Les cellules sont différenciées sur différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG) à différentes concentrations en glucose : LG, HG ou LGM ($^{\S} < 0.05$, $^{\S\S} < 0.01$, 7 jours *vs* 16 jours ; * $p < 0.05$, *vs* la condition LG au même jour et sur le même support ; $^{¤¤}$ $p < 0.01$ *vs* la condition LGM au même jour et sur le même support ; $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$ *vs* support plastique dans la même condition en glucose et au même jour ; $^{@}$ $p < 0.05$, *vs* la MEC_{AM} LG ; test de Mann-Whitney)

Le facteur de transcription Runx2, crucial pour la différenciation ostéoblastique, est bien exprimé dans les cellules, quelle que soit la concentration en glucose, le support et le temps d'analyse (**Figure 31.A**), indiquant que les CSM indifférenciées, qui n'expriment pas *RUNX2*, se sont bien différenciées en ostéoblastes, sans impact ni des matrices adipocytaires, ni de la concentration en glucose ou de l'osmolarité. L'expression de l'ostéocalcine (*BGLAP*), marqueur de la maturation des ostéoblastes, augmente entre le 7ème et le 16ème jour lorsque les cellules sont cultivées sur plastique en LG (§ $p = 0.02$). Sur matrices, l'expression tend également à augmenter au cours du temps quelle que soit la concentration en glucose **(Figure 31.B**). Ce résultat confirme le passage à un état pleinement différencié des CSM en ostéoblastes.

Il semble alors que ces deux marqueurs ne soient pas modulés par la concentration en glucose dans notre modèle cellulaire. D'autres études avaient en revanche montré une différence d'expression liée à la concentration en glucose sur des lignées ostéoblastiques à 7 et 14 jours sur support plastique (García-Hernández *et al.*, 2012). De plus, l'expression de ces marqueurs ne diffère pas entre les cellules cultivées sur les deux types de matrices adipocytaires et le support plastique. Un autre contrôle, comme des matrices de CSM dévitalisées par exemple, permettrait de mieux évaluer l'impact des MEC adipocytaires sur la différenciation et permettrait de compléter plus précisément les travaux de Hoshiba *et al.* qui démontrent une meilleure expression de Runx2 sur matrices adipocytaires obtenues à des temps précoces que sur des matrices obtenus de CSM indifférenciées (Hoshiba *et al.*, 2012).

L'expression du collagène de type I (*COL1A1*) est bien détectée dans toutes les conditions de culture à 7 jours, confirmant la différenciation des cellules. On observe cependant un niveau d'expression 25% plus faible en milieu LG sur matrice obtenue en LG que sur plastique ($^{\#\#}$ p = 0.001) et sur matrice obtenue en HG ($^{@}$ p = 0.01) (**Figure 31.C**). De plus, le niveau d'expression du collagène de type I est plus important en condition HG qu'en condition LG sur matrice obtenue en LG (* p = 0.04). Une telle différence est retrouvée au 16ème jour sur support plastique : l'expression en condition HG est supérieure à celle retrouvée en condition LG (* p = 0.01) et en condition LGM ($^{¤¤}$ p = 0.004) signifiant que cette différence n'est pas liée à l'osmolarité. À ce temps plus tardif, l'expression du collagène diminue sur plastique par rapport au 7ème jour (-65 % en LG, §§ p = 0.002 ; -55 % en HG, §§ p = 0.004 ; –80 % en LGM, §§ p = 0.002), comme décrit dans la littérature au cours de la maturation (Aubin, 2001). De telles diminutions de l'expression au cours du temps ne sont pas retrouvées lorsque les cellules sont cultivées sur matrices adipocytaires obtenues en LG, induisant une expression plus élevée à 16 jours sur matrice obtenue en LG que sur plastique ($^{\#\#}$ p = 0.004 en LG, $^{\#}$ p = 0.002 en LGM). Sur les matrices adipocytaires obtenues en HG, les ostéoblastes présentent une diminution de l'expression du *COL1A1* au cours du temps qui est cependant plus limitée que lors de la culture sur support plastique (- 25 % en LG, § p = 0.03 ; -37% en HG, § p = 0.02), atteignant un niveau d'expression à 16 jours supérieur à celui retrouvée au même temps sur support plastique ($^{\#}$ p = 0.03 en LG, $^{\#\#}$ p = 0.004 en LGM). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du *COL1A1* en présence de 25mM de glucose est totalement abrogée.

Ainsi, les matrices adipocytaires ne semblent pas impacter le processus de différenciation ostéoblastique au regard des différents niveaux d'expressions géniques mesurés. De plus, un

comptage des cellules effectué au 16ème jour (4 donneurs, n = 8) met en évidence une augmentation du nombre de cellules (**Figure 32**).

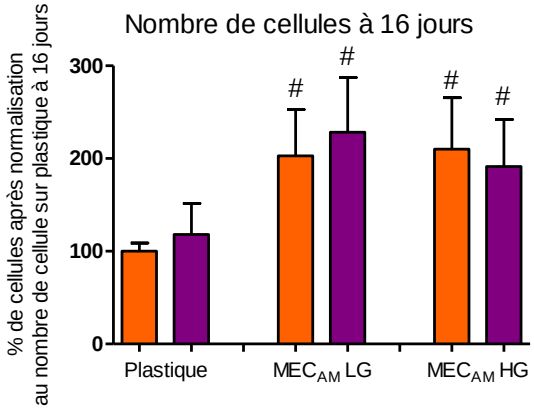


Figure 32 : Nombre de cellules à 16 jours (en %) après normalisation au nombre de cellules obtenues sur plastique en LG au même temps (4 donneurs, n = 8) ($^{\#}$ $p < 0.05$ *vs* plastique dans la même concentration en glucose, test de Mann-Whitney)

En effet, les cellules cultivées sur matrice sont 2 fois plus nombreuses au 16ème jour que les cellules cultivées sur support plastique ($^{\#}$ $p < 0.05$), indépendamment de la concentration en glucose, ce qui signifie que les cellules n'ont pas perdu leur capacité de prolifération lors de la différenciation.

D'après les expressions géniques mesurées et le niveau de prolifération des cellules, les matrices adipocytaires n'impactent pas l'engagement des CSM vers la voie de différenciation ostéogénique.

On observe toutefois des modifications de l'expression du collagène de type I au 16ème jour lorsque les cellules sont cultivées sur matrice adipocytaire. Ce temps correspond à l'étape de maturation et de minéralisation, c'est pourquoi nous nous sommes intéressées à des marqueurs impliqués dans la régulation de la minéralisation, tels que la matrix-gla-protéine, régulatrice de la minéralisation ; l'ostéopontine, régulatrice de la minéralisation via l'inhibition de la formation des cristaux d'hydroxyapatite et l'ostéonectine, également régulatrice de la minéralisation et à la périostine, régulatrice de la minéralisation et des cross-link des collagènes (Bonnet *et al.*, 2016; Bonucci, 2012). Les résultats obtenus sont exprimés par rapport à l'expression génique des cellules obtenues au 7ème jour en LG sur support plastique (**Figure 33**).

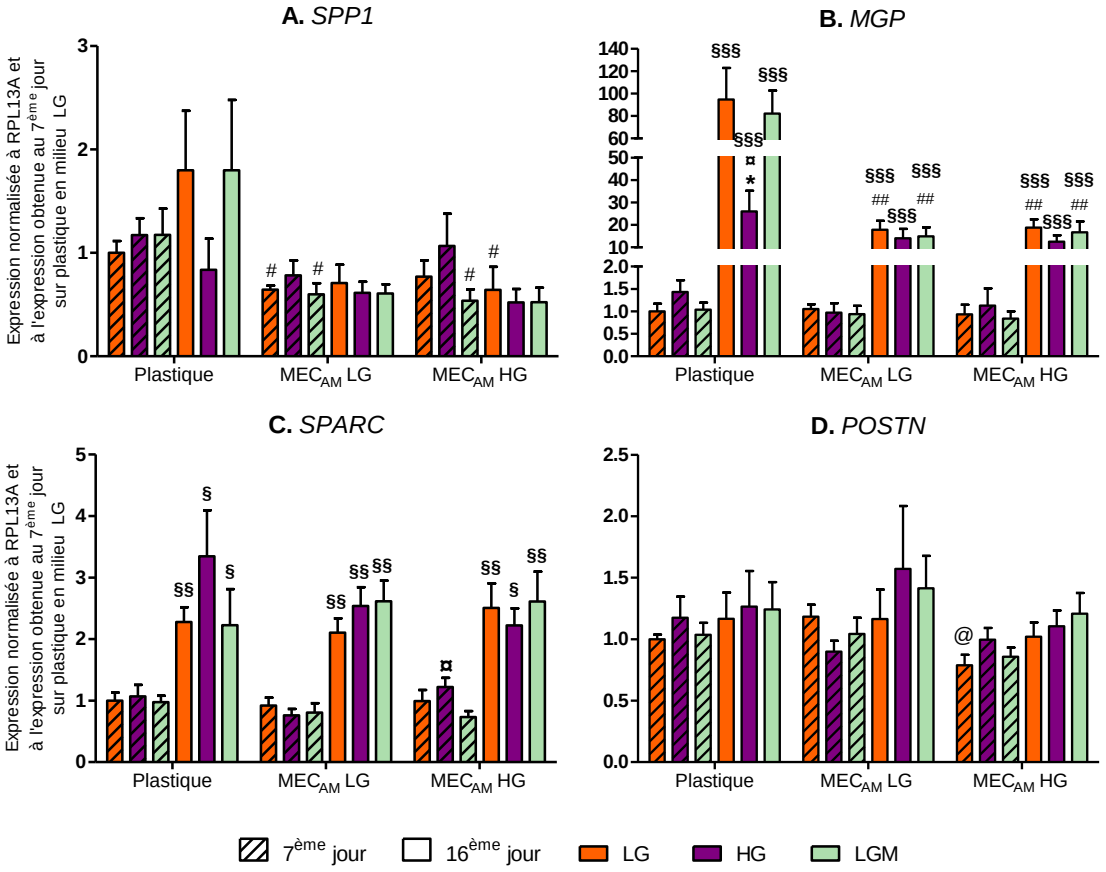


Figure 33 : Expression génique **A.** de l'ostéopontine (*SPP1*), **B.** de la MGP, **C.** de l'ostéonectine (*SPARC*) et **D.** de la périostine (POSTN) à 7 (histogrammes hachurés) et 16 jours (histogrammes pleins). Les cellules sont différenciées sur différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG) à différentes concentrations en glucose : LG, HG ou LGM (§ < 0.05, §§ < 0.01, §§§ p < 0.005, 7 jours *vs* 16 jours ; * p < 0.05, *vs* la condition LG au même jour et sur le même support ; $^{¤}$ p < 0.05, *vs* la condition LGM au même jour et sur le même support ; $^{\#}$ p < 0.05, $^{\#\#}$ p < 0.01 *vs* support plastique dans la même condition en glucose et au même jour ; $^{@}$ p < 0.05, *vs* la MEC_{AM} LG ; test de Mann-Whitney)

L'<u>ostéopontine</u> promeut l'adhésion cellulaire et inhibe la minéralisation. Au 7ème jour, l'expression mesurée sur matrice obtenue en LG est plus faible que celle mesurée sur support plastique, quelle que soit la concentration en glucose ($^{\#}$ p = en LG, p = 0.09 en HG, $^{\#}$ p = en LGM). Cette diminution n'est observée qu'en LGM sur matrice obtenue en HG ($^{\#}$ p = 0.03). De manière surprenante, l'expression mesurée à 16 jours est identique à celle obtenue à 7 jours pour tous les supports (**Figure 33.A**). Ces résultats diffèrent de la littérature qui démontre une augmentation de l'ostéopontine au cours de la différenciation (Frick & Bushinsky, 1998).

La <u>matrix-gla-protéine</u> intervient dans l'inhibition de la minéralisation. À 16 jours, l'expression de la MGP a drastiquement augmenté sur tous les supports (§§§ p < 0.001) (**Figure 33.B**) comme attendu d'après les données retrouvées dans la littérature (Frick & Bushinsky,

1998). On observe néanmoins une différence d'expression entre la condition LG et HG qui n'avait pas été démontrée auparavant : - 75 % en HG par rapport à la condition LG (* p = 0.04) et LGM ($^{¤}$ p = 0.02), indiquant que cette différence n'est pas liée à l'osmolarité induite par une forte concentration en glucose. Cette différence n'est pas observée sur les matrices adipocytaires. De plus le niveau d'expression observé sur matrices à 16 jours est plus faible que sur support plastique (sur matrice obtenue en LG : $^{\#\#}$ p = 0.02 en LG, $^{\#\#}$ p = 0.004 en LGM ; sur matrice obtenue en HG : $^{\#\#}$ p = 0.004 en LG, $^{\#\#}$ p = 0.008 en LGM). En revanche, le niveau d'expression à 16 jours en HG est équivalent quel que soit le support.

L'ostéonectine intervient dans le processus de minéralisation. On observe une augmentation de son expression au 16ème jour par rapport au 7ème dans toutes les conditions, quel que soit le support et la concentration en glucose (§ < 0.05, §§ < 0.01). Les niveaux d'expressions ne diffèrent pas en fonction des conditions (**Figure 33.C**). Ces résultats confirment la bonne différenciation cellulaire.

La périostine, qui intervient également dans le processus de minéralisation, n'est pas régulée au cours du temps ni par le glucose. On observe toutefois une expression plus faible en condition LG au 7ème jour sur MEC_{AM} HG que sur plastique ($^{@}$ p = 0.01) (**Figure 33.D**).

D'après les expressions géniques mesurées, les matrices adipocytaires modifient le niveau d'expression des cellules, suggérant un impact sur l'étape de maturation et de minéralisation. Ces modifications se font indépendamment de la concentration de glucose du milieu de différenciation.

Ces différentes données ne permettant pas d'élucider l'impact que pourrait avoir les matrices adipocytaires sur la minéralisation, nous avons choisi de les compléter, en mesurant l'expression génique au 16ème jour de l'ALP, de l'ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) et de Pit1 (3 donneurs, n = 6) (**Figure 34**). L'ALP est un marqueur précoce de la différenciation des ostéoblastes qui intervient dans la régulation du rapport PPi / Pi via l'hydrolyse de PPi en Pi. ENPP1 est une enzyme qui intervient également dans la régulation du rapport PPi / Pi via l'hydrolyse de l'ATP en PPi. Enfin, Pit1 est le transporteur principal de Pi dans les ostéoblastes et dans les vésicules extra-cellulaires qu'ils produisent. Ces trois protéines interviennent donc indirectement dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite nécessaire à la minéralisation de la matrice osseuse.

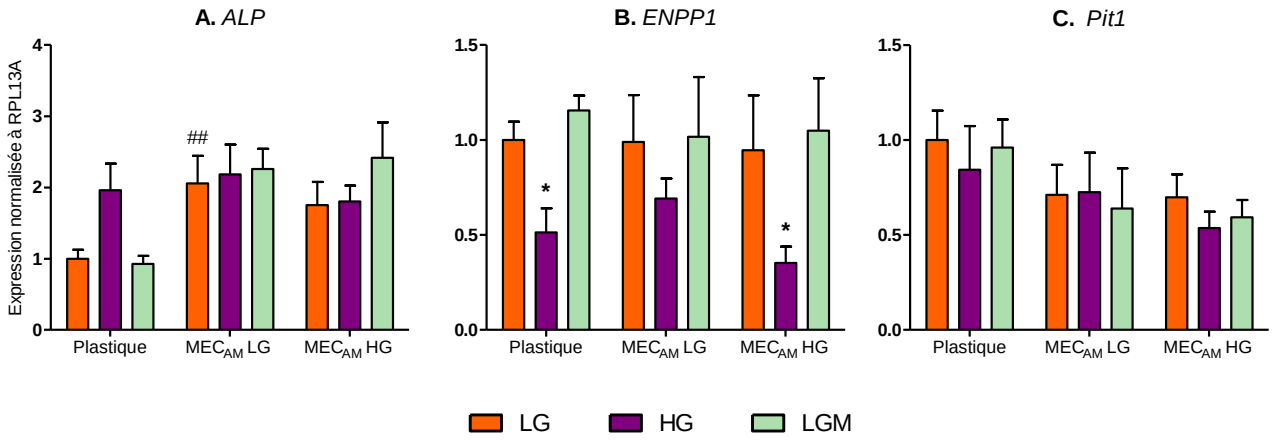


Figure 34 : Expression génique de **A.** l'ALP, **B.** ENPP1 et de **C.** Pit1 à 16 jours dans les cellules différenciées sur différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG) à différentes concentrations en glucose : LG, HG ou LGM (* $p < 0.05$, *vs* la condition LG sur le même support ; $^{\#\#}$ $p < 0.01$ *vs* support plastique dans la même condition en glucose ; test de Mann-Whitney)

Sur support plastique, l'expression génique de l'ALP tend à être plus importante en condition HG qu'en condition LG, sans impact de l'osmolarité ($p = 0.1$) (deux donneurs sur les trois présentent une augmentation significative de l'expression de l'ALP en condition HG). Cette tendance n'est pas retrouvée sur les matrices adipocytaires. En revanche, l'expression de l'ALP en condition LG est plus importante sur matrice adipocytaire obtenue en LG que sur support plastique ($^{\#\#}$ $p = 0.008$) (**Figure 34.A**).

L'expression de ENPP1 est diminuée de moitié en condition HG (* $p = 0.01$), sur support plastique. Cette différence est retrouvée sur matrices obtenues en HG (* $p = 0.04$) mais est absente sur matrice obtenue en LG ($p = 0.3$) et n'est pas liée à l'osmolarité (**Figure 34.B**). ENPP1 est capable, en plus de son rôle enzymatique, de réguler l'expression de plusieurs gènes ostéoblastiques. En effet, l'expression de l'ALP, de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine est diminuée tandis que l'expression du collagène de type I est augmentée dans des pré-ostéoblastes murins MC3T3E1/C4 dont l'expression de ENPP1 a été inhibée (Nam *et al.*, 2011). La sur-expression de ENPP1 induit un profil d'expression de ces marqueurs inverse, confirmant le rôle régulateur de ENPP1. Ces régulations se font indépendamment de l'activité catalytique de ENPP1 et de la concentration en PPi et Pi (Nam *et al.*, 2011). Dans notre étude, une augmentation de l'expression du collagène de type I est retrouvée en condition HG par rapport à la condition LG, au 16ème jour, sur support plastique uniquement, lorsque l'expression de ENPP1 est plus faible. En revanche, l'expression des autres marqueurs (ALP, ostéocalcine, ostéopontine ne suit pas (**Figure 33.A et C, Figure 34.A**).

L'expression de Pit1 n'est pas modifiée au 16ème jour par les différents supports et la concentration en glucose (**Figure 34.C**). On peut ainsi en déduire que l'entrée de Pi dans les cellules et vésicules extra-cellulaires n'est pas perturbée par les matrices adipocytaires ou par la concentration en glucose.

La mesure d'expression génique de ces nouveaux marqueurs met en évidence une possible altération de la phase de minéralisation des ostéoblastes qui est davantage étudiée par des tests fonctionnels.

Afin de mieux caractériser l'activité des cellules ostéoblastiques, l'activité de l'ALP est mesurée au 16ème jour de culture en milieu de différenciation ostéogénique (2 donneurs, n = 4) (**Figure 35**).

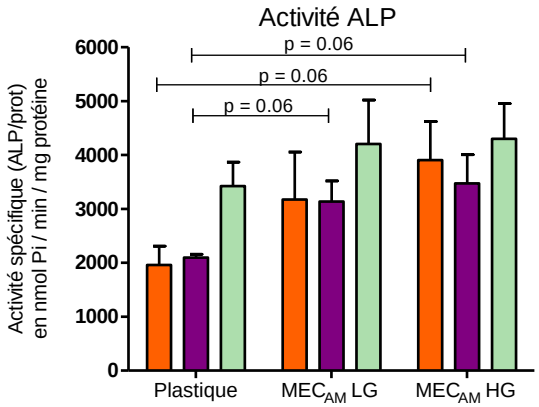


Figure 35 : L'activité de la Phosphatase Alcaline (ALP) est mesurée et exprimée par rapport à la quantité de protéine à 16 jours dans les cellules différenciées sur différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC$_{AM}$ LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC$_{AM}$ HG) à différentes concentrations en glucose : LG, HG ou LGM (p = 0.06, test de Mann-Whitney)

Sur support plastique, le niveau d'activité de la phosphatase alcaline est équivalent quelle que soit la condition en glucose. Pourtant, des études à partir de CSM obtenues de différents modèles (souris, rats et humains) mettent en évidence une augmentation (Balint *et al.*, 2001; Botolin & McCabe, 2006; W. Wang *et al.*, 2010) ou au contraire une diminution (García-Hernández *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2019; Shao *et al.*, 2014) de cette activité lorsque des cellules sont soumises *in vitro* à une forte concentration en glucose. Sur matrices adipocytaires, l'activité ALP des cellules est plus importante (p = 0.06) que sur support plastique.

Cette différence d'activité entre les différents supports peut indiquer un retard dans le processus de minéralisation. En effet, l'activité ALP est importante au démarrage de la différenciation puis diminue lors de la maturation (Vimalraj, 2020), ce qui suggère ici que les cellules cultivées sur matrices n'aient pas encore atteint pleinement leur étape de maturation et

de minéralisation. Cette observation aurait pu être éclaircie avec la réalisation d'une cinétique. Aussi, pour mieux évaluer le niveau de minéralisation des cellules, des mesures du taux d'hydroxyapatite et des analyses à l'échelle moléculaire par spectroscopie RAMAN sont réalisées.

5. Quantité et qualité de minéralisation

La quantité et qualité de minéralisation sont évaluées au 16ème jour de culture en milieu LG ou HG sur les différents supports par différentes approches.

Dans un premier temps, le niveau de minéralisation est évalué par mesure du taux d'hydroxyapatite avec le Kit Osteoimage™ Mineralization Assay (Lonza). Les résultats sont normalisés au nombre de cellules calculé au même temps dans chaque condition (**Figure 36**) (4 donneurs, n = 32).

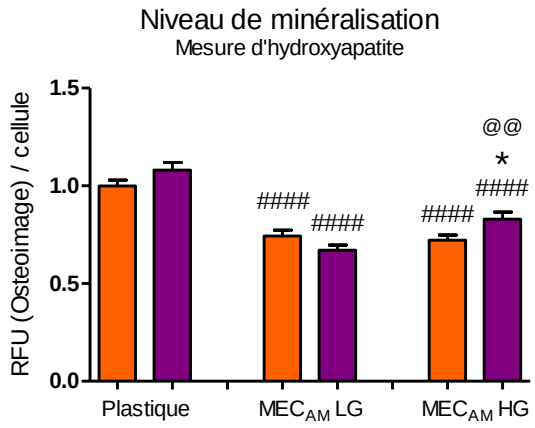


Figure 36 : Niveau de minéralisation au 16ème jour dans les cellules cultivées sur les différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG) à différentes concentrations en glucose : LG ou HG. Le niveau de minéralisation correspond au taux d'hydroxyapatite normalisé au nombre de cellules (4 donneurs, n = 32) (* $p < 0.05$, *vs* la condition LG sur le même support ; $^{\#\#\#\#}$ $p < 0.0001$ *vs* plastique dans la même concentration en glucose ; $^{@@}$ $p < 0.01$, *vs* la MEC_{AM} LG ; test de Mann-Whitney)

Avant normalisation au nombre de cellules, le taux d'hydroxyapatite mesuré est équivalent pour toutes les conditions (*cf. Article, supplementary data 4, page 120*). Néanmoins, le niveau de minéralisation par cellule apparait modifié entre les différents supports et concentrations en glucose (**Figure 36**). Les cellules cultivées sur matrices adipocytaires ont un rapport hydroxyapatite / cellule nettement plus faible que les cellules cultivées sur plastique ($^{\#\#\#\#}$ $p < 0.0001$). L'exposition à une forte concentration en glucose n'impacte pas le niveau de minéralisation sur support plastique et sur matrice obtenue en LG. En revanche, sur matrice obtenue en HG, le niveau de minéralisation est plus élevé en condition HG que celui des cellules cultivées en condition LG (* $p = 0.02$). De plus, ce rapport est supérieur aux cellules cultivées en HG sur les matrices obtenues en LG ($^{@@}$ $p = 0.001$). **Ces résultats démontrent une plus faible minéralisation des cellules lorsqu'elles sont cultivées sur matrice adipocytaire**

quelle que soit la concentration de glucose utilisée pour les générer. La plus forte concentration de glucose en milieu ostéogénique affecte beaucoup plus modérément la capacité de minéralisation et uniquement sur les matrices générées en HG.

Par ailleurs, de plus en plus d'études, *in vivo* (Boskey *et al.*, 2016; Lekkala *et al.*, 2019) et *in vitro* (Cifuentes-Mendiola *et al.*, 2022; García-Hernández *et al.*, 2012) soulignent l'importance de la qualité de minéralisation qui peut être altérée de façon indépendante de la quantité de minéral formé. Une analyse par spectroscopie Raman des nodules de minéralisation est donc réalisée au 16ème jour de culture. Plusieurs paramètres sont analysés : le rapport minéral / organique, les cross-links enzymatiques des fibres de collagènes, le niveau de carbonatation et la cristallinité (**Figure 37**).

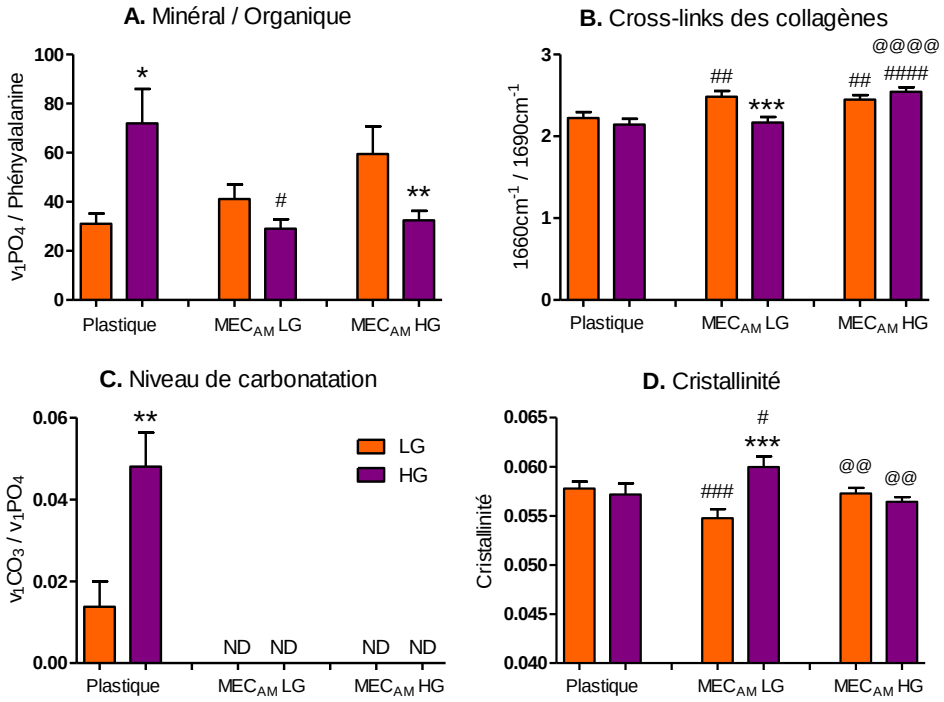


Figure 37 : Résultats de l'analyse Raman concernant le **A.** rapport minéral / organique, **B.** les cross-links des collagènes, **C.** le niveau de carbonatation et **D.** la cristallinité. Nombre de cellules sur matrices au 16ème jour de culture (4 donneurs, n = 8). Les cellules sont différenciées sur différents supports : plastique, MEC adipocytaire obtenue en LG (MEC_{AM} LG) et MEC adipocytaire obtenue en HG (MEC_{AM} HG) à différentes concentrations en glucose : LG ou HG (ND : non détecté, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$ *vs* la condition LG sur le même support ; $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$, $^{\#\#\#}$ $p < 0.005$, $^{\#\#\#\#}$ $p < 0.0001$, *vs* plastique dans la même concentration en glucose ; $^{@@}$ $p < 0.01$, $^{@@@@}$ $p < 0.0001$ *vs* la MEC_{AM} LG ; test de Mann-Whitney)

Le rapport minéral / organique est défini par le rapport d'aire sous la courbe des bandes ν_1PO_4 et de la phénylalanine (**Figure 37.A**). Sur support plastique, ce paramètre est plus important en condition HG qu'en condition LG (* $p = 0.05$) tandis que l'inverse est observé sur

matrices adipocytaires (p = 0.2 sur matrice obtenue en LG ; ** p = 0.007 sur matrice obtenue en HG). En condition LG, le rapport minéral / organique tend à augmenter sur matrice obtenue en HG (p = 0.08) par rapport au support plastique et aux matrices obtenues en LG (p = 0.08). En revanche, il est plus faible en condition HG sur matrices que sur support plastique ($^{\#}$ p = 0.03 sur matrice obtenue en LG, p = 0.1 sur matrice obtenue en HG).

Le niveau de maturité du collagène est défini par le rapport d'aire sous la courbe des pics à 1660cm^{-1} et 1690cm^{-1} pour définir le niveau total de réticulation enzymatique (**Figure 37.B**). Le niveau de cross-links enzymatiques dits matures est mesuré par le rapport de l'aire du pic 1660cm^{-1} sur celui du pic Amide I (*cf. Article, supplementary data 4, page 120*). De manière globale, le niveau de cross-links est plus élevée sur matrices adipocytaires que sur support plastique ($^{\#\#}$ p = 0.003 et p = 0.005 en LG sur support matrices obtenues en LG et HG respectivement, $^{\#\#\#\#}$ p < 0.0001 en HG sur matrice obtenue en HG). La concentration en glucose n'impacte pas le niveau de cross-links sur support plastique et sur matrices obtenues en HG. En revanche, sur matrice adipocytaire obtenue en LG, on observe une diminution en condition HG (*** p = 0.0002), qui engendre alors une différence en condition HG entre les deux types de matrice ($^{@@@@}$ p < 0.0001). Ce résultat démontre que les matrices peuvent impacter le degré de maturité des collagènes au cours de l'ostéoblastogénèse, indépendamment de la concentration en glucose du milieu de différenciation.

Le niveau de carbonatation de type B est défini par le rapport d'aire sous la courbe des bandes ν_1CO_3 et ν_1PO_4. Ce paramètre reflète l'incorporation des ions carbonates CO_3 à la place des ions phosphates dans les cristaux d'hydroxyapatite (**Figure 37.C**). Sur support plastique, le niveau de carbonatation est 3.5 fois plus important en condition HG qu'en condition LG (** p = 0.005). De manière surprenante, cette carbonatation de type B n'est pas détectée sur matrices, quelle que soit la concentration en glucose, suggérant la formation d'un cristal anormal. Ce type de substitution est généralement présent dans le minéral osseux *in vitro* (Schäck *et al.*, 2013) et *in vivo* (Boskey & Imbert, 2017). Ces résultats démontrent une moins bonne qualité du minéral sur matrices que sur plastique.

La cristallinité est définie par l'inverse de la largeur à mi-hauteur de la bande ν_1PO_4. Ce paramètre informe sur la taille et l'organisation des cristaux. Plus la valeur se rapproche de 1, plus le cristal est organisé. Dans le cas contraire, il est considéré comme amorphe (**Figure 37.D**). Les cellules cultivées sur support plastique présentent une organisation cristalline équivalente qui n'est pas modifiée par le glucose ce qui est surprenant par rapport à la différence

de carbonatation observée. En effet, l'insertion de carbonates au sein des cristaux engendrent des modifications des cristaux, notamment au niveau de leur élargissement (Bala & Seeman, 2015). La concentration en glucose n'impacte pas la cristallinité des cellules cultivées sur matrice adipocytaire obtenue en HG, en revanche, les cellules cultivées sur matrice obtenue en LG présentent un niveau de cristallinité différent en fonction du glucose, avec un niveau plus élevé en condition HG (*** p = 0.0002). Sur ces matrices, le niveau de cristallinité en condition LG est plus faible que sur support plastique ($^{\#\#\#}$ p = 0.0006) et autre matrice ($^{@@}$ p = 0.007). En condition HG, le niveau de cristallinité est supérieur à celui obtenu sur les autres supports (p = 0.1 sur plastique, $^{@@}$ p = 0.008 sur matrice obtenue en HG). Ainsi, seules les cellules cultivées sur matrice obtenue en LG présente une altération de la cristallinité.

Sur support plastique, le rapport minéral / organique et le niveau de carbonatation sont plus élevés en condition HG qu'en condition LG. Ces résultats ont déjà été observés sur lignée et sur cellules primaires humaines (Cifuentes-Mendiola *et al.*, 2022; García-Hernández *et al.*, 2012). Sur matrices adipocytaires, ces différences en fonction de la concentration de glucose ne sont pas retrouvées suggérant un effet des matrices adipocytaires qui prédomine sur l'effet de la concentration de glucose du milieu ostéogénique. Les résultats obtenus pour les cross-links des collagènes et la cristallinité mettent aussi en avant des différences entre matrices et support plastique.

Ces différents paramètres sont de plus en plus caractérisés dans les modèles animaux et les échantillons cliniques dans le cadre de l'ostéoporose du vieillissement, de la ménopause et du diabète de type 2 (Boskey & Imbert, 2017; Lekkala *et al.*, 2019). La plupart de ces paramètres diverge d'une étude à l'autre rendant difficile leur interprétation vis-à-vis des mécanismes physiopathologiques et de la fragilité osseuse. De façon intéressante, plusieurs de ces paramètres sont également différents selon le site analysé (os trabéculaire ou os cortical) et selon « l'âge de l'os » c'est-à-dire selon le temps depuis lequel il est formé (Boskey & Imbert, 2017). De plus, il est parfois discuté de l'interférence du niveau de remodelage osseux par les ostéoblastes et/ou les ostéoclastes (Germaini *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2017) mais l'implication des adipocytes médullaires, qui se développent à proximité des travées et de l'os néoformé notamment, n'est jamais envisagée. Nos résultats mettent en évidence que **les adipocytes médullaires contribuent à altérer la qualité de la matrice organique et du**

minéral produits par les ostéoblastes et sous-entendent que leur présence devrait être davantage analysée pour mieux comprendre les altérations observées au niveau osseux.

Ces résultats démontrent pour la première fois une altération de la minéralisation par les matrices adipocytaires : une diminution de la quantité de minéral par cellule (**Figure 36**) et une altération au niveau de la qualité de la minéralisation (**Figure 37**). Par ailleurs, les modifications engendrées par le glucose sur support plastique (niveau de minéralisation par rapport à la matrice organique, niveau de cross-links, carbonatation) diffèrent de ce qui est observé sur matrices adipocytaires.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats démontrent une bonne adhésion et prolifération des CSM sur matrices adipocytaires, indépendamment de la concentration en glucose d'obtention. Le niveau d'adhésion et de prolifération est supérieur à celui obtenu sur support plastique. Cette amélioration des paramètres peut s'expliquer par la meilleure affinité des CSM à un support contenant des motifs liés aux composants matriciels que peuvent reconnaître les intégrines (Anderson *et al.*, 2016) contrairement au support plastique. Ainsi, ce travail pourrait être complété par la mesure d'adhésion et de prolifération des CSM sur d'autres matrices, générées par des CSM ou des ostéoblastes dans les mêmes conditions en glucose, pour mieux évaluer l'impact des matrices adipocytaires. On peut cependant affirmer que la forte concentration en glucose ne modifie pas les « propriétés adhésives » des matrices adipocytaires.

De plus, au regard des différentes expressions géniques mesurées, les matrices adipocytaires n'impactent pas l'engagement des CSM vers la voie ostéoblastique, mais modifient l'étape de maturation et de minéralisation. La mesure de différents paramètres par spectroscopie Raman met en évidence une altération de la minéralisation des ostéoblastes par les matrices adipocytaires avec des atteintes de la qualité et de la quantité de minéralisation. Ces résultats reproduisent certaines altérations déjà observées dans l'ostéoporose et le diabète de type 2 (Hunt *et al.*, 2018; Mieczkowska *et al.*, 2020).

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer l'absence d'impact sur l'engagement des CSM vers la voie de différenciation, entre autres : - les CSM remanient intensément la matrice sur laquelle elles sont ensemencées, ou - la MEC produite par les AM ne modifie pas

l'engagement des CSM en dépit des facteurs potentiellement négatifs, ou encore - la présence des inducteurs, dans le milieu de différenciation ostéogénique, ajoutés pour optimiser la différenciation, neutralise l'effet des MEC adipocytaire. Pour répondre à cette dernière hypothèse, il serait intéressant de modifier le protocole de différenciation en ajustant la concentration des inducteurs ou en mettant les cellules en milieu de différenciation durant un temps donné avant de les placer en milieu complet comme déjà réalisé dans certains travaux (Granchi *et al.*, 2010; Sordi *et al.*, 2021).

Aussi, une mesure de la composition protéique de la matrice osseuse produite sur les matrices adipocytaires ainsi qu'une mesure de l'activité des protéases, par exemple, permettraient de compléter cette étude.

Notre travail devrait également stimuler l'étude de l'impact des matrices adipocytaires sur les autres cellules de la moelle osseuse, notamment les CSH, précurseurs des ostéoclastes, afin d'évaluer leur impact sur le remodelage osseux.

On peut néanmoins conclure, aux vues de l'ensemble de ces résultats, que les matrices adipocytaires participent aux changements de quantité et de qualité osseuses et pourraient contribuer à la fragilité osseuse observée dans l'ostéoporose et le diabète de type 2. Afin de mieux comprendre les altérations observées, une caractérisation des composants matriciels des adipocytes médullaires, aux deux concentrations en glucose, est réalisée (*CHAPITRE 2*).

L'article portant sur cette étude a été soumis et est disponible à la suite de ce chapitre.

Title: The Extracellular Matrix of human Bone Marrow Adipocytes and glucose concentration differently alter the mineralization quality without impairing osteoblastogenesis

Authors: Laura Entz, Guillaume Falgayrac, Christophe Chauveau, Gilles Pasquier and Stéphanie Lucas

Affiliation: Marrow Adiposity and Bone Lab, MABLab-ULR4490, Univ. Littoral Côte d'Opale F-62200 Boulogne-sur-Mer, Univ. Lille F-59000 Lille, CHU Lille, F-59000 Lille, France

Corresponding author: Stéphanie Lucas, stephanie.lucas@univ-littoral.fr

6 Keywords: Marrow adipocytes - Extracellular Matrix - Skeletal mesenchymal stromal cells – Osteoblast – Hyperglycemia - Osteoporosis.

Abbreviations:

AGEs: Advanced Glycation End-products

BMAd: Bone Marrow Adipocyte

BMSC: Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell

ECM: ExtraCellular Matrix

ECM_{BMAd}: ExtraCellular Matrix obtained from BMAds

ECM_{BMAd} LG : ExtraCellular Matrix obtained from BMAds cultured in LG concentration

ECM_{BMAd} HG: ExtraCellular Matrix obtained from BMAds cultured in HG concentration

HA: hydroxyapatite

HG: High Glucose

LG: Low Glucose

LGM: Low Glucose and Mannitol

T2D: Type 2 Diabetes

Abstract: 356 words

Bone Marrow Adipocytes (BMAds) accrue in various osteoporosis states and interfere with bone remodeling through the secretion of various factors. Yet, the involvement of the Extracellular Matrix (ECM) produced by BMAds in the impairment of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells (BMSCs) osteoblastogenesis has received little attention. In Type 2 Diabetes (T2D), skeletal fragility is associated with several changes in bone quality that are incompletely understood, and, the BMAds quantity increases in relationship with a poor glycemic control. Considering their altered phenotype in this pathophysiological context, we aimed at determining the contribution of the ECM of mature BMAds to osteoblastogenesis and mineralization quality in the context of chronic hyperglycemia.

Human BMSCs were differentiated for 21 days in adipogenic medium containing either a normo-glycemic (LG, 5.5mM) or a high glucose concentration (HG, 25mM). The ECMs laid down by BMAds were devitalized to test their impact on proliferation and differentiation of BMSCs toward osteoblastogenesis in LG and HG conditions. Compared to control plates, both adipocyte ECMs promoted cell adhesion and proliferation. As shown by the unmodified RUNX2 and Osteocalcin mRNA levels, BMSCs commitment in osteoblastogenesis was hampered by neither the hyperglycemic condition nor the adipocyte matrices. Yet adipocyte ECMs or HG condition alter the mineralization phase with perturbed expression levels of type 1 collagen, MGP and osteopontin. Despite higher ALP activity, mineralization levels per cell were decreased for osteoblasts grown on adipocyte ECMs compared to control. Raman spectrometry showed that culture on adipocyte matrices specifically prevents mineral carbonation and favors collagen crosslinkings in contrast to exposure to HG concentration alone. Moreover, the mineral to organic ratio was disturbed according to the presence of adipocyte ECM and to the glucose concentration used for adipocytes or osteoblasts culture. HG concentration and adipocyte ECM lead to different defects within the mineralization quality which, yet, recapitulate contradictory changes reported in T2D osteoporosis.

Our study shows that the ECMs from BMAds do not impair osteoblastogenesis but alter both the quantity and the quality of mineralization partly in a glucose concentration-dependent manner. This sheds light on the involvement of BMAds which should be considered in the compromised bone quality of T2D and osteoporosis more generally.

1. Introduction

Bone Marrow Adipocytes (BMAds) have been revealed as important contributor cells in bone homeostasis. These lipid-laden cells mainly arise in close vicinity of trabeculae within the long bones or vertebrae, and dramatically accrue in various osteoporosis types such as that of aging, menopause, or Type 2 Diabetes (T2D) [1]. The Bone Marrow (BM) fat fraction negatively correlates with Bone Mineral Density (BMD) in aging and menopause. It is also strongly associated with a poor glycemic control in T2D [2,3] which is characterized by unchanged -or even increased- bone mass with a compromised bone quality [4]. While BMAds can potentially affect both bone quantity and quality, their role has been primarily investigated in relation with bone remodeling. Bone marrow Mesenchymal Stromal cells (BMSCs) are considered as a common precursor for BMAds and osteoblasts, and their preferential diversion toward the adipocyte lineage has been reported to reduce bone formation [5]. BMAds can also modulate osteoblastogenesis and stimulate osteoclastogenesis through paracrine factors [1,6,7]. So far, the involvement of the Extracellular Matrix (ECM) produced by BMAds has been little examined [8].

The ECM, through its proper components as well as its capacity to bind and release factors, is well-known to create a biochemical and a physical environment which interacts with cells to modify their behavior. *In vitro* cell-free ECMs (obtained through various devitalization processes) have been shown to drive more efficiently these changes than pre-coating of key ECM components [9]. The ECMs generated by either BMSCs [9,10] or osteoblasts [11-13] improve BMSCs proliferation, osteogenic differentiation and mineralization. Study of the impact of adipocyte ECM on these functions has been limited. The ECM produced by adipocytes at their early stage of differentiation from either human BMSCs [14,15] or extramedullary adipose tissue stem cells [16] favors the commitment toward adipogenesis rather than osteoblastogenesis. Devitalized ECM composition reflects cell specificity [11,14,16] but the microenvironment and its afferent signaling cues also modify its components and consecutively influences cell fate [17] and activity [12]. As BMAds activities adapt according to the pathophysiological context [1,18], the marked development of adipocytes in the BM could therefore alter the balance between adipogenesis and osteoblastogenesis by the synthesis of a specific ECM.

A decline in glucose homeostasis is often associated with aging and menopause while chronic hyperglycemia is the hallmark of T2D. In these osteoporotic contexts, the bone quality can vary independently of BMD, more specifically in T2D, and contributes to an increased fracture risk [19,20]. The assessment of bone quality encompasses several aspects and mainly includes the characterization of the organic and mineral components of bone. These measurements

have been considerably upgraded using vibrational spectroscopic techniques with spatial resolution [19,21]. Combined with the analyses of mechanical tests in animal models or fracture history in patients, several parameters -such as collagen maturity, extent of mineralization, mineral stoichiometry, or carbonate substitution of the apatite crystal- have been shown to contribute to bone strength [19-21]. In the T2D context, the accumulation of Advanced Glycation End-products (AGEs) in protein matrix is considered to be driven by high glucose (HG) levels and oxidative stress and to interfere with bone properties [20,22,23]. Yet several studies nuance the importance of AGEs to bring attention on a large array of other bone quality components [24-27]. The study of the direct impact of HG concentration on osteoblast mineralization was undertaken early *in vitro* to show divergent defects in cell calcium accumulation and a modified calcium to phosphorus ratio in the mineral [28,29]. Indeed, greater attention has been paid to the effects of HG concentration on proliferation [30-34] and the differentiation potential of various precursor types. Following a relatively short-term culture, HG concentrations have been reported to promote adipogenesis over osteoblastogenesis in human BMSCs [33,34] and rodent bone marrow stromal cells [35-37]. Moreover, *in vivo* experiments [38], *ex vivo* characterization of BMAds from T2D patients [39] and *in vitro* studies [33,40,41] support that BMAds are responsive to glucose levels and adapt their phenotype accordingly. Specifically, our group showed *in vitro* that mature human BMAds produce more intracellular and extracellular Reactive Oxygen Species (ROS) when exposed to a HG concentration [41], indicating that BMAds could damage bone quality in the context of uncontrolled hyperglycemia.

