

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS  
UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS

# FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Thèse  
pour le  
DOCTORAT EN MEDECINE  
Diplôme d'état

*par*

**Mathilde MONSEU**  
née le 06 Mai 1985 à Paris

*Présentée et soutenue publiquement le 26 Octobre 2015*

---

**Associations entre le tissu adipeux viscéral,  
la stéatose hépatique, l'athérosclérose et  
l'ostéoprotégérine plasmatique chez des sujets  
souffrant de syndrome métabolique**

---

**Jury :**

Monsieur le Professeur	Thierry	CONSTANS
Monsieur le Professeur	<u>Pierre-Henri</u>	<u>DUCLUZEAU</u>
Monsieur le Professeur	François	MAILLOT
Madame le Docteur	Lise	CRINIERE

# Associations entre le tissu adipeux viscéral, la stéatose hépatique, l'athérosclérose et l'ostéoprotégérine plasmatique chez des sujets souffrant de syndrome métabolique

## Résumé

**Introduction** L'obésité et le syndrome métabolique sont souvent accompagnés d'une augmentation du tissu adipeux viscéral et de la stéatose hépatique. Ces deux phénomènes conduisent à une augmentation du risque cardio-vasculaire. Cependant, l'association entre le tissu adipeux viscéral, le contenu lipidique du foie, et l'ostéoprotégérine (OPG) chez les sujets dysmétaboliques est peu décrite. L'objectif de notre étude est de déterminer l'association entre le tissu adipeux viscéral, la teneur lipidique du foie et d'autres marqueurs du syndrome métabolique (*i.e.* hypertension artérielle, dyslipidémie et insulino-résistance) avec l'ostéoprotégérine chez des patients souffrant de syndrome métabolique.

**Patients et Méthodes** 314 sujets de la cohorte NUMEVOX, présentant au moins un critère de syndrome métabolique, ont été inclus. Chaque patient a bénéficié d'une évaluation métabolique et cardio-vasculaire détaillée incluant une évaluation de la rigidité artérielle, du score de plaque, un calcul du score d'insulino-résistance HOMA, un dosage des enzymes hépatiques, de la ferritine, une mesure du tour de taille et une évaluation de l'IMC. L'ostéoprotégérine plasmatique a été dosée par une technique ELISA. Le tissu adipeux viscéral et le contenu lipidique du foie ont été évalués par IRM chez un sous-groupe de 140 patients. La rigidité artérielle et le score de plaque étaient évalués par échographie doppler. Les corrélations ont ensuite été calculées, avec un ajustement sur l'âge et le genre.

**Résultats** Cette étude a permis de montrer que l'IMC, le tour de taille et le tissu adipeux viscéral évalué par IRM étaient associés à l'ostéoprotégérine, contrairement au tissu adipeux sous-cutané. Le contenu lipidique du foie était associé à l'ostéoprotégérine, de même que les ALAT, les  $\gamma$ -GT, la ferritine et les triglycérides. L'indice d'insulino-résistance HOMA était formellement corrélé à l'ostéoprotégérine, tout comme les dosages de leptine et d'adiponectine. L'ostéoprotégérine était également corrélée à la rigidité artérielle et au score de plaque.

**Conclusion** L'ostéoprotégérine plasmatique est associée positivement au tissu adipeux viscéral et à la stéatose hépatique, ainsi qu'à l'insulino-résistance et aux adipokines. L'association significative entre l'ostéoprotégérine et la plupart des composants du syndrome métabolique suggère un lien entre cette hormone et les complications vasculaires associées au syndrome métabolique.

**Mots clés** Ostéoprotégérine, syndrome métabolique, stéatose hépatique, tissu adipeux viscéral, risque vasculaire.

# Associations between visceral adipose tissue, liver steatosis, atherosclerosis and plasma osteoprotegerin levels in dysmetabolic adults

## Abstract

**Introduction:** Obesity and metabolic syndrome are accompanied by increased visceral adipose tissue as well as liver steatosis, both leading to increased cardiovascular risk. High plasma osteoprotegerin has been recently associated with cardiovascular diseases. However, less is known about the associations between visceral adipose tissue (VAT), liver fat content (LF) and plasma osteoprotegerin (OPG) in dysmetabolic subjects. The objective is to determine the association between VAT, LF, and other markers of metabolic syndrome (*i.e.* hypertension, dyslipidemia and insulin resistance) and OPG in dysmetabolic adults.

**Patients and methods:** 314 subjects from the NUMEVOX cohort were included on the basis of at least one metabolic syndrome criterion. They underwent a thorough metabolic and cardiovascular evaluation including: arterial stiffness and atherosclerotic plaques, HOMA insulin resistance index (HOMA-IR), liver enzymes, ferritin, waist circumference and BMI. Plasma OPG were assessed by Elisa technique. Visceral adipose tissue and liver fat content were measured by magnetic resonance imaging in a subgroup of 140 patients. Ultrasound examination of arteries and arterial stiffness (pulse wave velocity) were recorded. Age and gender adjusted paired correlation were calculated.

**Results:** BMI, waist circumference, and MRI-based VAT correlated with OPG ( $r=0.19$ ,  $p=0.006$ ;  $r=0.18$ ,  $p=0.001$ ;  $r=0.24$ ,  $p=0.004$  respectively) while subcutaneous fat did not correlated. Liver fat content correlated with OPG ( $r=0.25$ ,  $p=0.003$ ) as well as ALT ( $r=0.39$ ,  $p<0.001$ ),  $\gamma$ -GT ( $r=0.35$ ,  $p<0.001$ ), ferritinemia ( $r=0.18$ ,  $p=0.002$ ) and triglyceridemia ( $r=0.17$ ,  $p=0.004$ ). HOMA-IR was strongly correlated with OPG ( $r=0.39$ ,  $p<0.0001$ ), as well as leptinemia ( $r=0.28$ ,  $p<0.0001$ ) and adiponectinemia ( $r=-0.12$ ,  $p=0.05$ ). Plasma OPG correlated to arterial stiffness ( $r=0.19$ ,  $p=0.04$ ). In the whole cohort OPG correlated weakly with the number of atherosclerotic sites ( $r=0.12$ ,  $p=0.03$ ).

**Conclusion:** Plasma OPG levels were positively associated with VAT and liver steatosis, as well as insulin resistance and adipokines. The significant association between OPG and some of the major components of the metabolic syndrome suggests a possible link with the vascular complications associated to the metabolic syndrome.

**Key words:** Osteoprotegerin, metabolic syndrome, fatty liver, visceral adipose tissue, vascular risk.

## Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté,  
de mes chers condisciples  
et selon la tradition d'Hippocrate,  
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur  
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,  
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admise dans l'intérieur des maisons, mes yeux  
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira  
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas  
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueuse et reconnaissante envers mes Maîtres,  
je rendrai à leurs enfants  
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime  
si je suis fidèle à mes promesses.  
Que je sois couverte d'opprobre  
et méprisée de mes confrères  
si j'y manque.

## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Ducluzeau,**

Qui me fait l'honneur de diriger ce travail et de présider ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide, votre soutien tout au long de cette expérience.