Considering the accrual of BMAds and their altered phenotype in the T2D pathophysiological context, the aim of this study was to assess if the ECM provided by mature human BMAds in a HG concentration could interfere with osteoblastogenesis and mineralization quality. Human BMSCs were differentiated and matured for 21 days in adipogenic medium containing either a normo-glycemic glucose concentration (5.5mM, LG) or a high glucose concentration (25mM, HG). The ECMs laid down by BMAds were thus devitalized to test their impact on proliferation and differentiation toward osteoblastogenesis of BMSCs. Considering the effect of HG on BMSCs differentiation, osteoblastogenesis was also studied in LG and HG conditions on the two types of adipocyte ECMs with classical culture plates as a control. The different osteoblasts cultures were characterized through gene expression and functional assays while the quality of mineralization was measured using Raman spectroscopy.

2. Material and methods

2.1 Culture of human BMSCs and differentiation toward adipogenesis

Prescreened human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells (BMSCs) obtained from RoosterBio were cultured using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (all from PanBiotech) and 5.5mM glucose at the density of 1.1 × 104 cells/cm² up to 80% cell confluence to proceed with subsequent passages (cell amplification) or differentiation. All cultures were kept at 37°C and 5% CO2 in a humidified atmosphere. All the experiments were performed between passages 4 and 5 using four donors (2 females, 20 and 26 years, and, 2 males, both 25 years).

Human BMSCs were seeded at the density of 1.1 × 104 cells/cm² and differentiated into Bone Marrow Adipocytes (BMAds) using complete DMEM (with FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin) containing either a Low Glucose (noted LG, 5.5mM to represent normal glycaemia) or a High Glucose (noted HG, 25mM to mimic a severe diabetes), supplemented with 6.25µg/mL insulin (PanBiotech), 0.5µM dexamethasone, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine and 50µM indomethacin (all from Sigma). Adipogenic media were replaced every 3-4 days up to 21 days of culture.

2.2 Preparation of decellularized ECM from BMAds and quality assessment

After 21 days in adipogenic media, mature BMAds generated in either LG or HG concentration were washed twice in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, no calcium, no magnesium - Dutscher) and devitalization was performed by hypotonic shock with adaptations from [42,43]. Demineralized sterile water at room temperature was gently added on cells and removed after 7 mins of incubation. This step was then repeated 5 times in a row. The remaining components were washed twice in DPBS and incubated for 30 mins at 37°C in a sterile solution of lipase (40 U/L, Sigma) and DNase (10 U/mL, Roche). After confirmation of complete cell lysis with microscopic observation, the resulting devitalized ECMs, noted either ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, were gently washed twice with DPBS, air dried and frozen at -80°C until use.

Decellularization was confirmed by the absence of nuclear materials and cellular components such as lipid droplets. Following fixation in 2 % paraformaldehyde, washing steps with DPBS and then labeling with DAPI (1,2 µg/mL) and BODIPY (1:200) (both from Invitrogen) in DPBS for 30 mins, plates were visualized with Axioskop50 Fluorescence Microscope (Carl Zeiss) and

images were acquired using Histolab software (Microvision Instrument). Protein measurements were performed using DC Protein assay (Bio-Rad) and a BSA standard curve.

2.3 Attachment, proliferation, and characterization of human BMSCs on decellularized ECM_{BMAd}

Human BMSCs from each donor were seeded at the density of 8.3 × 103 cells/cm² on the corresponding decellularized matrices (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG) or on plastic (control referred to as without ECM) and cultured in complete DMEM medium with 5.5mM of glucose. DNA amount was quantified at 24, 48 and 96 hours after seeding using the CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The DNA-bound fluorescence was measured using Xenius XMA fluorescence microplate reader (SAFAS) at ~500 nm excitation and ~530 nm emission maxima in each lysed sample. The parameter settings were kept constant for all comparative sets of experiments. Finally, the amount of DNA was calculated from a standard curve and converted in number of cells (one cell corresponding to 242pg DNA).

For characterization, BMSCs were collected after 1 and 2 days in LG complete medium in Extract-All (Eurobio) for RNA extraction.

2.4 Human BMSCs differentiation into osteoblasts on decellularized ECM_{BMAd}

Human BMSCs were seeded at the density of 8.3 × 103 cells/cm² on decellularized ECM_{BMAd} LG, ECM_{BMAd} HG or on plastic (without ECM) and cultured in complete DMEM medium with 5.5mM glucose. After 2 days (~60% of confluence), human BMSCs were differentiated into osteoblasts using complete DMEM containing either a Low Glucose (LG, 5.5mM), a High Glucose (HG, 25mM) or 5mM glucose and 20mM mannitol (noted LGM; to address the osmolarity effect of HG). All osteogenic media were supplemented with 10µM β-glycerophosphate, 50µM ascorbic acid, 0.1µM vitamin D3 and 10nM dexamethasone (all from Sigma) and were replaced every 3-4 days up to 7 and 16 days of culture for the specified experiments.

2.4 RNA extraction, reverse transcription and RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted using Extract-All following the manufacturer's instructions. Residual contaminating genomic DNA was digested by 2.5U/µl of DNase I recombinant

(Roche). Reverse transcription was performed from 250ng RNA using Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific). Real-time PCR was carried out with PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) using StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers were designed with OLIGO Primer Analysis Software 6 (Molecular Biology Insights) and used when efficiency was >1.8. The primers used are listed in Supplemental Table 1. Amplifications were performed according to the manufacturer's instructions. A melting curve analysis confirmed product specificity. The relative mRNA expression of tested genes was calculated according to Ct values and primer efficiencies (E), then normalized to the ones calculated for the ribosomal protein L13a (RPL13A) housekeeping gene according to Egene-Ctgene/Eref-Ctref. As indicated for each figure, relative mRNA expression levels were appropriately normalized as fold level according to the considered control of the experiment.

2.5 Alkaline Phosphatase (ALP) activity measurement

After 16 Days in osteogenic media, cells were rinsed with DPBS and frozen at -80°C until use. After thawing, cells were harvested in 0.2% Nonidet P-40, sonicated during 30 s and then centrifuged to collect the supernatant only.

To determine the ALP activity, 10µL of sample was mixed with 90µL of a solution containing 10nM p-nitrophenyl phosphate, 0,56M 2-amino-2-methyl-1-propanol (pH 10,3) and 1mM MgCl2. After 4 mins in 37°C, the reaction was stopped with 40µL of 1M NaOH and the absorbance was measured at 405 nm. Values were next expressed according to the protein content in each sample using DC Protein assay (Bio-Rad). Finally, ALP activity was determined according to the following calculation: (Absorbance x 1000) / (18.182 x minutes of incubation x volume of sample) / protein concentration.

2.6 Measurement of cell mineralization by fluorescent hydroxyapatite staining

After 16 days in osteogenic media, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and rinsed three times, then stained with the Osteoimage Mineralization Assay (Lonza) in the dark for 30 mins according to the instructions. After washing, fluorescence was measured using Xenius XC spectrofluorometer (SAFAS) at 492 and 500 nm (excitation and emission, respectively). Following cell number determination using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit, the cell mineralization level was expressed by calculating the fluorescence values-to-cell number ratio.

2.7 Raman spectroscopy

Human BMSCs were seeded at 1.1 × 104 cells/cm² on Raman grade CaF2 slides (dimension 13x1mm, Crystran) and differentiated into BMAds using adipogenic media containing either LG or HG as described in the section 2.1. After 21 days, cells were fixed (2% paraformaldehyde) or decellularized (as described in section 2.2) prior fixation to validate the decellularization and the integrity of ECM after the devitalization process. Moreover, CaF2 slides without ECM or with ECM_{BMAd} were used to seed and to culture human BMSCs (cell density of 8.3 × 103 cells/cm² for seeding) in osteogenic media (section 2.4) for 16 days. Osteoblasts were fixed (2% paraformaldehyde) to measure mineralization parameters.

After rinsing, the fixed samples were analyzed using a LabRAM HR800 microspectrometer (HORIBA; Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). The Raman analysis were done with a diode laser (λ=785 nm) and an immersive objective Nikon water (×100, NA=1.25). The acquisition time was set to 30 s averaged 2 times. The following physico-chemical parameters were evaluated from the Raman spectra: 1) the collagen crosslinks as the intensity ratio of the bands 1660 cm-1 with 1690 cm-1 is also referred to as collagen maturity [19]; 2) the pyridinoline trivalent crosslinks as the ratio of the intensity 1660 cm-1 over the Amide I area [44]; 3) the mineral/organic ratio defined as the ratio of the band area 960 cm-1 (v1PO4) over 1002 cm-1 (phenylalanine), which corresponds to the relative amount of mineral over organic amount; 4) the type-B carbonate substitution defined as the ratio of band area of 1070 cm-1 (v1CO3) over band area 960 cm-1 (v1PO4), which corresponds to the relative amount of scarbonate over the mineral amount; 5) the crystallinity defined as the inverse of the full width at half maximum intensity of the v1PO4 band, which reflects the size and perfection of crystals of hydroxyapatite.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using non-parametric Mann-Whitney tests, or two-way Anova (for the time effect in proliferation and the different osteogenic media in gene expression) with Prism 5 (GraphPad). $p<0.05$ was considered significant. Data are presented as means ± standard error of the mean (i.e. SEM) from at least two independent experiments performed with two to four distinct donors as stated.

3. Results

3.1. Obtention and validation of the devitalized ECMs from human Bone Marrow Adipocytes (BMAds) in low and high glucose concentrations

To investigate the impact of ECM generated *in vitro* from mature human BMAds in hyperglycemic condition, human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells (BMSCs) were differentiated up to 21 days in adipogenic media containing either 5.5mM (LG) or 25mM (HG) glucose, according to our previous study [41]. In agreement with our earlier work, glucose concentration does not induce any changes in the commitment to adipogenesis, and between the 14th and 21st days, BMAds equally accumulate triglycerides in the LG and HG conditions, regardless of the donor (Fig.1A and 1C).

Among the different devitalization methods, the use of a hypotonic solution such as demineralized sterile water was found to be the most efficient and the gentlest one to explode cells without altering the produced matrix as already advised [42,45]. Following a treatment with DNase and lipase, no more staining of nuclei residues or lipid droplets on both ECM_{BMAd} LG and ECM_{BMAd} HG can be observed (Fig.1B and 1D), which confirms the removal of cellular components. Measurements (Supplemental Fig.S1) and visualization of proteins contained in the two types of ECM_{BMAd} (following SDS-PAGE electrophoresis and silver nitrate staining) confirm the presence of high and low molecular weight proteins (data not shown). Besides, Raman spectroscopy analyses demonstrate that the two ECM_{BMAd} display a similar composition compared to the ECM underlying the non-decellularized BMAds (as exemplified in Fig.1E in the LG concentration) with different collagens and proteoglycans, which indicates the good integrity of ECM_{BMAd} following the devitalization process. Of note, AGEs are detected but with no obvious difference between devitalized ECM_{BMAd} LG and ECM_{BMAd} HG (data not shown). While their characterization has been carried on, both ECM_{BMAd} are used to analyze their impact on human BMSCs behavior, commitment to osteoblastogenesis and quality of the resulting mineralized matrices.

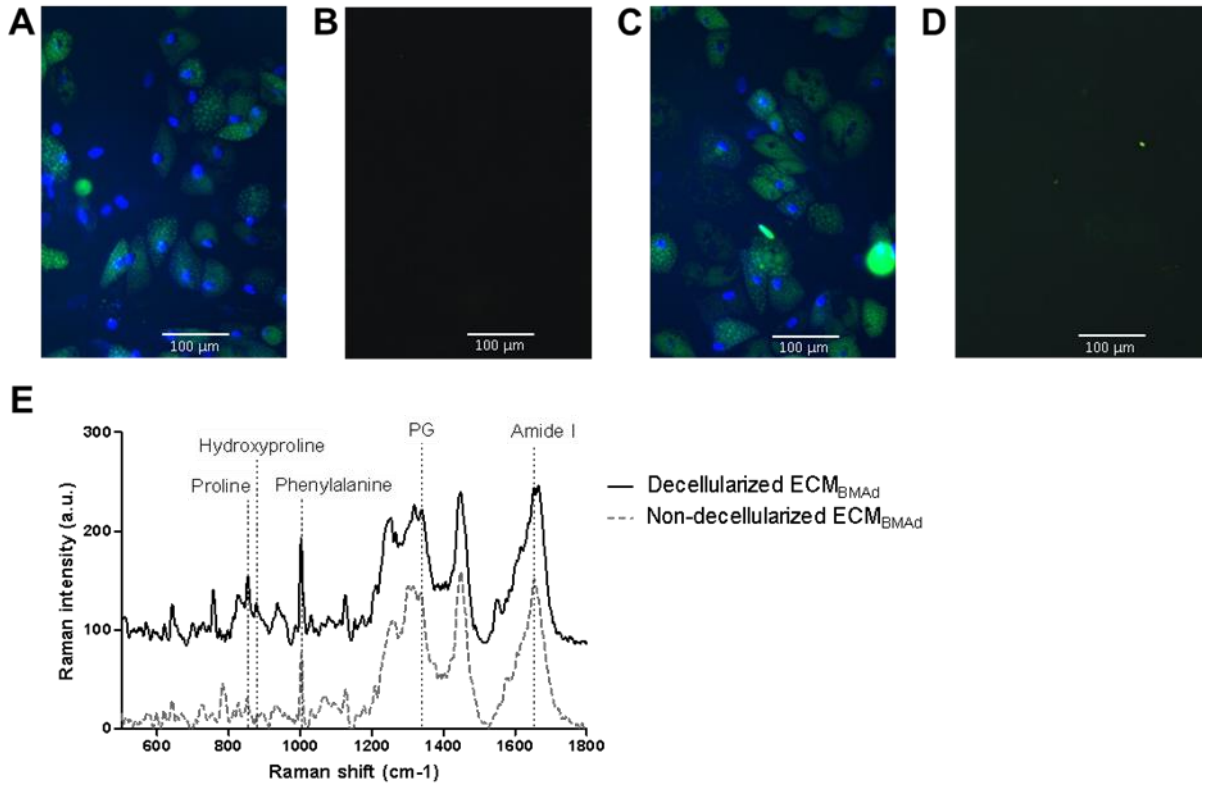


Figure 1 : Quality assessment of decellularized ECM_{BMAd}
Human BMSCs were differentiated into BMAds and, after 21 days, the cultures were decellularized to recover their ECMs.
The images of BMAds obtained in **(A)** LG or **(C)** HG concentrations and of ECM_{BMAd} obtained in **(B)** LG or **(D)** HG concentrations after the devitalization process are shown following nuclear labeling (blue, DAPI) and triglycerides staining (green, BODIPY) using fluorescence microscopy.
(E) Typical Raman spectra of the underlying layer of non-decellularized BMAds (dotted line) and of the decellularized ECM_{BMAd} (black line) -both obtained in LG condition- are shown. The assignment of the major bands is indicated for the peaks corresponding to the groups Proline, Hydroxyproline, Phenylalanine and Amide I for proteins (mainly collagens) and proteoglycans (PG).

3.2. The matrices of BMAds favor BMSCs attachment and proliferation

Human BMSCs were seeded on ECM_{BMAd} LG, ECM_{BMAd} HG or plastic (control referred to as "without ECM") to study the impact of both adipocyte ECM on adhesion and proliferation. Cell number was determined through DNA measurement. These parameters were only studied with the LG concentration since our study mainly aimed to analyze the effect of adipocyte matrices generated at two glucose concentrations on osteogenesis and, in that context, any preconditioning of human BMSCs by the HG condition during amplification was avoided as mentioned. Indeed, exposure of human BMSCs to the HG concentration can result in a higher release of lactate deshydrogenase (an indicator of cytotoxicity) compared to the normo-glycemic concentration as observed in some donors (Supplementary Fig.S2A).

After 24 hour-seeding, more cells (~15%) adhere to both types of adipocyte matrices compared to control (Fig.2A). Human BMSCs proliferate with culture time on all supports; yet an increase in the proliferation rate is observed between 2 and 4 days for the cells on ECM_{BMAd} leading to a 24% elevation of the cell number in the end (Fig.2B). The mRNA expression level of Cyclin B1, one of the cell cycle regulatory proteins, is up-regulated as early as 24h for cells seeded on ECM_{BMAd} whereas this increase only occurs after 48 hours for cells without ECM (Fig.2C). This corroborates a better cell attachment and proliferation on BMAd matrices. Owing to the role of integrins in the interaction with surfaces and in the modulation of proliferation of human BMSCs [46], the expression level of some of the main subunits has been analyzed. When comparing the influence of the different supports, ITGA5 and ITGB1 mRNA levels are found unmodified (Supplementary Fig.S2B and S2C). However, the expression level of ITGAV is surprisingly down-regulated for cells on ECM_{BMAd} LG and partly for those on ECM_{BMAd} HG ($p=0.09$) compared to cells without ECM at 48h-seeding (Fig.2D). This regulation could relate to an attempt of BMSCs to reduce their proliferation rate on ECM_{BMAd}, but could also indicate an early commitment toward the adipocyte pathway [47]. Yet mRNA levels of PPARG, the critical adipocyte transcriptional factor, are unchanged for cells on ECM_{BMAd} (Supplementary Fig.S2D) which discards a priming effect toward adipogenesis. As expected, the components of adipocyte ECMs thus favor cell attachment and proliferation, yet moderately compared to other ECM types [13,46]. The ability of human BMSCs to differentiate into osteoblasts and to mineralize was then investigated at a ~48h-seeding (60% confluence) without ECM, on ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG.

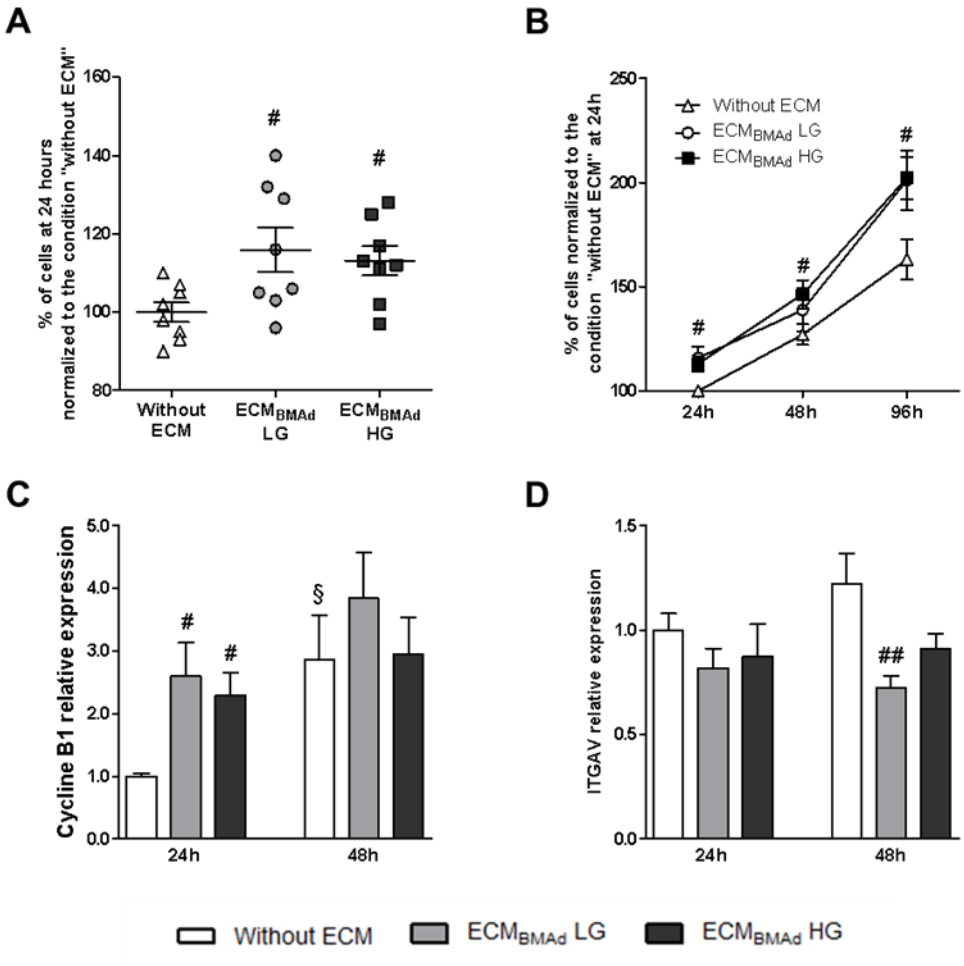


Figure 2. Impact of adipocyte ECM on adhesion and proliferation of BMSCs.
BMSCs were seeded in complete medium LG, directly on culture plates (without ECM, control) or on adipocyte ECMs generated either in 5.5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively). After 24, 48 and 96 hours, DNA amounts were measured and converted into cell number.
(A) Adhesion was assessed after 24 hours and **(B)** proliferation of cells was determined after 48 and 96 hours following seeding. Results are means ± SEM from 8 independent experiments (4 donors) and are normalized to the cell number at 24 hours "without ECM". $^{\#}p<0.05$, compared to "without ECM" for the same timing, using unpaired t-test. Using 2-way ANOVA, significant differences are observed between 48h and 96h for ECM_{BMAd} LG *versus* without ECM (p=0,006, Bonferroni post-tests with p<0,05 at 96h) and for ECM_{BMAd} HG *versus* without ECM (p=0,025, Bonferroni post-tests with p<0,01 at 96h).
Gene expression was performed after 24 and 48 hours for **(C)** Cyclin B1 and **(D)** Integrin alpha-V (*ITGAV*). Results are means ± SEM from 8 independent experiments (4 donors) and are expressed according to *RPL13A* and normalized according to the condition "Without ECM at 24 hours" for each donor. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ compared to "without ECM" for the same timing; $^{\S}p<0.05$ between 24 and 48 hours for each condition of support, using Mann-Whitney tests.

3.3. High glucose concentration and adipocyte matrices do not alter osteoblastogenesis but reshape the expression pattern of mineralization-related genes

BMSCs differentiation into osteoblasts was studied using the three support types and osteogenic medium containing either 5.5mM glucose (LG), 25mM glucose (HG) or 5.5mM glucose and 20mM mannitol (LGM, as an osmolarity control). The expression level of osteoblast markers was analyzed after 7 days, when commitment and differentiation toward the osteoblast lineage are primarily established and 16 days when cell maturation and the mineralization process take place [48] (Fig.3).

The mRNA levels of RUNX2 are well expressed in all conditions and at both time points (Fig.3A) while the expression of the late marker osteocalcin (OCN/BGLAP) is similarly induced at 16 days whatever the culture condition (Fig.3B). PPARG mRNA level is also found unmodified by any culture conditions (Supplementary Fig.S3A). Besides, cell quantity is doubled on both ECM_{BMAd} compared to the cells without ECM confirming the maintenance of cell proliferation during osteoblastogenesis (Supplementary Fig.S3C). Altogether, these data support that BMSCs differentiation into osteoblasts is not hampered by either the hyperglycemic condition or by the adipocyte matrices.

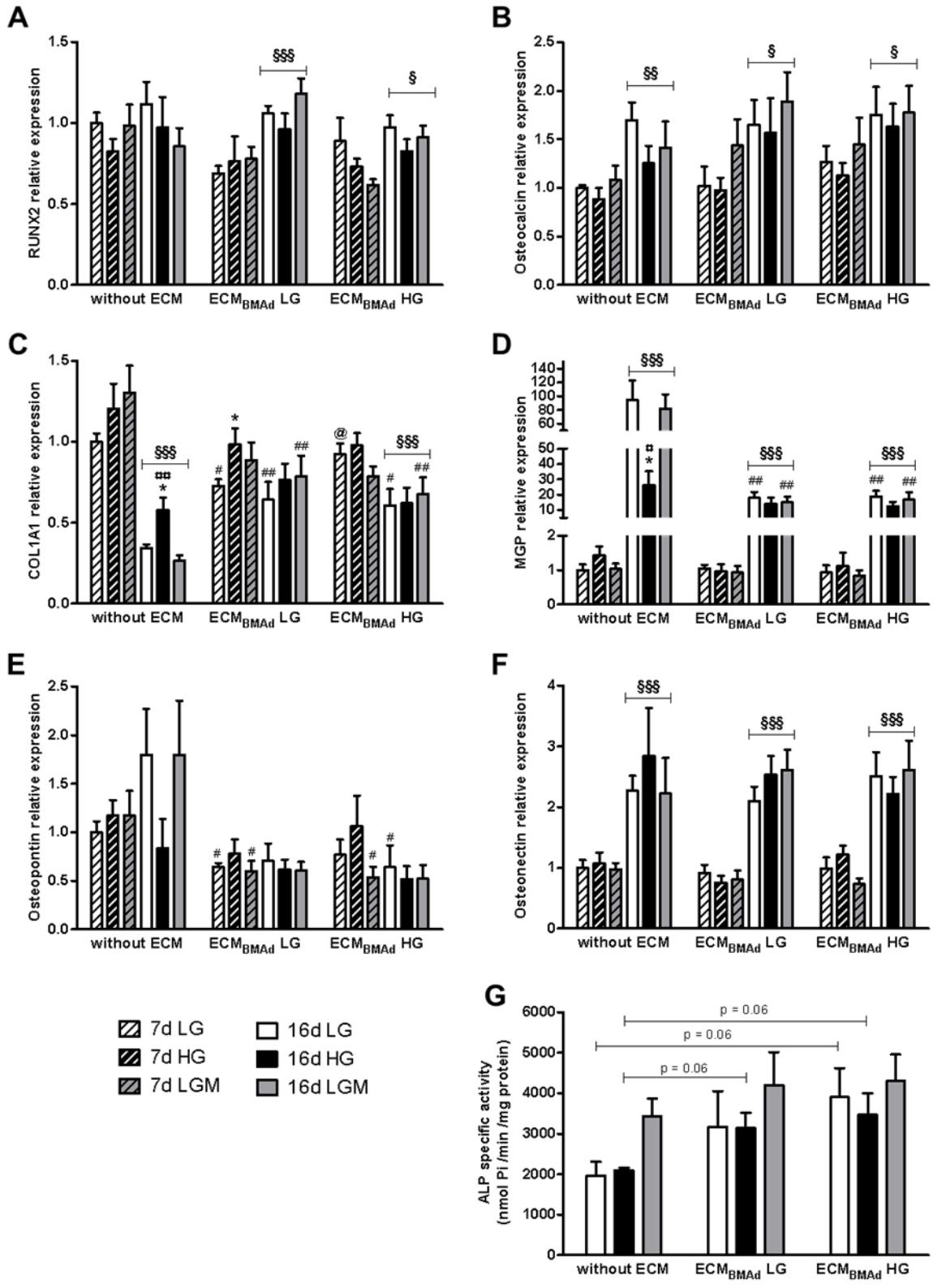
The activity of osteoblasts was then assessed through the mRNA expression analysis of several components of the mineralized matrix. Firstly, the expression level of type 1 Collagen (the main isoform □1, COL1A1) is well achieved by 7 days in all culture conditions confirming unaltered differentiation (Fig.3C). Yet, at this time, moderate alterations occur for osteoblasts on ECM_{BMAd} LG and in LG concentration: the mRNA level is lower compared to osteoblasts without ECM or on ECM_{BMAd} HG. Moreover, COL1A1 level is up-regulated by the HG concentration for osteoblasts on ECM_{BMAd} LG at the same time point. Such glucose-induced alteration is observed for osteoblasts without ECM by 16 days: while COL1A1 levels are substantially lowered as expected during this maturation phase [48], COL1A1 levels are higher in the presence of 25mM glucose compared to LG and LGM. Interestingly, COL1A1 mRNA levels remain stable on ECM_{BMAd} LG or are slightly diminished on ECM_{BMAd} HG between the two time points. By 16 days, osteoblasts on both ECM_{BMAd} express more COL1A1 in LG and LGM conditions than those without ECM. Culture at HG concentration does not further increase COL1A1 expression which is then like that of osteoblasts without ECM in this glucose concentration (Fig.3C).

Secondly, among other ECM components, attention has been brought to the expression profile of the Matrix-Gla-Protein (MGP), a glycoprotein considered to inhibit mineralization [49]. MGP

mRNA levels drastically rise at the maturation phase in all conditions (Fig.3D). Culture without ECM and in HG concentration reduces the MGP expression level by more than 3.5-fold compared to LG and LGM. Interestingly, MGP mRNA levels were similarly reduced when osteoblasts are cultured on any ECM_{BMAd} and whatever the glucose concentration. A comparable pattern is found for Osteopontin (OPN/SPP1), another glycoprotein with mineralization inhibiting properties [49] (Fig.3E). Though one donor induces variability, OPN mRNA levels tend to increase by 16 days in osteogenic medium containing LG or LGM but remain low in HG concentration ($p=0.09$) in the absence of adipocyte ECM. Compared to the situation without ECM, osteoblasts generated on ECM_{BMAd} globally exhibit diminished OPN expression levels at both time points and without any clear impact of glucose concentration. In contrast, the expression analysis of Osteonectin (SPARC) indicates a strong induction of this other mineralization regulator [49] between 7 and 16 days, with no influence of the glucose concentration, nor the support type (Fig.3F).

Finally, to better characterize the osteoblast phenotype, the specific activity of Alkaline Phosphatase (ALP) was measured after 16 days in osteogenic medium (Fig.3G). The enzyme activity is unchanged by glucose concentration in the absence of ECM. Compared to these latter conditions, ALP activity tends to increase by 1.5 to 2-fold when osteoblasts were cultured on ECM_{BMAd}. Of note, ALP mRNA levels are not modified by culture conditions at 7 or 16 days (Supplementary Fig.S3B).

Collectively, these data strengthen that ECM_{BMAd} do not impair osteoblastogenesis but could alter the functional activity of osteoblasts. The gene expression analyses support that HG concentration also triggers alteration in the mineralization phase of osteoblasts without ECM. Some of these HG-induced changes could be accelerated when osteoblasts are grown on adipocyte matrices: COL1A1 expression disturbances are detected on ECM_{BMAd} LG as early as 7 days. Besides, the modifications of COL1A1, MGP and OPN after 16 days of culture on both ECM_{BMAd} appear to be established in the LG concentration without further impact of the higher glucose concentration. In addition, the specific effect of mannitol was rather comparable to the LG effect discarding any strong impact of osmolarity, and so the LGM condition was no longer included for the next analyses.


A
RUNX2 relative expression
without ECM
ECMBMAd LG
ECMBMAd HG
B
Osteocalcin relative expression
C
COL1A1 relative expression
D
MGP relative expression
E
Osteopontin relative expression
F
Osteonectin relative expression
G
ALP specific activity (nmol Pi /min /mg protein)
p = 0.06
7d LG
7d HG
7d LGM
16d LG
16d HG
16d LGM

380

381

Figure 3. Impact of glucose concentration and adipocyte ECM on osteoblastogenesis markers, mineralization-related genes and ALP activity.
BMSC were seeded without ECM or on adipocyte ECM generated either in 5,5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively). After 48h, cells were differentiated in osteogenic medium containing either 5.5mM (LG, white) or 25mM (HG, black) glucose, or 5.5mM glucose + 20mM mannitol (LGM, grey).
Gene expression was performed after 7 days (hatched) and 16 days (filled) in osteogenic medium for **(A)** *RUNX2*, **(B)** Osteocalcin (*OCN*), **(C)** Collagen type I isoform α1 (*COL1A1*), **(D)** Matrix-Gla-Protein (*MGP*), **(E)** Osteopontin (*OPN*) and **(F)** Osteonectin (*SPARC*).
Results are means ± SEM from 6 independent experiments (3 donors), and are expressed according to *RPL13A* and normalized according to the condition "Without ECM in LG" for each donor. $^{\S}p<0.05$, $^{\S\S}p<0.01$, $^{\S\S\S}p<0.001$ state significant differences between 7 and 16 days for each condition of support and osteogenic medium using 2 way-ANOVA. $^{*}p<0.05$ compared to LG for the same support and timing; $^{\alpha}p<0.05$, $^{\alpha\alpha}p<0.01$ compared to LGM for the same support and timing; $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium and timing; $^{@}p<0.05$, compared to ECM_{BMAd} LG for the same osteogenic medium and timing, using Mann-Whitney tests.
(G) Alkaline Phosphatase (ALP) activity was performed after 16 days and expressed per amount of proteins. Results are means ± SEM from 4 independent experiments (2 donors). p=0.06 for the indicated comparisons, using Mann-Whitney tests.

3.4 The quantity and quality of mineralization are altered for osteoblasts grown on adipocyte ECM

The osteoblast mineralization capacity was measured after 16 days using a fluorochrome which specifically binds to hydroxyapatite (HA) (Osteoimage) (Supplementary Fig.S4A). The cell count (through DNA measurements) was taken into account given the increase in cell number on ECM_{BMAd} (Supplementary Fig.S3C). HA formation per cell is unchanged for osteoblasts generated without ECM when comparing the two glucose concentrations (Fig.4A). Osteoblasts cultured on ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG exhibit a severe decreased mineral formation compared to those without ECM and regardless glucose concentration. Of note, on these ECM_{BMAd}, the addition of 25mM glucose slightly interfere with HA formation in an opposite manner; in the end, the HG condition triggers a mineralization level slightly higher on ECM_{BMAd} HG than that on ECM_{BMAd} LG. Overall, osteoblasts grown on ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG display a reduced ability to produce mineral, despite sustained or higher ALP activities, respectively (Fig.3G).

Independently of the amount of mineralized tissue, the qualities of both the organic and the mineral matrix are important contributing factors in the determination of bone strength *in vivo*. The quality of mineralized nodules laid down by cells after 16 days was then characterized using Raman microspectroscopy as already used *in vitro* [50,51]. The microscopic observation of nodules prior analysis showed the presence of smaller nodules on both ECM_{BMAd} compared to those generated without ECM (data not shown) confirming the observed mineralization defects (Fig.4A). Raman spectra of nodules showed the presence of bands assigned to mineral

and organic matrix. The mineral band was v4PO4 (580cm -1), v1PO4 (960cm-1) and v1CO3 (1070cm-1) which are characteristics of carbonated hydroxyapatite (Supplementary Fig.S4C). The organic matrix is identified by the presence of bands of phenylalanine (1001 cm-1), Amide III (1257 cm-1) and the Amide I (1657 cm-1) which are characteristics of collagen I. The contents of collagen crosslinks (Fig.4B) and pyridinoline trivalent crosslinks (Supplementary Fig.S4B) were first determined from the band Amide I based on the method of Gamsjaeger and coll. [44]. Compared to the conditions without ECM, the levels of collagen cross-links are increased in the presence of ECM_{BMAd}. Culture in the HG concentration does not modify collagen cross-links in the absence of ECM but causes a different response depending on the adipocyte matrix. These post-translational modifications in collagen appear the most pronounced on the ECM_{BMAd} HG: the levels of cross-linking are not increased by the high concentration of glucose in the osteogenic medium but are significantly amplified with this glucose concentration compared to the ECM_{BMAd} LG. On the ECM_{BMAd} LG, exposure to the LG concentration also triggers an elevation of both types of collagen crosslinking while that to HG lowers them. Altogether, these data support that changes in glucose levels during osteoblasts development are not the main cause impacting their collagen processing. Moreover, the matrix formed by BMAds exposed to the HG concentration could interfere more prominently with this process than those generated under the LG condition.

The mineral to organic ratio was determined through the ratio of the integrated areas of v1PO4 to phenylalanine. This parameter shows striking differences according to culture conditions (Fig.4C). The matrix mineralization significantly increases (by 2-fold) in HG concentration compared to LG concentration in the absence of ECM. In LG concentration, the matrix mineralization also tends to increase on ECM_{BMAd} HG, compared to the situations without ECM (by 92%, p=0.08) and ECM_{BMAd} LG (by 42%, p=0.08). Yet, in HG concentration, the matrix mineralization is reduced in both ECM_{BMAd} compared to the situation without ECM. This reduction is also observed (by 45%) when comparing the HG and LG concentrations on ECM_{BMAd} HG. Considering that the expression level of COL1A1 (the matrix component primarily mineralized) is relatively similar in HG conditions whatever the support type (Fig.3C), these HG-mediated perturbations most likely result from alterations in HA deposit within collagen fibrils.

The amount of type-B carbonate is also affected according to the culture condition (Fig.4D). In the condition without ECM, type-B carbonation is increased by 3.4-fold in HG compared to LG concentration. Remarkably, on both ECM_{BMAd} and regardless of glucose concentration, no carbonation of hydroxyapatite is detected.

Finally, the crystallinity parameter was also assessed in all conditions (Fig.4E). This parameter depends on the size of crystallites and/or the degree of order of the ions within the crystal lattice. Crystallinity is not modified by the glucose concentration in the absence of ECM. Besides, in the ECM_{BMAd} LG condition, the crystallinity is the lowest in LG concentration and the highest in HG concentration compared to the two other supports.

Taking together, these data reveal that adipocyte matrices alter the phase of mineralization of osteoblasts. Osteoblasts culture on any ECM_{BMAd} lowers the quantity of mineral laid down per cell, and the quality of both the organic matrix and the mineral is impaired. Moreover, some of these ECM_{BMAd} -induced changes differ from those induced by the HG concentration in the absence of ECM.

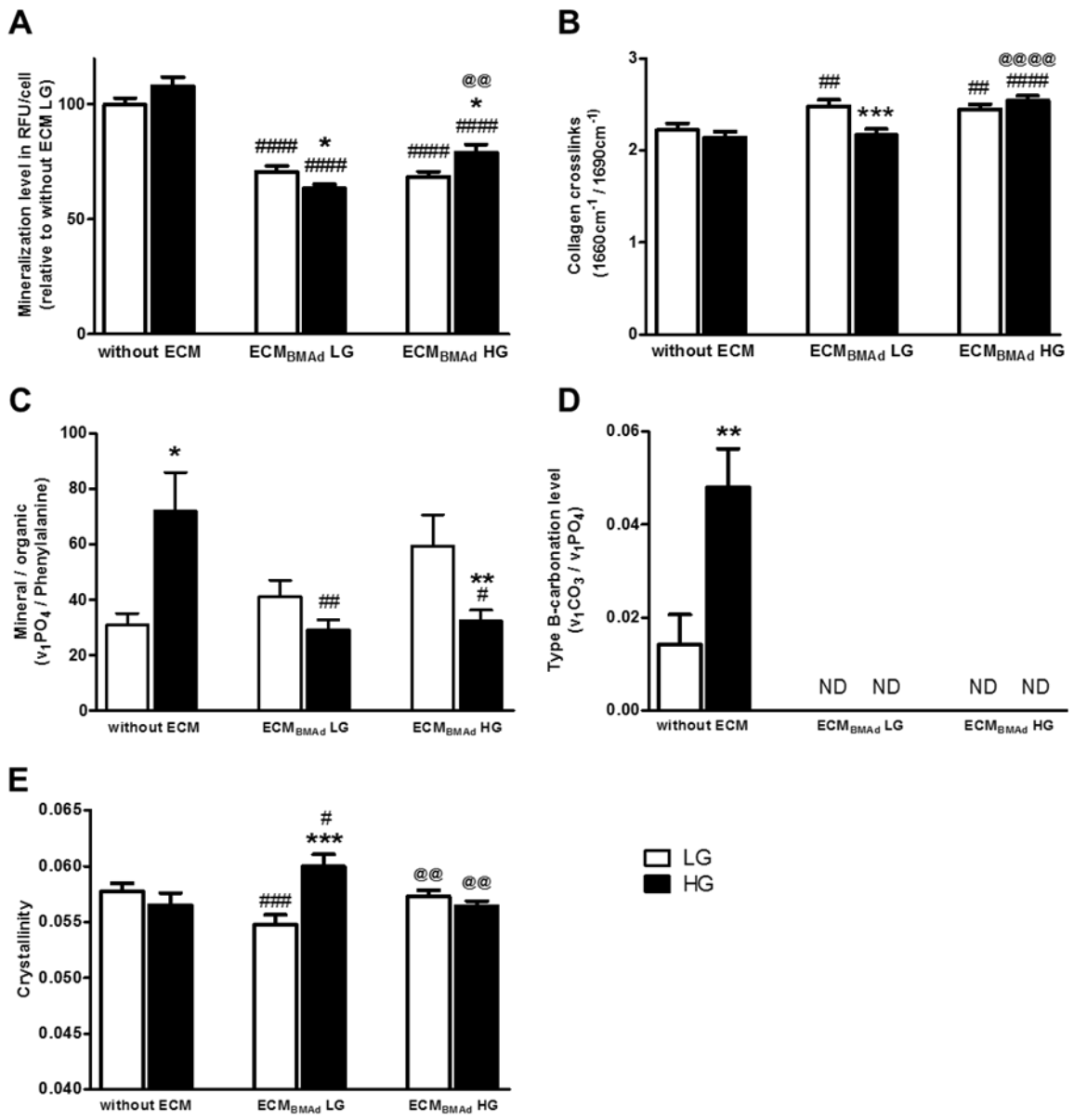


Figure 4. Impact of glucose concentration and adipocyte ECM on mineralization parameters.
BMSCs were seeded without ECM or on adipocyte ECM generated either in 5.5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively) and differentiated in osteogenic medium containing either 5.5mM (LG, white) or 25mM (HG, black) glucose for 16 days.
(A) The mineralization achieved per cell was obtained after hydroxyapatite labeling and DNA measurement and was expressed according to the condition "Without ECM in LG" for each donor. Results are means ± SEM from 32 independent experiments (4 donors). $^{\#\#\#\#}p<0.0001$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium; $^{@@}p<0.01$, compared to ECM_{BMAd} LG for the same osteogenic medium; $^{*}p<0.05$ compared to LG for the same support, using Mann-Whitney tests.
(B) The collagen total cross-links (determined as the ratio of the integrated area of the band at $1660cm^{-1}$ to that of $1690cm^{-1}$), **(C)** the mineral to organic ratio (determined as the ratio of the integrated areas of ν_1PO_4 to phenylalanine), **(D)** the level of B-carbonation (determined as the ratio of the integrated areas of ν_1CO_3 to ν_1PO_4) and **(E)** the crystallinity order of hydroxyapatite (determined from the full width at half height of the ν_1PO_4 band) were measured using RAMAN spectroscopy. Results are means ± SEM from at least 40 and up to 120 independent spectra, according to parameters (using 4 independent wells, 2 donors). $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ compared to LG for the same support; $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#\#}p<0.001$, $^{\#\#\#\#}p<0.0001$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium; $^{@@}p<0.01$, $^{@@@@}p<0.0001$ compared to ECM_{BMAd} LG for the same osteogenic medium, using Mann-Whitney tests. ND, not detected.

4. Discussion

BMAds are considered as active cells which participate to the formation and resorption of bone by interfering with osteoblastogenesis and releasing various regulating factors. In this study, we aimed at deciphering the contribution of the ECM of mature BMAds in the context of a chronic hyperglycemia. Using osmotic shock followed by DNase and lipase treatment, BMAds-free ECMs exhibit a similar general composition than the native matrix with adipocytes indicating the preservation of the matrix composition after devitalization. Regardless of glucose concentration provided during differentiation and maturation of adipocytes, the matrices of BMAds favor the attachment and proliferation of BMSCs and do not prevent their commitment toward the osteoblast lineage. Yet adipocyte matrices alter the maturation and mineralization phase of osteoblasts resulting in low quantity and disturbed quality of mineralization. In contrast to exposure to HG concentration, the adipocyte matrices provide an environment which specifically prevents carbonation of the mineral and favors collagen crosslinking. Moreover, the mineral to organic ratio is disturbed according to the presence of adipocyte ECM and to the glucose concentration used during the culture of adipocytes or osteoblasts. Our results highlight that HG concentration and ECM_{BMAd} can lead to different defects within the mineralization quality and should be both considered in the compromised bone quality of T2D.

Higher adhesion and proliferation of human BMSCs on various ECMs compared to plastic surface are quite common [12,46]. Compared to these studies, our two types of ECM_{BMAd} promote the proliferation rate of human BMSCs rather moderately. However, our results differ from previous work showing no impact of the ECM generated from human BMSC-derived BMAds on these parameters [14]. Such discrepancy may result from the use of more mature BMAds (following 21 days in adipogenic medium) which can affect the deposition of matrix components that were also obtained through a different and gentler process. We acknowledge that direct comparison with the ECM from other cells such as the BMSCs could have been beneficial in better characterizing the effects of ECM_{BMAd}. However, compared to these earlier studies [12,14], we used multiple donors (2 females and 2 males) which owing to variability between individuals is likely to reflect more generalizable responses. Finally, apart from promoting BMSCs attachment and proliferation, no early commitment toward adipogenesis or osteoblastogenesis is observed.

The gene expression analyses of the early and late osteogenic markers RUNX2 and OCN, the adipogenic marker PPARG, as well as the measurements of ALP activity demonstrate that adipocyte matrices, regardless of glucose concentration used during the adipogenic process,

do not affect the commitment and differentiation of BMSCs toward the osteoblast lineage even in the presence of 25mM glucose. Firstly, such results seem surprising in view of several factors secreted by BMAds which can inhibit osteoblastogenesis [6] and could be retained by the ECM. Secondly, the ECM composition itself is expected to modify BMSCs commitment and differentiation [53]. However, another independent study reported that the ECM generated after either early or later stages of adipogenesis (3 and 10 days respectively) does not perturb osteoblastogenesis: human BMSCs-derived osteoblasts differentiated either on these adipocyte ECMs or osteoblasts ECM display similar ALP staining, RUNX2 and OPN mRNA expression [15]. In addition, this same group also demonstrated that only the ECM produced by early adipocytes, and not that generated by late adipocytes, promotes adipogenesis [14,15]. Using matrices generated from even more mature adipocytes and according to another devitalization method, our study thus strengthens that the matrix of BMAds does not predominantly interfere with osteoblastic differentiation. Nevertheless, one has to keep in mind that these results are derived from *in vitro* studies for which the differentiation medium has been developed to maximize the stimulation of osteogenic differentiation, which could mitigate the effect of important components in a more pathophysiological context.

Thirdly, a HG concentration has been demonstrated to drastically inhibit osteoblast differentiation in the human osteoblast MG-63 cell line [30,32] and in primary rat osteoblasts [31] leading to a shift toward adipogenesis. However divergent results have been obtained for human BMSCs with either decreased [33] or unchanged [34] osteoblastogenesis in the presence of 25mM glucose compared to the normo-glycemic condition. Our data thus confirm that HG is not detrimental for human BMSCs commitment and differentiation toward the osteogenic lineage and that their culture on ECM_{BMAd} does not sensitize them to the potential anti-osteoblastic effects of the HG concentration. Importantly, it is during their maturation and mineralizing stage that osteoblasts become responsive to the HG concentration and to the adipocyte matrices.

Changes in the expression levels of COL1A1, MGP and OPN are observed on the 16th day for osteoblasts obtained on ECM_{BMAd} and for those cultured on plastic in HG condition. Despite a sustained or even higher ALP activity and the downregulation of two mineralization inhibitors, these changes result in a much less mineralizing ability of osteoblasts on adipocyte matrices regardless of glucose concentration. Yet as examined [51,54,55], ALP activity level is not always proportional to the degree of mineralization of cells. Besides as discussed in the last paragraph, MGP and OPN transcription could be regulated by other environmental cues. Regarding the impact of HG concentration, *in vitro* data are quite divergent showing either

519 reduced [28,57], higher [29] or unchanged [54] mineralization level. However, two of these
520 studies have revealed that an increase in glucose concentration interferes with the
521 mineralization process [28,29]. The quality of the mineral has begun to be analyzed and it was
522 reported a diminished calcium to phosphorus ratio induced in HG concentration [29]. This led
523 us to further characterize the mineralization quality using Raman spectrometry, which revealed
524 alterations more specific to the type of support or to the glucose concentration used.

525 In the absence of ECM and compared to the normo-glycemic condition, the mineralized matrix
526 generated in the HG concentration displays an increase in the mineral to matrix ratio and in
527 the type-B carbonation level. The latter alteration (corresponding to a substitution of a
528 phosphate by a carbonate group) is in agreement with the reduced calcium to phosphorus ratio
529 already mentioned [29] and has also been recently reported using a human osteoblast cell line
530 [58]. A higher mineralization of the organic matrix is a feature of the cortical part of long bones
531 in most rodent models of T2D [24,59,60]. The HG condition without ECM thus mimics some of
532 the defects in bone quality observed in T2D. Interestingly, on ECM_{BMAd} HG and following
533 exposure to LG, such an elevation in mineral to organic ratio also takes place. This suggests
534 that the ECM provided by BMAds previously exposed to a HG concentration perturbs the
535 mineral deposition even if the subsequent concentration of glucose is not deleterious.
536 Surprisingly though, when osteoblasts are exposed to both ECM_{BMAd} and HG concentration,
537 the mineral to organic ratios appear restored to the levels of the control situation (without ECM
538 in LG condition) and are significantly decreased compared to the situations without ECM in HG
539 and ECM_{BMAd} HG in LG. In fact, a decline in this ratio has also been reported at sites of bone
540 formation in a T2D model [61] suggesting that such defect can appear early in diabetes.
541 Besides, one can take into account that BMAds primarily develop in close vicinity to the
542 trabeculae and that changes often reported for the cortical at midshaft of long bones may be
543 not representative. In that context, it should be emphasized that the mineral to organic ratio for
544 the trabecular compartment is quite low compared to the cortical one, and, is unchanged by
545 the diabetes or obese status [24,62].

546 Moreover, two other modifications are specifically triggered in the presence of the adipocyte
547 matrices. Firstly, both total and trivalent crosslinks levels of collagen are increased when
548 osteoblasts are differentiated on ECM_{BMAd}. These enzyme-mediated cross-linkings of collagen
549 are related to the way matrix collagen molecules are arranged and stabilized in fibrils which
550 results in different mechanical properties of the organic matrices and play a role in bone
551 toughness and strength [63]. Of note, the non-enzymatic formation of AGEs - which is also
552 considered to impair bone quality [20,63]- could not be reliably measured in our experiments.
553 The enzymatic cross-link formation has been reported both as decreased [61-64] or increased

554 [24,26] in the bones of different T2D models. However, our set of experiments supports that
555 differentiation and maturation of osteoblasts on any on ECM_{BMAd} impacts more on this
556 parameter than the HG concentration exposure itself. In this regard, it has to be mentioned
557 that collagen maturity is positively correlated with age [19] and is increased in various post-
558 menopausal animal models [65,66] as well as in human bones of different osteoporotic types
559 [67-69] compared to controls. A raise in collagen maturity has been associated with impaired
560 bone mechanical properties [65,66] and fragility fractures [70,71]. Altogether, our results
561 strongly suggest that BMAds contribute indirectly through their ECM to the alterations of the
562 new bone collagen matrix produced in osteoporosis. Such deleterious contribution could also
563 occur in T2D: though the effects of the HG concentration on ECM_{BMAd} LG are difficult to
564 interpret, our results indeed infer that the ECM produced by BMAds chronically exposed to
565 hyperglycemia can perturb the osteoblast processing of the organic matrix independently of
566 the glucose concentration thereafter.

567 The second striking feature of the mineral generated on both ECM_{BMAd} is the absence of type-
568 B carbonate which is characteristic of biological apatite in bone. Raman spectroscopy has
569 been shown to be very sensitive to determine the amount of type-B carbonate [72]. This
570 carbonate substitution occurs *in vitro* with human BMSC-derived osteoblasts as shown in our
571 control experiments (without ECM) and by Schäck and coll. [51] with an increasing rate of
572 formation between 14 and 21 days of culture [50]. Of note, in a culture medium allowing both
573 adipogenesis and osteogenesis of murine bone-marrow stromal cells, the formed HA was also
574 devoid of any carbonate [73] (G. Falgayrac, personal communication). Altogether, these data
575 support that the presence of BMAd factors in the micro-environment of differentiating and
576 maturing osteoblasts can prevent the carbonate substitution of apatite.

577 As previously observed for other criteria, the carbonation is highly variable and appears
578 increased [74], unchanged [24,59,60] or decreased [26,61] in T2D models. In contrast, we
579 (Fig.4D) and others [58] show that HG exposure alone results in a higher carbonation level;
580 which indicates that other mechanisms are involved to modulate carbonation level. The
581 consequences of carbonate substitution on bone mechanical properties [52] and fracture
582 resistance [70,75,76] are still controversial and investigated. This type of substitution has been
583 reported to be negatively associated with crystallinity [77,78], another parameter potentially
584 interfering with bone quality [52]. Yet, as also described in other studies [19,75], the expected
585 changes in crystallinity were not observed in relation with the lack of carbonation in our
586 experiments. The use of synthetic hydroxyapatites also provides interesting insights regarding
587 the biological effect of different carbonate contents which can affect the proliferation and
588 differentiation of osteoblast-like cells [79,81] as well as the rate of resorption [81]. Though the

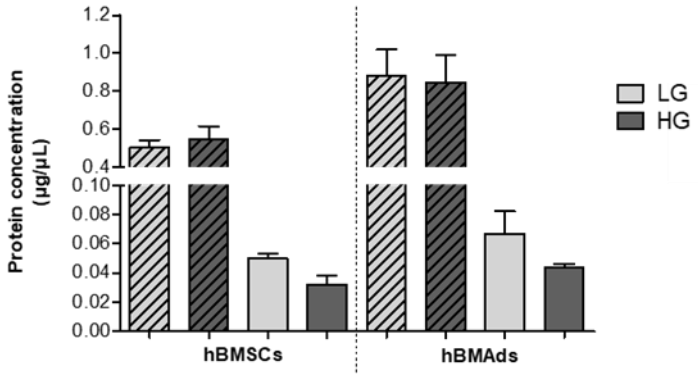
outcomes of changes in carbonate substitution in the bone mechanical properties have still to be clarified, our study underlines the importance of the ECM produced by BMAds which can prevent this substitution in the apatite crystal.

Besides quantity, bone composition plays a crucial role in mechanical properties and fragility of bone. Yet, their inter-relationships are difficult to assess since these different bone constituents differ with age, disease state, bone site (i.e. metaphysis or diaphysis) and bone compartment (cortical or trabecular) [19]. In that respect, the use of *in vitro* models, and more particularly devitalized matrices [53], provides key clues regarding the relative importance of cells and their microenvironment in the bone changes. Our study shows that BMAds can interfere with bone quantity and quality through the production of their ECM. For osteoblasts grown on these adipocyte matrices, the mineralization process alterations diverge from those triggered by the HG condition only. The extension level of the mineral to matrix, the collagen maturity as well as the degree of carbonation are modified in the presence of the BMAd micro-environment. Considering the relevance of these parameters in T2D and in osteoporosis more generally, our study should stimulate the appraisal of the presence of BMAds to better decipher the underlying mechanisms in bone quality. The defects in mineral deposition by osteoblasts grown on ECM_{BMAd} are -at the cellular (Fig.4A) and molecular (Fig.4.C) levels- partly dependent on the glucose concentration to which BMAds and then osteoblasts are exposed. The quantity of produced COL1A1 is unlikely to be implicated: mRNA levels from cells on ECM_{BMAd} are found as elevated as for osteoblasts without ECM in the HG concentration. Moreover, as expected [54,57], HG exposure in the absence of ECM results in the up regulation of COL1A1. Yet other mechanisms such as acidosis can be involved. Acidosis strongly inhibits the mineralization of the matrix produced by osteoblasts [82]. Indeed a low pH inhibits ALP activity [82], decreases bone carbonate content [83] and down-regulates the mRNA levels of both MGP [84] and OPN [82,84]. The deposition of hydroxyapatite onto the collagen is also highly dependent on the control of the pH which should remain at ~pH 7.4 [85]. Importantly, the exposure of osteoblasts to a HG concentration results in acidification of the medium [54]. In our study, osteoblasts grown on ECM_{BMAd} (and regardless of glucose concentration) display comparable decrease in expression of MGP and OPN than osteoblasts cultured in HG concentration and lay down a mineral with no carbonate. Taking into account the environment acidification associated with adipocyte metabolism [86,87], one can speculate that the BMAds have provided an acidic microenvironment leading to the observed alterations. Subsequent exposure of osteoblasts on ECM_{BMAd} to the HG concentration could further lower pH and could result in a severe decrease in mineral deposit, as observed (Fig.4C). This interesting hypothesis linking several outcomes of our study further deserves investigation.

5. Conclusions

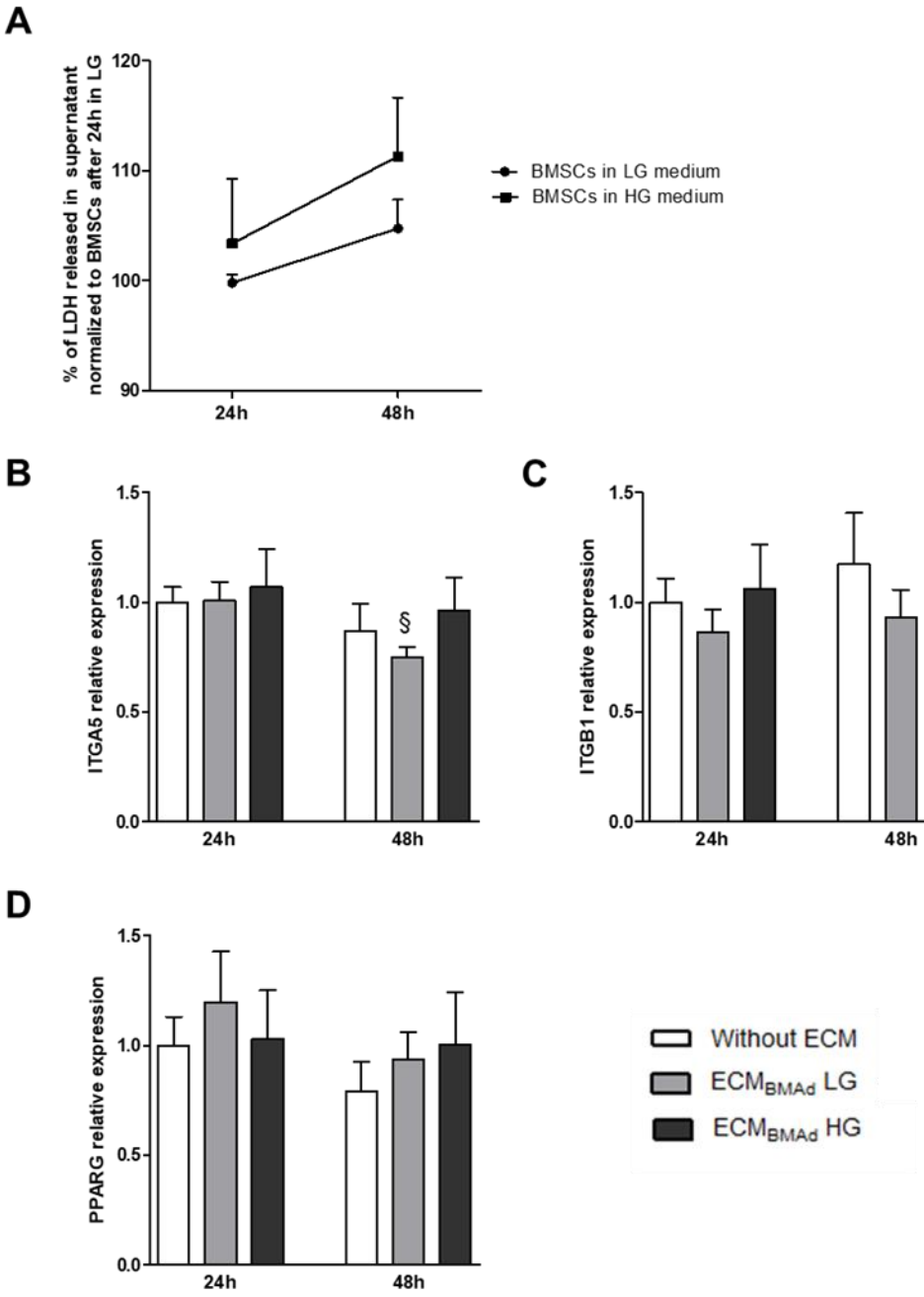
Our study shows for the first time that the ECM produced by human BMAds affects bone quantity and quality. The ECMs of BMAds - independently of the glucose concentration to which they were exposed- do not impair the commitment of BMSCs in osteoblastogenesis but disrupt the mineralization phase of osteoblasts. In addition to lower cell mineralization, culture of osteoblasts on adipocyte ECMs results in abnormal mineralized nodules with increased collagen cross-links and no type-B carbonation. Moreover, glucose concentration mainly interferes with the mineral to organic ratio with divergent outcomes according to culture conditions. Our results highlight that HG concentration and adipocyte ECM can result in different alterations of the mineralization quality which, yet, recapitulate contradictory changes observed in T2D osteoporosis. Given the rising need for a better understanding of bone composition, our study sheds light on the importance of BMAds involvement which should definitively be considered in the compromised bone quality of T2D and osteoporosis more generally.

638 **Supplementary data**



Supplementary Figure S1. Protein concentration before (hatched) and after (filled) decellularization of hBMSCs and hBMAds.
Human BMSCs were maintained in undifferentiated states in 5.5mM or 25mM glucose. Human BMAds were obtained by culture of BMSCs in adipogenic media in 5.5mM or 25mM glucose during 21 days. Undifferentiated BMSCs and BMAds were decellularized to recover their matrices. Then, using the same volume of buffer for the different plates, the protein concentration of each sample was measured. Data shown are means ± SEM of 2 independent experiments.

639

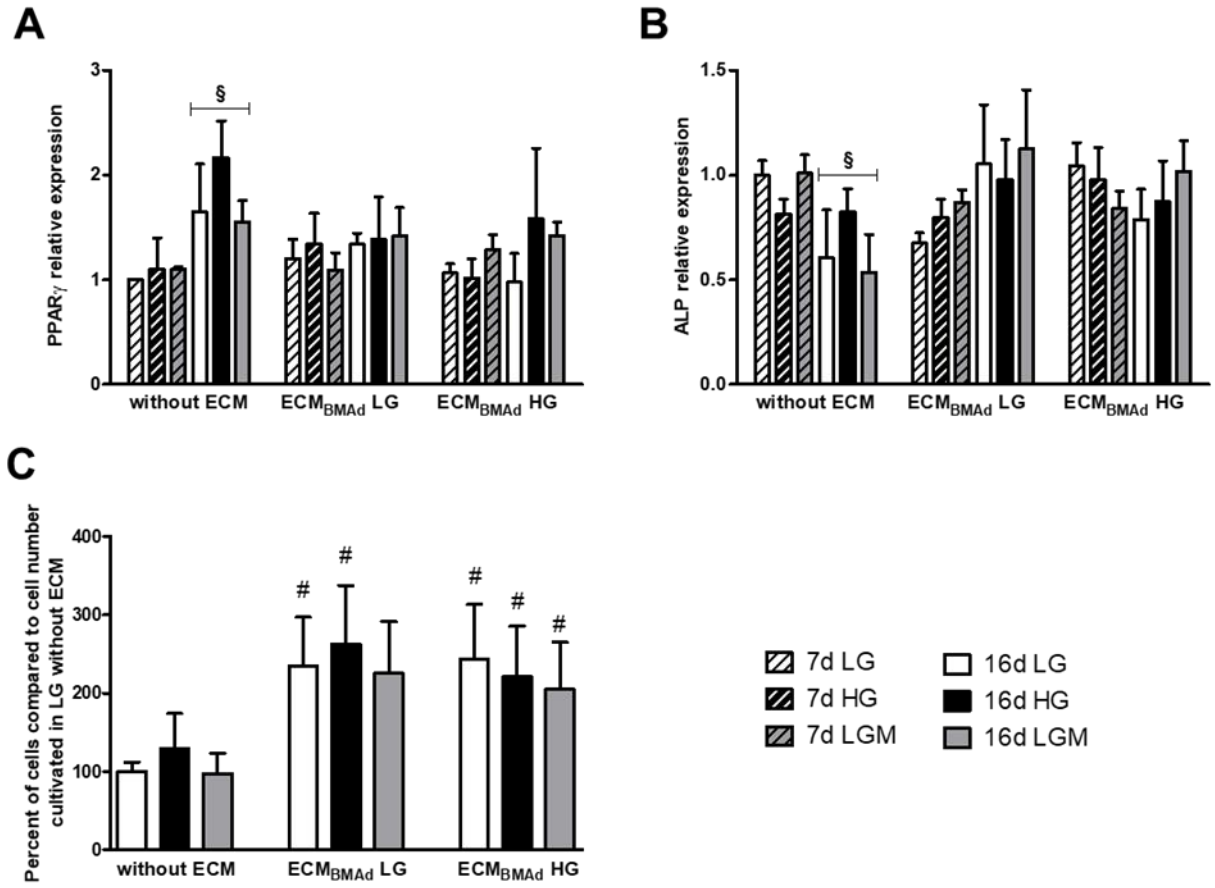


Supplementary Figure S2. . Characterization of human BMSCs according to glucose concentration or following seeding on adipocyte ECMs.

(A) Percent of Lactate DesHydrogenase (LDH) released in supernatant of human BMSCs cultured in LG (circle) or HG (square) without ECM, 24h and 48h after seeding.

Gene expression was performed for **(B)** Integrin alpha 5 (*ITGA5*), **(C)** Integrin beta 1 (*ITGB1*) and **(D)** *PPARG* with human BMSCs seeded in complete medium LG, on without ECM or on adipocyte ECM generated either in 5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively) after 24h and 48 hours.

Results are means ± SEM from 4 independent experiments (4 donors), and are expressed according to *RPL13A* and normalized to the condition "Without ECM at 24 hours" for each donor. $^{§}p<0,05$ states significant between 24 and 48 hours, using Mann-Whitney tests.



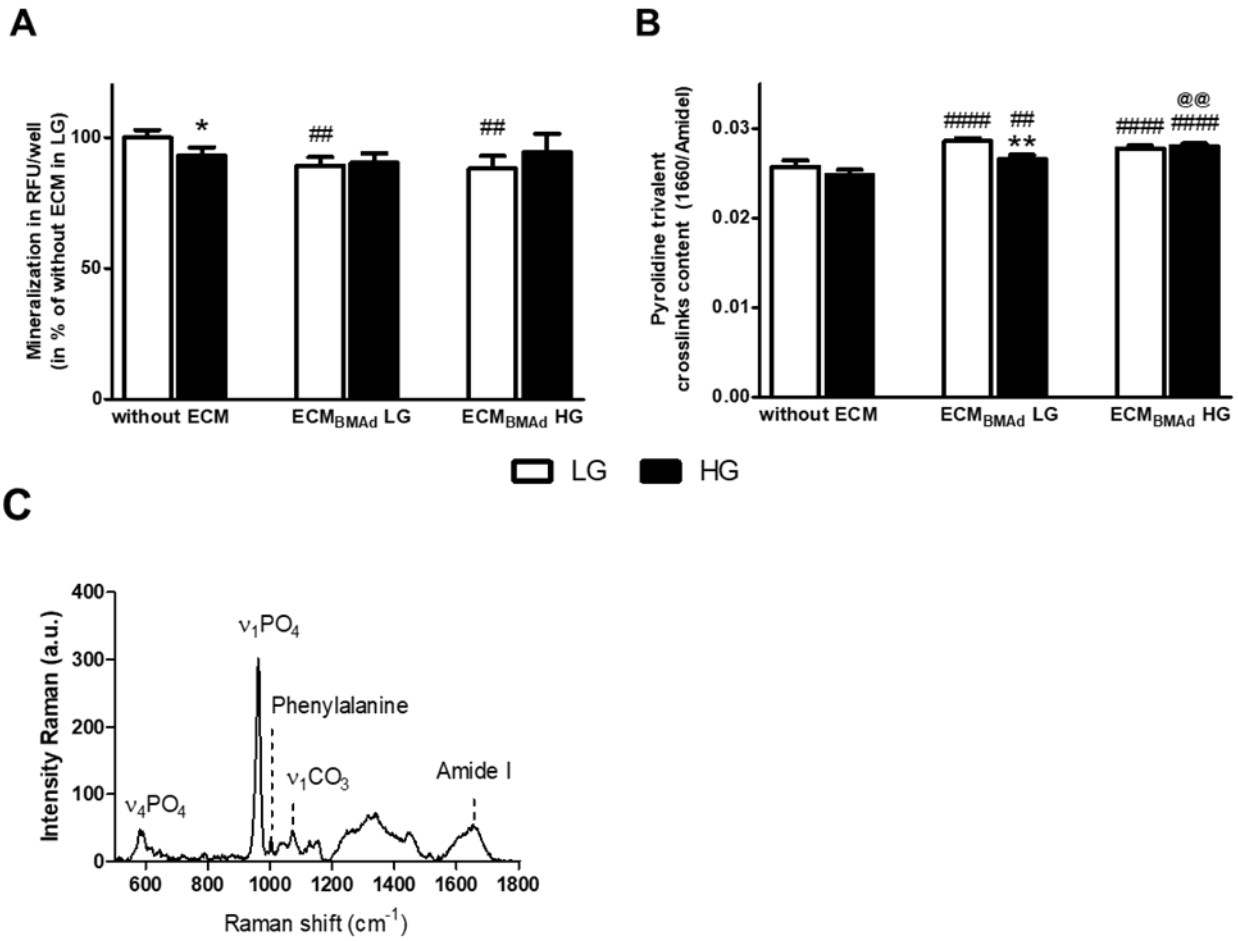
Supplementary Figure S3. Impact of glucose concentration and adipocyte ECM on cell differentiation and proliferation.

BMSCs were seeded without ECM or on adipocyte ECM generated either in 5.5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively). After 48h, cells were differentiated in osteogenic medium containing either 5,5mM (LG, white) or 25mM (HG, black) glucose, or 5,5mM glucose + 20mM mannitol (LGM, grey).

Gene expression was performed after 7 days (hatched) and 16 days (filled) for **(A)** *PPARG* and **(B)** Alkaline Phosphatase (*ALP*). Results are means ± SEM from 6 independent experiments (3 donors), and, are expressed according to *RPL13A* and normalized according to the condition "Without ECM in LG" for each donor.

(C) Cell number was determined through DNA measurements using Cyquant after 16 days in osteogenic medium. Results are expressed according to the condition "Without ECM in LG" for each donor and are means ± SEM from 32 independent experiments (4 donors).

$^{\S}p<0.05$ states significant difference between 7 and 16 days for each condition of support and osteogenic medium using 2 way-ANOVA; $^{\#}p<0.05$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium and timing, using Mann-Whitney tests.



Supplementary Figure S4. Impact of glucose concentration and adipocyte ECM on mineralization parameters.

BMSCs were seeded without ECM or on adipocyte ECM generated either in 5.5mM or 25mM glucose (ECM_{BMAd} LG or ECM_{BMAd} HG, respectively) and differentiated in osteogenic medium containing either 5.5mM (LG, white) or 25mM (HG, black) glucose for 16 days.

(A) The mineralization achieved per well was obtained after hydroxyapatite labeling and was normalized according to the condition "Without ECM in LG" for each donor. Results are means ± SEM from 32 independent experiments (4 donors). $^{\#\#}p<0.01$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium; $^{*}p<0.05$ compared to LG for the same support, using Mann-Whitney tests.

(B) Another parameter of collagen maturity corresponding to the Pyridinoline trivalent crosslinks was determined using RAMAN spectroscopy. Results are means ± SEM from at least 55 and up to 80 independent spectra (using 4 independent wells, 2 donors). $^{**}p<0.01$ compared to LG for the same support; $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#\#}p<0.0001$ compared to "without ECM" for the same osteogenic medium; $^{@@}p<0.01$ compared to ECM_{BMAd} LG for the same osteogenic medium, using Mann-Whitney tests.

(C) Example of Raman spectrum of nodule of mineralization with the assignment of the mineral and organic bands.

Name	Sequence 5'-3'	Gen Bank accession number
RPL13A	F : GCGGATGAACACCAACCCTT R : GCAGCATACCTCGCACGG	NM_012423.3
ALP	F : CAAAGGCTTCTTCTTGCTGGT R : AAGGGCTTCTTGTCCGTGTC	NM_000478
BGLAP	F : ATGAGAGCCCTCACACTCCTC R : GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	NM_199173
Cyclin B1	F : TACTGCCTCTCCAAGCCCAA R : TGTTTCCAGTGACTTCCCGA	NM_031966
COL1A1	F : GGCGAACAGGGCGACAGA R : GGCCAGGGAGACCGTTGAGT	NM_000088.4
ITGA5	F : GACAAACTCTCGCCGATTCAC R : GCTCTGGTTCACGGCAAAG	NM_002205
ITGAV	F : TGTGCAGCCAATACCCATCTCAAT R : CGTTCAAACCAGCCAACCAACA	NM_002210
ITGB1	F : GGGCGTGTTGGTAGACATT R : ACATGCACTGCCAGTGTAGTT	NM_002211
MGP	F : GCCTTAGCGGTAGTAACTTT R : CTGCTGAGGGGATATGA	NM_001190839.3
PPARG	F : GCTTCTGGATTTCACTATGG R : AAACCTGATGGCATTATGAG	NM_015869
RUNX2	F : GCGCTGCAACAAGACCCT R : CCGCCATGACAGTAACCACA	NM_001024630.4
SPARC	F : GTGCAGAGGAAACCGAAGAG R : TCTCATCCAGCTCGCACA	NM_003118.4
SPP1	F : CCTGCCAGCAACCGAAGTTT R : ACTGTCCTTCCCACGGCTGT	NM_001040058.2

F : Forward, R : Reverse

Table 1. PCR primer pairs used for amplification of human mRNA.

649

650

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors deeply thank Dr Tareck Rharass for his valuable comments regarding the manuscript, and, Dr Guillaume Duflos (ANSES, Boulogne sur Mer, France) for providing spectrofluorimeter facility. We also address our acknowledgements to the University of Littoral Côte d'Opale (ULCO) for its support during the Covid-19 pandemic.

Funding

LE was supported by the University of Littoral Côte d'Opale (ULCO) through a doctoral fellowship.

This work was supported by MSD AVENIR Foundation [ADIMETABONE project] to SL.

Author contribution

Laura Entz: Investigation; Methodology; Formal analysis; Validation; Writing - review & editing.

Guillaume Falgayrac: Data curation; Formal analysis; Validation; Methodology (Raman); Writing - review & editing.

Christophe Chauveau: Resources; Writing - review & editing.

Gilles Pasquier: Supervision; Writing - review & editing.

Stéphanie Lucas: Conceptualization; Supervision; Validation; Funding acquisition; Project administration; Resources; Writing - original draft.

673 **References**

674 [1] P. Hardouin, T. Rharass, S. Lucas, Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be
675 a Typical Adipose Tissue?, Front. Endocrinol. 7 (2016) 85.
676 https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00085.

677 [2] E.W. Yu, L. Greenblatt, A. Eajazi, M. Torriani, M.A. Bredella, Marrow adipose tissue
678 composition in adults with morbid obesity, Bone. 97 (2017) 38–42.
679 https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.12.018.

680 [3] Andrade Vfc, Besen D, Chula Dc, Borba Vzc, Dempster D, M. Ca, Bone Marrow
681 Adiposity in Premenopausal Women With Type 2 Diabetes With Observations on Peri-
682 Trabecular Adipocytes, J. Clin. Endocrinol. Metab. (2021).
683 https://doi.org/10.1210/clinem/dgab322.

684 [4] A.V. Schwartz, Epidemiology of fractures in type 2 diabetes, Bone. 82 (2016) 2–8.
685 https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.032.

686 [5] H. Sadie-Van Gijsen, N.J. Crowther, F.S. Hough, W.F. Ferris, The interrelationship
687 between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity, Cell. Mol. Life Sci. CMLS.
688 70 (2013) 2331–2349. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1211-2.

689 [6] T. Rharass, S. Lucas, MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Bone Marrow Adiposity
690 and bone, a bad romance?, Eur. J. Endocrinol. (2018). https://doi.org/10.1530/EJE-18-0182.

691 [7] L. Wang, H. Zhang, S. Wang, X. Chen, J. Su, Bone Marrow Adipocytes: A Critical
692 Player in the Bone Marrow Microenvironment, Front. Cell Dev. Biol. 9 (2021) 770705.
693 https://doi.org/10.3389/fcell.2021.770705.

694 [8] C.S. Craft, E.L. Scheller, Evolution of the Marrow Adipose Tissue Microenvironment,
695 Calcif. Tissue Int. (2016). https://doi.org/10.1007/s00223-016-0168-9.

696 [9] Y. Lai, Y. Sun, C.M. Skinner, E.L. Son, Z. Lu, R.S. Tuan, R.L. Jilka, J. Ling, X.-D. Chen,
697 Reconstitution of Marrow-Derived Extracellular Matrix *Ex vivo*: A Robust Culture System for
698 Expanding Large-Scale Highly Functional Human Mesenchymal Stem Cells, Stem Cells Dev.
699 19 (2010) 1095–1107. https://doi.org/10.1089/scd.2009.0217.

700 [10] X.-D. Chen, V. Dusevich, J.Q. Feng, S.C. Manolagas, R.L. Jilka, Extracellular matrix
701 made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor
702 cells and prevents their differentiation into osteoblasts, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc.
703 Bone Miner. Res. 22 (2007) 1943–1956. https://doi.org/10.1359/jbmr.070725.

[11] Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G, Development of stepwise osteogenesis-mimicking matrices for the regulation of mesenchymal stem cell functions, J. Biol. Chem. (2009). https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054676.

[12] Baroncelli M, van der Eerden Bcj, Chatterji S, Rull Trinidad E, Kan Yy, Koedam M, van Hengel Iaj, Alves Rdam, Fratila-Apachitei Le, Demmers Jaa, van de Peppel J, van Leeuwen Jptm, Human Osteoblast-Derived Extracellular Matrix with High Homology to Bone Proteome Is Osteopromotive, Tissue Eng. Part A. (2018). https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0448.

[13] M. Li, T. Zhang, J. Jiang, Y. Mao, A. Zhang, J. Zhao, ECM coating modification generated by optimized decellularization process improves functional behavior of BMSCs, Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 105 (2019) 110039. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110039.

[14] Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G, Development of extracellular matrices mimicking stepwise adipogenesis of mesenchymal stem cells, Adv. Mater. Deerfield Beach Fla. (2010). https://doi.org/10.1002/adma.201000038.

[15] Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G, The balance of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by matrices that mimic stepwise tissue development, Biomaterials. (2012). https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.061.

[16] V. Guneta, Z. Zhou, N.S. Tan, S. Sugii, M.T.C. Wong, C. Choong, Recellularization of decellularized adipose tissue-derived stem cells: role of the cell-secreted extracellular matrix in cellular differentiation, Biomater. Sci. 6 (2017) 168–178. https://doi.org/10.1039/c7bm00695k.

[17] Y. Sun, W. Li, Z. Lu, R. Chen, J. Ling, Q. Ran, R.L. Jilka, X.-D. Chen, Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix, FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 25 (2011) 1474–1485. https://doi.org/10.1096/fj.10-161497.

[18] Tencerova M, Ferencakova M, Kassem M, Bone marrow adipose tissue: Role in bone remodeling and energy metabolism, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. (2021). https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101545.

[19] A.L. Boskey, L. Imbert, Bone quality changes associated with aging and disease: a review, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1410 (2017) 93–106. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nyas.13572.

[20] Lekkala S, Taylor Ea, Hunt Hb, Donnelly E, Effects of Diabetes on Bone Material Properties, Curr. Osteoporos. Rep. (2019). https://doi.org/10.1007/s11914-019-00538-6.

[21] S. Gamsjaeger, R. Mendelsohn, A.L. Boskey, S. Gourion-Arsiquaud, K. Klaushofer, E.P. Paschalis, Vibrational spectroscopic imaging for the evaluation of matrix and mineral chemistry, Curr. Osteoporos. Rep. 12 (2014) 454–464. https://doi.org/10.1007/s11914-014-0238-8.

[22] K.F. Moseley, Z. Du, S.E. Sacher, V.L. Ferguson, E. Donnelly, Advanced glycation endproducts and bone quality: practical implications for people with type 2 diabetes, Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 28 (2021) 360–370. https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000641.

[23] L. Karim, T. Rezaee, R. Vaidya, The Effect of Type 2 Diabetes on Bone Biomechanics, Curr. Osteoporos. Rep. 17 (2019) 291–300. https://doi.org/10.1007/s11914-019-00526-w.

[24] H.B. Hunt, J.C. Pearl, D.R. Diaz, K.B. King, E. Donnelly, Bone Tissue Collagen Maturity and Mineral Content Increase With Sustained Hyperglycemia in the KK-Ay Murine Model of Type 2 Diabetes, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 33 (2018) 921–929. https://doi.org/10.1002/jbmr.3365.

[25] L. Karim, J. Moulton, M. Van Vliet, K. Velie, A. Robbins, F. Malekipour, A. Abdeen, D. Ayres, M.L. Bouxsein, Bone microarchitecture, biomechanical properties, and advanced glycation end-products in the proximal femur of adults with type 2 diabetes, Bone. 114 (2018) 32–39. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.05.030.

[26] A. Creecy, S. Uppuganti, M. Unal, R. Clay Bunn, P. Voziyan, J.S. Nyman, Low bone toughness in the TallyHO model of juvenile type 2 diabetes does not worsen with age, Bone. 110 (2018) 204–214. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.005.

[27] H.B. Hunt, N.A. Miller, K.J. Hemmerling, M. Koga, K.A. Lopez, E.A. Taylor, D.E. Sellmeyer, K.F. Moseley, E. Donnelly, Bone Tissue Composition in Postmenopausal Women Varies With Glycemic Control From Normal Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes Mellitus, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 36 (2021) 334–346. https://doi.org/10.1002/jbmr.4186.

[28] E. Balint, P. Szabo, C.F. Marshall, S.M. Sprague, Glucose-induced inhibition of *in vitro* bone mineralization, Bone. 28 (2001) 21–28.

765 [29] A. García-Hernández, H. Arzate, I. Gil-Chavarría, R. Rojo, L. Moreno-Fierros, High
766 glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells, Bone.
767 50 (2012) 276–288. https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.032.

768 [30] W. Wang, X. Zhang, J. Zheng, J. Yang, High glucose stimulates adipogenic and inhibits
769 osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-
770 regulated kinase pathway, Mol. Cell. Biochem. 338 (2010) 115–122.
771 https://doi.org/10.1007/s11010-009-0344-6.

772 [31] Y. Zhang, J.-H. Yang, Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates
773 high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts, J. Cell.
774 Biochem. 114 (2013) 2595–2602. https://doi.org/10.1002/jcb.24607.

775 [32] X. Shao, X. Cao, G. Song, Y. Zhao, B. Shi, Metformin rescues the MG63 osteoblasts
776 against the effect of high glucose on proliferation, J. Diabetes Res. 2014 (2014) 453940.
777 https://doi.org/10.1155/2014/453940.

778 [33] E. Keats, Z.A. Khan, Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and
779 mesenchymal cells to high levels of glucose, PloS One. 7 (2012) e38752.
780 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038752.

781 [34] W. Hankamolsiri, S. Manochantr, C. Tantrawatpan, D. Tantikanlayaporn, P.
782 Tapanadechopone, P. Kheolamai, The Effects of High Glucose on Adipogenic and Osteogenic
783 Differentiation of Gestational Tissue-Derived MSCs, Stem Cells Int. 2016 (2016) 9674614.
784 https://doi.org/10.1155/2016/9674614.

785 [35] C.C. Chuang, R.S. Yang, K.S. Tsai, F.M. Ho, S.H. Liu, Hyperglycemia enhances
786 adipogenic induction of lipid accumulation: involvement of extracellular signal-regulated protein
787 kinase 1/2, phosphoinositide 3-kinase/Akt, and peroxisome proliferator-activated receptor
788 gamma signaling, Endocrinology. 148 (2007) 4267–4275. https://doi.org/10.1210/en.2007-
789 0179.

790 [36] A. Wang, R.J. Midura, A. Vasanji, A.J. Wang, V.C. Hascall, Hyperglycemia diverts
791 dividing osteoblastic precursor cells to an adipogenic pathway and induces synthesis of a
792 hyaluronan matrix that is adhesive for monocytes, J. Biol. Chem. 289 (2014) 11410–11420.
793 https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541458.

794 [37] A.H. Chaves Neto, V.G.B. Brito, T. Landim de Barros, C.C.F. do Amaral, D.H. Sumida,
795 S.H.P. Oliveira, Chronic high glucose and insulin stimulate bone-marrow stromal cells

adipogenic differentiation in young spontaneously hypertensive rats, J. Cell. Physiol. 233 (2018) 6853–6865. https://doi.org/10.1002/jcp.26445.

[38] K.J. Suchacki, A.A.S. Tavares, D. Mattiucci, E.L. Scheller, G. Papanastasiou, C. Gray, M.C. Sinton, L.E. Ramage, W.A. McDougald, A. Lovdel, R.J. Sulston, B.J. Thomas, B.M. Nicholson, A.J. Drake, C.J. Alcaide-Corral, D. Said, A. Poloni, S. Cinti, G.J. Macpherson, M.R. Dweck, J.P.M. Andrews, M.C. Williams, R.J. Wallace, E.J.R. van Beek, O.A. MacDougald, N.M. Morton, R.H. Stimson, W.P. Cawthorn, Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis, Nat. Commun. 11 (2020) 3097. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16878-2.

[39] D. Ferland-McCollough, D. Masseli, G. Spinetti, M. Sambataro, N. Sullivan, A. Blom, P. Madeddu, MCP-1 Feedback Loop Between Adipocytes and Mesenchymal Stromal Cells Causes Fat Accumulation and Contributes to Hematopoietic Stem Cell Rarefaction in the Bone Marrow of Diabetic Patients, Diabetes. (2018). https://doi.org/10.2337/db18-0044.

[40] E.C. Keats, J.M. Dominguez, M.B. Grant, Z.A. Khan, Switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates high glucose-induced adipogenesis, Stem Cells Dayt. Ohio. 32 (2014) 1649–1660. https://doi.org/10.1002/stem.1659.

[41] T. Rharass, S. Lucas, High Glucose Level Impairs Human Mature Bone Marrow Adipocyte Function Through Increased ROS Production, Front. Endocrinol. 10 (2019) 607. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00607.

[42] Wang L, Johnson Ja, Zhang Q, Beahm Ek, Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering, Acta Biomater. (2013). https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.035.

[43] E. Rossi, J. Guerrero, P. Aprile, A. Tocchio, E.A. Kappos, I. Gerges, C. Lenardi, I. Martin, A. Scherberich, Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue regeneration, Acta Biomater. 73 (2018) 154–166. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.039.

[44] Gamsjaeger S, Robins Sp, Tatakis Dn, Klaushofer K, Paschalis Ep, Identification of Pyridinoline Trivalent Collagen Cross-Links by Raman Microspectroscopy, Calcif. Tissue Int. (2017). https://doi.org/10.1007/s00223-016-0232-5.

[45] Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A, Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds, Int. J. Mol. Sci. (2020). https://doi.org/10.3390/ijms21155447.

[46] U. Lindner, J. Kramer, J. Behrends, B. Driller, N.-O. Wendler, F. Boehrnsen, J. Rohwedel, P. Schlenke, Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins, Cytotherapy. 12 (2010) 992–1005. https://doi.org/10.3109/14653249.2010.510503.

[47] E.M. Morandi, R. Verstappen, M.E. Zwierzina, S. Geley, G. Pierer, C. Ploner, ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells, Sci. Rep. 6 (2016) 1–14. https://doi.org/10.1038/srep28889.

[48] G.R. Beck, Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation, J. Cell. Biochem. 90 (2003) 234–243. https://doi.org/10.1002/jcb.10622.

[49] E. Bonucci, Bone mineralization, Front. Biosci. Landmark Ed. 17 (2012) 100–128. https://doi.org/10.2741/3918.

[50] L.L. McManus, G.A. Burke, M.M. McCafferty, P. O'Hare, M. Modreanu, A.R. Boyd, B.J. Meenan, Raman spectroscopic monitoring of the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, The Analyst. 136 (2011) 2471–2481. https://doi.org/10.1039/c1an15167c.

[51] L.M. Schäck, S. Noack, R. Winkler, G. Wißmann, P. Behrens, M. Wellmann, M. Jagodzinski, C. Krettek, A. Hoffmann, The Phosphate Source Influences Gene Expression and Quality of Mineralization during *In vitro* Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, PLOS ONE. 8 (2013) e65943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065943.

[52] M. Unal, A. Creecy, J.S. Nyman, The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone, Curr. Osteoporos. Rep. 16 (2018) 205–215. https://doi.org/10.1007/s11914-018-0433-0.

[53] Hoshiba T, Chen G, Endo C, Maruyama H, Wakui M, Nemoto E, Kawazoe N, Tanaka M, Decellularized Extracellular Matrix as an *In vitro* Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation, Stem Cells Int. 2016 (2016). https://doi.org/10.1155/2016/6397820.

[54] S. Botolin, L.R. McCabe, Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways, J. Cell. Biochem. 99 (2006) 411–424. https://doi.org/10.1002/jcb.20842.

[55] M. Baroncelli, B.C. van der Eerden, Y.-Y. Kan, R.D. Alves, J.A. Demmers, J. van de Peppel, J.P. van Leeuwen, Comparative proteomic profiling of human osteoblast-derived extracellular matrices identifies proteins involved in mesenchymal stromal cell osteogenic

differentiation and mineralization, J. Cell. Physiol. 233 (2018) 387–395. https://doi.org/10.1002/jcp.25898.

[56] H.C. Blair, Q.C. Larrouture, Y. Li, H. Lin, D. Beer-Stoltz, L. Liu, R.S. Tuan, L.J. Robinson, P.H. Schlesinger, D.J. Nelson, Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In vivo* and *In vitro*, Tissue Eng. Part B Rev. 23 (2017) 268–280. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454.

[57] J.S. Cunha, V.M. Ferreira, E. Maquigussa, M.A. Naves, M.A. Boim, Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function *in vitro*, Cell Tissue Res. 358 (2014) 249–256. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1913-x.

[58] Cifuentes-Mendiola Se, Moreno-Fierros L, González-Alva P, García-Hernández Al, Docosahexaenoic acid improves altered mineralization proteins, the decreased quality of hydroxyapatite crystals and suppresses oxidative stress induced by high glucose, Exp. Ther. Med. (2022). https://doi.org/10.3892/etm.2022.11160.

[59] M.A. Hammond, M.A. Gallant, D.B. Burr, J.M. Wallace, Nanoscale changes in collagen are reflected in physical and mechanical properties of bone at the microscale in diabetic rats, Bone. 60 (2014) 26–32. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.11.015.

[60] A. Creecy, S. Uppuganti, A.R. Merkel, D. O'Neal, A.J. Makowski, M. Granke, P. Voziyan, J.S. Nyman, Changes in the Fracture Resistance of Bone with the Progression of Type 2 Diabetes in the ZDSD Rat, Calcif. Tissue Int. 99 (2016) 289–301. https://doi.org/10.1007/s00223-016-0149-z.

[61] A. Mieczkowska, P. Millar, D. Chappard, V.A. Gault, G. Mabilleau, Dapagliflozin and Liraglutide Therapies Rapidly Enhanced Bone Material Properties and Matrix Biomechanics at Bone Formation Site in a Type 2 Diabetic Mouse Model, Calcif. Tissue Int. 107 (2020) 281–293. https://doi.org/10.1007/s00223-020-00720-4.

[62] C. Marin, G. Papantonakis, K. Sels, G.H. van Lenthe, G. Falgayrac, R. Vangoitsenhoven, B. Van der Schueren, G. Penel, F. Luyten, K. Vandamme, G. Kerckhofs, Unraveling the compromised biomechanical performance of type 2 diabetes- and Roux-en-Y gastric bypass bone by linking mechanical-structural and physico-chemical properties, Sci. Rep. 8 (2018) 5881. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24229-x.

[63] Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas Pd, The role of collagen in bone strength, Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA. (2006). https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9.

892 [64] M. Saito, K. Fujii, Y. Mori, K. Marumo, Role of collagen enzymatic and glycation induced
893 cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats,
894 Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found.
895 USA. 17 (2006) 1514–1523. https://doi.org/10.1007/s00198-006-0155-5.

896 [65] Wen Xx, Wang Fq, X. C, Wu Zx, Zhang Y, Feng Yf, Yan Yb, Lei W, Time Related
897 Changes of Mineral and Collagen and Their Roles in Cortical Bone Mechanics of
898 Ovariectomized Rabbits, PloS One. (2015). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127973.

899 [66] Pezzotti G, Rondinella A, Marin E, Zhu W, A. Nn, Ulian G, Valdrè G, Raman
900 spectroscopic investigation on the molecular structure of apatite and collagen in osteoporotic
901 cortical bone, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. (2017).
902 https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.030.

903 [67] Paschalis Ep, Shane E, Lyritis G, Skarantavos G, Mendelsohn R, Boskey Al, Bone
904 fragility and collagen cross-links, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. (2004).
905 https://doi.org/10.1359/JBMR.040820.

906 [68] Garcia I, Chiodo V, Ma Y, Boskey A, Evidence of altered matrix composition in iliac
907 crest biopsies from patients with idiopathic juvenile osteoporosis, Connect. Tissue Res. (2016).
908 https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1088531.

909 [69] Bätge B, Diebold J, Stein H, Bodo M, Müller Pk, Compositional analysis of the
910 collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue, Eur. J. Clin.
911 Invest. (1992). https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01450.x.

912 [70] Gourion-Arsiquaud S, Faibish D, Myers E, Spevak L, Compston J, Hodsman A, Shane
913 E, Recker Rr, Boskey Er, Boskey Al, Use of FTIR spectroscopic imaging to identify parameters
914 associated with fragility fracture, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. (2009).
915 https://doi.org/10.1359/jbmr.090414.

916 [71] Rokidi S, Paschalis Ep, Klaushofer K, Vennin S, Desyatova A, Turner Ja, Watson P,
917 Lappe J, Akhter Mp, Recker Rr, Organic matrix quality discriminates between age- and BMD-
918 matched fracturing versus non-fracturing post-menopausal women: A pilot study, Bone.
919 (2019). https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.06.017.

920 [72] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres, MicroRaman spectral study of the PO4 and CO3
921 vibrational modes in synthetic and biological apatites, Calcif. Tissue Int. 63 (1998) 475–481.
922 https://doi.org/10.1007/s002239900561.

[73] O. Ghali, O. Broux, G. Falgayrac, N. Haren, J.P.T.M. van Leeuwen, G. Penel, P. Hardouin, C. Chauveau, Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation, BMC Cell Biol. 16 (2015) 9. https://doi.org/10.1186/s12860-015-0056-6.

[74] Tice Mjl, Bailey S, Sroga Ge, Gallagher Ej, Vashishth D, Non-Obese MKR Mouse Model of Type 2 Diabetes Reveals Skeletal Alterations in Mineralization and Material Properties, JBMR Plus. (2021). https://doi.org/10.1002/jbm4.10583.

[75] A.L. Boskey, E. Donnelly, E. Boskey, L. Spevak, Y. Ma, W. Zhang, J. Lappe, R.R. Recker, Examining the Relationships Between Bone Tissue Composition, Compositional Heterogeneity, and Fragility Fracture: A Matched Case-Controlled FTIRI Study, J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 31 (2016) 1070–1081. https://doi.org/10.1002/jbmr.2759.

[76] G.S. Mandair, M.P. Akhter, F.W.L. Esmonde-White, J.M. Lappe, S.P. Bare, W.R. Lloyd, J.P. Long, J. Lopez, K.M. Kozloff, R.R. Recker, M.D. Morris, Altered collagen chemical compositional structure in osteopenic women with past fractures: A case-control Raman spectroscopic study, Bone. 148 (2021) 115962. https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115962.

[77] Yerramshetty Js, Lind C, Akkus O, The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade, Bone. (2006). https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.06.002.

[78] A.C. Deymier, A.K. Nair, B. Depalle, Z. Qin, K. Arcot, C. Drouet, C.H. Yoder, M.J. Buehler, S. Thomopoulos, G.M. Genin, J.D. Pasteris, Protein-free formation of bone-like apatite: New insights into the key role of carbonation, Biomaterials. 127 (2017) 75–88. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.029.

[79] Rupani A, Hidalgo-Bastida La, Rutten F, Dent A, Turner I, Cartmell S, Osteoblast activity on carbonated hydroxyapatite, J. Biomed. Mater. Res. A. (2012). https://doi.org/10.1002/jbm.a.34037.

[80] B.R. Adams, A. Mostafa, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Osteoblast response to nanocrystalline calcium hydroxyapatite depends on carbonate content, J. Biomed. Mater. Res. A. 102 (2014) 3237–3242. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34994.

[81] M.-M. Germaini, R. Detsch, A. Grünewald, A. Magnaudeix, F. Lalloue, A.R. Boccaccini, E. Champion, Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted

hydroxyapatite ceramics for bone regeneration, Biomed. Mater. Bristol Engl. 12 (2017) 035008. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa69c3.

[82] A. Brandao-Burch, J.C. Utting, I.R. Orriss, T.R. Arnett, Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts *in vitro* by preventing mineralization, Calcif. Tissue Int. 77 (2005) 167–174. https://doi.org/10.1007/s00223-004-0285-8.

[83] D.A. Bushinsky, B.C. Lam, R. Nespeca, N.E. Sessler, M.D. Grynpas, Decreased bone carbonate content in response to metabolic, but not respiratory, acidosis, Am. J. Physiol. 265 (1993) F530-536. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.4.F530.

[84] K.K. Frick, D.A. Bushinsky, *In vitro* metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression, Am. J. Physiol. 277 (1999) F750-755. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.5.F750.

[85] P.H. Schlesinger, H.C. Blair, D. Beer Stolz, V. Riazanski, E.C. Ray, I.L. Tourkova, D.J. Nelson, Cellular and extracellular matrix of bone, with principles of synthesis and dependency of mineral deposition on cell membrane transport, Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 318 (2019) C111–C124. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2019.

[86] D. Sabater, S. Arriarán, M. del M. Romero, S. Agnelli, X. Remesar, J.A. Fernández-López, M. Alemany, Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability, Sci. Rep. 4 (2014) 1–9. https://doi.org/10.1038/srep03663.

[87] Civelek Vn, Hamilton Ja, Tornheim K, Kelly Kl, Corkey Be, Intracellular pH in adipocytes: effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996). https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10139.

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES MATRICES EXTRA-CELLULAIRE DES ADIPOCYTES MEDULLAIRES

I. INTRODUCTION

La matrice extra-cellulaire joue un rôle crucial dans l'adhésion, la prolifération, la différenciation, l'organisation cellulaire et l'homéostasie tissulaire (Frantz *et al.*, 2010). Notre étude précédente a démontré, *in vitro,* que la MEC des adipocytes médullaires impacte l'adhésion et la prolifération des CSM ainsi que la quantité et qualité de minéralisation des cellules sans modifier l'ostéoblastogénèse. La MEC adipocytaire joue donc un rôle dans l'homéostasie osseuse et on peut supposer qu'elle impacte également les autres cellules environnantes comme les CSH et les cellules dérivées de la lignée hématopoïétique. Malheureusement peu d'informations sont disponibles concernant la composition de cette MEC adipocytaire et son rôle dans d'autres physiopathologies.

Ce travail consiste alors à caractériser la composition des matrices extra-cellulaire des adipocytes médullaires, dans différentes conditions de perte osseuse et de perturbations métaboliques, afin de mieux comprendre leur implication dans la fragilité osseuse, plus particulièrement celle associée au diabète de type 2. Pour cela, trois approches complémentaires sont mises en place.

Cette caractérisation débute par une approche *in vitro*, à partir d'adipocytes médullaires différenciés de CSM humaines à deux concentrations en glucose : 5.5 mM de glucose (LG), pour mimer la normoglycémie et 25 mM de glucose (HG), pour mimer une hyperglycémie sévère afin d'étudier directement l'impact de la concentration de glucose. Une mesure d'expression génique de divers composants matriciels et facteurs impliqués dans la minéralisation est réalisée sur les AM et directement comparée aux CSM indifférenciées et ostéoblastes différenciés. Ce criblage permettra d'orienter les analyses à l'échelle protéique qui seront réalisées sur cellules entières et sur MEC dévitalisées selon leur niveau d'expression. De plus, une analyse par spectroscopie Raman est réalisée sur les MEC dévitalisées pour confirmer mais aussi pour identifier la présence de nouveaux composants par une approche globale. Ces premiers résultats sont ensuite validés avec la caractérisation d'adipocytes médullaires primaires isolés du modèle murin d'ovariectomie ou de patientes post-ménopausées. Ces échantillons sont comparés à des adipocytes de référence déjà bien caractérisés, ceux du tissu

adipeux sous-cutané, et aux autres cellules isolées de la moelle afin d'évaluer la contribution des AM dans la moelle osseuse. Ces deux approches, *ex vivo* et clinique, consistent dans un premier temps à mesurer le profil d'expression génique des composants matriciels des AM.

L'ostéoporose ménopausique constitue un contexte de choix pour étudier l'adiposité médullaire. En effet, elle est liée au vieillissement et présente une augmentation de l'adiposité médullaire et une fragilité osseuse associées à la carence en œstrogènes. De plus, ce contexte s'accompagne du développement de plusieurs défauts métaboliques qui augmentent le risque de développer un diabète de type 2. Ainsi, la période pré-ménopausique et la transition vers la ménopause s'accompagnent d'une augmentation de l'adiposité viscérale pouvant mener jusqu'au développement d'une obésité (Toth *et al.*, 2000). Une insulino-résistance et une intolérance au glucose sont également des perturbations courantes (Mauvais-Jarvis *et al.*, 2017). Enfin, chez les patientes ménopausées, le développement d'un diabète de type 2 s'accompagne d'altérations plus marquées de l'adiposité médullaire : la quantité d'adiposité médullaire est bien corrélée à l'hémoglobine glyquée (Baum *et al.*, 2012) et à un indice mesurant le degré d'insulino-résistance (HOMA-IR) (Zhu *et al.*, 2019). La composition lipidique est aussi altérée vers un profil plus délétère pour l'homéostasie osseuse (Patsch *et al.*, 2013).

Les analyses des AM de souris ovariectomisées sont réalisées à deux temps, précoce et tardif, permettant de suivre l'évolution du profil des différents composants. En effet, la caractérisation de ce modèle montre qu'entre ces deux temps, la perte osseuse se poursuit, alors que les adipocytes médullaires présentent un profil plus délétère avec une augmentation de l'expression de deux inhibiteurs de la voie Wnt et de RANKL (S. Lucas, données personnelles). De plus, une intolérance au glucose et une augmentation de la glycémie à jeun sont pleinement établies indiquant bien un état pré-diabétique des souris ovariectomisées. Les profils d'expression des AM des patientes ménopausées pourront être aussi davantage explorés en fonction de plusieurs paramètres métaboliques mesurés chez ces patientes.

La composition des MEC des adipocytes extra-médullaires suscite un intérêt croissant dans les contextes de l'obésité et de l'insulino-résistance : en effet, le remodelage de la MEC par les adipocytes est considéré comme un processus fondamental dans leur expansion et contribue aux altérations fonctionnelles des tissus adipeux (sous-cutanés et viscéraux) (Pope *et al.*, 2016). En se basant sur la composition actuelle de ces tissus adipeux, nous avons choisi de nous intéresser à différents types de collagènes ; à des composants non collagéniques de la membrane

basale comme la laminine et la fibronectine ; à des glycosaminoglycanes et protéoglycanes et enfin à des composants propres à la matrice osseuse intervenant dans la minéralisation.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Partie *in vitro* sur cellules en culture

a) Culture et différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

Maintien en état indifférencié : Les CSM sont ensemencées à 1.1 x 10^4 cellules/cm² et sont cultivées en milieu complet LG durant 48h.

Différenciation adipogénique des CSM : Les CSM sont ensemencées à 1.1 x 10^4 cellules/cm² et sont cultivées en milieu complet LG. Lorsque les cellules ont atteint 80 % de confluence, la différenciation adipogénique est induite avec un milieu adipogénique contenant 5.5 mM de glucose (LG) ou 25 mM de glucose (HG). Les cellules sont cultivées durant 21 jours avec un renouvellement de milieu tous les 3 jours.

Différenciation ostéogénique des CSM : Les CSM sont ensemencées à 8.3 x 10^3 cellules/cm² en milieu complet LG. Lorsque les cellules ont atteint 60 % de confluence, la différenciation ostéogénique est induite avec un milieu ostéogénique contenant 5.5 mM de glucose (LG) ou 25 mM de glucose (HG). Les CSM sont cultivées durant 16 jours avec un renouvellement de milieu tous les 3 jours.

Des courbes de cinétiques ont été réalisées pendant ces étapes de différenciation (comme indiquées au CHAPITRE 1) pour mieux caractériser l'expression de certains composants.

Ces expériences sont menées sur les 4 donneurs de CSM présentés dans le CHAPITRE 1.

b) Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR

Les ARN messagers (ARNm) sont extraits : 1) de CSM indifférenciées, 2) d'adipocytes différenciés après 21 jours de culture en milieu LG et HG, et 3) d'ostéoblastes différenciés après 16 jours de culture en milieu LG et HG, en utilisant le réactif Extract-All® (Eurobio Scientific). Après dosage, un traitement à la DNAse est effectué (DNAse I, Roche) puis la transcription inverse est réalisée sur 500 ng ou 1 µg d'ARNm à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific™) afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Puis, les

échantillons sont analysés par qPCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en utilisant le master mix SYBRgreen (Applied Biosystems). Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le **Tableau II**. Le gène de référence utilisé est le RPL13A.

Tableau II. Couples d'amorces PCR utilisées pour l'amplification des ARNm humains
Séquence sens : F, Séquence anti-sens : R

	Séquences 5'-3'	**Numéro d'accession GenBank**
RPL13A	F : GCGGATGAACACCAACCCTT R : GCAGCATACCTCGCACGG	NM_012423.3
ADIPOQ	F : GCCTGCACAGGTTGGAT R : ACCGATGTGTCCCTTAGGAC	NM_004797
BGLAP	F : ATGAGAGCCCTCACACTCCTC R : GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	NM_199173
COL1A1	F : GGCGAACAGGGCGACAGA R : GGCCAGGGAGACCGTTGAGT	NM_000088.4
COL4A1	F : CAAGGGAGAAATGGGCGTCA R : TTGCCAGGGAGACCGACATC	NM_001845.5
COL5A1	F : TTGCCTGATGGAATAACAAA R : GCAGACGCAGGGTACAG	NM_000093.5
COL6A3	F : CCTAACCACATATGTTAGTGGAGGT R : GAATGTCTCGCTTGCTCTCTG	NM_004369
FN	F : CACAGAACTATGATGCCGACC R : ACCCATGTCATGCTGCTTATC	NM_212482.2
HAS1	F : CAAGCGCGAGGTCATGTA R : GTCCAACCTTGTGTCCGAGT	NM_001523.4
HAS2	F : ATCTCACGAACCGGGTGCT R : GACTTGCTCCAACGGGTCTG	NM_005328.3
LAMB1	F : TGCAAGCCGTTTTACTACCAG R : GCCAGCAATGAGACCAGTAGA	NM_002291.2
MGP	F : GCCTTAGCGGTAGTAACTTT R : CTGCTGAGGGGATATGA	NM_001190839.3
Plin1	R : GAGACACTGCGGAATTTGC F : ATCGAGAGAGGGTGTTGGTC	NM_002666
POSTN	F : GAGCTTTACAACGGGCAAAT R : TGATGATCTCGCGGAATATG	NM_006475
PPARG	F : GCTTCTGGATTTCACTATGG R : AAACCTGATGGCATTATGAG	NM_015869
RUNX2	F : GCGCTGCAACAAGACCCT R : CCGCCATGACAGTAACCACA	NM_001024630.4
SPOCK1	F : TCAGATGGCCACTCCTACAC R : TCCTTTCTGCCTTGTGCTT	NM_004598
SPP1	F : CCTGCCAGCAACCGAAGTTT R : ACTGTCCTTCCCACGGCTGT	NM_001040058.2
VCAN	F : AATCGTGTGGGCCATGATTA R : TGTCTGGCTGGTTGGGTC	NM_004385.5

c) Dosage des protéines et Western-Blot

Les protéines sont récupérées dans du tampon RIPA, composé de 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0.5 % de désoxycholate de sodium, 0.1 % de SDS et 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, et contenant des anti-protéases (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, ThermoScientific™).

Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Lowry avec le kit *DC*™ protein (BioRad) et du sérum d'albumine bovine (BSA) en guise de standard.

Une migration sur gel de polyacrylamide est réalisée avec 25 à 40 µg de protéines. Au préalable, les protéines sont marquées avec le réactif Cy5 (QuickStain, Amersham) pour mesurer la quantité de protéines totales qui auront migré et été transférées (Hagner-McWhirter *et al.*, 2015), évitant l'emploi d'un contrôle protéique avec un gène de ménage. Les échantillons migrent ensuite sur un gel de polyacrylamide à 8% et sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Hybond™ ECL™). Les protéines transférées révélées avec l'imageur Amersham™ 600 sont quantifiées avec le logiciel ImageQuantQTL (GE Healthcare). L'analyse portant sur des protéines de haut poids moléculaires, seules les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 50 kDa sont visibles et prises en compte.

La membrane est ensuite incubée sur la nuit avec un anticorps primaire de fibronectine dilué à 1 :1000 dans du tampon TBS Tween à 0.1 % et 5 % de BSA (anticorps polyclonal de lapin, ab2413, Abcam). Après lavages, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire dilué à 1 :10 000 dans du tampon TBT avec 1 % de lait (anticorps anti-lapin couplé à l'enzyme HRP, Sc2004, Santa Cruz) puis la révélation s'effectue avec le réactif ECL Prime (Amersham).

Le marquage de la fibronectine est observé à l'imageur Amersham™ 600 et quantifié avec le logiciel ImageQuantQTL.

d) Spectroscopie Raman

Des CSM sont ensemencées en milieu complet LG à une densité de 1.1 x 10^4 cellules/cm² sur des lamelles de CaF_2 de 13 x 1 mm (Crystran, Poole, UK) et différenciées durant 21 jours en milieu de différenciation adipogénique LG ou HG. Au 21ème jour de différenciation, les cultures cellulaires sont dévitalisées par méthode hypotonique puis fixées au formaldéhyde 2 %. Les échantillons sont analysés avec l'instrument LabRAM HR 800 (HORIBA; Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) avec un laser à diode (λ = 785 nm) et un objectif à immersion dans l'eau (Nikon, ×100, NA = 1.25). Le temps d'acquisition est fixé à 30 secondes.

2. Partie *ex vivo* sur cellules isolées du modèle murin

a) Description du modèle

Le modèle murin d'ovariectomie (OVX) est bien connu au laboratoire. Ce modèle consiste en l'ablation bilatérale des ovaires ce qui permet de mimer la ménopause et d'induire une perte osseuse, une obésité et une intolérance au glucose avec hyperglycémie basale (Iwaniec & Turner, 2013; Rogers *et al.*, 2009) par rapport aux souris contrôles dites Sham (n'ayant subi qu'une laparotomie). De plus, une augmentation de l'adiposité médullaire est observée dans ce modèle OVX (Iwaniec & Turner, 2013). La perte osseuse est due à l'augmentation de l'ostéoclastogénèse qui dérègle l'homéostasie osseuse, bien que l'ostéoblastogénèse soit aussi augmentée mais pas de manière suffisante.

b) Isolement des adipocytes médullaires et extra-médullaires

Seuls les AM des souris ovariectomisées (et non ceux des souris contrôles Sham) ont pu être isolés en quantité suffisante et avec peu d'autres contaminants cellulaires. Par ailleurs, la quantité et le diamètre réduits des adipocytes médullaires nous conduit à pooler les os longs (tibias et fémurs) de 4 à 8 souris par point expérimental comme réalisé dans le travail initial de Liu *et al.* (L. F. Liu *et al.*, 2011).

Les étapes sont brièvement présentées et ne font pas partie du travail de cette thèse. À la 4ème et 14ème semaine suivant l'ovariectomie, différents types cellulaires sont isolés : les adipocytes viscéraux, classiquement isolés à partir du tissu adipeux péri-utérin et les adipocytes sous-cutanés, isolé du tissu adipeux inguinal. Ces tissus sont digérés dans un milieu DMEM contenant 3% de BSA (Sigma, A7030) et 0.3 U/mL de collagénase (Collagenase NB 4 standard grade, SERVA) pendant 30 et 60 minutes sous agitation à 37 °C. Les fémurs et tibias sont nettoyés pour retirer au maximum les tissus musculaires et les ligaments, puis placés dans du milieu DMEM contenant de la collagénase de type IV (Sigma) pendant 30 minutes à 37 °C pour retirer tout tissu extérieur. Les épiphyses sont ensuite retirées, puis les os sont coupés longitudinalement et placés dans du milieu DMEM contenant 3 % de BSA avec un barreau aimanté et mis sous agitation à 37 °C pendant 30 minutes. Après incubation, les adipocytes sont libérés et flottent à la surface du milieu. Les cellules flottantes sont récupérées et 2 à 3 lavages sont réalisés (dont un par incubation à 37 °C avec de la trypsine durant 5 minutes) pour éliminer au maximum les différents contaminants cellulaires. Les autres cellules de la moelle osseuse

qui ont sédimenté lors de la séparation des AM sont récupérées et les cellules de la lignée érythropoïétique sont éliminées à ~90 % à l'aide d'un tampon de lyse des globules rouges.

Les différents échantillons obtenus correspondent donc : 1/ aux adipocytes viscéraux, 2/ aux adipocytes sous-cutanés, 3/ aux adipocytes médullaires fémoraux et tibiaux et 4/ aux autres cellules médullaires (nommées « culot médullaire » dans la suite de ce manuscrit) constituées par l'ensemble des cellules stromales sans les érythrocytes (soit des CSM, des cellules endothéliales, des monocytes, des mégacaryocytes, des progéniteurs hématopoïétiques, etc.). Ces différents échantillons sont lysés dans le tampon d'extraction des ARN (Extract-All pour les adipocytes viscéraux et sous-cutanés et le tampon de lyse RLT du kit Qiagen) et congelés jusqu'à extraction.

c) Extraction des ARN, rétro-transcription et analyse par RT-qPCR

Les étapes sont brièvement présentées et ne font pas partie du travail de cette thèse. Comme mentionné précédemment, les échantillons correspondant aux adipocytes médullaires constituent le point limitant. Les ARN de ces échantillons sont extraits et traités à la DNAse à l'aide du kit RNAeasyMicro (Qiagen). Les ARN des autres échantillons sont d'abord extraits à partir du protocole de l'Extract-all. Un pool d'ARNm des échantillons d'adipocytes (viscéraux et sous-cutanés) correspondant à chaque pool d'AM est constitué (chaque échantillon contribuant à la même quantité d'ARNm dans le pool final). Chaque pool (n = 5 à 6 par catégorie d'échantillon et groupe expérimental) et les échantillons du culot médullaire sont ré-extraits et traités à la DNAse avec le kit RNAeasyMicro. Au final, entre 15 ng (pour les échantillons à 4 semaines) et 50 ng (à 14 semaines) d'ARN sont rétro-transcrits et amplifiés à l'aide du kit QuantiTect Whole Transcriptome (Qiagen). Puis, les échantillons sont analysés par qPCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en utilisant le master mix SYBRgreen (Applied Biosystems). Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le **Tableau III** et les gènes de référence utilisés sont PPIA et YWHAZ.

Tableau III. Couples d'amorces PCR utilisées pour l'amplification des ARNm murins
Séquence sens : F, Séquence anti-sens : R

Nom	Séquences 5'-3'	Numéro d'accession GenBank
mPPIA	R : GGGTTCCTCCTTTCACAGAA F : GATGCCAGGACCTGTATGCT	NM_008907
mYWHAZ	R : GAAAGGAATTGTGGACCAGT F : GGGAGTTCAGGATCTCGTAA	NM_011740
mADIPOQ	R : CCAACCTGCACAAGTTCCCTT F : TGTTCCTCTTAATCCTGCCCA	NM_009605
mCOL1A2	R : GGAGAGAGGAGTCGTTGGAC F : TTCACCCTTCACACCCTGT	NM_007743.3
mCOL4A1	R : AGGGAGAGCAAGGGGTCAGC F : CCAGGTTTTCCCCGAGGC	NM_009931.2
mCOL6A3	R : GCTGCTGACGCCCATC F : AATGTTGAGTCTGCGAACGA	NM_001243008.1
mFN	R : TGTTGTTCGGTGGAGTAGAC F : TGAGGGTGACGGAGTTG	NM_010233.2
mHAS1	R : GGGCGACTCCGTGGAC F : TCATCCAACACTCGACAAG	NM_008215.2
mMGP	R : ACGAAAGCATGGAGTCCTAT F : GCCTGAAGTAGCGGTTGTA	S77350
mPPARG	R : TGAACGTGAAGCCCATCGAG F : GGAGCACCTTGGCGAACAG	NM_011146
mPOSTN	R : GCTGCCCTGGCTATATGAGA F : GGCGCGAAGTACGTGTATG	NM_015784.3

3. Partie clinique sur les échantillons issus de patientes

a) Description du modèle

Les échantillons cliniques sont issus de patientes atteintes de gonarthrose primaire nécessitant la pose d'une prothèse totale de genou. Seules les femmes ménopausées sont retenues dans le protocole clinique. De nombreux critères ont orienté le choix d'inclusion ou d'exclusion des patientes dans le protocole. Ainsi, les femmes de plus de 85 ans ont été exclues en raison de la fragilité des adipocytes liées à l'âge. De même, les patientes souffrant de pathologies osseuses, de pathologies thyroïdiennes ou de diabète de type I étaient exclues car celles-ci pouvaient altérer l'Ad Med. Enfin les patientes bénéficiant de traitements à visée osseuse étaient exclues car ceux-ci engendrent une diminution de l'adiposité médullaire.

Lors de la pose de prothèse de genou, des prélèvements en zone épiphysaire fémorale « saine », à distance de la zone altérée par l'arthrose sont réalisés. Ces prélèvements sont ainsi composés d'os spongieux et d'adipocytes médullaires. À la fin de la chirurgie, un lambeau de tissu adipeux sous-cutané est récupéré au niveau du site d'incision. L'ensemble des prélèvements est immédiatement placé dans un tube stérile contenant du milieu de culture DMEM afin de limiter la nécrose tissulaire.

Ces échantillons cliniques sont obtenus en collaboration avec le service de chirurgie orthopédique du CHRU de Lille dans le cadre du protocole MEDADIPO. Ce protocole a été mis en place par le Pr Gilles Pasquier, chirurgien orthopédiste, et le Dr Stéphanie Lucas (N° ID-RCB : 2018-A00660-55). La récupération des échantillons et leurs traitements sont réalisés à l'aide des techniciens du Centre de Ressources Biologiques CRB du CHU de Lille.

b) Isolement des adipocytes médullaires et des autres types cellulaires

L'isolement des différents types cellulaires est réalisé par le CRB de Lille.

Les fragments fémoraux et le lambeau de tissu adipeux sous-cutané sont ensuite coupés en petits fragments et digérés dans un milieu DMEM contenant 3 % de BSA (Sigma) et de la collagénase (1,8 et 2,5 mg/mL respectivement, Serva). Cette étape de digestion est réalisée à 37 °C, sous agitation et durant 20 minutes pour les fragments fémoraux et 60 minutes (maximum) pour le tissu adipeux sous-cutané, permettant de libérer les adipocytes des échantillons tissulaires récupérés. Après la digestion, les solutions cellulaires sont filtrées sur une membrane de nylon de 250 µm de diamètre (VWR) permettant de récupérer les cellules isolées du reste des fragments. Une première centrifugation permet de récupérer les adipocytes flottants en surface et qui sont ainsi séparés des autres cellules qui sédimentent. Trois cycles de lavage en milieu DMEM contenant 3% de BSA sont ensuite réalisés pour diluer la collagénase, stopper son action et récupérer les adipocytes. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation au cours de laquelle les adipocytes flottants sont récupérés. Cette méthode d'isolement des adipocytes médullaires (et convenant aux autres types d'adipocytes) est recommandé par un groupe de travail de la Bone Marrow Adiposity Society BMAS (Stephanie Lucas *et al.*, 2021). Le culot des échantillons fémoraux (nommé « culot médullaire » dans la suite de ce manuscrit), contenant le reste des cellules médullaires, est également récupéré permettant d'abord de vérifier le bon isolement des adipocytes puis d'évaluer le niveau de contribution des AM par rapport aux autres cellules de la moelle.

Enfin, les adipocytes médullaires, le culot médullaire et les adipocytes sous-cutanés sont placés dans le réactif Extract-All® (Eurobio Scientific), congelés à -80 °C, transporté jusqu'au laboratoire et stockés dans les mêmes conditions de température jusqu'à utilisation.

Les résultats présentés ont été réalisés sur une série d'échantillons déjà obtenus et validés pour 11 patientes avec une comparaison entre échantillons selon un test apparié (comparaison intra-patiente des 3 types cellulaires selon le test de Wilcoxon) pour mettre en évidence

l'importance relative de l'adiposité médullaire par rapport aux autres cellules de la moelle osseuse et autres dépôts adipeux périphériques de référence tels que le tissu adipeux sous-cutané.

45 patientes sont prévues au sein de l'étude MEDADIPO qui comprend également une caractérisation sur le plan métabolique des patientes. Cette caractérisation prend notamment en compte l'IMC (indice de masse corporelle, pour définir la présence et le type d'obésité), le rapport de la circonférence de la taille sur celle des hanches (un indice de répartition centrale ou non des tissus adipeux), l'indice HOMA (HOmeostasis Model Assessment) reflétant une résistance périphérique à l'insuline, le taux d'hémoglobine glyquée HbA1C pour déterminer la présence d'un diabète non contrôlé, des mesures de glycémie, insulinémie, triglycérides, HDL-cholestérol, et de pression artérielle pour définir la présence d'un syndrome métabolique (trois critères parmi les cinq suivants : une large circonférence de la taille, diminution du taux de HDL-cholestérol, une triglycéridémie élevée, une glycémie à jeun élevée, une pression artérielle élevée (selon l'harmonisation et la définition de la Fédération national du diabète (IDF), de l'Association américaine du cœur (AHA) et de l'Institut national américain du cœur, des poumons et du sang (NHLBI) en 2005). Cette caractérisation permettra de définir si le profil d'expression génique des AM est contrôlé par le statut métabolique des patientes. Dans le cadre de mon projet, une attention plus particulière sera donnée à l'indice HOMA-IR, aux taux d'HbA1C, et à la glycémie à jeun pour mettre en évidence un lien avec une perte de l'homéostasie du glucose.

c) RT-qPCR

Les ARN messagers ARNm sont extraits en utilisant le réactif Extract-All® (Eurobio Scientific) en suivant le protocole du fournisseur. Après dosage, la transcription inverse est réalisée sur 250 ng d'ARNm à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific™) afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Puis, les échantillons sont analysés par qPCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en utilisant le master mix SYBRgreen (Applied Biosystems). Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le **Tableau II** (*cf. Page 136*) et le gène de référence est le RPL13A.

4. Tests statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (ESM). Le seuil de $p < 0.05$ est établi pour déterminer les données significatives. Les échantillons cellulaires issus de la culture cellulaire et du modèle murin sont comparés selon le test non paramétrique et non apparié de Mann-Whitney. Les échantillons cellulaires issus du protocole clinique sont comparés selon le test non paramétrique apparié de Wilcoxon (« test des rangs signés de Wilcoxon). L'ensemble des tests statistiques est réalisé avec le logiciel Prism5 (GraphPad).

III. RESULTATS & DISCUSSION

1. Validation de la qualité des échantillons

a) CSM, Adipocytes médullaires et Ostéoblastes humains cultivés in vitro

La capacité de différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CSM utilisées a été démontrée dans le *CHAPITRE 1*. Il s'agit des CSM humaines primaires de 4 donneurs différents (2 femmes et 2 hommes).

b) Echantillons issus du modèle murin d'ovariectomie

Différents paramètres sont mesurés, sur les souris Sham et OVX, à 4 et 14 semaines après intervention chirurgicale, afin d'observer l'évolution de paramètres corporels, de la microarchitecture osseuse et de l'adiposité médullaire (**Tableau IV**).

Tableau IV. Caractéristiques des souris Sham et des souris OVX à 4 et 14 semaines au moment du sacrifice

	Souris Sham		**Souris OVX**	
	4 semaines	**14 semaines**	**4 semaines**	**14 semaines**
	(n = 6)	(n = 9)	(n = 30)	(n = 46)
Poids utérus (mg)	102.3 ± 9.9	82.7 ± 7.3	21.4 ± 2.1 (***)	31.6 ± 5.7 (***)
Poids corporel (g)	20.8 ± 0.5	24.3 ± 0.3 ($^{###}$)	23.7 ± 0.2 (**)	29.8 ± 0.4 ($^{####, ***}$)
	(n = 5)	(n = 9)	(n = 5)	(n = 7)
BV/TV (%)	13.2 ± 0.6	8.1 ± 0.7 ($^{###}$)	10.4 ± 0.4 (**)	5.8 ± 0.6 ($^{###, *}$)
	(n = 6)	(n = 5)	(n = 6)	(n = 5)
Densité des adipocytes médullaires (nombre / mm²)	78.1 ± 13.0	150.3 ± 24.1 ($^{#}$)	279.8 ± 57.2 (**)	393.1 ± 62.4 (**)
Diamètre des adipocytes médullaires (µm)	18.3 ± 0.5	23.4 ± 0.5 ($^{##}$)	20.8 ± 1.1	32.8 ± 1.6 ($^{##, **}$)

Les valeurs sont des moyennes ± ESM. $^{##}$ $p < 0.01$, $^{###}$ $p < 0.005$, $^{####}$ $p < 0.0001$, 4 *vs* 14 semaines ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, Sham vs OVX au même temps, Test de Mann-Whitney.

L'ovariectomie engendre une atrophie de l'utérus comme attendu (*** $p < 0.005$) et une augmentation du poids corporel par rapport aux souris Sham. Le poids corporel et la masse des tissus périgonadiques et sous-cutanés (données non montrées) augmentent au cours du temps. Le volume osseux trabéculaire (BV/TV : volume os trabéculaire par rapport au volume d'os analysé) mesuré au niveau de la métaphyse proximale du tibia est diminué pour les souris OVX par rapport aux souris Sham aux deux temps d'analyse : cette donnée confirme une perte osseuse chez les souris OVX qui s'accentue avec le temps (perte de 45 % pour les souris OVX et de 39 % pour les souris Sham, entre 4 et 14 semaines de chirurgie). La densité d'adipocytes médullaires est plus importante chez les souris OVX que chez les souris Sham, quel que soit le temps d'analyse (** $p < 0.01$) confirmant bien l'augmentation de l'adiposité médullaire sur ce modèle. Enfin, le diamètre des adipocytes médullaires augmente de manière conséquente (de 58 %) pour les souris OVX à la 14ème semaine, indiquant un accroissement de l'accumulation des triglycérides entre les deux temps analysés.

Après avoir isolé les adipocytes médullaires des souris OVX, l'expression génique de PPARγ et de l'adiponectine, deux marqueurs typiques adipocytaires, est mesurée et comparée à celle des adipocytes sous-cutanés (SCAT, données non montrées) et d'adipocytes viscéraux (VAT) (**Figure 38**).

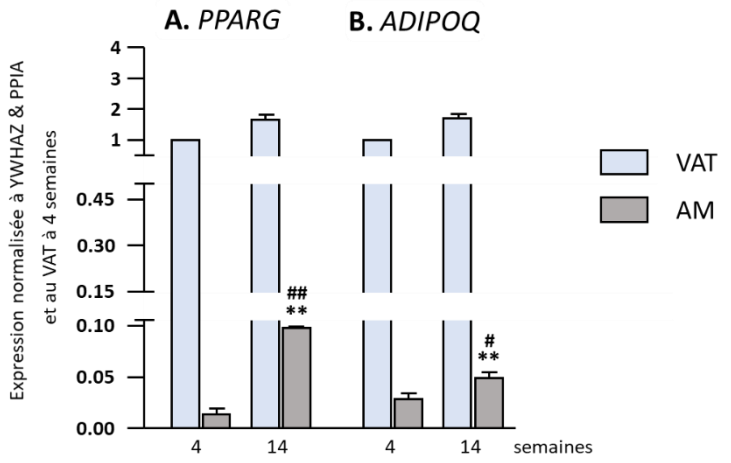


Figure 38 : Expression génique **A.** de PPARγ et **B.** de l'adiponectine (*ADIPOQ*) dans les adipocytes médullaires (AM) isolés de la moelle, et dans les adipocytes viscéraux (VAT) des souris OVX à 4 et 14 semaines après chirurgie (** $p < 0.001$, AM *vs* VAT au même temps ; $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$, 4 *vs* 14 semaines, Test de Mann-Whitney)

Ces deux marqueurs sont davantage exprimés dans les adipocytes du tissu adipeux viscéral que dans les adipocytes médullaires, quel que soit le temps d'analyse comme déjà rapporté dans les modèles murins du vieillissement (L. F. Liu *et al.*, 2011) et d'obésité (Tencerova *et al.*, 2018). Une telle différence entre les deux types adipocytaires a été associée à un stade plus immature de maturation des AM et est considérée comme une caractéristique différenciant les AM des adipocytes extra-médullaires (Hardouin *et al.*, 2016). En revanche, tandis que leur expression n'est pas modulée au cours du temps dans le VAT, leur niveau d'expression augmente dans les AM au temps le plus tardif par rapport au temps le plus précoce. Cette augmentation de l'expression de PPARγ et de l'adiponectine confirme une adaptation métabolique des AM au cours du temps, qui s'accompagne, notamment, de leur élargissement, comme déjà observé dans le modèle d'obésité. De plus, aux deux temps d'analyses, le niveau de pureté cellulaire des échantillons isolés apparaît correct : un plus faible niveau d'expression de marqueurs monocytaires (CD11b) et lymphocytaire (CD3e) est retrouvé dans les AM par rapport au culot médullaire pour lequel peu d'expression de PPARγ et des traces d'expression d'adiponectine sont détectées (données non montrées). Ces analyses nous permettent de valider la qualité des échantillons. Dans la suite de ce manuscrit, les résultats obtenus dans les AM seront comparés à ceux obtenus dans les adipocytes sous-cutanés, afin de réaliser la même comparaison que dans les échantillons cliniques.

c) Echantillons issus du modèle clinique

Après avoir isolé les adipocytes médullaires (AM) des autres cellules de la moelle (CM), l'expression génique de PPARγ, de l'adiponectine et de Plin1, trois marqueurs adipocytaires, est mesurée et comparée à celle des adipocytes sous-cutanés (SCAT) et autres cellules de la moelle (n = 11 patientes) (**Figure 39**).

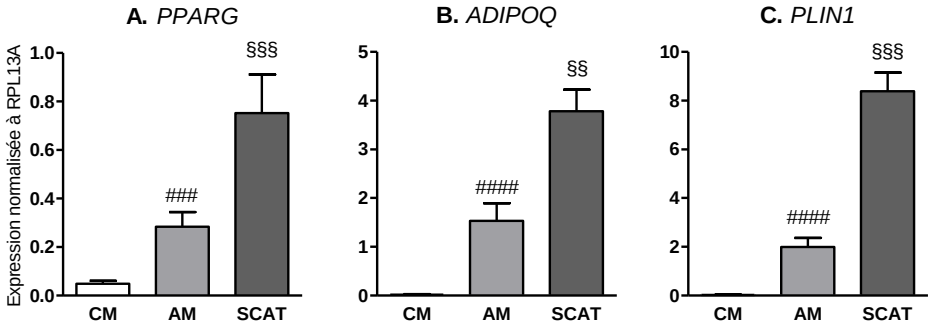


Figure 39 : Expression génique **A.** de PPARγ, **B.** de l'adiponectine (*ADIPOQ*) et **C.** de Plin1 dans les adipocytes médullaires (AM) isolés de la moelle, dans le culot médullaire (CM) et dans les adipocytes sous-cutanés (SCAT) des patientes inclues dans le protocole clinique ($^{###}$ $p < 0.001$, $^{####}$ $p < 0.0001$, AM *vs* CM ; §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$, AM *vs* SCAT, Test de Mann-Whitney)

Ces trois marqueurs sont davantage exprimés dans les adipocytes médullaires que dans les autres cellules de la moelle indiquant une bonne séparation des adipocytes du reste des cellules médullaires ($^{###}$ $p = 0.0003$ pour PPARγ, $^{####}$ $p < 0.0001$ pour l'adiponectine et Plin1). En revanche, les adipocytes médullaires expriment moins ces marqueurs que les adipocytes du tissu sous-cutané (§§§ $p = 0.0009$ pour PPARγ, §§ $p = 0.003$ pour l'adiponectine et §§§ $p = 0.0001$ pour Plin1). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature à partir de divers échantillons isolés de tissus humains (Mattiucci *et al.*, 2018; Miggitsch *et al.*, 2019; Poloni *et al.*, 2013). Ainsi, ces analyses nous permettent de valider la qualité des ARN ainsi que le niveau de pureté cellulaire nous permettant de retenir les échantillons de 11 patientes parmi les 15 patientes actuellement inclues dans l'étude.

Les données métaboliques des 11 patientes (moyenne d'âge de 64.9 ± 6.3 ans) sont listées dans le **Tableau V**.

Tableau V. Caractéristiques métaboliques des patientes

	Patientes (n = 11)
Age (années)	64,9 ± 6,3
IMC (kg/cm^2)	33,1 ± 8,0
Tour de taille / tour de hanche	0,907 ± 0,075
Glycémie basale (mM)	5,92 ± 1,32
Indice HOMA	1,667 ± 1,149
HbA1c (%)	5,52 ± 0,42
Cholestérol HDL (mg/dL)	72,1 ± 25,4
Triglycérides (mg/dL)	122,4 ± 37,3
Syndrome métabolique	6 patientes

Résultats exprimés en moyenne ± ESM ; IMC : indice de masse corporelle, HOMA : HO*meostasis Model Assessment*, HbA1c : Hémoglobine glyquée, HDL : lipoprotéine de haute densité.

Parmi cette population, une seule femme est de corpulence normale (IMC compris entre 18,5 et 25). Les autres sont en surpoids (n = 3, IMC entre 25 et 30), en obésité (n = 5, IMC entre 30 et 40) ou en obésité morbide (n = 2, IMC > 40). Neuf patientes présentent une obésité centrale, associée à un rapport tour de taille / tour de hanche supérieur à 0.85, accroissant le risque de complications métaboliques (selon les critères établis par l'OMS). La glycémie basale est perturbée pour six patientes mais aucune des patientes ne présentent d'insulino-résistance d'après l'indice HOMA qui est inférieur à 2,4. Cet indice, correspondant au produit de la valeur de glycémie à jeun et de la valeur d'insulinémie, n'a pas pu être déterminé pour 3 patientes. Les valeurs d'hémoglobine glyquée (en moyenne 5.52 %) se situe dans la norme fixée à 6 %. Au sein de cette population, des patientes présentent un taux de cholestérol HDL inférieur à 50 mg/dL (n = 2) et un taux de triglycérides supérieur à 150 mg/dL (n = 3), deux marqueurs accroissant le risque de complications métaboliques. Au final, 6 patientes présentent au moins 3 critères du syndrome métabolique défini par une combinaison de facteurs de risques comme l'augmentation de glucose plasmatique, l'hypertension, l'hypertriglycéridémie, une diminution du cholestérol HDL et/ou l'élévation de la circonférence abdominale (Ma *et al.*, 2009).

2. Composition matricielle des adipocytes médullaires

La composition matricielle des adipocytes médullaires est d'abord établie par mesure d'expression génique de divers composants dans les adipocytes médullaires obtenus *in vitro*, dans les adipocytes médullaires murins du modèle d'ovariectomie et dans les adipocytes médullaires des patientes ménopausées incluses dans le protocole clinique. L'expression

génique des divers composants est comparée à d'autres types cellulaires pour chaque modèle d'étude tel que résumé dans le **Tableau VI** ci-dessous.

Tableau VI. Récapitulatif des cellules pour chaque modèle

Modèles	***In vitro***	***Ex vivo / murin***	***Clinique / patientes ménopausées***
Cellules d'intérêts	AM obtenus en LG AM obtenus en HG	AM isolés à 4 semaines AM isolés à 14 semaines	AM
Cellules comparatives (1)	CSM cultivées en LG CSM cultivées en HG	CM isolés à 4 semaines CM isolés à 14 semaines	CM
Cellules comparatives (2)	OB obtenus en LG OB obtenus en HG	SCAT isolés à 4 semaines SCAT isolés à 14 semaines	SCAT

AM : adipocytes médullaires, CSM : cellules souches mésenchymateuses, OB : ostéoblastes, CM : autres cellules de la moelle, SCAT : adipocytes du tissu sous-cutané, LG : 5.5 mM de glucose, HG, 25 mM de glucose

De plus, une analyse par spectroscopie Raman est réalisée sur les matrices adipocytaires générées *in vitro* et dévitalisées, permettant d'orienter les recherches et de valider sur le plan protéique la présence de certains composants.

Les composants matriciels évalués sont divisés en plusieurs catégories : les collagènes, les composants non-collagéniques, les glycosaminoglycanes et protéoglycanes et enfin, les composants impliqués dans la minéralisation et potentiellement associés aux MEC des cellules osseuses.

a) Les collagènes

Après différenciation et maturation à différentes concentrations en glucose des CSM, le profil d'expression génique de différents types de collagènes est mesuré par RT-qPCR dans les adipocytes médullaires (4 donneurs, n = 14) et les ostéoblastes (4 donneurs, n = 12) puis comparé aux profils des CSM indifférenciées (4 donneurs, n = 15). Les résultats sont normalisés à l'expression génique des CSM non différenciées en LG (**Figure 40**).

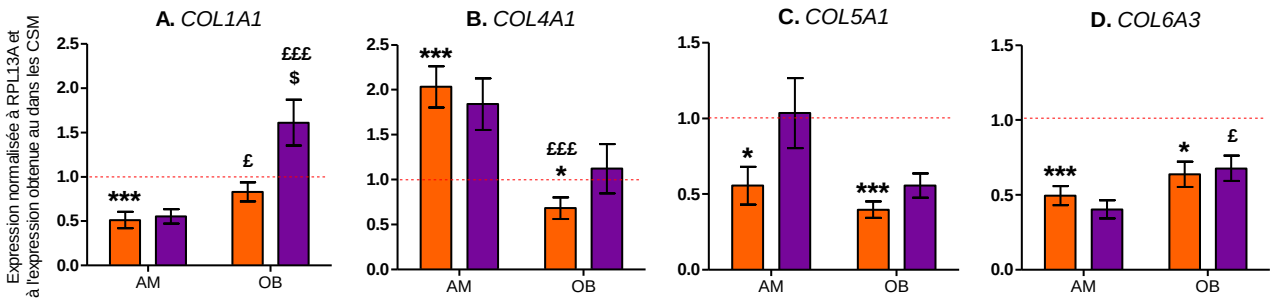


Figure 40 : Expression génique du collagène **A.** de type I (chaîne alpha 1, *COL1A1*), **B.** de type IV (chaîne alpha 1, *COL4A1*), **C.** de type V (chaîne alpha 1, *COL5A1*) et **D.** de type VI (chaîne alpha 3, *COL6A3*) dans les adipocytes médullaires (AM) et les ostéoblastes (OB) différenciés en milieux LG (orange) et HG (violet). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression génique mesurée dans les CSM indifférenciées (ligne rouge) (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, AM ou OB *vs* CSM LG ; $^{£}$ $p < 0.05$, $^{£££}$ $p < 0.001$, AM *vs* OB dans la même concentration en glucose ; $^{\$}$ $p < 0.05$, LG *vs* HG pour le même type cellulaire, Test de Mann-Whitney).

Les CSM indifférenciées expriment chacun de ces différents types de collagènes (données non montrées) permettant de normaliser les expressions des adipocytes et des ostéoblastes à celle des CSM en condition LG.

Le collagène de type I est 50% moins exprimé dans les adipocytes médullaires cultivés en milieu LG que dans les CSM indifférenciées (*** $p = 0.0005$) et les ostéoblastes différenciés ($^{£}$ $p = 0.01$) (**Figure 40.A**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hoshiba *et al.* montrant, par immunohistochimie, une diminution de l'expression du collagène de type I au cours de la différenciation des CSM en adipocytes (Hoshiba *et al.*, 2010). Son expression dans les AM n'est pas modifiée par la concentration en glucose comme confirmé par l'analyse des MEC adipocytaires générées en LG et HG par spectroscopie Raman (résultats non montrés). Au contraire, les ostéoblastes expriment davantage de collagène de type I en condition HG ($^{\$}$ $p = 0.02$), comme déjà identifié dans le CHAPITRE 1 (***Figure 31.C**, page 79*) et attendu (Botolin & McCabe, 2006; Cunha *et al.*, 2014).

L'expression du collagène de type IV dans les adipocytes est 2 fois plus importante que dans les CSM (*** $p = 0.0009$) (**Figure 40.B**), quelle que soit la concentration en glucose. Elle est également plus importante que l'expression retrouvée dans les ostéoblastes en milieux LG et en HG. L'expression du collagène de type V est plus faible (de moitié) dans les adipocytes que dans les CSM indifférenciées (* $p = 0.01$) et n'est pas différente du niveau retrouvé dans les ostéoblastes (**Figure 40.C**).

Enfin, le collagène de type VI est également moins exprimé dans les adipocytes médullaires que dans les CSM (*** p = 0.0006) (**Figure 40.D**). Son expression n'est pas impactée par la concentration en glucose, mais les adipocytes obtenus en milieu HG expriment moins de collagène de type VI que les ostéoblastes obtenus dans les mêmes concentrations en glucose.

Au regard de ces premiers résultats sur modèle *in vitro*, les adipocytes médullaires expriment un profil spécifique de collagènes. Celui-ci diffère du profil des CSM pour les quatre collagènes évalués et du profil des ostéoblastes pour le collagène de type I et de type IV. La concentration en glucose n'impacte pas leur niveau d'expression dans les adipocytes médullaires.

Pour compléter cette approche *in vitro*, l'expression génique du collagène de type I, de type IV et de type VI est mesurée dans les adipocytes médullaires isolés des souris ovariectomisées aux deux temps considérés comme précoce et tardif (respectivement 4 et 14 semaines après ovariectomie) par rapport au développement de l'adiposité médullaire et de l'intolérance au glucose. Les résultats sont comparés à l'expression mesurée dans les adipocytes sous-cutanés (SCAT), constituant les cellules adipeuses de référence, et à l'expression mesurée dans les autres cellules de la moelle (CM, culot médullaire) récupérées lors de l'isolement des adipocytes (n = 5). De plus, l'expression génique du collagène de type I est mesurée dans les échantillons cliniques des patientes : les adipocytes médullaires isolés du fémur, le culot médullaire obtenu lors de l'isolement des adipocytes médullaires et les adipocytes sous-cutanés (n = 11) (**Figure 41**).

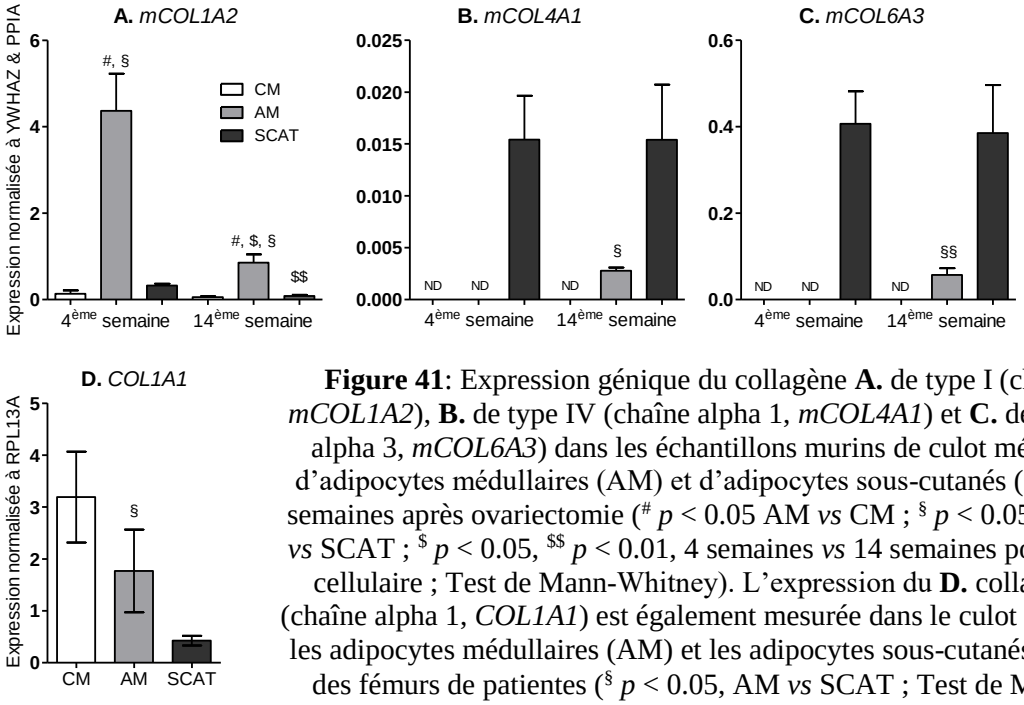


Figure 41: Expression génique du collagène **A.** de type I (chaîne alpha 2, *mCOL1A2*), **B.** de type IV (chaîne alpha 1, *mCOL4A1*) et **C.** de type VI (chaîne alpha 3, *mCOL6A3*) dans les échantillons murins de culot médullaire (CM), d'adipocytes médullaires (AM) et d'adipocytes sous-cutanés (SCAT) à 4 et 14 semaines après ovariectomie ($^{\#}$ p < 0.05 AM *vs* CM ; § p < 0.05, §§ p < 0.01 AM *vs* SCAT ; $^{\$}$ p < 0.05, $^{\$\$}$ p < 0.01, 4 semaines *vs* 14 semaines pour le même type cellulaire ; Test de Mann-Whitney). L'expression du **D.** collagène de type I (chaîne alpha 1, *COL1A1*) est également mesurée dans le culot médullaire (CM), les adipocytes médullaires (AM) et les adipocytes sous-cutanés (SCAT) isolées des fémurs de patientes (§ p < 0.05, AM *vs* SCAT ; Test de Mann-Whitney)

Le collagène de type I est bien exprimé dans l'ensemble des cellules murines analysées (**Figure 41.A**). À 4 semaines, l'expression dans les adipocytes médullaires est 4 fois plus importante que dans le culot médullaire ($^{\#}$ p = 0.01) et les adipocytes sous-cutanés (§ p = 0.01). À la 14ème semaine, cette différence d'expression entre les adipocytes médullaires et les autres cellules (CM et SCAT) est conservée ($^{\#}$ p = 0.01 *vs* CM et § p = 0.01 *vs* SCAT). On observe une diminution du niveau d'expression dans les AM et le SCAT au cours du temps ($^{\$}$ p = 0.02 pour les AM, $^{\$\$}$ p = 0.007 pour le SCAT).

Dans les différents échantillons cliniques, l'expression du collagène de type I est bien détectée (**Figure 41.D**). Le niveau d'expression des adipocytes médullaires, est supérieur à celui des adipocytes sous-cutanés (§ p = 0.03), comme observé dans le modèle murin, mais identique à celui des autres cellules de la moelle.

Ces résultats obtenus à partir d'adipocytes primaires diffèrent de ceux obtenus *in vitro* pour lesquels les adipocytes médullaires expriment moins de collagène de type I (α1 et α2) que les CSM. Cette divergence peut s'expliquer par le fait que les CSM ne représentent qu'une faible proportion des cellules contenues dans la moelle osseuse.

Le collagène de type IV et le collagène de type VI, décrits comme spécifiques des adipocytes extra-médullaires (Mariman & Wang, 2010), sont bien exprimés dans les adipocytes sous-cutanés isolés à 4 et 14 semaines du modèle d'ovariectomie. Leurs expressions ne sont en revanche pas détectées dans le culot médullaire, quel que soit le temps d'analyse, ce qui peut encore s'expliquer par la faible proportion de CSM dans ces échantillons. Dans les adipocytes médullaires, l'expression du collagène de type IV et de type VI n'est détectée qu'à 14 semaines et reste inférieure à celle mesurée dans les adipocytes sous-cutanés (§ p = 0.01 pour le collagène de type IV et §§ p = 0.007 pour le collagène de type VI) (**Figure 41.B et C**).

Le faible niveau d'expression du collagène de type I mesuré *in vitro* dans les adipocytes médullaires n'est pas surprenant puisqu'il s'agit davantage d'un composant matriciel retrouvé dans les tissus minéralisés. On peut cependant, aux vues des résultats obtenus pour les échantillons murins et cliniques, affirmer que les adipocytes médullaires représentent une bonne source de collagène de type I au sein de la moelle osseuse. Les tissus adipeux extra-médullaires sont essentiellement composés de collagène de type IV et de type VI, ce qui est confirmé par les résultats obtenus sur modèle murin. Le collagène de type VI est davantage exprimé, dans

des conditions hyperglycémiques et d'obésité, conduisant à des fibroses et à des inflammations (Pasarica *et al.*, 2009). Dans les adipocytes médullaires obtenus *in vitro*, l'expression du collagène de type VI reste plus faible que dans les CSM indifférenciées qui sont connues pour bien exprimer ce type de collagène (Andersen *et al.*, 2011). De plus, son expression ainsi que celle du collagène de type IV ne sont faiblement retrouvées dans les adipocytes médullaires murins qu'à partir du temps le plus tardif. Comme souligné, les AM du modèle d'ovariectomie présentent également une diminution de l'expression du collagène de type I entre les 2 temps d'analyses. Les profils d'expression de ces collagènes pourraient refléter la poursuite de la maturation des AM et les modifications accompagnant l'élargissement des adipocytes médullaires, dont la taille augmente significativement entre ces deux temps d'analyses (***Tableau IV**, page 144*). En effet, il a déjà été démontré que l'accumulation des triglycérides et consécutivement l'augmentation du diamètre adipocytaire s'accompagne du remaniement de composants matriciels pour générer un micro-environnement plus souple dans le modèle cellulaire 3T3-L1 (X. Liu *et al.*, 2020; Mori *et al.*, 2014). Cette adaptation comprend la diminution de l'expression du collagène de type I et une augmentation de l'expression des collagènes de type IV et VI (Mor-Yossef Moldovan *et al.*, 2018). Par ailleurs, un faible niveau d'expression des collagènes de type IV et VI peut être attendu en l'absence de fibrose au sein de la moelle osseuse.

On peut ainsi en déduire que ces trois types de collagènes font partie des composants de la matrice extra-cellulaire des adipocytes médullaires, comme démontré par d'autres travaux via des marquages IHC (Craft & Scheller, 2017; Hoshiba *et al.*, 2010), mais dans de faibles proportions.

Toutefois, cette composition collagénique spécifique de la matrice des adipocytes médullaires, différente des autres cellules médullaires et des ostéoblastes peut impacter la prolifération des CSM, leur potentiel de différenciation vers la voie ostéogénique et les interactions avec les CSH. En effet, le collagène de type I améliore la prolifération des CSM et la différenciation ostéogénique *in vitro* lorsqu'il est déposé sur une surface 2D ou contenu dans un biomatériau (Tsai *et al.*, 2010; Yunus Basha *et al.*, 2015), et diminue la prolifération des CSH cultivées sur un support 2D recouvert de ce collagène (Çelebi *et al.*, 2012). De la même façon, le collagène de type IV améliore la prolifération et la différenciation ostéogéniques (Wen *et al.*, 2019). Le collagène de type VI joue un rôle important dans le tissu osseux, où son inactivation génique peut même aboutir à une atteinte de la masse osseuse via la stimulation de

l'ostéoclastogénèse (Pham *et al.*, 2020) et sert également de substrat préférentiel pour l'adhésion des CSH (G. Klein *et al.*, 1995).

b) Les composants non collagéniques

De la même façon que pour les collagènes, l'expression génique de la fibronectine et de la laminine, deux composants matriciels majeurs, est mesurée dans les adipocytes et les ostéoblastes différenciés des CSM après normalisation à l'expression génique des CSM non différenciées (**Figure 42**).

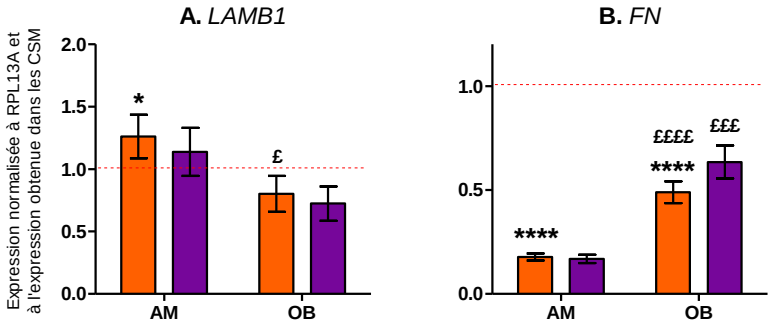


Figure 42 : Expression génique **A.** de sous-unité beta-1 de la laminine (*LAMB1*) et **B.** de la fibronectine (*FN*) dans les adipocytes médullaires (AM) et les ostéoblastes (OB) différenciés en LG (orange) et HG (violet). Les résultats sont normalisés à l'expression génique mesurée dans les CSM indifférenciées (ligne rouge). (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, AM ou OB *vs* CSM LG ; $^{£}$ $p < 0.05$, $^{£££}$ $p < 0.001$, $^{££££}$ $p < 0.0001$, AM *vs* OB dans la même concentration en glucose, Test de Mann-Whitney)

La laminine est légèrement plus exprimée dans les adipocytes médullaires que dans les CSM indifférenciées (* $p = 0.04$) (**Figure 42.A**) et 1.5 fois plus exprimée que dans les ostéoblastes ($^{£}$ $p = 0.03$). Il n'y a pas d'impact du glucose sur l'expression des ARN de ce composant dans ces deux types cellulaires. La fibronectine est faiblement exprimée dans les adipocytes médullaires (**Figure 42.B**) par rapport aux CSM (- 80 %, **** $p < 0.0001$) et aux ostéoblastes (-60 %, $^{££££}$ $p < 0.0001$ en LG, -75 %, $^{£££}$ $p = 0.0002$ en HG). De manière surprenante, l'ARNm de la fibronectine, décrite comme faisant partie des composants matriciels des ostéoblastes, est également plus faiblement exprimée que dans les CSM (**** $p < 0.0001$). Le niveau d'expression de la fibronectine pour ces différents types cellulaires est confirmé par la réalisation d'une cinétique d'expression génique au cours de la différenciation et par Western-Blot sur les échantillons *in vitro* (**Figure 43**).

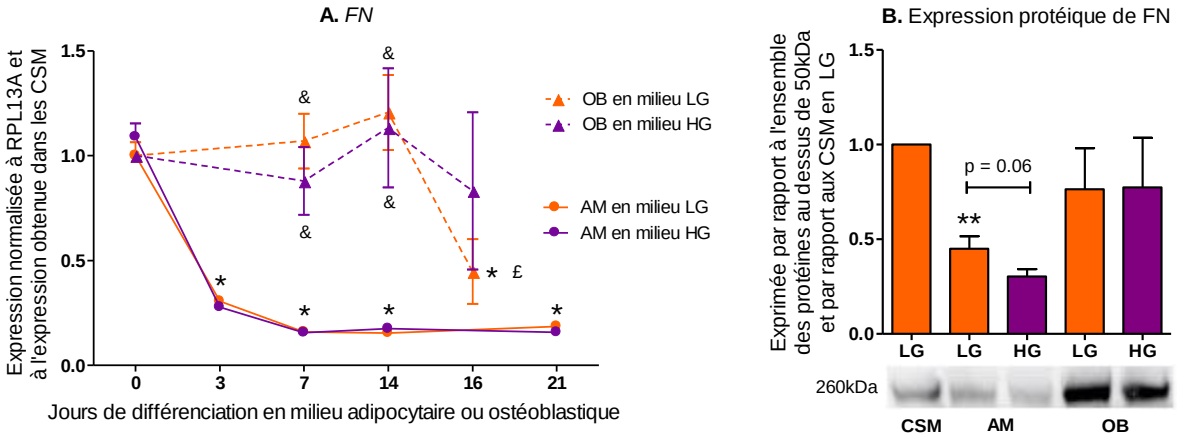


Figure 43 : **A.** Expression génique de la fibronectine (*FN*) au cours de la différenciation adipocytaire (rond) et ostéoblastique (triangle) en milieux LG (orange) et HG (violet) **B.** Expression protéique de la FN dans les adipocytes et ostéoblastes matures au 21ème et 16ème jour de différenciation et maturation respectivement n = 4 à 6 échantillons, 4 donneurs par Western-Blot (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, AM au 21ème jour ou OB au 16ème jour *vs* CSM LG ; $^{£}$ $p < 0.05$, AM au 21ème jour *vs* OB au 16ème dans la même concentration en glucose ; $^{\&}$ $p < 0.05$, AM *vs* OB au même temps et dans la même concentration en glucose ; Test de Mann-Whitney)

On constate que le niveau d'expression de la fibronectine chute rapidement au cours de la différenciation adipogénique et se stabilise dès le 7ème jour, sans différence entre les deux concentrations en glucose (**Figure 43.A**). Au cours de la différenciation ostéoblastique, son niveau d'expression reste identique à celui des CSM jusqu'au 14ème jour puis chute en condition LG. Le niveau protéique de fibronectine mesuré par Western-Blot dans les adipocytes cultivés en LG est significativement inférieur à celui des CSM cultivées en LG (* $p < 0.05$) et est identique entre les CSM et les ostéoblastes (**Figure 43.B**). Les adipocytes cultivés en HG semblent exprimer moins de fibronectine que ceux obtenus en condition LG ($p = 0.06$). Cependant, cet effet du glucose sur les cellules est compliqué à évaluer en raison de la variabilité des profils entre les donneurs et au sein d'un même donneur en condition HG. De plus, le niveau protéique de fibronectine est évalué par la bande obtenue à 260 kDa sur le gel, qui correspond à la forme majeure de la protéine. Cependant, il existe différentes formes, des fragments plus petits (Mao & Schwarzbauer, 2005) qui doivent être analysés également. À noter que la quantification de cette protéine dans les échantillons d'ostéoblastes a nécessité une adaptation du protocole initial avec une meilleure solubilisation (emploi de détergents supplémentaires) qui a été appliquée à l'ensemble des échantillons. Cette difficulté d'extraction de la FN dans le culot des ostéoblastes pourrait expliquer en partie la différence d'un donneur à l'autre.

Ces résultats permettent de confirmer le faible niveau de fibronectine retrouvé dans les AM et démontre que le niveau de fibronectine dans les ostéoblastes est plus important que ce que le résultat d'expression génique montrait.

Pour compléter ces résultats, l'expression génique de la fibronectine est mesurée dans le culot médullaire, les adipocytes médullaires et les adipocytes sous-cutanés isolés des souris ovariectomisées (**Figure 44**).

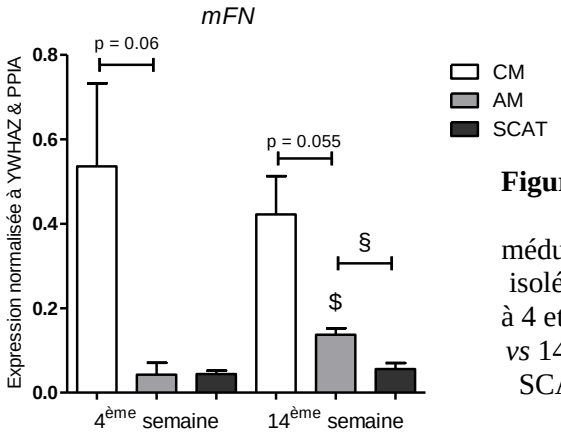


Figure 44 : Expression génique de la fibronectine (m*FN*) dans le culot médullaire (CM), les adipocytes médullaires (AM) et les adipocytes sous-cutanés (SCAT) isolés des membres inférieurs de souris ovariectomisées à 4 et 14 semaines après chirurgie ($^{\$}$ $p < 0.05$, 4 semaines *vs* 14 semaines pour le même type cellulaire ; § $p < 0.05$, SCAT *vs* AM à 14 semaines, Test de Mann-Whitney).

L'expression de la fibronectine est retrouvée dans l'ensemble des échantillons analysés. La fibronectine tend à être moins exprimée dans les adipocytes médullaires que dans les autres cellules de la moelle ($p = 0.06$ à 4 semaines et $p = 0.055$ à 14 semaines) (**Figure 44**), soulignant, comme observé *in vitro*, que les adipocytes médullaires représentent une faible source de fibronectine dans la moelle. Leur expression est identique à celle retrouvée dans les adipocytes sous-cutanés à 4 semaines mais augmente à 14 semaines ($^{\$}$ $p = 0.03$), devenant plus importante que dans les adipocytes extra-médullaires (§ $p = 0.02$).

Ainsi, la laminine décrite comme étant un composant de la membrane basale des adipocytes extra-médullaires est bien exprimée dans les adipocytes médullaires. De manière surprenante, son niveau d'expression est équivalent à celui retrouvé dans les CSM obtenues *in vitro* alors qu'une augmentation exponentielle de l'expression de cette sous-unité est rapportée dans des adipocytes différenciés de CSM humaines (Noro *et al.*, 2013). Cette sous-unité est nécessaire à la formation de la laminine qui s'organise ensuite dans la membrane basale des adipocytes. Un marquage IHC permettrait de confirmer ou non sa présence dans les adipocytes différenciées. En revanche, la fibronectine est faiblement exprimée et produite dans les adipocytes médullaires par rapport aux CSM et aux OB. Comme déjà démontré pour la lignée

3T3-L1, l'expression de l'ARNm chute dramatiquement au cours de la différenciation (Huang & Greenspan, 2012). Ce profil « présence de laminine / absence de fibronectine » est déjà décrit dans les adipocytes extra-médullaires et a été mis en évidence dans les adipocytes médullaires (Cai *et al.*, 2016). L'exposition à une forte concentration en glucose n'impacte pas l'expression de la laminine et de la fibronectine dans les adipocytes médullaires obtenus *in vitro*. En revanche, l'expression de la fibronectine augmente dans les adipocytes médullaires murins entre les deux temps d'analyse suggérant que des signaux indépendants de la maturation des AM et de la concentration de glucose interviennent dans la régulation de son expression.

Ces deux composants améliorent l'adhésion et la prolifération des CSM humaines (Lindner *et al.*, 2010) et des CSH (Gu *et al.*, 2003). L'augmentation de la prolifération des CSM sur les matrices adipocytaires par rapport au support plastique (CHAPITRE 1), démontre que la faible présence de fibronectine dans les MEC n'impacte pas la différenciation des CSM. Une première analyse par Western-Blot réalisée avec des CSM ensemencées sur plastique et sur matrices adipocytaires dévitalisées montrent que la protéine de FN est bien produite par les CSM à un niveau équivalent, quel que soit le support à 48h. Ce résultat suggère que la production de FN par les CSM soit indépendante du support fourni.

c) Glycosaminoglycanes et protéoglycanes

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane crucial présent dans les matrices extra-cellulaires. Il est généré par les hyaluronanes synthases (HAS) dont trois isoformes existent : HAS1, HAS2 et HAS3. L'expression génique des isoformes HAS1 et HAS2 est mesurée dans les CSM (4 donneurs, n = 15), les adipocytes médullaires (4 donneurs, n = 14) et les ostéoblastes obtenus en milieux LG et HG (4 donneurs, n = 12). Ces résultats sont complétés par la mesure d'expression génique de HAS1 dans les adipocytes médullaires murins isolés à 4 et 14 semaines après chirurgie, ainsi que dans le culot médullaire et les adipocytes sous-cutanés (**Figure 45**).

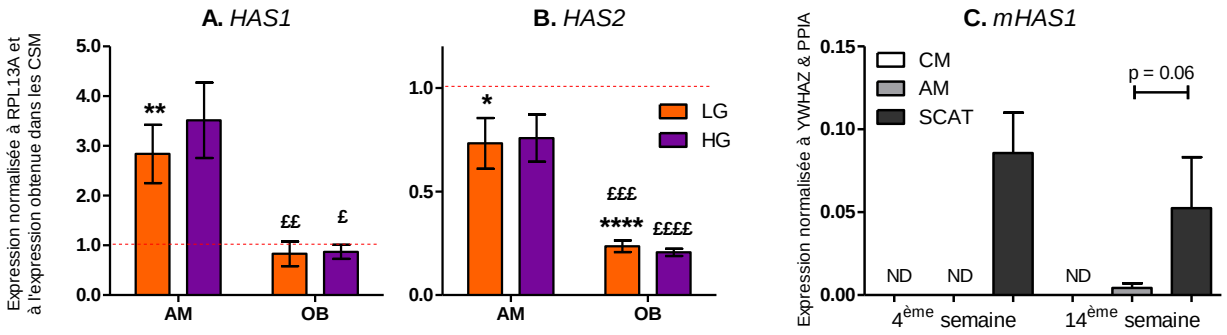


Figure 45 : Expression génique **A.** de la hyaluronane synthase 1 (*HAS1*) et **B.** 2 (*HAS2*) dans les adipocytes médullaires (AM) et les ostéoblastes (OB) différenciés en LG (orange) et HG (violet). Les résultats sont normalisés à l'expression génique mesurée dans les CSM indifférenciées (ligne rouge). L'expression génique de **C.** *mHAS1* est mesurée dans les échantillons murins de culot médullaire (CM), d'AM et d'adipocytes sous-cutanés (SCAT) à 4 et 14 semaines après ovariectomie (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, AM ou OB *vs* CSM LG ; $^{£}$ $p < 0.05$, $^{££}$ $p < 0.01$, $^{£££}$ $p < 0.001$, $^{££££}$ $p < 0.0001$, AM *vs* OB dans la même concentration en glucose ; Test de Mann-Whitney)

La hyaluronane synthase 1 est davantage exprimée dans les adipocytes médullaires que dans les CSM (3 fois plus, ** $p = 0.003$) et les OB (3.5 fois plus en LG, $^{££}$ $p = 0.004$ et 4 fois plus en HG, $^{£}$ $p = 0.01$) (**Figure 45.A**). Le niveau d'expression dans les CSM et les OB est équivalent. Au contraire, la hyaluronane synthase 2 est plus faiblement exprimée dans les AM que dans les CSM (- 25 %, * $p = 0.03$). Il en est de même pour les OB qui expriment faiblement HAS2 par rapport au CSM (- 80 %, **** $p < 0.0001$). Ainsi, les AM expriment davantage la HAS2 que les OB ($^{£££}$ $p = 0.0005$ en LG, $^{££££}$ $p < 0.0001$ en HG) (**Figure 45.B**). La concentration en glucose n'impacte pas l'expression de HAS1 et de HAS2 quel que soit le type cellulaire. Dans les échantillons murins, l'expression de la hyaluronane synthase 1 n'est pas détectée dans le culot médullaire et les adipocytes médullaires à 4 semaines contrairement aux adipocytes sous-cutanés. À 14 semaines, les AM expriment faiblement ce composant tandis que son expression n'est toujours pas détectée dans le CM. Pour autant, son expression n'atteint pas celle retrouvée dans le SCAT. L'expression de HAS2 n'a pas pu être encore mesurée dans les échantillons.

De manière surprenante, l'expression de HAS1 est supérieure à celle de HAS2 dans le modèle *in vitro* alors que l'isoforme 2 est la forme prépondérante dans la mise en place de l'acide hyaluronique. Le niveau d'acide hyaluronique produit *in vitro* doit cependant être très faible au sein de la MEC des adipocytes médullaires puisque l'analyse par spectroscopie Raman des MEC dévitalisées n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique améliore la prolifération et différenciation ostéoblastique des CSM (Zhai *et al.*, 2020). Il joue également un rôle dans l'adhésion et la migration des CSH (Lee-Thedieck *et al.*, 2022). Un déficit de sa production peut perturber l'hématopoïèse, notamment par l'isoforme HAS2, et impacte négativement la prolifération des CSH dans le modèle murin (Goncharova *et al.*, 2012). De plus, une augmentation de l'expression des enzymes, plus particulièrement HAS1, est retrouvée dans des cellules de myélome humain par rapport à des cellules saines (Calabro *et al.*, 2002). Ainsi, la forte expression de HAS1 par les AM pourrait davantage impacter les CSH que les CSM et l'ostéoblastogénèse.

L'analyse Raman a mis en évidence la présence de protéoglycanes à motifs chondroitin-4-sulfate ou chondroitin-6-sulfate, qui pourrait être modifiée par la concentration en glucose. Ainsi, l'expression de deux protéoglycanes, SPOCK1 (testicane) et le versicane, est mesurée dans les échantillons *in vitro* et dans les échantillons cliniques (**Figure 46**). (L'expression dans les échantillons murins n'a pas encore pu être réalisée).

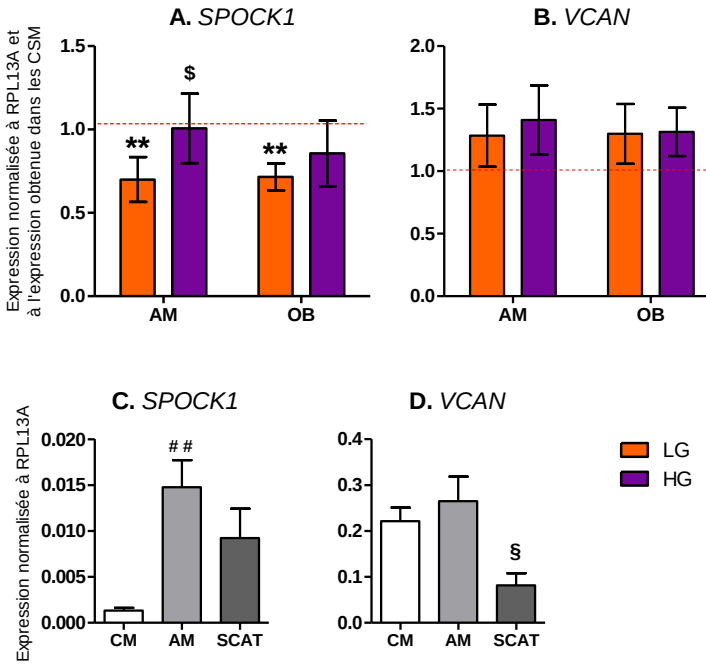


Figure 46 : Expression génique **A.** de la testicane (*SPOCK1*) et **B.** du versicane (*VCAN*) dans les adipocytes médullaires (AM) et les ostéoblastes (OB) différenciés des CSM *in vitro* en LG (orange) et HG (violet). Les résultats sont normalisés à l'expression génique mesurée dans les CSM indifférenciées (ligne rouge) (** $p < 0.01$, AM ou OB *vs* CSM LG ; $^{\$}$ $p < 0.05$, LG *vs* HG pour le même type cellulaire, Test de Mann-Whitney). L'expression **C.** de *SPOCK1* et **D.** de *VCAN* est mesurée dans les adipocytes médullaires isolés de la moelle, dans le culot médullaire (CM) et dans les adipocytes sous-cutanés (SCAT) des patientes inclues dans le protocole clinique ($^{\#\#}$ $p < 0.01$, AM *vs* CM ; § $p < 0.05$, AM *vs* SCAT, Test de Mann-Whitney)

L'ensemble des échantillons obtenus *in vitro* expriment ces deux composants matriciels. Les adipocytes médullaires et les ostéoblastes obtenus en milieu LG expriment un niveau d'expression similaire de SPOCK1 qui est plus faible (-30 %) que dans les CSM (** p = 0.003 pour les AM et ** p = 0.008 pour les OB) (**Figure 46.A**). En condition HG, l'expression n'est pas modulée dans les ostéoblastes par rapport à la condition LG, mais augmente dans les adipocytes médullaires ($^{\$}$ p = 0.03). Ce niveau rejoint alors le niveau d'expression des CSM. Le versicane est exprimé de manière équivalente dans les CSM, les adipocytes médullaires et les ostéoblastes, sans impact de la concentration en glucose. Ces résultats diffèrent des travaux de Cai *et al.* qui démontrent une plus faible présence du versicane dans les matrices adipocytaires dès le 3ème jour de différenciation (Cai *et al.*, 2016) (**Figure 46.B**).

Les adipocytes médullaires isolés du modèle clinique expriment également SPOCK1 et le versicane. L'expression de SPOCK1 dans les adipocytes médullaires est 15 fois plus importante que dans les cellules du culot médullaire ($^{\#\#}$ p = 0.005) (**Figure 46.C**) et ne diffère pas de l'expression retrouvée dans les adipocytes sous-cutanés. Le versicane est exprimé de manière équivalente dans les adipocytes médullaires et les cellules du culot médullaire, suggérant que les cellules contenues dans le culot, autres que les CSM, expriment également le versicane. Son expression est 70 % plus faible dans les adipocytes sous-cutanés que dans les adipocytes médullaires (§ p = 0.02) (**Figure 46.D**).

Ainsi, le niveau d'expression du versicane est différent de celui décrit dans de précédents travaux (Cai *et al.*, 2016), suggérant qu'il fasse bien partie des composants de la matrice extra-cellulaire des adipocytes médullaires. De même, compte tenu du niveau d'expression de SPOCK1 dans les échantillons cliniques, ce protéoglycane semble faire partie des composants matriciels de la matrice des adipocytes médullaires, ce qui n'a pas encore été rapporté dans la littérature. Ce protéoglycane est effectivement nouvellement caractérisé au sein des tissus adipeux. Dans le modèle murin soumis à un régime hyperlipidique, les différents tissus adipeux extra-médullaires expriment davantage SPOCK1 que ceux du modèle murin en régime standard (Alshargabi *et al.*, 2020). Cette régulation dans des conditions d'obésité ainsi que notre première caractérisation montrant que l'expression de SPOCK1 est régulée lors de l'exposition à une forte concentration en glucose sous-entendent un rôle de SPOCK1 dans des conditions de perturbation métabolique qui resteront à préciser dans nos modèles murin et clinique. Par ailleurs, l'expression de SPOCK1 augmente et accélère la différenciation en adipocytes des cellules 3T3-L1 (Alshargabi *et al.*, 2020). Au regard de la forte expression de SPOCK1 dans

les adipocytes primaires matures du modèle clinique, il serait intéressant de vérifier si l'adipogénèse des CSM s'accompagne d'une telle augmentation au-delà de 21 jours de différenciation. En effet, les données obtenues après 21 jours de différenciation suggèrent que cela ne serait pas le cas.

Le versicane est davantage produit par les adipocytes hypertrophiés du tissu adipeux viscéral murin lors d'un régime hypercalorique sans pour autant que son expression ne joue un rôle dans l'adipogénèse. En effet, il a pu être démontré *in vitro*, que l'exposition à une forte concentration en glucose conduisait à une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine du versicane en employant la lignée cellulaire 3T3-L1 (C. Y. Han *et al.*, 2020). Nos données *in vitro* suggèrent donc ici une régulation différente des adipocytes médullaires. Le fort niveau d'expression du versicane dans les adipocytes médullaires mériterait d'être vérifié à l'échelle protéique et bien entendu dans les échantillons murins.

SPOCK1 est davantage étudié dans le domaine de la cancérologie où il est décrit comme induisant un remodelage de la matrice extra-cellulaire afin de favoriser la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose (Ye *et al.*, 2020). Peu d'informations sont rapportées quant à son expression dans les cellules osseuses. Une analyse transcriptomique sur la différenciation ostéogénique de CSM humaines montre cependant que son expression n'est pas retrouvée durant la phase de prolifération cellulaire mais pendant la minéralisation, sans investiguer davantage son rôle (Granchi *et al.*, 2010). Une autre étude démontre que SPOCK1 intervient dans le développement d'ostéosarcome humain via son effet sur des voies de signalisation (Y. Wang *et al.*, 2017). Ainsi, si l'expression protéique de SPOCK1 peut être confirmée notamment par IHC dans le modèle murin, ce nouveau composant matriciel méritera d'être davantage exploré dans les relations entre AM et l'ostéogénèse.

Le versicane est un composant matriciel exprimé au cours de l'ostéoblastogénèse (Foster *et al.*, 2005). Au-delà de ses propriétés structurelles, il joue un rôle dans l'inflammation via son rôle pro- ou anti-inflammatoire qui n'est pas encore clairement défini. Il est également lié au développement de myélome dans la moelle osseuse (Gupta *et al.*, 2019). Ainsi, le versicane présent dans la MEC des adipocytes médullaires pourrait participer au développement d'une inflammation dans le tissu osseux.

d) Les composants matriciels des cellules osseuses

L'expression génique de divers composants matriciels, rapportés comme spécifiques des cellules ostéoblastiques, est mesurée dans les CSM, les adipocytes médullaires et les ostéoblastes. Parmi ces composants, sont mesurées l'ostéopontine, la Matrix-Gla-Protéine (MGP) et la périostine, intervenant toutes, entre autres, dans la régulation de la minéralisation de la matrice osseuse (**Figure 47**).

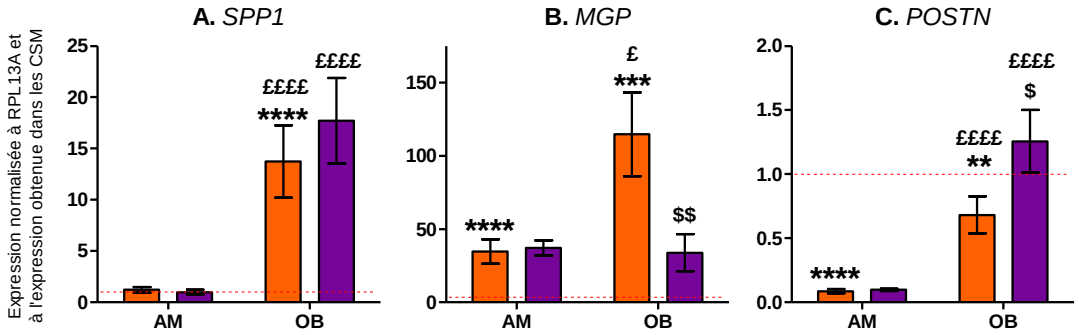


Figure 47 : Expression génique **A.** de l'ostéopontine (*SPP1*), **B.** de la MGP et **C.** de la périostine (*POSTN*) dans les adipocytes médullaires (AM) et les ostéoblastes (OB) différenciés en LG (orange) et HG (violet). Les résultats sont normalisés à l'expression génique mesurée dans les CSM indifférenciées (ligne rouge). (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, AM ou OB *vs* CSM LG ; $^{££££}$ $p < 0.0001$, AM *vs* OB dans la même concentration en glucose ; $^{\$}$ $p < 0.05$, $^{\$\$}$ $p < 0.01$, LG *vs* HG pour le même type cellulaire, Test de Mann-Whitney)

Dans les adipocytes médullaires, l'ostéopontine (*SPP1*) est exprimée à un niveau équivalent des CSM, sans impact de la concentration en glucose. L'absence d'effet du glucose et sa faible expression contrastent avec l'intérêt considérable que suscite l'expression de l'ostéopontine dans les tissus adipeux extra-médullaires : son expression est augmentée dans le cadre de fibroses adipeuses liées à l'obésité (Kahles *et al.*, 2014; D. Lin *et al.*, 2016) en lien avec le développement de l'inflammation et d'une insulino-résistance (Nomiyama *et al.*, 2007). Dans ce contexte, les adipocytes ne semblent pas la source principale d'ostéopontine. Comme attendu, l'ostéopontine est fortement exprimée dans les ostéoblastes par rapport aux CSM (**** $p < 0.0001$) et donc par rapport aux adipocytes médullaires ($^{££££}$ $p < 0.0001$ en milieu LG et HG). Son niveau d'expression n'est pas impacté par la concentration en glucose (**Figure 47.A**) contrairement à ce qui était retrouvé sur ostéoblastes différenciés de CSM de rats (Jiang *et al.*, 2019). L'ostéopontine intervient à la fois dans la minéralisation mais également dans le remodelage osseux via des interactions avec les ostéoclastes (Kahles *et al.*, 2014). Au regard de cette expression génique, l'ostéopontine ne semble pas être impactée par une forte concentration en glucose.

La Matrix-Gla-Protéine est bien exprimée dans les adipocytes médullaires. Son expression est largement supérieure à celle retrouvée dans les CSM (**** $p < 0.0001$), sans impact de la concentration en glucose. La MGP est également fortement exprimée dans les ostéoblastes ($^{\$\$}$ $p = 0.008$). Son expression est en revanche diminuée en condition HG ($^{£}$ $p = 0.02$) et rejoint le niveau d'expression des adipocytes médullaires. Cette différence d'expression en fonction du glucose avait déjà été observée dans le CHAPITRE 1 dans les cellules cultivées sur plastiques (**Figure 47.B**).

Enfin, la périostine (*POSTN*) est faiblement exprimée dans les adipocytes médullaires par rapport aux CSM (**** $p < 0.0001$) (**Figure 47.C**). Elle est également exprimée plus faiblement par les ostéoblastes en milieu LG par rapport aux CSM (** $p = 0.005$). En revanche, son expression augmente lorsque les ostéoblastes sont obtenus en milieu HG ($^{\$}$ $p = 0.03$). Ces résultats divergent avec ceux d'une étude montrant une expression protéique équivalente de la périostine dans les CSM, les adipocytes et les ostéoblastes différenciés humains (Xiaowei Wang *et al.*, 2013). L'augmentation de l'ARNm de la périostine par la concentration HG dans les ostéoblastes est particulièrement intéressante au regard de l'augmentation de la périostine dans le plasma observée chez les patients obèses et diabétiques (Cipriani *et al.*, 2020) ainsi que chez les femmes ménopausées diabétiques (J. Li *et al.*, 2021). En dépit de son rôle positif vis-à-vis de la formation osseuse (Bonnet *et al.*, 2016), les taux plasmatiques de périostine ont été rapportés négativement corrélés à la BMD chez ces patientes ménopausées avec un diabète de type 2 (J. Li *et al.*, 2021). Toutefois, les questionnements relatifs à la mesure de la périostine plasmatique ainsi que la contribution d'autres tissus (dont les tissus adipeux) libérant la périostine (Bonnet *et al.*, 2016) limitent cette interpretation qui demanderait davantage d'investigation.

Ces résultats sont complétés par la mesure d'expression génique de la MGP et de la périostine dans les échantillons murins (n = 5) et les échantillons cliniques (n = 10 donneurs) (**Figure 48**).

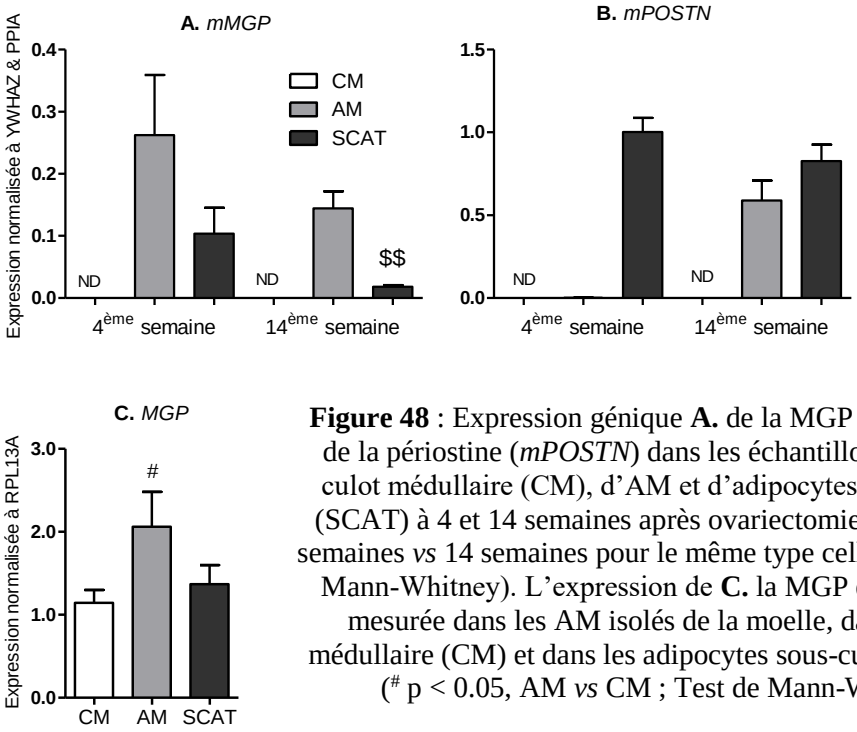


Figure 48 : Expression génique **A.** de la MGP (*mMGP*) et **B.** de la périostine (*mPOSTN*) dans les échantillons murins de culot médullaire (CM), d'AM et d'adipocytes sous-cutanés (SCAT) à 4 et 14 semaines après ovariectomie ($^{\$}$ $p < 0.05$, 4 semaines *vs* 14 semaines pour le même type cellulaire ; Test de Mann-Whitney). L'expression de **C.** la MGP est également mesurée dans les AM isolés de la moelle, dans le culot médullaire (CM) et dans les adipocytes sous-cutanés (SCAT) ($^{\#}$ $p < 0.05$, AM *vs* CM ; Test de Mann-Whitney)

Quel que soit le temps d'analyse, l'ARNm de la Matrix-Gla-Protéine n'est pas détecté dans les cellules murines du culot médullaire mais est bien exprimé dans les adipocytes médullaires murins. Les adipocytes sous-cutanés expriment également ce composant et celui-ci est régulé au cours du temps aboutissant à une expression plus faible à 14 semaines ($^{\$\$}$ $p = 0.007$) (**Figure 48.A**). Dans les échantillons cliniques (**Figure 48.C**), la MGP est bien exprimée dans tous les échantillons. Elle est deux fois plus exprimée dans les adipocytes médullaires que dans le culot médullaire ($^{\#}$ $p = 0.03$), ce qui, avec les observations sur cellules murines, confirme que les AM seraient une très bonne source de la MGP dans la moelle osseuse. La MGP est retrouvée dans différents tissus au sein de l'organisme, notamment au niveau des tissus adipeux. Une étude clinique montre qu'elle est davantage exprimée dans le tissu adipeux viscéral (VAT) que dans le SCAT (van Beek *et al.*, 2007). Nos résultats démontrent alors que l'expression dans les AM est encore supérieure à celle retrouvée dans les autres tissus adipeux.

La MGP suscite beaucoup d'intérêt en tant qu'inhibiteur de la calcification vasculaire. Son rôle dans la minéralisation osseuse est de plus en plus étudié. Dans la lignée MC3T3, la PTH induit son expression de façon concomitante à une inhibition de la minéralisation (Gopalakrishnan *et al.*, 2001). Cependant, la surexpression de la MGP conduit à une meilleure prolifération, différenciation et capacité de minéralisation des ostéoblastes de la lignée MG-63 (J. Zhang *et al.*, 2019). Son expression augmente au cours de la prolifération, de la différenciation et de la mise en place de la matrice d'ostéoblastes issus de la calvaria de rat ou

de souris (Barone *et al.*, 1991; Frick & Bushinsky, 1998). Nos résultats précédents (*CHAPITRE 1*) indiquent que la différenciation ostéoblastique des CSM humaines s'accompagne d'une induction drastique de l'expression de la MGP. La diminution de l'expression de l'ARNm de la MGP dans les ostéoblastes exposés à la concentration HG pourrait être provoquée par une acidose du milieu comme déjà suggéré dans la lignée MG-63 (Frick & Bushinsky, 1998). L'analyse d'expression dans les différents types d'AM obtenus *in vitro* et *ex vivo* indique que les AM sont potentiellement une excellente source de MGP. Il apparait donc nécessaire de valider davantage l'expression au niveau protéique de la MGP au niveau de nos échantillons et d'explorer davantage son rôle dans la minéralisation.

Tout comme la MGP, la périostine n'est pas détectée dans les cellules murines du culot médullaire, quel que soit le temps d'analyse. La faible proportion de CSM dans le culot médullaire ne permettrait donc pas de détecter son expression dans cet échantillon en dépit d'une bonne expression rapportée dans les CSM (humaines) dans notre étude (**Figure 47.C**) et par d'autres (Xiaowei Wang *et al.*, 2013). Dans les adipocytes médullaires, elle n'est exprimée que très faiblement à 4 semaines dans 2 échantillons sur 5 puis son expression augmente à 14 semaines. Comparativement aux AM, les adipocytes sous-cutanés expriment un niveau important et constant de la périostine aux deux temps d'analyse (**Figure 48.B**). L'expression de la périostine a été récemment décrite comme augmentée dans les tissus adipeux dans les modèles murins d'inflammation et d'obésité induite par un régime hyperlipidique. Dans ce contexte, les cellules progénitrices des adipocytes extra-médullaires sont caractérisées comme la source principale de périostine. Par ailleurs, la diminution d'expression et le knock-out de la périostine favorisent l'adipogénèse du modèle 3T3-L1 et des précurseurs des tissus adipeux (Yang *et al.*, 2021). Cependant, la périostine pourrait réguler positivement l'adipogénèse dans d'autres types cellulaires (Xiaowei Wang *et al.*, 2013). L'évolution de l'expression de la périostine dans les adipocytes de nos souris ovariectomisées entre les deux temps analysés pourrait être associée au développement des AM et/ou à l'adaptation de leur métabolisme.

Enfin, la périostine a été décrite comme favorisant la migration, la prolifération et la différenciation ostéoblastique dans des lignées cellulaires. De plus, cette protéine stimule l'activation d'une des enzymes principales impliquées dans la formation des cross-links du collagène (Bonnet *et al.*, 2016). Toutefois, les faibles niveaux d'expression de l'ARNm de la périostine dans les AM dérivés des CSM (**Figure 47.C**) ne suggèrent pas qu'elle soit bien exprimée dans les MEC adipocytaires dévitalisées et qu'elle puisse être impliquée dans

l'augmentation de la prolifération cellulaire et les cross-links du collagène observés pour les CSM ensemencées et différenciées (*CHAPITRE 1*).

IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Cette étude consiste en une première caractérisation de la composition des matrices adipocytaires par mesure d'expression génique et est encore en cours.

Au regard de l'expression du collagène de type IV et du collagène de type VI, les adipocytes médullaires présentent un profil d'expression génique différent des adipocytes extra-médullaires, qui se rapprochent davantage de celui des cellules ostéoblastiques, par leur expression de collagène de type I et de la MGP. Cette partie de l'étude permet d'identifier trois nouveaux composants matriciels intéressants synthétisés par les AM : SPOCK1, le versicane et la MGP, dont l'expression sera davantage analysée sur le plan protéique par Western-Blot et IHC à partir des échantillons obtenus *in vitro* et du modèle murin. Les résultats de l'étude *in vitro* ne mettent pas en évidence d'impact de la concentration de glucose sur l'expression des composants matriciels des adipocytes médullaires. Cependant, les premiers résultats sur échantillons murins suggèrent une évolution du profil d'expression génique pour le collagène de type I, IV et VI au cours du temps qui pourraient correspondre à une adaptation des AM dont le diamètre s'élargit avec l'accumulation des triglycérides. Cette hypothèse pourra être vérifiée par le suivi de l'expression de ces gènes au cours de la différenciation des CSM en adipocytes. Par ailleurs, l'analyse finale des échantillons cliniques en fonction des paramètres métaboliques des patientes permettra de déterminer si la composition matricielle des AM peut, comme les adipocytes extra-médullaires, dépendre du statut métabolique.

Les adipocytes médullaires présentent globalement un profil matriciel spécifique qui est cohérent avec le remodelage de la matrice extra-cellulaire décrit dans différentes revues (Almalki & Agrawal, 2016; Assis-Ribas *et al.*, 2018). On retrouve toutefois une bonne expression de la MGP, équivalente à celle retrouvée dans les ostéoblastes cultivés en condition HG. Ce marqueur pourrait intervenir dans les altérations de la minéralisation observée dans des ostéoblastes cultivés sur les différentes matrices adipocytaires (*CHAPITRE 1*). De plus, bien que l'expression d'autres composants spécifiques aux cellules ostéoblastiques soit faiblement retrouvée dans les adipocytes médullaires, comme le collagène de type I, la périostine et

l’ostéopontine, l’augmentation du nombre d’adipocytes au sein de la moelle dans des contextes pathologiques peut également contribuer à des perturbations de l’environnement osseux.

L’expression génique de certains facteurs soulève des questions quant à l’impact de ces MEC adipocytaires sur les autres cellules de la moelle. En effet, ces MEC pourraient impacter l’ostéoclastogénèse ou l’hématopoïèse à travers l’expression de la hyaluronidase 1 et de SPOCK1 notamment. La poursuite de la caractérisation des MEC adipocytaires ainsi que l’évaluation de l’impact des MEC sur d’autres types cellulaires permettront d’évaluer si cette MEC joue un rôle dans d’autres pathologies comme le développement de tumeurs par exemple.

On peut globalement confirmer que la MEC adipocytaire, à travers sa composition spécifique qui peut perturber plusieurs types cellulaires environnant, pourrait participer à l’atteinte de la quantité et qualité osseuses dans l’ostéoporose. Son rôle précis dans l’ostéoporose liée au diabète de type 2 restera encore à éclaircir.

CHAPITRE 3 : EFFET D'UN TRAITEMENT HYPOGLYCEMIANT SUR LE MODELE MURIN D'OVARIECTOMIE

I. INTRODUCTION

Comme décrit précédemment, l'implication de l'augmentation de l'adiposité médullaire dans l'atteinte de la quantité et qualité osseuse de l'ostéoporose peut s'expliquer par - une compétition de différenciation des CSM, - la sécrétion de facteurs perturbant l'homéostasie osseuse et, comme présenté dans le premier chapitre, - un impact négatif des matrices adipocytaires. Nos premiers résultats démontrent également que les matrices adipocytaires générées *in vitro* induisent des altérations quantitatives de la minéralisation et des défauts de la qualité de la matrice organique et du minéral qui sont en partie dépendants de la concentration en glucose (CHAPITRE 1). **L'objectif de ce travail est d'évaluer *in vivo*, dans le modèle murin d'ovariectomie, l'implication de l'hyperglycémie chronique dans le développement et les activités des adipocytes médullaires et sur le tissu osseux**.

Les souris ovariectomisées (OVX) présente une augmentation de l'adiposité médullaire, une perte osseuse, une obésité, une intolérance au glucose et une hyperglycémie basale (Iwaniec & Turner, 2013; Rogers *et al.*, 2009). Afin d'améliorer les paramètres glycémiques de ces souris, un traitement à la dapagliflozine (DAPA) est réalisé, après l'instauration des troubles métaboliques. Cette molécule appartient à la famille des inhibiteurs du transporteur rénal du glucose (SGLT2) et favorise l'élimination du glucose sanguin par voie rénale (Rieg & Vallon, 2018). Le traitement améliore la glycémie basale, l'intolérance au glucose et plusieurs paramètres métaboliques dont le poids corporel par une diminution de la masse de tissus adipeux comme rapportés dans des études sur des rongeurs avec un diabète de type 1 ou de type 2 prononcé (S. Han *et al.*, 2008; Tahara *et al.*, 2016; J. Y. Wang *et al.*, 2019). De plus, le traitement par DAPA de souris obèses et diabétique améliore au site de formation la résistance osseuse et certains paramètres de qualité osseuse (rapport minéral / organique, cristallinité, glycation du collagène) (Mieczkowska *et al.*, 2020). Cependant l'effet des inhibiteurs de SGLT2 n'a jamais été testé sur souris ovariectomisées. Plusieurs de ces inhibiteurs de SGLT2 dont la DAPA sont employés pour le traitement des patients diabétiques de type 2. L'effet de le DAPA est persistant à la suite de son administration (Tahara *et al.*, 2016) et n'entraîne pas de fragilité osseuse contrairement à d'autres inhibiteurs de SGLT2 qui sont associés à des

perturbations du métabolisme phosphocalcique conduisant à des défauts osseux indépendants des effets sur le métabolisme énergétique (Thrailkill *et al.*, 2020).

Ainsi, pour mener à bien ce projet, les souris OVX sont traitées avec de la DAPA durant 5.5 semaines. Dans un premier temps, l'amélioration des paramètres glycémiques par le traitement à la DAPA est vérifiée par la mesure de la glycémie basale et la réalisation de tests de tolérance au glucose. Puis, différents paramètres de la micro-architecture osseuse du tibia sont mesurés par densitométrie au rayons X. De plus, plusieurs paramètres de l'adiposité médullaire - densité, surface occupée, diamètre – sont mesurés par histologie pour estimer leur évolution suite au traitement. Enfin, une première caractérisation par expression génique des cellules de la moelle osseuse est réalisée afin d'analyser les répercussions de l'ovariectomie et du traitement hypoglycémiant sur l'environnement médullaire. Une attention particulière est portée aux composants matriciels dans le cadre de ma thèse.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Description du modèle murin

L'ensemble du protocole a été approuvé par le comité d'éthique régional CEEA75 (n° 2016071815452669 et 2021060316221938). 24 souris femelles C57BL/6J de 11 semaines (Charles RIVER Laboratories, France) sont réparties dans 2 groupes en fonction de leur poids afin d'obtenir des groupes homogènes. Les souris sont opérées à 14 semaines d'âge, ce temps correspondant à celui auquel la croissance osseuse est terminée et le squelette est dit « à maturité » selon les études préalablement publiées (Iwaniec *et al.*, 2006; Somerville *et al.*, 2004). Une ablation bilatérale des ovaires est réalisée sur 12 souris (groupe OVX) et une simple laparotomie est réalisée sur les 12 autres souris (groupe Sham). Les souris sont pesées hebdomadairement.

2. Test d'intolérance au glucose (IPGTT)

Des tests d'intolérance au glucose sont réalisés à 4, 9 et 15 semaines après ovariectomie. Après un jeûne de 12 h, les souris sont pesées et leur glycémie basale est mesurée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Check® Performa, Roche) avec 2 µL de sang prélevé au niveau de la veine caudale. Puis, un bolus de glucose (2 g/kg de poids corporel) est administré aux souris par voie intrapéritonéale. La glycémie est ensuite évaluée à 15, 30, 45, 60, 120 et 180 minutes après l'injection.

3. Traitement à la dapagliflozine

La DAPA est administrée, à raison de 1 mg/kg, après instauration d'une intolérance au glucose pendant 5.5 semaines chez des souris ovariectomisées (n = 6, groupe OVX / DAPA) et des souris contrôles laparotomisées (n = 6, groupe Sham / DAPA), au travers l'eau de boisson. L'eau de boisson est changée tous les trois jours avec une réévaluation de la dose moyenne administrée en fonction de la consommation d'eau et du poids corporel. Chaque groupe a son propre groupe contrôle qui reçoit le « véhicule » (éthanol, quantité équivalente et inférieure à 0.4%) dans l'eau de boisson (groupe OVX et groupe Sham, n = 6 chacun).

Au moment du sacrifice, soit 9 semaines après l'opération et après 5.5 semaines de traitement ou non à la DAPA, les souris sont anesthésiées et mises à mort pour récupérer, entre autres, les tibias et fémurs qui sont d'abord séparés et bien nettoyés de tout tissu extérieur. Les tibias et fémurs gauches sont fixés dans du tampon PBS contenant 3.7 % de paraformaldéhyde à 4 °C pendant 24h. Les deux os sont ensuite transférés dans une solution d'éthanol à 70 % pour conservation en attendant leur traitement. Après excision des épiphyses, le fémur droit est centrifugé pour extruder l'ensemble des cellules de la moelle osseuse dans le réactif Extract-all®. Le tibia droit est coupé, puis les deux parties sont centrifugées pour extruder les cellules de la moelle osseuse des parties métaphysaires et distale séparément en tampon RIPA et anti-protéases (Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, ThermoScientific™). Les échantillons de moelle osseuse et d'os sont rapidement congelés en azote liquide et conserver à -80 °C jusqu'à leur analyse.

4. Analyse globale de la composante osseuse

La densité minérale osseuse à l'échelle corporelle est mesurée par densitométrie aux rayons X (Lunar PIXImus, GE Healthcare) avant l'opération (T = 0) et au moment du sacrifice soit 9 semaines après l'opération et après 5.5 semaines de traitement à la dapagliflozine (T = 15). Cette technique est non invasive et peut être réalisée sur souris vivantes anesthésiées.

5. Analyse de la micro-architecture osseuse

Les échantillons d'os fixés sont déhsydratés, imprégnés puis inclus en résine Technovit9100®. Alors que les fémurs sont coupés longitudinalement pour des analyses de qualité osseuse par spectroscopie Raman, les tibias sont scannés par microCT (Skyscan 1172, Bruker) selon les paramètres déjà publiés (Louvet *et al.*, 2020). Après reconstruction et

alignement, l'analyse est réalisée à partir de 250 µm de la fin de la plaque de croissance et sur 500 µm de profondeur pour mesurer plusieurs paramètres de l'os trabéculaire. L'analyse de l'os cortical est réalisée au niveau de la diaphyse, au milieu de l'os, sur une épaisseur de 500 µm.

6. Analyse de l'adiposité médullaire

Après récupération des blocs de résine, des coupes longitudinales de 6 µm sont réalisées, de la face antérieure vers la face postérieure. Deux coupes réalisées au milieu de l'os et distantes de 250 µm sont gardées. Celles-ci sont colorées au bleu de toluidine puis observées à l'aide du logiciel Histolab (Microvision Instrument). Un comptage des AM et la mesure de leur diamètre est réalisé sur ImageJ dans une zone située à 200 µm sous la plaque de croissance et sur une distance de 1 mm. Ces mesures sont réalisées sur trois souris de chaque groupe pour le moment (n = 6 valeurs / groupe expérimental, 2 coupes par souris).

7. Extraction des ARN des cellules médullaires, rétro-transcription et RT-qPCR

Les échantillons de moelle osseuse fémorale sont broyés à 4 °C avec l'Ultra-TURRAX® (IKA), avant d'extraire les ARN de l'ensemble des cellules de la moelle par le protocole classique. Après dosage, un traitement à la DNAse est effectué (DNAse I, Roche) puis la transcription inverse est réalisée sur 4 µg d'ARNm à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific™). Puis, les échantillons sont analysés par qPCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en utilisant le master mix SYBRgreen (Applied Biosystems). Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le **Tableau VII** et les gènes de référence utilisés sont PPIA et YWHAZ.

Tableau VII. Couples d'amorces PCR utilisées pour l'amplification des ARNm murins
Séquence sens : F, Séquence anti-sens : R

Nom	Séquences 5'-3'	Numéro d'accession GenBank
mPPIA	R : GGGTTCCTCCTTTCACAGAA F : GATGCCAGGACCTGTATGCT	NM_008907
mYWHAZ	R : GAAAGGAATTGTGGACCAGT F : GGGAGTTCAGGATCTCGTAA	NM_011740
mADIPOQ	R : CCAACCTGCACAAGTTCCCTT F : TGTTCCTCTTAATCCTGCCCA	NM_009605
mFN	R : TGTTGTTCGGTGGAGTAGAC F : TGAGGGTGACGGAGTTG	NM_010233.2
mMGP	R : ACGAAAGCATGGAGTCCTAT F : GCCTGAAGTAGCGGTTGTA	S77350
mPlin1	R : CAC CAT CTC TAC CCG CCT TC F : GGG TGT TGG CGG CAT ATT C	NM_001113471
mPPARG2	R : GAGAGGTCCACAGAGCTGATT F : TCGCTGATGCACTGCCTATG	NM_011146.3

8. Tests statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (ESM). Le seuil de $p < 0.05$ est établi pour déterminer les données significatives. Les mesures de la densité minérale osseuse, des différents paramètres osseux et de l'adiposité médullaire sont analysées avec le test non paramétrique et non apparié de Mann-Whitney. Un test de corrélation r de Spearman est réalisé entre l'expression génique de 2 composants matriciels. Les mesures de l'évolution de la glycémie lors des tests de tolérance au glucose et la répartition des différents diamètres des adipocytes médullaires sont analysées selon le test Two-Way ANOVA. L'ensemble des tests statistiques est réalisé avec le logiciel Prism5 (GraphPad).

III. RESULTATS & DISCUSSION

1. Validation de l'instauration d'une intolérance au glucose après ovariectomie

Des mesures de la glycémie après un jeûne de 12h et au cours de tests de tolérance au glucose (suite à l'injection péritonéale d'un bolus de glucose) sont réalisés chez les souris Sham et OVX à 4 et 9 semaines après la chirurgie (**Figure 48**).

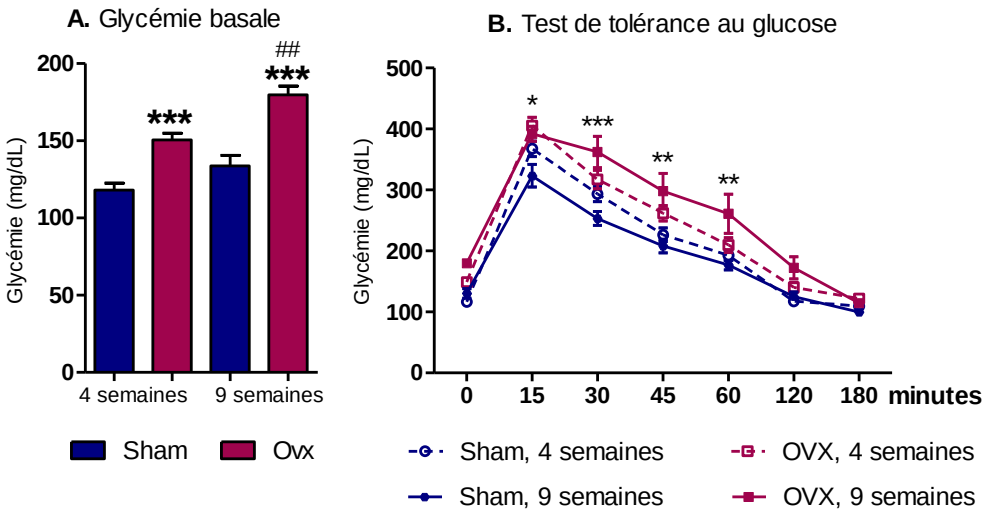


Figure 49 : Mesure de la glycémie **A.** basale chez les souris Sham (n = 9 et 10) et OVX (n = 10 et 12) à 4 et 9 semaines après chirurgie et **B.** durant un test de tolérance au glucose injecté par voie intrapéritonéale (A : $^{***}p < 0.001$, Sham vs OVX au même temps ; $^{\#\#}p < 0.01$, 4 semaines *vs* 9 semaines pour le même groupe de souris, Test de Mann-Whitney) (B : Test Two-Way ANOVA ; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$, Sham vs OVX après 9 semaines de chirurgie, post-tests de Bonferroni)

Comme attendu, la glycémie basale des souris ovariectomisées est plus importante que chez les souris contrôles à 4 semaines (*** p = 0.0005) et à 9 semaines (*** p = 0.0003). Entre les deux temps d'analyses, la glycémie tend à augmenter pour les souris Sham (p = 0.08) tandis qu'une augmentation nette est observée chez les souris OVX ($^{\#\#}$ p = 0.01) (**Figure 49.A**). Ces résultats confirment un état pré-diabétique des souris OVX avec une intolérance au glucose qui est confirmée avec des tests de tolérance en glucose. Après 4 semaines de chirurgie, l'élimination du glucose est relativement similaire entre les souris Sham et OVX (p = 0.02, test Two-Way ANOVA). Après 9 semaines, la glycémie est plus vite restaurée chez les souris Sham que chez les souris OVX (p = 0.009, two-way ANOVA ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, post-tests de Bonferroni) indiquant bien un défaut de clairance du glucose suite à l'ovariectomie (**Figure 49.B**).

Après validation de la mise en place de cet état pré-diabétique chez les souris ovariectomisées, la molécule DAPA est administrée pour valider son rôle hypoglycémiant.

2. <u>Impact du traitement à la DAPA sur les paramètres glycémiques</u>

La molécule est administrée 9 semaines après chirurgie, durant 5 semaines à travers l'eau de boisson. La consommation moyenne de DAPA était de 0.99 ± 0.04 µg/g pour les souris OVX et 1.01 ± 0.02 µg/g pour les souris Sham. Après 4 semaines de traitement, la glycémie basale est mesurée et un test de tolérance au glucose est réalisé (**Figure 50**).

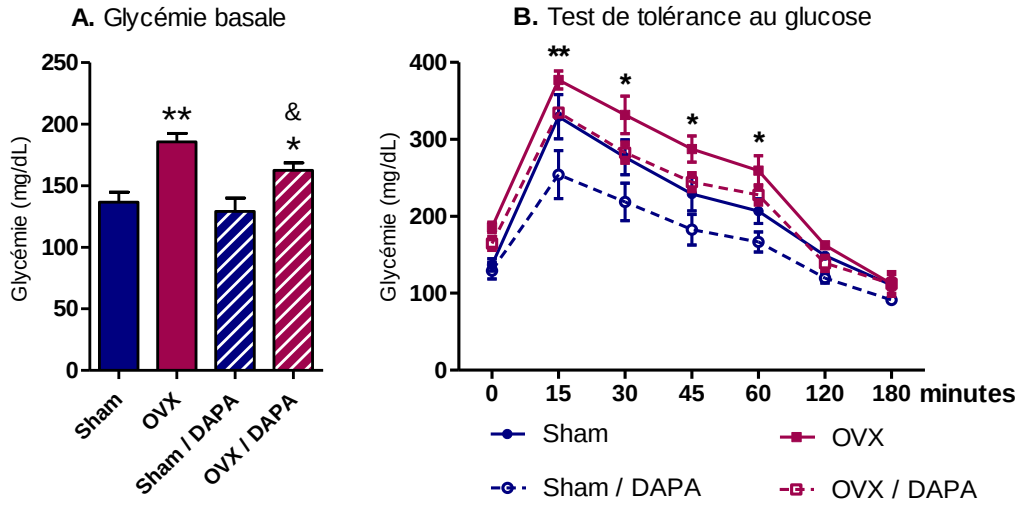


Figure 50 : Mesure de la glycémie **A.** basale chez les souris Sham et OVX traitées ou non à la dapagliflozine durant 4 semaines et **B.** durant un test de tolérance au glucose injecté par voie intrapéritonéale (n = 6 par groupe) (A : $^{**}p < 0.01$, Sham vs OVX dans la même condition de traitement ; $^{\&}$ $p < 0.01$, OVX/DAPA *vs* OVX ; Test de Mann-Whitney) (B : Test Two-Way ANOVA ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Sham / DAPA vs OVX / DAPA après 9 semaines de chirurgie, post-tests de Bonferroni)

La glycémie basale des souris OVX est plus élevée que celle des souris Sham, comme déjà observé à 4 et 9 semaines après chirurgie (** p = 0.002). Cette différence est conservée après 4 semaines de traitement à la DAPA (* p = 0.03). On note cependant une réduction de cette hyperglycémie chez les souris OVX / DAPA par rapport aux souris non traitées ($^{\&}$ p = 0.01), indiquant que le traitement améliore la glycémie à jeun, sans pour autant la restaurer après 4 semaines de traitement. Le traitement n'impacte en revanche pas la glycémie des souris Sham (**Figure 50.A**).

Le test de tolérance au glucose confirme une intolérance au glucose du groupe OVX par rapport au groupe Sham pour lequel les valeurs de glycémie sont plus rapidement restaurées (p = 0.015, two-way ANOVA). Le traitement à la DAPA améliore l'élimination du glucose pour les souris OVX (p = 0.02, OVX *vs* OVX / DAPA) dont les valeurs se rapprochent du groupe Sham. De façon surprenante, il y a également une meilleure élimination du glucose pour les souris Sham traitées avec la DAPA (p = 0.045, Sham *vs* Sham / DAPA). Ainsi, sous traitement DAPA, les souris OVX sont toujours intolérantes au glucose par rapport aux souris Sham (p = 0.012, OVX / DAPA *vs* Sham / DAPA) mais présentent la même clairance au glucose que les souris Sham sans traitement (**Figure 50.B**).

L'ensemble de ces résultats, après 4 semaines de traitement, confirme un effet de la dapagliflozine sur l'élimination du glucose avec une amélioration des paramètres glycémiques dans le modèle murin d'ovariectomie.

3. Impact du traitement à la DAPA sur le tissu osseux et sa microarchitecture

Une altération des paramètres osseux est observée au cours du vieillissement et de la ménopause chez l'Homme. Ces altérations sont également observées sur le modèle murin d'ovariectomie. Suite à l'amélioration de ces paramètres par le traitement DAPA, nous avons mesuré différents paramètres osseux. Une première approche consiste à évaluer la densité minérale osseuse à l'échelle corporelle par analyse densitométrique sur 1/ les souris avant chirurgie et 2/ sur les souris après chirurgie et traitement ou non à la DAPA (**Figure 51**).

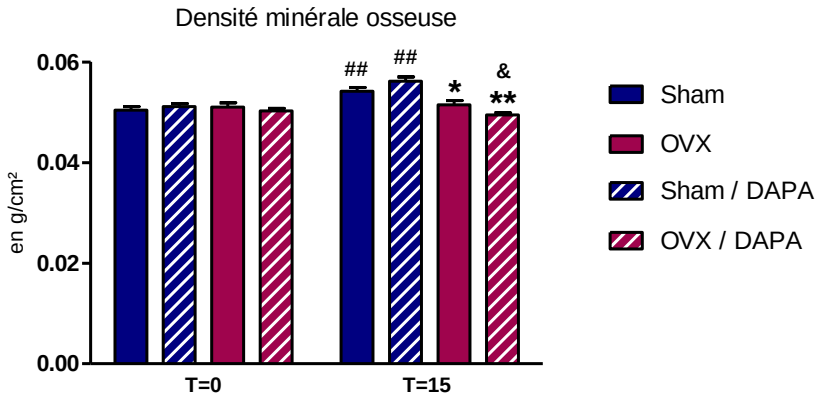


Figure 51 : Mesure de la **A.** Densité minérale osseuse avant chirurgie (T=0) et 15 semaines après chirurgie et traitement à la DAPA (T=15) (n = 6 souris par groupe) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Sham *vs* OVX au même temps ; $^{\&}$ $p < 0.01$, OVX / DAPA *vs* OVX ; $^{\#\#}$ $p < 0.01$ T=15 *vs* T=0 ; Test de Mann-Whitney)

Il n'y a pas de différence de densité minérale osseuse entre les différents groupes constitués avant la chirurgie, attestant de l'homogénéité des différents groupes. Au cours du temps, les souris Sham gagnent en densité minérale osseuse comme décrit dans la littérature (Blais *et al.*, 2009) ($^{\#\#}$ $p = 0.008$ pour les Sham, $^{\#\#}$ $p = 0.005$ pour les Sham / DAPA). En revanche, les souris OVX, traitées ou non à la DAPA ne gagnent pas en densité minérale osseuse au cours du temps. Cette absence d'augmentation est interprétée comme un signe d'ostéoporose chez les souris confirmant l'installation de perturbations osseuse à la suite de l'ovariectomie. Par ailleurs, le traitement n'induit dans aucun groupe (Sham ou OVX) de diminution de la masse graisseuse, ni de changement de la masse maigre considérée comme la masse musculaire. Ces données sont en accord avec l'absence de différence du poids corporel suite au traitement DAPA pour les deux groupes (données non montrées).

À 15 semaines, alors que les souris Sham traitées à la DAPA présentent une densité minérale osseuse équivalente à celle des souris Sham non traitées, les souris OVX traitées à la DAPA présentent une légère diminution de la densité minérale osseuse au niveau corporel par rapport aux souris OVX non traitées (- 4%, $^{\&}$ $p = 0.02$), suggérant un impact du traitement à la DAPA sur la composante minérale.

Afin d'étudier plus précisément les atteintes osseuses induites par l'ovariectomie et le traitement à la DAPA, des analyses par µCT sont réalisées au niveau du tibia proximal des souris, à la 15ème semaine. Dans un premier temps, une mesure du volume d'os trabéculaire par

rapport au volume de tissu analysé (BV/TV) et du nombre de travées osseuses est réalisée (**Figure 52**)

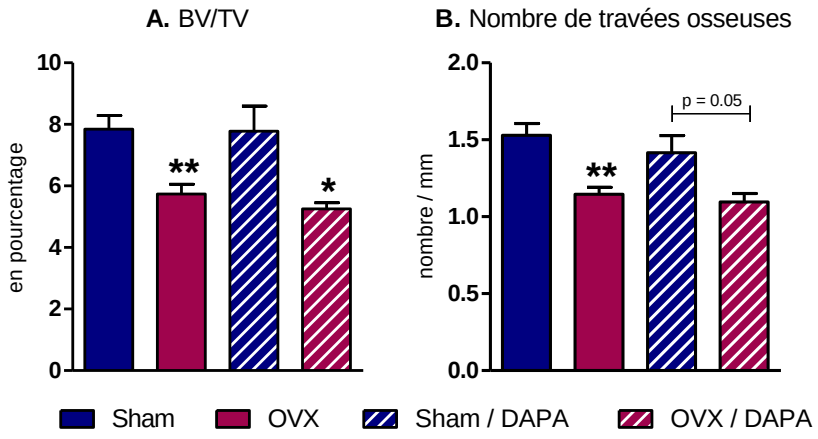


Figure 52 : Mesure du **A.** volume trabéculaire par rapport au volume osseux analysé (BV/TV) et **B.** du nombre de travées osseuses au niveau du tibia proximal des souris Sham et OVX traitées ou non à la DAPA durant 5.5 semaines (n = 6 souris par groupe) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Sham *vs* OVX dans la même condition de traitement ; Test de Mann-Whitney)

Le BV/TV est plus faible chez les souris OVX que chez les souris Sham, sans impact du traitement à la DAPA (* $p = 0.03$ sans traitement DAPA, ** $p < 0.004$ avec traitement DAPA) (**Figure 52.A**). Cette mesure est associée à une augmentation du volume tissulaire chez les souris OVX (résultats non montrés) et à une diminution du nombre de travées osseuses chez les souris OVX, traitées ou non à la DAPA, par rapport aux groupes Sham (** $p = 0.002$ sans traitement, $p = 0.05$ avec traitement) (**Figure 52.B**). Ce résultat est confirmé par l'observation de l'augmentation de l'espace entre les travées osseuses chez les souris OVX par rapport aux souris Sham (résultats non montrés). Ces résultats confirment bien la perte osseuse au niveau trabéculaire chez les souris OVX, sans influence du traitement par la DAPA (**Figure 51**).

L'administration de la DAPA n'entraîne pas de modifications de l'os trabéculaire même chez les souris Sham qui présentent une diminution de la clairance au glucose. Ces premiers résultats indiquent que le traitement n'a pas d'effet sur la quantité d'os trabéculaire. Cette absence d'effet de la DAPA est en accord avec les données obtenues dans un modèle murin d'obésité et de diabète (Mieczkowska *et al.*, 2020).

Pour compléter ces données, nous avons mesuré au µCT différents paramètres de l'os cortical, au niveau de la diaphyse du tibia : l'épaisseur de l'os cortical, le diamètre externe de l'os cortical, correspondant au périoste, et le diamètre interne de l'os cortical, correspondant à l'endoste (**Figure 53**).

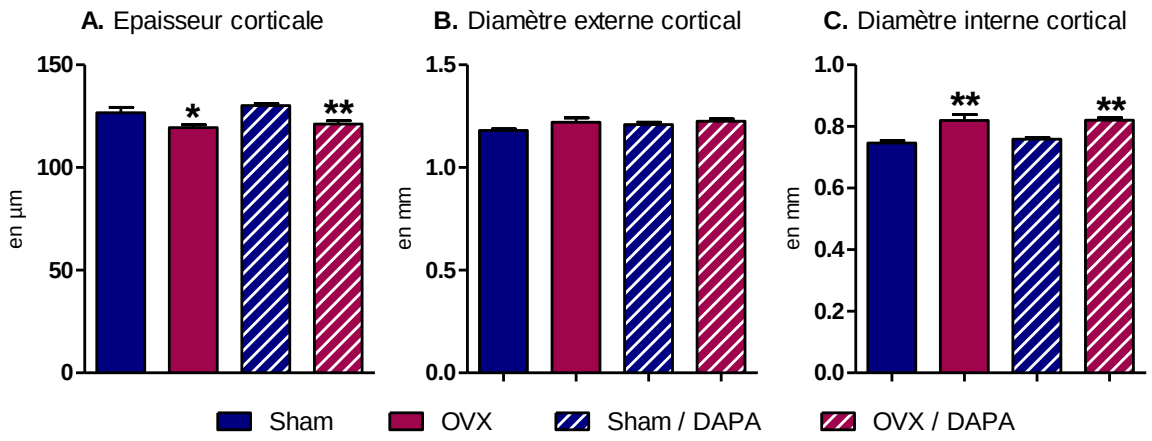


Figure 53 : Mesure de **A.** l'épaisseur de l'os cortical, **B.** du diamètre extérieur de l'os cortical : le périoste et **C.** du diamètre interne de l'os cortical, l'endoste, du tibia proximal des souris Sham et OVX traitées ou non à la DAPA durant 5.5 semaines (n = 6 souris par groupe) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Sham *vs* OVX dans la même condition de traitement ; Test de Mann-Whitney)

La valeur de l'épaisseur de l'os cortical est plus faible dans les souris OVX que dans les souris Sham, qu'elles soient traitées ou non avec la DAPA (* $p = 0.04$ sans traitement, ** $p = 0.004$ avec traitement) (**Figure 53.A**). Le diamètre externe est équivalent entre les différents groupes : Sham, OVX, et Sham et OVX avec ou sans traitement DAPA (**Figure 53.B**). En revanche, la taille du diamètre interne augmente dans les souris OVX par rapport aux souris Sham, qu'elles soient traitées ou non avec la DAPA (** $p = 0.002$ sans traitement, ** $p = 0.002$ avec traitement) (**Figure 53.C**). Ces résultats démontrent que l'endoste est remodelé chez les souris ovariectomisées, diminuant ainsi l'épaisseur de l'os cortical et augmentant la taille de la cavité médullaire.

L'administration de la DAPA n'entraîne pas de modifications de l'os cortical des os longs.

Ainsi, l'absence d'augmentation de la densité minérale osseuse mesurée à l'échelle corporelle dans les souris OVX, est due à la diminution de l'épaisseur de l'os cortical (qui correspond à 80 % de la masse osseuse totale) et à la diminution du volume d'os trabéculaire. L'effet mineur du traitement à la DAPA sur la DMO n'est pas retrouvé lors des analyses au µCT des tibias proximaux. Ce résultat pourrait s'expliquer par une atteinte osseuse par le traitement à la DAPA au niveau du squelette axial et sera donc à vérifier.

Ces données sont actuellement complétées par des analyses qualitatives de l'os (fémurs gauches) par spectroscopie Raman et par l'analyse des paramètres de minéralisation (mesure

par microscopie confocale suite aux marquages des fronts de minéralisation à 2 temps par la calcéine et l'alizarine complexone).

4. Impact du traitement à la DAPA sur les adipocytes médullaires

Plusieurs paramètres de l'adiposité médullaire sont mesurés par histologie : densité des AM, surface qu'ils occupent et diamètre au niveau de la métaphyse proximale du tibia (**Figure 54**).

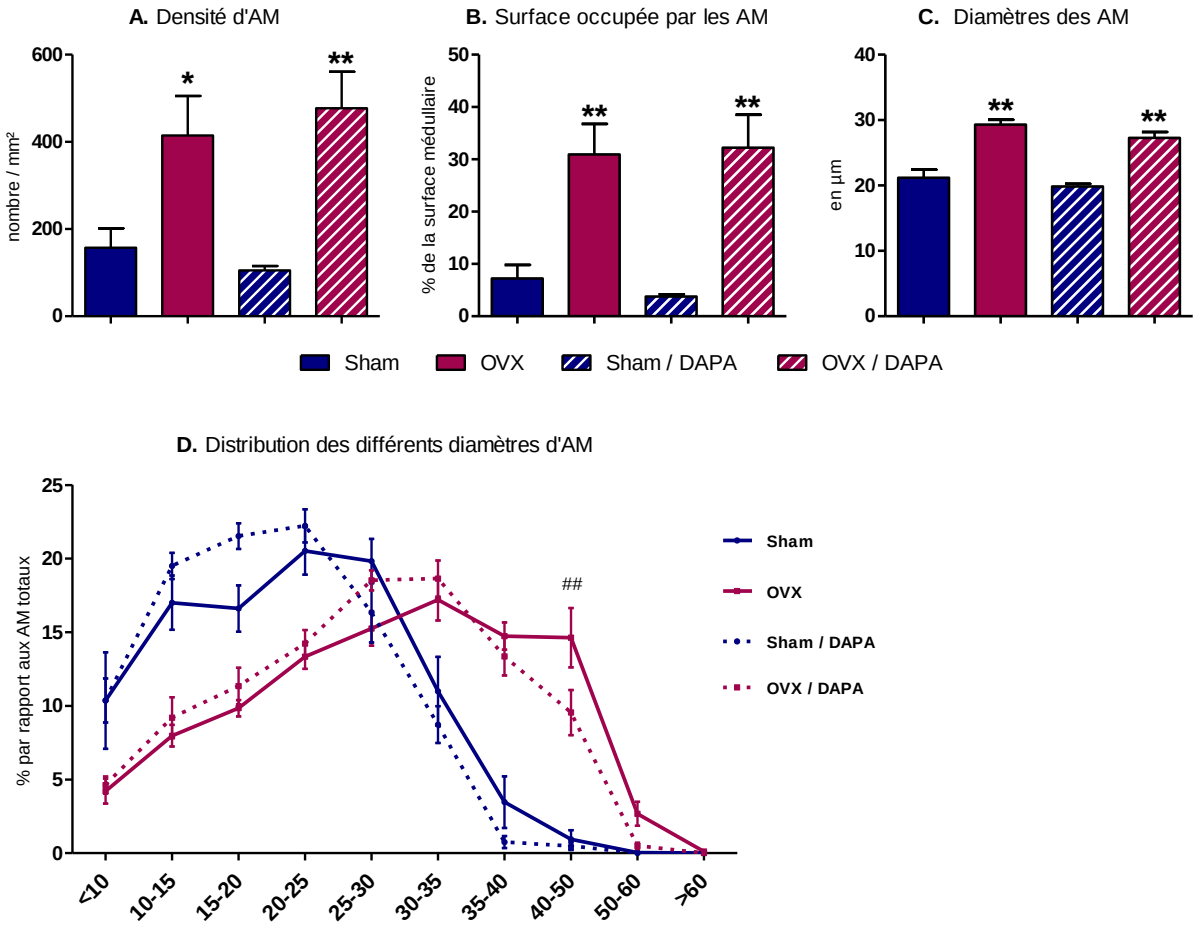


Figure 54 : Mesure **A.** du nombre d'adipocytes médullaires (AM) par mm², **B.** de la surface occupée par les adipocytes médullaires dans la zone médullaire analysée, **C.** du diamètre moyen des AM dénombrés, et **D.** de la distribution des différents diamètres des AM (n = 3 souris par groupe, 2 coupes par souris) (A, B, C : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, OVX *vs* DAPA ou OVX / DAPA *vs* Sham / DAPA ; Test de Mann-Whitney) (D : $^{\#\#}$ $p < 0.01$, OVX *vs* OVX / DAPA en post-tests Bonferroni, Two-Way ANOVA)

Le nombre d'AM est plus important dans les souris OVX que dans les souris Sham (**Figure 54.A**), de même que la surface qu'ils occupent (**Figure 54.B**) et leur diamètre (**Figure 54.C**). Le traitement à la DAPA ne modifie pas ces différents paramètres, ni chez les Sham, ni chez les OVX, malgré l'amélioration des paramètres glycémiques.

Une analyse plus précise de la répartition du diamètre des AM met en évidence des différences entre les différents groupes de souris (**Figure 54.D**). On constate effectivement que les AM des souris Sham sont de plus petites tailles que les AM des souris OVX, comme attendu (**Figure 54.C**). De plus, le traitement à la DAPA induit une distribution des adipocytes médullaires des souris OVX vers des classes de diamètre plus petits ($^{\#\#}$ $p < 0.01$, two-way ANOVA). Ce résultat nous permet de constater un effet positif du traitement à la DAPA qui n'était pas perceptible avec la mesure de la densité et de la surface. Ainsi, bien que le nombre d'adipocytes reste inchangé par le traitement à la DAPA, leur taille diminue suggérant un changement de leur activité métabolique.

La caractérisation des AM se poursuit par une mesure d'expression génique de PPARγ2, de l'adiponectine (*ADIPOQ*) et de la périlipine (*Plin1*). Ces différentes mesures sont réalisées sur l'ensemble des cellules de la moelle, c'est-à-dire non seulement les AM mais également les CSM, cellules stromales, cellules endothéliales et les cellules de la lignée hématopoïétique (**Figure 55**).

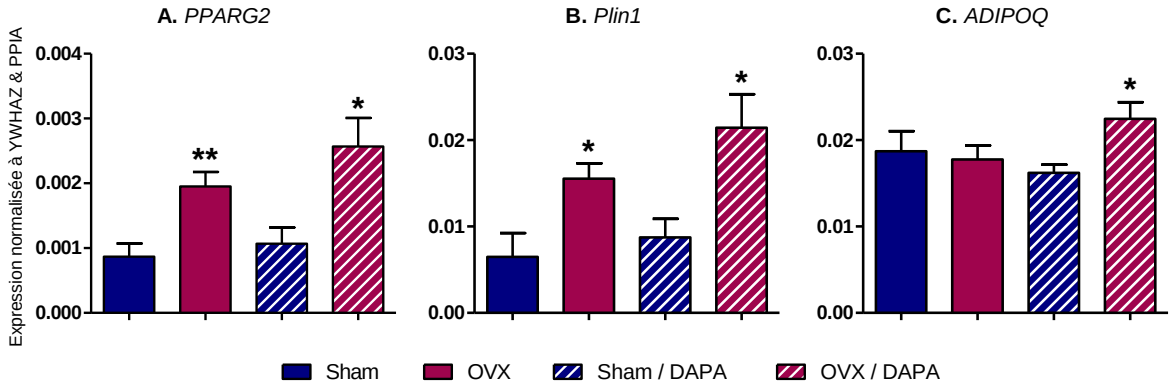


Figure 55 : Expression génique **A.** de PPARγ2, **B.** de l'adiponectine (*ADIPOQ*) et **C.** de Plin1 dans les cellules de la moelle isolés des souris Sham, OVX, Sham / DAPA et OVX / DAPA après 5 semaines de traitement (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, OVX *vs* DAPA ou OVX / DAPA *vs* Sham / DAPA ; Test de Mann-Whitney)

L'expression de PPARγ2 est spécifiquement mesurée, puisqu'il n'est exprimé que par les adipocytes. L'expression de PPARγ2 est bien supérieure dans les souris OVX par rapport aux souris Sham, avec (* $p = 0.03$) ou sans traitement (** $p = 0.01$) (**Figure 55.A**). La périlipine, retrouvée au niveau des gouttelettes lipidiques, est un marqueur spécifique des adipocytes qui peut être un indicateur de la taille et du nombre de cellules adipocytaires (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995). Quel que soit le traitement, son expression est plus élevée chez les souris OVX

que chez les souris Sham (* p = 0.02 avec traitement DAPA, * p = 0.04 sans traitement DAPA) (**Figure 55.B**). Ce résultat confirme une augmentation de l'adiposité médullaire chez les souris ovariectomisées. Le traitement à la DAPA ne modifie pas ces deux niveaux d'expressions, ce qui est cohérent 1/ avec l'absence de différence de densité d'adipocytes médullaires entre les souris OVX et les souris OVX / DAPA (**Figure 54.A**) et 2/ avec l'absence de différence du diamètre moyens des AM entre ces deux groupes (**Figure 54.C**).

Le niveau d'expression de l'adiponectine est identique entre les souris Sham et les souris OVX, en absence de traitement à la DAPA. La quantité d'adipocytes médullaires étant supérieure dans les souris OVX par rapport aux souris Sham, cela signifie que l'expression de l'adiponectine dans les AM des souris OVX est plus faible que dans les souris Sham. Après traitement à la DAPA, l'expression de l'adiponectine est plus élevée dans les souris OVX que dans les souris Sham (**Figure 55.C**). Une telle augmentation avait déjà été mise en évidence dans des adipocytes viscéraux isolés de modèle murin soumis à un régime hyperlipidique et traités avec un autre inhibiteur de SGLT2 (Xu *et al.*, 2017) ou isolés de modèle murin diabétique traités 5 semaines avec la DAPA (Nishitani *et al.*, 2018). Dans les adipocytes extra-médullaires, la taille des adipocytes et l'expression de l'adiponectine sont liées : en effet, plus les adipocytes sont petits, plus ils sécrètent de l'adiponectine (Meyer *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans l'obésité, l'expression d'adiponectine diminue en raison d'une hypertrophie des adipocytes (Straub & Scherer, 2019). Ainsi, cette augmentation de l'expression de l'adiponectine suite au traitement à la DAPA s'accompagne bien d'une modification de la taille des adipocytes médullaires et confirme un changement de leur activité métabolique.

Ainsi, un traitement de 5.5 semaines à la DAPA ne permet pas de diminuer le nombre d'AM dans les souris OVX, mais induit une réduction de leur taille, perceptible par analyse histologique uniquement, et une amélioration de leur activité métabolique. **Ces premiers résultats suggèrent donc une sensibilité des AM à l'hyperglycémie chronique qui peut être améliorée suite à une correction partielle de la glycémie.**

La réduction de la taille des adipocytes médullaires suggère un possible remaniement de la matrice extra-cellulaire induit par la DAPA. Ainsi, une première caractérisation des composants matriciels est réalisée avec la mesure d'expression génique de la fibronectine et de la MGP (**Figure 56**).

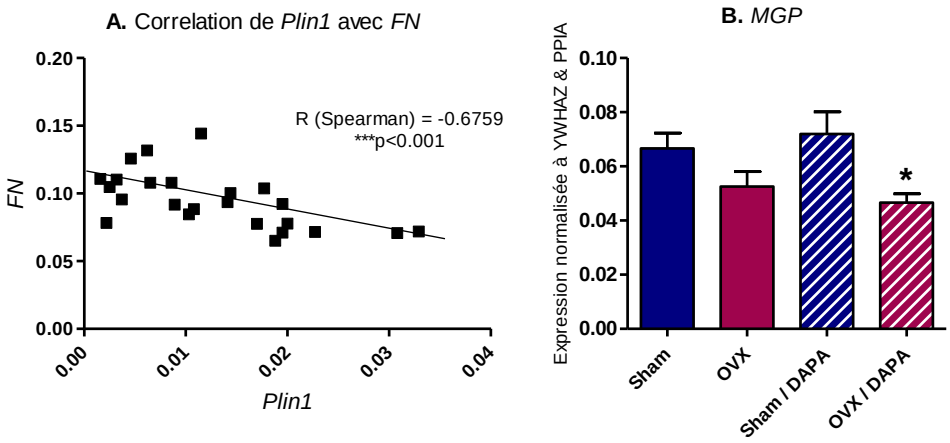


Figure 56 : **A.** Corrélation de l'expression génique de la périlipine (*Plin1*) avec la fibronectine (*FN*) **B.** Expression génique la MGP dans les cellules de la moelle isolés des souris Sham, OVX, Sham / DAPA et OVX / DAPA après 5 semaines de traitement (Test de corrélation r de Spearman) (* $p <$ 0.05, OVX / DAPA *vs* Sham / DAPA ; Test de Mann-Whitney)

L'expression de la fibronectine est identique quel que soit le groupe de souris, Sham ou OVX, Sham et OVX traitées ou non à la DAPA (données non montrées). Ce résultat est en accord avec le faible niveau de production de fibronectine par les AM par rapport aux autres cellules de la moelle osseuse comme démontré dans le CHAPITRE 2 (***Figure 42**, page 153 et **Figure 44**, page 155*). Cependant son expression est bien corrélée négativement à celle de la périlipine (Coefficient R Spearman = 0.67). Ainsi, plus la périlipine est exprimée moins la fibronectine l'est, suggérant que le niveau d'adiposité médullaire puisse significativement impacter la quantité de fibronectine présente dans la moelle osseuse (**Figure 56.A**).

La Matrix-Gla-Protéine, retrouvée spécifiquement exprimée dans les adipocytes médullaires lors de leur caractérisation chez les souris OVX (*CHAPITRE 2, **Figure 48**, page 163*), tend à être moins exprimée dans les souris OVX non traitées par rapport aux souris Sham (p = 0.1). Cette différence est significative lorsque les souris sont traitées à la dapagliflozine (* p = 0.03) (**Figure 56.B**). Comme la MGP joue un rôle dans la minéralisation des ostéoblastes, ce résultat pourrait s'expliquer par une diminution de la formation osseuse à ce stade chez les souris OVX. Il sera intéressant d'analyser ce résultat au regard d'autres paramètres de minéralisation et de formation osseuse.

La caractérisation de la capacité de production des composants matriciels par les adipocytes médullaires est poursuivie avec notamment la mesure d'expression génique du collagène de type I, de la hyaluronidase 1, de SPOCK1 et de la périostine. Ces résultats vont compléter et renforcer les données obtenues dans le CHAPITRE 2.

IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ce travail constitue une étude pilote actuellement en cours au laboratoire. Nos résultats ont confirmé l'amélioration des paramètres glycémiques par le traitement à la dapagliflozine sur notre modèle murin d'ovariectomie. De plus, ce traitement n'induit pas de perturbations osseuses d'après les mesures réalisées au niveau des tibias. Ces observations sont complétées par une analyse en cours de la qualité osseuse par spectroscopie Raman et pas la mesure des fronts de minéralisation. La quantité d'adipocytes médullaires n'est pas diminuée par le traitement à la DAPA, mais on observe une amélioration de leur activité métabolique à travers la diminution de leur diamètre et une meilleure expression de l'adiponectine.

Une première caractérisation de la matrice des adipocytes médullaires confirme le faible niveau de production de fibronectine par les adipocytes médullaires ainsi qu'une bonne expression de la MGP. Le traitement à la DAPA n'impacte pas ces différentes expressions, comme déjà observés dans les AM du modèle d'ovariectomie à 4 et 14 semaines. Ainsi, d'autres marqueurs seront mesurés afin de compléter les données du CHAPITRE 2 et mieux comprendre l'effet d'une hyperglycémie chronique sur le remodelage de la matrice extra-cellulaire *in vivo*.

Afin de compléter ces données, une seconde étude est en cours au laboratoire avec un temps de traitement plus long (12 semaines) et davantage de souris (pour atteindre n = 10 par groupe expérimental) pour compléter les données sur l'amélioration de la glycémie et ses effets sur les composantes osseuses et adipocytaire dans ce modèle d'ovariectomie

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse constitue un projet tout à fait nouveau développé au laboratoire. Il a permis de montrer que les MEC adipocytaires, générées à 5 ou 25 mM de glucose, favorisent l'adhésion et la prolifération des CSM. De plus, l'engagement des CSM dans la voie de différenciation ostéoblastique n'est modifié ni par les différentes matrices, ni par la concentration en glucose du milieu de différenciation ostéogénique. Des altérations de la maturation et de la minéralisation des cellules sont toutefois observées sur matrices adipocytaires. Certaines de ces altérations (baisse de la quantité de minérale produite par cellule, augmentation du niveau de cross-links enzymatiques, absence de carbonatation) semblent indépendantes de la concentration de glucose à laquelle les AM puis les ostéoblastes ont été exposés. Malgré tout, la concentration de glucose peut moduler la réponse des ostéoblastes sur MEC adipocytaires notamment vis-à-vis du niveau de minéralisation de la matrice organique. Ce premier projet met en évidence, pour la première fois, que les adipocytes médullaires, par leur MEC, peuvent altérer la qualité de la matrice organique et minérale produite par les ostéoblastes. Ces résultats supportent un nouveau rôle des adipocytes médullaires dans le contexte de l'ostéoporose.

Notre première caractérisation par mesure d'expression génique des MEC adipocytaires, sur AM obtenus *in vitro* et sur modèles murin et humain, bien que n'expliquant pas les altérations pré-citées, met en évidence la spécificité des adipocytes médullaires par rapport aux adipocytes extra-médullaires (au niveau des collagènes) et révèle l'expression de composants intéressants dans les AM, notamment de la MGP, un inhibiteur de la minéralisation et de SPOCK1, jamais étudié dans ce contexte. La caractérisation d'AM primaires murins ou humains reste encore très restreinte en raison de difficultés techniques et constitue donc un atout. Avec la poursuite de cette caractérisation sur le plan protéique, ces données devraient conduire à l'identification de nouveaux composants adipocytaires matriciels d'intérêt dans le contexte de l'ostéoporose. Cette nouvelle description ouvrirait également d'autres perspectives quant à l'implication des AM dans d'autres contextes pathologiques, comme celui de la cancérologie.

Bien que la différenciation adipocytaires des CSM ne soit pas modulée par la forte concentration en glucose *in vitro*, le traitement hypoglycémiant (par la DAPA) administrée aux souris ovariectomisées permet d'améliorer les paramètres glycémiques et de modifier le phénotype des adipocytes médullaires (diminution du diamètre, meilleure expression de

l’adiponectine) confirmant une sensibilité *in vivo* des AM aux paramètres de la glycémie. Cette expérience pilote est également complétée par d’autres analyses du phénotype adipocytaire et de paramètres osseux (vitesse et qualité de minéralisation notamment au site de formation) qui pourront être analysés conjointement. La poursuite de cette étude, notamment à plus long terme, devrait permettre d’établir et de mieux comprendre les relations entre variations de la glycémie, phénotype adipocytaire et certains paramètres osseux dans le contexte de l’ostéoporose ménopausique.

Ainsi, la MEC des AM présente une composition spécifique dont l’expression génique de certains composants est sensible à une forte concentration en glucose et à d’autres mécanismes sous-jacents. Cette étude confirme l’intérêt de poursuivre la caractérisation de cette MEC afin de mieux cerner les perturbations osseuses associées à une augmentation de l’adiposité médullaire, notamment dans l’ostéoporose liée au diabète de type 2. De plus, ce travail de thèse et cette première caractérisation des MEC adipocytaires supposent un impact des MEC dans d’autres pathologies telles que la formation de tumeur au sein de la moelle par exemple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akbari Zahmati, A. H., Alipoor, R., Rezaei Shahmirzadi, A., Khori, V., & Abolhasani, M. M. (2017). Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*, *2*(3), 76. https://doi.org/10.24200/imminv.v2i3.63

Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U. Il, Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Kadowaki, T., & Kawaguchi, H. (2004). PPARγ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(6), 846–855. https://doi.org/10.1172/JCI200419900

Al-Qtaitat, A. I., & Aldalaen, S. M. (2014). A Review of Non-Collagenous Proteins; their Role in Bone. *American Journal of Life Sciences*, *2*(6), 351–355. https://doi.org/10.11648/j.ajls.20140206.14

Alford, A. I., & Hankenson, K. D. (2006). Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, *38*(6), 749–757. https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.11.017

Ali, A. T., Penny, C. B., Paiker, J. E., Psaras, G., Ikram, F., & Crowther, N. J. (2006). The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. *Analytical Biochemistry*, *354*(2), 247–254. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.028

Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, *7*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0393-1

Alshargabi, R., Shinjo, T., Iwashita, M., Yamashita, A., Sano, T., Nishimura, Y., Hayashi, M., Zeze, T., Fukuda, T., Sanui, T., & Nishimura, F. (2020). SPOCK1 induces adipose tissue maturation: New insights into the function of SPOCK1 in metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *533*(4), 1076–1082. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.129

Amarasekara, D. S., Kim, S., & Rho, J. (2021). Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 1–16. https://doi.org/10.3390/ijms22062851

Andersen, D. C., Kortesidis, A., Zannettino, A. C. W., Kratchmarova, I., Chen, L., Jensen, O. N., Teisner, B., Gronthos, S., Jensen, C. H., & Kassem, M. (2011). Development of novel monoclonal antibodies that define differentiation stages of human stromal (mesenchymal) stem cells. *Molecules and Cells*, *32*, 133–142. https://doi.org/10.1007/s10059-011-2277-7

Anderson, H. J., Sahoo, J. K., Ulijn, R. V., & Dalby, M. J. (2016). Mesenchymal stem cell fate: Applying biomaterials for control of stem cell behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *4*(MAY), 1–14. https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00038

Aprile, M., Ambrosio, M. R., D'Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., Costa, V., & Ciccodicola, A. (2014). PPARG in human adipogenesis: Differential contribution of

canonical transcripts and dominant negative isoforms. *PPAR Research*, 18–20. https://doi.org/10.1155/2014/537865

Assis-Ribas, T., Forni, M. F., Winnischofer, S. M. B., Sogayar, M. C., & Trombetta-Lima, M. (2018). Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Developmental Biology*, *437*, 63–74. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.002

Atashi, F., Modarressi, A., & Pepper, M. S. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells and Development*, *24*(10), 1150–1163. https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484

Attané, C., Estève, D., Chaoui, K., Iacovoni, J. S., Corre, J., Moutahir, M., Valet, P., Schiltz, O., Reina, N., & Muller, C. (2020). Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism. *Cell Reports*, *30*(4), 949-958.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.089

Aubin, J. E. (2001). Regulation of Osteoblast Formation and Function. In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 2, Issue 1, pp. 81–94). https://doi.org/10.1023/A:1010011209064

Bala, Y., & Seeman, E. (2015). Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment. *Calcified Tissue International*, *97*(3), 308–326. https://doi.org/10.1007/s00223-015-9971-y

Balint, E., Szabo, P., Marshall, C. F., & Sprague, S. M. (2001). Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*, *28*(1), 21–28. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00426-9

Baroncelli, M., Van der Eerden, B. C. J., Chatterji, S., Rull Trinidad, E., Kan, Y. Y., Koedam, M., Van Hengel, I. A. J., Alves, R. D. A. M., Fratila-Apachitei, L. E., Demmers, J. A. A., Van de Peppel, J., & Van Leeuwen, J. P. T. M. (2018). Human Osteoblast-Derived Extracellular Matrix with High Homology to Bone Proteome Is Osteopromotive. *Tissue Engineering Part A*, *24*(17–18), 1377–1389. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0448

Barone, L. M., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Bortell, R., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1991). Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix GLA protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *46*(4), 351–365. https://doi.org/10.1002/jcb.240460410

Baum, T., Yap, S. P., Karampinos, D. C., Nardo, L., Luo, D., Burghardt, A. J., Masharani, Umesh B.Schwartz, A. V., Li, X., & Link, T. M. (2012). Does vertebral bone marrow fat content correlate with abdominal adipose tissue, lumbar spine BMD and blood biomarkers in women with type 2 diabetes mellitus? *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, *35*(1), 117–124. https://doi.org/10.1002/jmri.22757.Does

Beck, G. R. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *90*(2), 234–243. https://doi.org/10.1002/jcb.10622

Beekman, K. M., Zwaagstra, M., Veldhuis-Vlug, A. G., Van Essen, H. W., Den Heijer, M., Maas, M., Kerckhofs, G., Parac-Vogt, T. N., Bisschop, P. H., & Bravenboer, N. (2019). Ovariectomy increases RANKL protein expression in bone marrow adipocytes of C3H/HeJ mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *317*, E1050–E1054. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00142.2019

Benova, A., & Tencerova, M. (2020). Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 1–15. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00294

Bhartiya, A., Batey, D., Cipiccia, S., Shi, X., Rau, C., Botchway, S., Yusuf, M., & Robinson, I. K. (2021). X-ray Ptychography Imaging of Human Chromosomes After Low-dose Irradiation. *Chromosome Research*, *29*(1), 107–126. https://doi.org/10.1007/s10577-021-09660-7

Bianco, P., Ballanti, P., & Bonucci, E. (1988). Tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts and osteocytes. *Calcified Tissue International*, *43*, 167–171. https://doi.org/10.1007/BF02571315

Blais, A., Malet, A., Mikogami, T., Martin-Rouas, C., & Tomé, D. (2009). Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *296*(6), E1281–E1288. https://doi.org/10.1152/ajpendo.90938.2008

Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Barber, T., Coxey, R. A., Takeda, T., Rondinone, C. M., Theodorakis, J. L., Greenberg, A. S., & Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *Journal of Lipid Research*, *36*(6), 1211–1226. https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)41129-0

Blebea, J. S., Houseni, M., Torigian, D. A., Fan, C., Mavi, A., Zhuge, Y., Iwanaga, T., Mishra, S., Udupa, J., Zhuang, J., Gopal, R., & Alavi, A. (2007). Structural and Functional Imaging of Normal Bone Marrow and Evaluation of Its Age-Related Changes. *Seminars in Nuclear Medicine*, *37*(3), 185–194. https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2007.01.002

Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B., & Boskey, A. (2003). Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International*, *72*(5), 537–547. https://doi.org/10.1007/s00223-002-1057-y

Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2015). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(12), 786–801. https://doi.org/10.1038/nrm3904

Bonnet, N., Garnero, P., & Ferrari, S. (2016). Periostin action in bone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *432*, 75–82. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.014

Bonnet, N., Standley, K. N., Bianchi, E. N., Stadelmann, V., Foti, M., Conway, S. J., & Ferrari, S. L. (2009). The Matricellular Protein Periostin Is Required for Sost Inhibition and the Anabolic Response to Mechanical Loading and Physical Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35939–35950. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060335

Bonucci, E. (2012). Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience*, *17*(1), 100–128. https://doi.org/10.2741/3918

Boskey, A. L., Donnelly, E., Boskey, E., Spevak, L., Ma, Y., Zhang, W., Lappe, J., & Recker, R. R. (2016). Examining the Relationships Between Bone Tissue Composition, Compositional Heterogeneity, and Fragility Fracture: A Matched Case-Controlled FTIRI Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, *31*(5), 1070–1081. https://doi.org/10.1002/jbmr.2759

Boskey, A. L., & Imbert, L. (2017). Bone quality changes associated with aging and disease: a

review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1410*(1), 93–106. https://doi.org/10.1111/nyas.13572

Botolin, S., & McCabe, L. R. (2006). Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, *99*(2), 411–424. https://doi.org/10.1002/jcb.20842

Boukhechba, F., Balaguer, T., Michiels, J. F., Ackermann, K., Quincey, D., Bouler, J. M., Pyerin, W., Carle, G. F., & Rochet, N. (2009). Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *Journal of Bone and Mineral Research*, *24*(11), 1927–1935. https://doi.org/10.1359/jbmr.090517

Bukowska, J., Frazier, T., Smith, S., Brown, T., Bender, R., McCarthy, M., Wu, X., Bunnell, B. A., & Gimble, J. M. (2018). Bone Marrow Adipocyte Developmental Origin and Biology. *Current Osteoporosis Reports*, *16*(3), 312–319. https://doi.org/10.1007/s11914-018-0442-z

Burghardt, A. J., Issever, A. S., Schwartz, A. V., Davis, K. A., Masharani, U., Majumdar, S., & Link, T. M. (2010). High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *95*(11), 5045–5055. https://doi.org/10.1210/jc.2010-0226

Cai, R., Nakamoto, T., Hoshiba, T., Kawazoe, N., & Chen, G. (2016). Matrices secreted during simultaneous osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells affect stem cells differentiation. *Acta Biomaterialia*, *35*, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.009

Calabro, A., Oken, M. M., Hascall, V. C., & Masellis, A. M. (2002). Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood*, *100*(7), 2578–2585. https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0030

Caplan, A. I. (2005). Review : mesenchymal stem cells : cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering*, *11*(7). https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1198

Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *561*(May), 3–12. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003

Cawthorn, W. P., & Scheller, E. L. (2017). Editorial: Bone marrow adipose tissue: Formation, function, and impact on health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 112. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00112

Çelebi, B., Pineault, N., & Mantovani, D. (2012). The role of collagen type I on Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells expansion and differentiation. *Advanced Materials Research*, *409*, 111–116. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.409.111

Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? *Cell Death and Differentiation*, *23*(7), 1128–1139. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168

Chen, Y., Pan, R., & Pfeifer, A. (2016). Fat tissues, the brite and the dark sides. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *468*(11–12), 1803–1807. https://doi.org/10.1007/s00424-016-1884-8

Cheng, C., Chen, L., & Chen, K. (2022). Osteoporosis Due to Hormone Imbalance : An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). https://doi.org/10.3390/ijms23031376

Chuang, C. C., Yang, R. S., Tsai, K. S., Ho, F. M., & Liu, S. H. (2007). Hyperglycemia enhances adipogenic induction of lipid accumulation: Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, phosphoinositide 3-kinase/Akt, and peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling. *Endocrinology*, *148*(9), 4267–4275. https://doi.org/10.1210/en.2007-0179

Cifuentes-Mendiola, S., Moreno-Fierros, L., González-Alva, P., & García-Hernández, A. (2022). Docosahexaenoic acid improves altered mineralization proteins, the decreased quality of hydroxyapatite crystals and suppresses oxidative stress induced by high glucose. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *23*(3), 1–12. https://doi.org/10.3892/etm.2022.11160

Cinti, S. (2018). Adipose Organ Development and Remodeling. *Comprehensive Physiology*, *8*(4), 1357–1431. https://doi.org/10.1002/cphy.c170042

Cipriani, C., Colangelo, L., Santori, R., Renella, M., Mastrantonio, M., Minisola, S., & Pepe, J. (2020). The Interplay Between Bone and Glucose Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00122

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, *3 Suppl 3*, 131–139. https://doi.org/10.2215/CJN.04151206

Cornish, J., Wang, T., & Lin, J. (2018). Role of Marrow Adipocytes in Regulation of Energy Metabolism and Bone Homeostasis. *Current Osteoporosis Reports*, *16*(2), 116–122. https://doi.org/10.1007/s11914-018-0425-0

Craft, C. S., & Scheller, E. L. (2017). Evolution of the Marrow Adipose Tissue Microenvironment. *Calcified Tissue International*, *100*(5), 461–475. https://doi.org/10.1007/s00223-016-0168-9

Cunha, J. S., Ferreira, V. M., Maquigussa, E., Naves, M. A., & Boim, M. A. (2014). Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell and Tissue Research*, *358*(1), 249–256. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1913-x

Dankel, S. N., Svärd, J., Matthä, S., Claussnitzer, M., Klöting, N., Glunk, V., Fandalyuk, Z., Grytten, E., Solsvik, M. H., Nielsen, H. J., Busch, C., Hauner, H., Blüher, M., Skurk, T., Sagen, J. V., & Mellgren, G. (2014). COL6A3 expression in adipocytes associates with insulin resistance and depends on PPARγ and adipocyte size. *Obesity*, *22*(8), 1807–1813. https://doi.org/10.1002/oby.20758

De Araújo, I. M., Salmon, C. E. G., Nahas, A. K., Nogueira-Barbosa, M. H., Elias, J., & De Paula, F. J. A. (2017). Marrow adipose tissue spectrum in obesity and type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*, *176*(1), 21–30. https://doi.org/10.1530/EJE-16-0448

Deorosan, B., & Nauman, E. A. (2011). The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*. https://doi.org/10.4061/2011/429187

DiMascio, L., Voermans, C., Uqoezwa, M., Duncan, A., Lu, D., Wu, J., Sankar, U., & Reya, T. (2007). Identification of Adiponectin as a Novel Hemopoietic Stem Cell Growth Factor. *The Journal of Immunology*, *178*(6), 3511–3520. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3511

Dobnig, H., & Turner, R. T. (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*, *136*(8), 3632–3638. https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628403

Edwards, J. R., & Mundy, G. R. (2011). Advances in osteoclast biology: Old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, *7*(4), 235–243. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.23

Elbaz, A., Rivas, D., & Duque, G. (2009). Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice. *Biogerontology*, *10*(6), 747–755. https://doi.org/10.1007/s10522-009-9221-7

Fan, Y., Hanai, J., Le, P. T., Bi, R., Maridas, D., Demambro, V., Figueroa, C. A., Kir, S., Zhou, X., Mannstadt, M., Baron, R., Bronson, R. T., Horowitz, M. C., Wu, J. Y., Bilezikian, J. P., Dempster, D. W., Rosen, C. J., & Lanske, B. (2017). Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate. *Cell Metabolism*, *25*(3), 661–672. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.01.001.

Ferland-McCollough, D., Maselli, D., Spinetti, G., Sambataro, M., Sullivan, N., Blom, A., & Madeddu, P. (2018). MCP-1 feedback loop between adipocytes and mesenchymal stromal cells causes fat accumulation and contributes to hematopoietic stem cell rarefaction in the bone marrow of patients with diabetes. *Diabetes*, *67*(7), 1380–1394. https://doi.org/10.2337/db18-0044

Flynn, L. E. (2010). The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, *31*(17), 4715–4724. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.046

Foster, L. J., Zeemann, P. A., Li, C., Mann, M., Jensen, O. N., & Kassem, M. (2005). Differential Expression Profiling of Membrane Proteins by Quantitative Proteomics in a Human Mesenchymal Stem Cell Line Undergoing Osteoblast Differentiation. *STEM CELLS*, *23*(9), 1367–1377. https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0372

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195–4200. https://doi.org/10.1242/jcs.023820

Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*, *235*(1), 176–190. https://doi.org/10.1002/dvdy.20603

Frick, K. K., & Bushinsky, D. A. (1998). Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *275*(5). https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F840

Frith, J. E., Mills, R. J., Hudson, J. E., & Cooper-White, J. J. (2012). Tailored Integrin–

Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells and Development*, *21*(13), 2442–2456. https://doi.org/10.1089/scd.2011.0615

Fukumoto, S., & Martin, T. J. (2009). Bone as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *20*(5), 230–236. https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.02.001

Gagnon, A., & Sorisky, A. (1998). The effect of glucose concentration on insulin-induced 3T3-L1 adipose cell differentiation. *Obesity Research*, *6*(2), 157–163. https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1998.tb00330.x

Gallagher, D., Heymsfield, S. B., Heo, M., Jebb, S. A., Murgatroyd, P. R., & Sakamoto, Y. (2000). Healthy percentage body fat ranges: An approach for developing guidelines based on body mass index. *American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(3), 694–701. https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.694

García-Hernández, A., Arzate, H., Gil-Chavarría, I., Rojo, R., & Moreno-Fierros, L. (2012). High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*, *50*(1), 276–288. https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.032

Gasparrini, M., Rivas, D., Elbaz, A., & Duque, G. (2009). Differential expression of cytokines in subcutaneous and marrow fat of aging C57BL/6J mice. *Experimental Gerontology*, *44*, 613–618. https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.05.009

Gattazzo, F., Urciuolo, A., & Bonaldo, P. (2014). Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*(8), 2506–2519. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.010

Gaudio, A., Privitera, F., Battaglia, K., Torrisi, V., Sidoti, M. H., Pulvirenti, I., Canzonieri, E., Tringali, G., & Fiore, C. E. (2012). Sclerostin levels associated with inhibition of the Wnt/β-catenin signaling and reduced bone turnover in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(10), 3744–3750. https://doi.org/10.1210/jc.2012-1901

Germaini, M.-M., Detsch, R., Grünewald, A., Magnaudeix, A., Lalloue, F., Boccaccini, A. R., & Champion, E. (2017). Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. *Biomedical Materials*, *12*(3), 035008. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa69c3

Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, *131*(2), 242–256. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004

Ghali, O., Al Rassy, N., Hardouin, P., & Chauveau, C. (2016). Increased bone marrow adiposity in a context of energy deficit: The tip of the iceberg? *Frontiers in Endocrinology*, *7*, 1–7. https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00125

Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*, 3675–3683. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014

Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Research International*, *2017*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2017/9831534

Gimble, J. M., Robinson, C. E., Wu, X., & Kelly, K. A. (1996). The function of adipocytes in

the bone marrow stroma: An update. *Bone*, *19*(5 SUPPL.), 421–428. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00258-X

Goncharova, V., Serobyan, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N., Kimata, K., Orlovskaja, I. A., Yamaguchi, Y., & Khaldoyanidi, S. (2012). Hyaluronan Expressed by the Hematopoietic Microenvironment Is Required for Bone Marrow Hematopoiesis. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(30), 25419–25433. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376699

Gopalakrishnan, R., Ouyang, H., Somerman, M. J., McCauley, L. K., & Franceschi, R. T. (2001). Matrix γ-Carboxyglutamic Acid Protein Is a Key Regulator of PTH-Mediated Inhibition of Mineralization in MC3T3-E1 Osteoblast-Like Cells. *Endocrinology*, *142*(10), 4379–4388. https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8413

Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2010). Collagens. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 247–257. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4

Goto, H., Hozumi, A., Osaki, M., Fukushima, T., Sakamoto, K., Yonekura, A., Tomita, M., Furukawa, K., Shindo, H., & Baba, H. (2011). Primary human bone marrow adipocytes support TNF-α-induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Cytokine*, *56*(3), 662–668. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.005

Goto, H., Osaki, M., Fukushima, T., Sakamoto, K., Hozumi, A., Baba, H., & Shindo, H. (2011). Human bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation and function through RANKL expression. *Biomedical Research*, *32*(1), 37–44. https://doi.org/10.2220/biomedres.32.37

Granchi, D., Ochoa, G., Leonardi, E., Devescovi, V., Baglio, S. R., Osaba, L., Baldini, N., & Ciapetti, G. (2010). Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *16*(3), 511–524. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0405

Green, D. E., & Rubin, C. T. (2014). Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone*, *63*, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.018

Griffith, J. F., Yeung, D. K. W., Ahuja, A. T., Choy, C. W. Y., Mei, W. Y., Lam, S. S. L., Lam, T. P., Chen, Z. Y., & Leung, P. C. (2009). A study of bone marrow and subcutaneous fatty acid composition in subjects of varying bone mineral density. *Bone*, *44*(6), 1092–1096. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.022

Griffith, J. F., Yeung, D. K. W., Ma, H. T., Leung, J. C. S., Kwok, T. C. Y., & Leung, P. C. (2012). Bone marrow fat content in the elderly: A reversal of sex difference seen in younger subjects. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, *36*(1), 225–230. https://doi.org/10.1002/jmri.23619

Gu, Y.-C., Kortesmaa, J., Tryggvason, K., Persson, J., Ekblom, P., Jacobsen, S.-E., & Ekblom, M. (2003). Laminin isoform–specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*, *101*(3), 877–885. https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0796

Gunaratnam, K., Vidal, C., Gimble, J. M., & Duque, G. (2014). Mechanisms of Palmitate-Induced Lipotoxicity in Human Osteoblasts. *Endocrinology*, *155*(1), 108–116. https://doi.org/10.1210/en.2013-1712

Gupta, N., Kumar, R., Seth, T., Garg, B., Sati, H. C., & Sharma, A. (2019). Clinical significance of circulatory microRNA-203 in serum as novel potential diagnostic marker for multiple myeloma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *145*(6), 1601–1611. https://doi.org/10.1007/s00432-019-02896-1

Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1092*, 385–396. https://doi.org/10.1196/annals.1365.035

Hagner-McWhirter, Å., Laurin, Y., Larsson, A., Bjerneld, E. J., & Rönn, O. (2015). Cy5 total protein normalization in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*, *486*, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.06.017

Han, C. Y., Kang, I., Harten, I. A., Gebe, J. A., Chan, C. K., Omer, M., Alonge, K. M., den Hartigh, L. J., Gomes Kjerulf, D., Goodspeed, L., Subramanian, S., Wang, S., Kim, F., Birk, D. E., Wight, T. N., & Chait, A. (2020). Adipocyte-Derived Versican and Macrophage-Derived Biglycan Control Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Cell Reports*, *31*(13), 107818. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107818

Han, S., Hagan, D. L., Taylor, J. R., Xin, L., Meng, W., Biller, S. A., Wetterau, J. R., Washburn, W. N., & Whaley, J. M. (2008). Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes*, *57*(6), 1723–1729. https://doi.org/10.2337/db07-1472

Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., & Zou, W. (2018). Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research*, *6*. https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6

Hankamolsiri, W., Manochantr, S., Tantrawatpan, C., Tantikanlayaporn, D., Tapanadechopone, P., & Kheolamai, P. (2016). The effects of high glucose on adipogenic and osteogenic differentiation of gestational tissue-derived MSCs. *Stem Cells International*, *16*. https://doi.org/10.1155/2016/9674614

Hardouin, P., Rharass, T., & Lucas, S. (2016). Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Frontiers in Endocrinology*, *7*(June), 1–11. https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00085

Hindorf, C., Glatting, G., Chiesa, C., Lindén, O., & Flux, G. (2010). EANM dosimetry committee guidelines for bone marrow and whole-body dosimetry. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *37*(6), 1238–1250. https://doi.org/10.1007/s00259-010-1422-4

Holt, V., Caplan, A. I., & Haynesworth, S. E. (2014). Identification of a subpopulation of marrow MSC-derived medullary adipocytes that express osteoclast-regulating molecules: Marrow adipocytes express osteoclast mediators. *PLoS ONE*, *9*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108920

Hoshiba, T., Kawazoe, N., & Chen, G. (2012). The balance of osteogenic and adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by matrices that mimic stepwise tissue development. *Biomaterials*, *33*(7), 2025–2031. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.061

Hoshiba, T., Kawazoe, N., Tateishi, T., & Chen, G. (2009). Development of stepwise osteogenesis-mimicking matrices for the regulation of mesenchymal stem cell functions. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(45), 31164–31173.

https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054676

Hoshiba, T., Kawazoe, N., Tateishi, T., & Chen, G. (2010). Development of extracellular matrices mimicking stepwise adipogenesis of mesenchymal stem cells. *Advanced Materials*, *22*(28), 3042–3047. https://doi.org/10.1002/adma.201000038

Hu, Y., Li, X., Zhi, X., Cong, W., Huang, B., Chen, H., Wang, Y., Li, Y., Wang, L., Fang, C., Guo, J., Liu, Y., Cui, J., Cao, L., Weng, W., Zhou, Q., Wang, S., Chen, X., & Su, J. (2021). RANKL from bone marrow adipose lineage cells promotes osteoclast formation and bone loss. *EMBO Reports*, *22*, 1–14. https://doi.org/10.15252/embr.202152481

Huang, G., & Greenspan, D. S. (2012). ECM Roles in the function of metabolic tissues. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *23*(1), 16–22. https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.09.006

Hunt, H. B., Pearl, J. C., Diaz, D. R., King, K. B., & Donnelly, E. (2018). Bone Tissue Collagen Maturity and Mineral Content Increase With Sustained Hyperglycemia in the KK-Ay Murine Model of Type 2 Diabetes. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(5), 921–929. https://doi.org/10.1002/jbmr.3365

Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903

Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, *42*, 11–55. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003

Iwaniec, U. T., & Turner, R. T. (2013). Failure to Generate Bone Marrow Adipocytes Does Not Protect Mice from Ovariectomy-Induced Osteopenia. *Bone*, *53*(1), 145–153. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Iwaniec, U. T., Yuan, D., Power, R. A., & Wronski, T. J. (2006). Strain-Dependent Variations in the Response of Cancellous Bone to Ovariectomy in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *21*(7), 1068–1074. https://doi.org/10.1359/jbmr.060402

Jafari, A., Qanie, D., Andersen, T. L., Zhang, Y., Chen, L., Postert, B., Parsons, S., Ditzel, N., Khosla, S., Johansen, H. T., Kjærsgaard-Andersen, P., Delaisse, J. M., Abdallah, B. M., Hesselson, D., Solberg, R., & Kassem, M. (2017). Legumain Regulates Differentiation Fate of Human Bone Marrow Stromal Cells and Is Altered in Postmenopausal Osteoporosis. *Stem Cell Reports*, *8*(2), 373–386. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.003

Jiang, Z. L., Jin, H., Liu, Z. S., Liu, M. Y., Cao, X. F., Jiang, Y. Y., Bai, H. D., Zhang, B., & Li, Y. (2019). Lentiviral-mediated Shh reverses the adverse effects of high glucose on osteoblast function and promotes bone formation via Sonic hedgehog signaling. *Molecular Medicine Reports*, *20*(4), 3265–3275. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10540

Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E. N., Mosekilde, L., Steiniche, T., & Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*, *2*(3), 165–171. https://doi.org/10.1023/A:1011513223894

Kahles, F., Findeisen, H. M., & Bruemmer, D. (2014). Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Molecular Metabolism*, *3*(4), 384–393.

https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.03.004

Kamiya, S., Kato, R., Wakabayashi, M., Tohyama, T., Enami, I., Ueki, M., Yajima, H., Ishii, T., Nakamura, H., Katayama, T., Takagi, J., & Fukai, F. (2002). Fibronectin peptides derived from two distinct regions stimulate adipocyte differentiation by preventing fibronectin matrix assembly. *Biochemistry*, *41*(9), 3270–3277. https://doi.org/10.1021/bi015660a

Kassem, M., & Marie, P. J. (2011). Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell*, *10*, 191–197. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00669.x

Keats, E. C., Dominguez 2nd, J. M., Grant, M. B., & Khan, Z. A. (2014). Switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates high glucose-induced adipogenesis. *Stem Cells*, *32*(6), 1649–1660. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Keats, E., & Khan, Z. A. (2012). Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and mesenchymal cells to high levels of glucose. *PLoS ONE*, *7*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038752

Klein, G., Müller, C. A., Tillet, E., Chu, M. L., & Timpl, R. (1995). Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: A strong cytoadhesive component. *Blood*, *86*(5), 1740–1748.

Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., & Scherer, P. E. (2022). Why does obesity cause diabetes? *Cell Metabolism*, *34*, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y.-H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, O., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*, *89*(5), 755–764.

Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, *5*, 1–17. https://doi.org/10.1177/2041731414557112

Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K. H., & Trajanoski, Z. (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, *8*, 1–15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-70

Larochette, N. (2017). *Evaluation de matrices extracellulaires décellularisées comme support de BMP-2 pour l'ingénierie tissulaire osseuse*. ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES.

Lee-Thedieck, C., Schertl, P., & Klein, G. (2022). The extracellular matrix of hematopoietic stem cell niches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *181*, 114069. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114069

Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., & Karsenty, G. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, *130*(3), 456–469. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047

Lefevre, E. (2016). *Caractérisation multimodale des propriétés de l'os cortical en croissance*. Ecole doctorale Sciences du Mouvement Humain, Université Aix-Marseille, France.

Legroux-Gérot, I., Vignau, J., Collier, F., & Cortet, B. (2008). Factors Influencing Changes in Bone Mineral Density in Patients with Anorexia Nervosa-Related Osteoporosis: The Effect of Hormone Replacement Therapy. *Calcified Tissue International*, *83*(5), 315–323. https://doi.org/10.1007/s00223-008-9173-y

Legroux-Gérot, I., Vignau, J., Viltart, O., Hardouin, P., Chauveau, C., & Cortet, B. (2019). Adipokines and bone status in a cohort of anorexic patients. *Joint Bone Spine*, *86*(1), 95–101. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.03.014

Lekkala, S., Taylor, E. A., Hunt, H. B., & Donnelly, E. (2019). Effects of Diabetes on Bone Material Properties. *Current Osteoporosis Reports*, *17*(6), 455–464. https://doi.org/10.1007/s11914-019-00538-6

Li, J., Niu, X., Si, Q., Song, Q., Jin, M., Zhou, R., Sun, Y., Li, J., & Wang, Q. (2021). Plasma periostin as a biomarker of osteoporosis in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *39*(4), 631–638. https://doi.org/10.1007/s00774-020-01200-3

Li, W., Wang, C., Zhang, M., Wu, J., Gu, Y., Deng, Y., Wang, J., Zhang, X., Feng, J., Chen, K., Zhu, J., Xie, J., & Zhang, J. (2018). Young and old adipocytes have differential influence on the development of osteoblasts. *Obesity Research and Clinical Practice*, *12*(6), 520–527. https://doi.org/10.1016/j.orcp.2018.06.006

Li, Y. M., Schilling, T., Benisch, P., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Limbert, C., Seufert, J., Kassem, M., Schütze, N., Jakob, F., & Ebert, R. (2007). Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *363*(1), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.161

Li, Z., Hardij, J., Bagchi, D. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2018). Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone*, *110*, 134–140. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.008.

Lin, D., Chun, T.-H., & Kang, L. (2016). Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochemical Pharmacology*, *119*, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.005

Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., & Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(May), 1–15. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757

Lin, Y., Berg, A. H., Iyengar, P., Lam, T. K. T., Giacca, A., Combs, T. P., Rajala, M. W., Du, X., Rollman, B., Li, W., Hawkins, M., Barzilai, N., Rhodes, C. J., Fantus, I. G., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2005). The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: The role of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 4617–4626. https://doi.org/10.1074/jbc.M411863200

Lindner, U., Kramer, J., Behrends, J., Driller, B., Wendler, N.-O., Boehrnsen, F., Rohwedel, J., & Schlenke, P. (2010). Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins. *Cytotherapy*, *12*(8), 992–1005. https://doi.org/10.3109/14653249.2010.510503

Liu, L. F., Shen, W. J., Ueno, M., Patel, S., & Kraemer, F. B. (2011). Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes. *BMC Genomics*, *12*. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-212

Liu, M., Miller, C. L., & Eaves, C. J. (2013). Human Long-Term Culture Initiating Cell Assay. In C. D. Helgason & C. L. Miller (Eds.), *Basic Cell Culture Protocols* (pp. 241–256). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_15

Liu, X., Long, X., Gao, Y., Liu, W., Hayashi, T., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Ogura, T., Onodera, S., Wang, D. O., & Ikejima, T. (2020). Type I collagen inhibits adipogenic differentiation via YAP activation in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, *235*, 1821–1837. https://doi.org/10.1002/jcp.29100

Louvet, L., Leterme, D., Delplace, S., Miellot, F., Marchandise, P., Gauthier, V., Hardouin, P., Chauveau, C., & Ghali Mhenni, O. (2020). Sirtuin 1 deficiency decreases bone mass and increases bone marrow adiposity in a mouse model of chronic energy deficiency. *Bone*, *136*(October 2019), 115361. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115361

Lucas, S., Clabaut, A., Ghali, O., Haren, N., Hardouin, P., & Broux, O. (2013). Implication of fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic differentiation. *Bone*, *55*(2), 429–430. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.04.010

Lucas, Stephanie, Tencerova, M., von der Weid, B., Andersen, T. L., Attané, C., Behler-Janbeck, F., Cawthorn, W. P., Ivaska, K. K., Naveiras, O., Podgorski, I., Reagan, M. R., & van der Eerden, B. C. J. (2021). Guidelines for Biobanking of Bone Marrow Adipose Tissue and Related Cell Types: Report of the Biobanking Working Group of the International Bone Marrow Adiposity Society. *Frontiers in Endocrinology*, *12*(September), 1–21. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.744527

Ma, W. Y., Li, H. Y., Hung, C. S., Lin, M. S., Chiu, F. C., Lin, C. H., Shih, S. R., Chuang, L. M., & Wei, J. N. (2009). Metabolic syndrome defined by IDF and AHA/NHLBI correlates better to carotid intima-media thickness than that defined by NCEP ATP III and WHO. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *85*(3), 335–341. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.06.020

Madel, M. B., Fu, H., Pierroz, D. D., Schiffrin, M., Winkler, C., Wilson, A., Pochon, C., Toffoli, B., Taïeb, M., Jouzeau, J. Y., Gilardi, F., Ferrari, S., Bonnet, N., Blin-Wakkach, C., Desvergne, B., & Moulin, D. (2021). Lack of Adiponectin Drives Hyperosteoclastogenesis in Lipoatrophic Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.627153

Małkiewicz, A., & Dziedzic, M. (2012). Bone marrow reconversion - Imaging of physiological changes in bone marrow. *Polish Journal of Radiology*, *77*(4), 45–50. https://doi.org/10.12659/PJR.883628

Mao, Y., & Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*, *24*(6), 389–399. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.06.008

Marie, P., & Halbout, P. (2008). OPG/RANKL: Role and therapeutic target in osteoporosis. *Medecine/Sciences*, *24*(1), 105–109. https://doi.org/10.1051/medsci/2008241105

Mariman, E. C. M., & Wang, P. (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(8), 1277–1292.

https://doi.org/10.1007/s00018-010-0263-4

Marinkovic, M., Tran, O. N., Block, T. J., Rakian, R., Gonzalez, A. O., Dean, D. D., Yeh, C. K., & Chen, X. D. (2020). Native extracellular matrix, synthesized ex vivo by bone marrow or adipose stromal cells, faithfully directs mesenchymal stem cell differentiation. *Matrix Biology Plus*, *8*, 100044. https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100044

Masamoto, Y., Arai, S., Sato, T., Kubota, N., Takamoto, I., Kadowaki, T., & Kurokawa, M. (2017). Adiponectin Enhances Quiescence Exit of Murine Hematopoietic Stem Cells and Hematopoietic Recovery Through mTORC1 Potentiation. *Stem Cells*, *35*(7), 1835–1848. https://doi.org/10.1002/stem.2640

Mattiucci, D., Maurizi, G., Izzi, V., Cenci, L., Ciarlantini, M., Mancini, S., Mensà, E., Pascarella, R., Vivarelli, M., Olivieri, A., Leoni, P., & Poloni, A. (2018). Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(2), 1500–1511. https://doi.org/10.1002/jcp.26037

Mauvais-Jarvis, F., Manson, J. A. E., Stevenson, J. C., & Fonseca, V. A. (2017). Menopausal hormone therapy and type 2 diabetes prevention: Evidence, mechanisms, and clinical implications. *Endocrine Reviews*, *38*(3), 173–188. https://doi.org/10.1210/er.2016-1146

Merle, B., & Garnero, P. (2012). The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporosis International*, *23*(4), 1199–1212. https://doi.org/10.1007/s00198-011-1892-7

Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C., & Phillips, S. A. (2013). Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*, *2*(4), 217–226. https://doi.org/10.4161/adip.24953

Mieczkowska, A., Millar, P., Chappard, D., Gault, V. A., & Mabilleau, G. (2020). Dapagliflozin and Liraglutide Therapies Rapidly Enhanced Bone Material Properties and Matrix Biomechanics at Bone Formation Site in a Type 2 Diabetic Mouse Model. *Calcified Tissue International*, *107*(3), 281–293. https://doi.org/10.1007/s00223-020-00720-4

Miggitsch, C., Meryk, A., Naismith, E., Pangrazzi, L., Ejaz, A., Jenewein, B., Wagner, S., Nägele, F., Fenkart, G., Trieb, K., Zwerschke, W., & Grubeck-Loebenstein, B. (2019). Human bone marrow adipocytes display distinct immune regulatory properties. *EBioMedicine*, *46*, 387–398. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.023

Miller, S. C., & Jee, W. S. S. (1987). The bone lining cell: A distinct phenotype? *Calcified Tissue International*, *41*(1), 1–5. https://doi.org/10.1007/BF02555122

Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., & Hirata, M. (2017). Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochemical Pharmacology*, *132*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.001

Moitra, J., Mason, M. M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Feigenbaum, L., Lee, E., Aoyama, T., Eckhaus, M., Reitman, M. L., & Vinson, C. (1998). Life without white fat: A transgenic mouse. *Genes and Development*, *12*(20), 3168–3181. https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3168

Moldes, M., Zuo, Y., Morrison, R. F., Silva, D., Park, B.-H., Liu, J., & Farmer, S. R. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor γ suppresses Wnt/β-catenin signalling during adipogenesis. *Biochemical Journal*, *376*(3), 607–613. https://doi.org/10.1042/bj20030426

Mor-Yossef Moldovan, L., Lustig, M., Naftaly, A., Mardamshina, M., Geiger, T., Gefen, A., & Benayahu, D. (2018). Cell shape alteration during adipogenesis is associated with coordinated matrix cues. *Journal of Cellular Physiology*, 1–14. https://doi.org/10.1002/jcp.27157

Morandi, E. M., Verstappen, R., Zwierzina, M. E., Geley, S., Pierer, G., & Ploner, C. (2016). ITGAV and ITGA5 diversely regulate proliferation and adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/srep28889

Morgan, S., Poundarik, A. A., & Vashishth, D. (2015). Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties? *Calcified Tissue International*, *97*(3), 281–291. https://doi.org/10.1007/s00223-015-0016-3

Mori, S., Kiuchi, S., Ouchi, A., Hase, T., & Murase, T. (2014). Characteristic expression of extracellular matrix in subcutaneous adipose tissue development and adipogenesis; Comparison with visceral adipose tissue. *International Journal of Biological Sciences*, *10*(8), 825–833. https://doi.org/10.7150/ijbs.8672

Moseley, K. F., Doyle, M. E., & Jan De Beur, S. M. (2018). Diabetic serum from older women increases adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Endocrine Research*, *43*(3), 155–165. https://doi.org/10.1080/07435800.2018.1441868

Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*, 771–785. https://doi.org/10.1038/nrm3902

Muruganandan, S., Ionescu, A. M., & Sinal, C. J. (2020). At the crossroads of the adipocyte and osteoclast differentiation programs: Future therapeutic perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072277

Muruganandan, S., Roman, A. A., & Sinal, C. J. (2010). Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, *25*(2), 222–234. https://doi.org/10.1359/jbmr.091106

Nam, H. K., Liu, J., Li, Y., Kragor, A., & Hatch, N. E. (2011). Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) protein regulates osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(45), 39059–39071. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221689

Napoli, N., Chandran, M., Pierroz, D. D., Abrahamsen, B., Schwartz, A. V., & Ferrari, S. L. (2017). Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*(4), 208–219. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.153

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Fahey, F., George, Q., Cancer, D. F., & Medical, H. (2009). Bone marrow adipocytes as negative regulators of the hematopoietic microenvironment. *Nature*, *460*(7252), 259–263. https://doi.org/10.1038/nature08099

Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R., & Portero-Otín, M. (2009). Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(12), 3071–3109. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2484

Ning, K., Liu, S., Yang, B., Wang, R., Man, G., Wang, D., & Xu, H. (2022). Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation. *Molecular Metabolism*, *58*. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101450

Nishitani, S., Fukuhara, A., Shin, J., Okuno, Y., Otsuki, M., & Shimomura, I. (2018). Metabolomic and microarray analyses of adipose tissue of dapagliflozin-treated mice, and effects of 3-hydroxybutyrate on induction of adiponectin in adipocytes. *Scientific Reports*, *8*(1), 8805. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27181-y

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C., & Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental Cell Research*, *314*(7), 1575–1584. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.022

Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E. B., Jones, K. L., Kawamori, R., Cassis, L. A., Tschöp, M. H., & Bruemmer, D. (2007). Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(10), 2877–2888. https://doi.org/10.1172/JCI31986

Noro, A., Sillat, T., Virtanen, I., Ingerpuu, S., Bäck, N., Konttinen, Y. T., & Korhonen, M. (2013). Laminin Production and Basement Membrane Deposition by Mesenchymal Stem Cells upon Adipogenic Differentiation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *61*(10), 719–730. https://doi.org/10.1369/0022155413502055

Okla, M., & Kassem, M. (2021). Thermogenic potentials of bone marrow adipocytes. *Bone*, *143*. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115658

Orimo, H. (2010). The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *Journal of Nippon Medical School*, *77*(1), 4–12. https://doi.org/10.1272/jnms.77.4

Ortner, D. J., & Turner-Walker, G. (2003). The Biology of Skeletal Tissues. In *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (2nd edition)* (pp. 11–35). https://doi.org/10.1016/B978-012528628-2/50039-9

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low / Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science*, *273*(5272), 242–245. https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242

Oshima, K., Nampei, A., Matsuda, M., Iwaki, M., Fukuhara, A., Hashimoto, J., Yoshikawa, H., & Shimomura, I. (2005). Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *331*(2), 520–526. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.210

Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., Ravussin, E., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2009). Adipose tissue collagen VI in obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(12), 5155–5162. https://doi.org/10.1210/jc.2009-0947

Patsch, J. M., Li, X., Baum, T., Yap, S. P., Karampinos, D. C., Schwartz, A. V, & Link, T. M. (2013). Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, *28*(8), 1721–1728. https://doi.org/10.1002/jbmr.1950

Pham, H. T., Kram, V., Dar, Q. A., Komori, T., Ji, Y., Mohassel, P., Rooney, J., Li, L., Kilts, T. M., Bonnemann, C., Lamande, S., & Young, M. F. (2020). Collagen VIα2 chain deficiency causes trabecular bone loss by potentially promoting osteoclast differentiation

through enhanced TNFα signaling. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70730-7

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143–147. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143

Poloni, A., Maurizi, G., Serrani, F., Mancini, S., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Cinti, S., Olivieri, A., & Leoni, P. (2013). Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Experimental Hematology*, *41*(6), 558-566.e2. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.02.005

Pope, B. D., Warren, C. R., Parker, K. K., & Cowan, C. A. (2016). Microenvironmental Control of Adipocyte Fate and Function. *Trends in Cell Biology*, *26*(10), 745–755. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.005

Qiu, Z. Y., Cui, Y., & Wang, X. M. (2019). Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. In *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes* (pp. 1–22). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1

Rharass, T., & Lucas, S. (2018). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Bone marrow adiposity and bone, a bad romance? *European Journal of Endocrinology*, *179*(4), R165–R182. https://doi.org/10.1530/EJE-18-0182

Rharass, T., & Lucas, S. (2019). High glucose level impairs human mature bone marrow adipocyte function through increased ROS production. *Frontiers in Endocrinology*. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00607

Rieg, T., & Vallon, V. (2018). Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetologia*, *61*(10), 2079–2086. https://doi.org/10.1007/s00125-018-4654-7.

Rinker, T. E., Hammoudi, T. M., Kemp, M. L., Lu, H., & Temenoff, J. S. (2014). Interactions between Mesenchymal Stem Cells, Adipocytes, and Osteoblasts in a 3D Tri-Culture Model of Hyperglycemic Conditions in the Bone Marrow Microenvironment. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, *6*(3), 324–337. https://doi.org/10.1039/c3ib40194d

Rogers, N. H., Li, J. W. P., Strissel, K. J., Obin, M. S., & Greenberg, A. S. (2009). Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology*, *150*(5), 2161–2168. https://doi.org/10.1210/en.2008-1405

Rolandsson Enes, S., Åhrman, E., Palani, A., Hallgren, O., Bjermer, L., Malmström, A., Scheding, S., Malmström, J., & Westergren-Thorsson, G. (2017). Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09127-y

Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*, *27*(8), 1229–1241. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(99)00061-2

Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., & MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science*, *289*(5481), 950–953. https://doi.org/10.1126/science.289.5481.950

Rossi, E., Guerrero, J., Aprile, P., Tocchio, A., Kappos, E. A., Gerges, I., Lenardi, C., Martin, I., & Scherberich, A. (2018). Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, *73*, 154–166. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.039

Rozario, T., & DeSimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology*, *341*(1), 126–140. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026

Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*, *22*, 95–106. https://doi.org/10.12659/msmbr.901142

Sadie-Van Gijsen, H., Crowther, N. J., Hough, F. S., & Ferris, W. F. (2013). The interrelationship between bone and fat: From cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(13), 2331–2349. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1211-2

Saito, M., & Marumo, K. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis International*, *21*(2), 195–214. https://doi.org/10.1007/s00198-009-1066-z

Sanches, C. P., Vianna, A. G. D., & Barreto, F. D. C. (2017). The impact of type 2 diabetes on bone metabolism. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *9*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s13098-017-0278-1

Sano, H., Orbay, H., Terashi, H., Hyakusoku, H., & Ogawa, R. (2014). Acellular adipose matrix as a natural scaffold for tissue engineering. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, *67*(1), 99–106. https://doi.org/10.1016/j.bjps.2013.08.006

Schäck, L. M., Noack, S., Winkler, R., Wißmann, G., Behrens, P., Wellmann, M., Jagodzinski, M., Krettek, C., & Hoffmann, A. (2013). The Phosphate Source Influences Gene Expression and Quality of Mineralization during In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, *8*(6), e65943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065943

Scheller, E. L., Cawthorn, W. P., Burr, A. A., Horowitz, M. C., & MacDougald, O. A. (2016). Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *27*(6), 392–403. https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.016

Scheller, E. L., Doucette, C. R., Learman, B. S., Cawthorn, W. P., Khandaker, S., Schell, B., Wu, B., Ding, S. Y., Bredella, M. A., Fazeli, P. K., Khoury, B., Jepsen, K. J., Pilch, P. F., Klibanski, A., Rosen, C. J., & MacDougald, O. A. (2015). Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nature Communications*, *6*, 1–13. https://doi.org/10.1038/ncomms8808

Scheller, E. L., Khandaker, S., Learman, B. S., Cawthorn, W. P., Anderson, L. M., Pham, H. A., Robles, H., Wang, Z., Li, Z., Parlee, S. D., Simon, B. R., Mori, H., Bree, A. J., Craft, C. S., & MacDougald, O. A. (2019). Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to β-adrenergic stimulation. *Bone*, *118*, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.01.016

Schwartz, A. V. (2016). Epidemiology of fractures in type 2 diabetes. *Bone*, *82*, 2–8. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.032

Schwarzbauer, J. E., & DeSimone, D. W. (2011). Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(7), 1–19. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005041

Shakouri-Motlagh, A., O'Connor, A. J., Brennecke, S. P., Kalionis, B., & Heath, D. E. (2017). Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 55, pp. 1–12). Acta Materialia Inc. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.014

Shao, X., Cao, X., Song, G., Zhao, Y., & Shi, B. (2014). Metformin rescues the MG63 osteoblasts against the effect of high glucose on proliferation. *Journal of Diabetes Research*. https://doi.org/10.1155/2014/453940

Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, *18*, 1–14. https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1

Somerville, J. M., Aspden, R. M., Armour, K. E., Armour, K. J., & Reid, D. M. (2004). Growth of C57Bl/6 Mice and the Material and Mechanical Properties of Cortical Bone from the Tibia. *Calcified Tissue International*, *74*(5), 469–475. https://doi.org/10.1007/s00223-003-0101-x

Sordi, M. B., Curtarelli, R. B., da Silva, I. T., Fongaro, G., Benfatti, C. A. M., de Souza Magini, R., & Cabral da Cruz, A. C. (2021). Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*(1), 1–9. https://doi.org/10.1007/s10856-020-06475-6

Straub, L. G., & Scherer, P. E. (2019). Metabolic Messengers: adiponectin. *Nature Metabolism*, *1*(3), 334–339. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0041-z

Suchacki, K. J., Tavares, A. A. S., Mattiucci, D., Scheller, E. L., Papanastasiou, G., Gray, C., Sinton, M. C., Ramage, L. E., McDougald, W. A., Lovdel, A., Sulston, R. J., Thomas, B. J., Nicholson, B. M., Drake, A. J., Alcaide-Corral, C. J., Said, D., Poloni, A., Cinti, S., Macpherson, G. J., … Cawthorn, W. P. (2020). Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis. *Nature Communications*, *11*(1), 3097. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16878-2

Tahara, A., Takasu, T., Yokono, M., Imamura, M., & Kurosaki, E. (2016). Characterization and comparison of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: Part 2. Antidiabetic effects in type 2 diabetic mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, *131*(3), 198–208. https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.06.004

Taipaleenmäki, H., Abdallah, B. M., AlDahmash, A., Säämänen, A. M., & Kassem, M. (2011). Wnt signalling mediates the cross-talk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations. *Experimental Cell Research*, *317*(6), 745–756. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.015

Takeshita, S., Fumoto, T., Naoe, Y., & Ikeda, K. (2014). Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(24), 16699–16710. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547919

Tencerova, M., Figeac, F., Ditzel, N., Taipaleenmäki, H., Nielsen, T. K., & Kassem, M. (2018). High-Fat Diet–Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and

Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(6), 1154–1165. https://doi.org/10.1002/jbmr.3408

Tencerova, M., & Kassem, M. (2016). The bone marrow-derived stromal cells: Commitment and regulation of adipogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00127

Thrailkill, K. M., Bunn, R. C., Uppuganti, S., Ray, P., Garrett, K., Popescu, I., Pennings, J. S., Fowlkes, J. L., & Nyman, J. S. (2020). Genetic ablation of SGLT2 function in mice impairs tissue mineral density but does not affect fracture resistance of bone. *Bone*, *133*(2019), 115254. https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115254

Toth, M. J., Tchernof, A., Sites, C. K., & Poehlman, E. T. (2000). Menopause-Related Changes in Body Fat Distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *904*(1), 502–506. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06506.x.

Trayhurn, P., & Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, *60*(3), 329–339. https://doi.org/10.1079/pns200194

Tsai, K. S., Kao, S. Y., Wang, C. Y., Wang, Y. J., Wang, J. P., & Hung, S. C. (2010). Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *94*(3), 673–682. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32693

Tuljapurkar, S. R., Mcguire, T. R., Brusnahan, S. K., Jackson, J. D., Garvin, K. L., Kessinger, M. A., Lane, J. T., O'Kane, B. J., & Sharp, J. G. (2011). Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *Journal of Anatomy*, *219*(5), 574–581. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01423.x

van Beek, E. A., Bakker, A. H., Kruyt, P. M., Hofker, M. H., Saris, W. H., & Keijer, J. (2007). Intra- and interindividual variation in gene expression in human adipose tissue. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *453*(6), 851–861. https://doi.org/10.1007/s00424-006-0164-4

van Gastel, N., & Carmeliet, G. (2021). Metabolic regulation of skeletal cell fate and function in physiology and disease. *Nature Metabolism*, *3*(1), 11–20. https://doi.org/10.1038/s42255-020-00321-3

Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, *17*(3), 319–336. https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9

Villareal, D. T., Apovian, C. M., Kushner, R. F., & Klein, S. (2005). Obesity in older adults: Technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, the Obesity Society. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(5), 923–934. https://doi.org/10.1038/ajcn/82.5.923

Vimalraj, S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, *754*(June), 144855. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855

Waddington, R., Roberts, H., Sugars, R., & Schönherr, E. (2003). Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *European Cells and Materials*, *6*(0), 12–21. https://doi.org/10.22203/eCM.v006a02

Wan, Y., Chong, L. W., & Evans, R. M. (2007). PPAR-γ regulates osteoclastogenesis in mice. *Nature Medicine*, *13*(12), 1496–1503. https://doi.org/10.1038/nm1672

Wang, A., Midura, R. J., Vasanji, A., Wang, A. J., & Hascall, V. C. (2014). Hyperglycemia diverts dividing osteoblastic precursor cells to an adipogenic pathway and induces synthesis of a hyaluronan matrix that is adhesive for monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(16), 11410–11420. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.541458

Wang, D., Haile, A., & Jones, L. C. (2013). Dexamethasone-induced lipolysis increases the adverse effect of adipocytes on osteoblasts using cells derived from human mesenchymal stem cells. *Bone*, *53*(2), 520–530. https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.009

Wang, J. Y., Cheng, Y. Z., Yang, S. L., An, M., Zhang, H., Chen, H., & Yang, L. (2019). Dapagliflozin Attenuates Hyperglycemia Related Osteoporosis in ZDF Rats by Alleviating Hypercalciuria. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(November), 1–14. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00700

Wang, L., Johnson, J. A., Zhang, Q., & Beahm, E. K. (2014). Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *9*(11), 8921–8931. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.035

Wang, W., Zhang, X., Zheng, J., & Yang, J. (2010). High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *338*(1–2), 115–122. https://doi.org/10.1007/s11010-009-0344-6

Wang, X., Shen, X., Li, X., & Mauli Agrawal, C. (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, *31*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00697-4

Wang, Xiaowei, Liu, J., Wang, Z., Huang, Y., Liu, W., Zhu, X., Cai, Y., Fang, X., Lin, S., Yuan, L., & Ouyang, G. (2013). Periostin Contributes to the Acquisition of Multipotent Stem Cell-Like Properties in Human Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *8*(8), e72962. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072962

Wang, Y. H., Liu, Y., Maye, P., & Rowe, D. W. (2006). Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnology Progress*, *22*(6), 1697–1701. https://doi.org/10.1021/bp060274b

Wang, Y., Wang, W., & Qiu, E. (2017). SPOCK1 promotes the growth of Osteosarcoma cells through mTOR-S6K signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *95*, 564–570. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.116

Weil, B. R., Abarbanell, A. M., Herrmann, J. L., Wang, Y., & Meldrum, D. R. (2009). High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *296*(6), 1735–1743. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90876.2008

Wen, Y., Yang, H., Wu, J., Wang, A., Chen, X., Hu, S., Zhang, Y., Bai, D., & Jin, Z. (2019). COL4A2 in the tissue-specific extracellular matrix plays important role on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *Theranostics*, *9*(15), 4265–4286. https://doi.org/10.7150/thno.35914

Westendorf, J. J., Kahler, R. A., & Schroeder, T. M. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, *341*, 19–39. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.044

Wright, E. M., Loo, D. D. F., & Hirayama, B. A. (2011). Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews*, *91*(2), 733–794. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2009

Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Li, X., McKnight, J. R., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism : implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, *40*(4), 42. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z.Proline

Wu, S. I., Chou, P., & Tsai, S. T. (2001). The impact of years since menopause on the development of impaired glucose tolerance. *Journal of Clinical Epidemiology*, *54*(2), 117–120. https://doi.org/10.1016/S0895-4356(00)00284-5

Xu, L., Nagata, N., Nagashimada, M., Zhuge, F., Ni, Y., Chen, G., Mayoux, E., Kaneko, S., & Ota, T. (2017). SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice. *EBioMedicine*, *20*, 137–149. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.028

Yang, Y., Zhang, Y., Zhou, X., Chen, D., Ouyang, G., Liu, Y., & Cui, D. (2021). Periostin deficiency attenuates lipopolysaccharide- and obesity-induced adipose tissue fibrosis. *FEBS Letters*, *595*(16), 2099–2112. https://doi.org/10.1002/1873-3468.14154

Ye, Z., Chen, J., Hu, X., Yang, S., Xuan, Z., Lu, X., & Zhao, Q. (2020). SPOCK1: a multi-domain proteoglycan at the crossroads of extracellular matrix remodeling and cancer development. *American Journal of Cancer Research*, *10*(10), 3127–3137.

Young, D. A., Ibrahim, D. O., Hu, D., & Christman, K. L. (2011). Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. *Acta Biomaterialia*, *7*(3), 1040–1049. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.035

Yu, E., Greenblatt, L., Eajazi, A., Torriani, M., & Bredella, M. (2017). Marrow adipose tissue composition in adults with morbid obesity. *Bone*, *97*, 38–42. https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.12.018

Yunus Basha, R., Sampath Kumar, T. S., & Doble, M. (2015). Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *57*, 452–463. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016

Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X. (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *151*, 1224–1239. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169

Zhang, J., Ma, Z., Yan, K., Wang, Y., Yang, Y., & Wu, X. (2019). Matrix Gla Protein Promotes the Bone Formation by Up-Regulating Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. *Frontiers in Endocrinology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00891

Zhang, Y., & Yang, J. H. (2013). Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*(11), 2595–2602. https://doi.org/10.1002/jcb.24607

Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., Wang, G., & Zou, W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, *9*(1), 11–19. https://doi.org/10.1038/cmi.2011.47

Zhou, B. O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J. J., Naveiras, O., & Morrison, S. J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and hematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*, *19*(8), 891–903. https://doi.org/10.1038/ncb3570

Zhu, L., Xu, Z., Li, G., Wang, Y., Li, X., Shi, X., & Lin, H. (2019). Marrow adiposity as an indicator for insulin resistance in postmenopausal women with newly diagnosed type 2 diabetes – an investigation by chemical. *European Journal of Radiology*, *113*(January), 158–164. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2019.02.020

Zizola, C. F., Julianelli, V., Bertolesi, G., Yanagishita, M., & Calvo, J. C. (2007). Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes. *Matrix Biology*, *26*(6), 419–430. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.04.002

ANNEXES

ANNEXE 1 : Description des adipocytes extra-médullaires……..208

ANNEXE 2 : Les différentes classes de collagènes……209

ANNEXE 3 : Les différentes familles de protéoglycanes (PG) et leur glycosaminoglycanes (GAG)…….210

ANNEXE 1 : Description des adipocytes extra-médullaires

	Origine	Localisation	Morphologie	Fonctions	Références
Adipocytes dits « blancs »	- embryonnaire - origine controversée	- au niveau des organes viscéraux (VAT), - au niveau sous-cutané (SCAT)	- uniloculaire - noyau et autres organiques repoussés contre la membrane plasmique	- site majeur de stockage d'énergie sous la forme de triglycérides (lipogénèse) et de libération des acides gras - sécrétion hormonale - participe à l'homéostasie métabolique, les processus inflammatoires et l'homéostasie vasculaire	(Gesta *et al.*, 2007) (Y. Chen *et al.*, 2016) (Trayhurn & Beattie, 2001)
Adipocytes dits « bruns »	- embryonnaire	- surtout présent chez les nouveaux nés, diminue après la naissance - au niveau supra-claviculaire - au niveau de la nuque	- multiloculaires - nombreuses mitochondries - plus petits que les adipocytes blancs	- site de la thermogénèse sans frisson, dépendant du transporteur UCP-1, spécifique des adipocytes bruns - oxydation des acides gras	(Y. Chen *et al.*, 2016) (Gesta *et al.*, 2007).
Adipocytes dits « beige » ou BRITE	- issus des adipocytes blancs ?	- au niveau du tissu adipeux blanc	- multiloculaires - nombreuses mitochondries	Assure des fonctions thermogéniques, de façon dépendante et indépendante de UCP-1 - oxydation des acides gras	(Y. Chen *et al.*, 2016)

ANNEXE 2 : Les différentes classes de collagènes

D'après (Mouw *et al.*, 2014)

Classes	Type de collagènes	Description
Collagènes fibrillaires	types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII	- structure la plus simple - un seul domaine triple-hélicoïdal
FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices)	types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII	- plusieurs domaines triple-hélicoïdaux - formation de ponts moléculaires - associés aux fibrilles du collagène de type I ou du collagène de type II
Collagène de la membrane basale	type IV	- forme un réseau avec la laminine et les autres protéines de la membrane basale.
Collagène à longue chaîne	type VII	- fibrille associée à la membrane basale.
Collagène filamenteux	type VI	- microfibrilles « perlées »
Collagène à courtes chaines	types VIII et X	- treillage hexagonal
Multiplexes	types XV et XVIII	- présence de GAG au niveau des domaines triple-hélicoïdaux
MACIT (Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices)	types XIII, XVII et XXIII	- à la surface de la cellule - domaines extra-cellulaires, membranaires et intracellulaires

ANNEXE 3 : Les différentes familles de protéoglycanes (PG) et leur glycosaminoglycanes (GAG)

D'après (Larochette, 2017)

Quelques exemples de protéoglycanes et de leur GAG, ainsi que leur fonction et leur localisation.

Famille	PG	GAG	Fonction	Localisation
PG des granules sécrétoires	Serglycine	- Héparine - Sulfate de Chondroïtine (SC)		Cellules endothéliales et hématopoïétiques
PG associés aux membranes	Syndécane Glypicane	- Syndécane 1 et 3 : SC & Sulfate d'Héparane (SH) - Syndécane 2 et 4 : SH	Transduction de signaux Régulation de voies de signalisation (Wnt, FGF, BMP)	
PG de la membrane basale	Perlécane Collagène de type XVIII	- SH ou SH & SC - SH	Séparation des tissus	
SLRP	Biglycane, Décorine Lumican	- SC - Sulfate de Dermatane (SD) - Sulfate de Kératane	Stabilisation et organisation des fibres de collagènes	Tendons Cornée
PG de Type hyalectanes / lecticanes	Versicane	-Domaine N-terminal qui peut lier l'hyaluronane. - Les SC et SD sont attachés au domaine central	Stabilisation et organisation des fibres de collagènes	Os Adipocytes

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DES ADIPOCYTES MEDULLAIRES : CARACTERISATION ET IMPACT SUR L'OSTEOBLASTOGENESE ET LA MINERALISATION DANS LE CONTEXTE DE L'OSTEOPOROSE

L'adiposité médullaire constitue un nouveau tissu adipeux d'intérêt dans les physiopathologies osseuses. Une augmentation du nombre d'adipocytes médullaires (AM) est associée à la fragilité et à la perte osseuse retrouvée dans différentes formes d'ostéoporose dont celles de la ménopause et du diabète de type 2. L'adipogénèse peut entrer en compétition avec l'ostéoblastogénèse, puisque les AM et les ostéoblastes sont issus du même progéniteur, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les AM sécrètent des facteurs pouvant stimuler l'ostéoclastogénèse, la résorption osseuse, et inhiber l'ostéoblastogénèse, la formation osseuse, induisant un déséquilibre de l'homéostasie osseuse. De plus, une augmentation de l'adiposité médullaire est observée dans la fragilité osseuse associée au diabète de type 2 et est corrélée au taux d'hémoglobine glyquée, un marqueur plasmatique d'une hyperglycémie chronique non contrôlée. La matrice extra-cellulaire (MEC) des AM est peu caractérisée et son impact sur les ostéoblastes n'a jamais été évalué dans ce contexte. Nous avons donc testé si la MEC des AM est altérée par l'exposition à une forte concentration en glucose *in vitro* par l'emploi de CSM humaines médullaires et si, une fois dévitalisée, elle impacte la prolifération des CSM, la différenciation ostéoblastique et la minéralisation à une concentration physiologique et physiopathologique de glucose. Nos résultats démontrent que les MEC dévitalisées améliorent l'adhésion et la prolifération des CSM sans modifier l'ostéoblastogénèse, quelle que soit la concentration de glucose employée au cours de la génération des MEC adipocytaires ou de la différenciation ostéoblastique. En revanche la quantité et la qualité du minéral produit est altérée par les matrices adipocytaires ainsi que par la concentration en glucose. Ce premier travail est poursuivi par la caractérisation des MEC adipocytaires par plusieurs approches complémentaires. Une première caractérisation génique des AM obtenus par différenciation de CSM humaines *in vitro* met en évidence la production d'une MEC spécifique qui diffère de celle produite par les cellules à proximité : les CSM et les ostéoblastes, sans impact de la concentration en glucose. La qualité et la composition moléculaires des MEC sont évaluées par spectroscopie RAMAN, révélant des modifications liées à la forte concentration en glucose, avec notamment davantage de protéoglycanes à motifs chondroïtine sulfate. Ces résultats sont confirmés par l'analyse des AM isolés des os de deux modèles : le modèle d'ovariectomie murin, un modèle classique mimant la ménopause avec le développement d'une obésité et d'un état pré-diabétique ; et un modèle clinique de femmes post-ménopausées souffrant de gonarthrose nécessitant la pose d'une prothèse totale de genou et caractérisées sur le plan métabolique. Enfin, l'impact de la modulation de la glycémie dans le modèle d'ovariectomie sur le tissu osseux et le micro-environnement médullaire, dont les AM, a également commencé à être étudié avec le suivi de l'évolution de l'adiposité médullaire et de la quantité / qualité osseuse au cours d'un traitement avec une molécule hypoglycémiante (inhibiteur de SGLT2). En conclusion, les MEC adipocytaires induisent des altérations au niveau de la minéralisation des ostéoblastes, participant donc au développement d'une fragilité osseuse dans l'ostéoporose et le diabète de type 2.

Adipocytes médullaires, Matrice Extra-cellulaire, Glucose, Ostéoblastes, Minéralisation, Dévitalisation

BONE MARROW ADIPOCYTES EXTRACELLULAR MATRIX : CHARACTERIZATION AND IMPACT ON OSTEOBLASTOGENESIS AND MINERALIZATION IN THE CONTEXT OF OSTEOPOROSIS

Bone marrow adiposity is a new adipose tissue of interest in bone pathophysiology. An increase of bone marrow adipocytes (BMAds) is associated with the fragility and bone loss found in different forms of osteoporosis including that of menopause and type 2 diabetes. Adipogenesis can compete with osteoblastogenesis, since BMAds and osteoblasts originate from the same progenitor, mesenchymal stem cells (MSCs). BMAds can release various factors which stimulate osteoclastogenesis, bone resorption, and inhibit osteoblastogenesis, bone formation, inducing an imbalance in bone homeostasis. Besides, an increase in medullar adiposity is observed in bone fragility associated with type 2 diabetes and is correlated with the level of glycated hemoglobin, a plasma marker of chronic uncontrolled hyperglycemia. The extra-cellular matrix (ECM) of BMAds is poorly characterized and its impact on osteoblast has never been assessed in hyperglycemic context. We thus tested whether the ECM of AM is altered by exposure to a high concentration of glucose *in vitro* using human bone marrow MSCs and whether, once devitalized, it impacts MSCs proliferation, osteoblastogenesis and mineralization capacity at physiological or pathophysiological concentration of glucose. Our results demonstrates that devitalized BMAds ECM enhance the adhesion and proliferation of MSCs without modifying osteoblastogenesis, regardless of the glucose concentration used during the generation of BMAds ECM or osteoblastic differentiation *in vitro*. However the mineralization quantity and quality is altered, regarding Raman spectroscopy analysis, by the ECM and the glucose concentration. This first work is continued by the characterization of BMAds ECM by several complementary approaches. Using a first gene expression characterization, *in vitro* MSCs-derived BMAds exhibit a different ECM composition compared to osteoblast and MSCs regarding gene expression, without any impact of the glucose concentration. The molecular quality and composition of BMAds ECM are assessed by RAMAN spectroscopy and reveal modifications according to the high glucose concentration, with in particular more proteoglycans with chondroitin sulfate motifs. These results are confirmed by the analysis of BMAds isolated from the bones of two models : the mouse ovariectomy, a classic model mimicking menopause with the development of obesity and a pre-diabetic state ; and a clinical model of post-menopausal women with knee osteoarthritis requiring a total knee prosthesis and characterized at the metabolic level. Finally, the impact of glycaemia modulation in the ovariectomy model on bone tissue and the marrow microenvironment including BMAds has also begun to be studied with the study of the evolution of medullar adiposity and bone quantity / quality during a treatment with a hypoglycemic molecule (SGLT2 inhibitor). In conclusion, BMAds ECM induce alterations in osteoblasts mineralization, thus contributing to the development of bone fragility in osteoporosis and type 2 diabetes.

Bone Marrow Adipocytes, Extra-cellular Matrix, Glucose, Osteoblasts, Mineralization, Devitalization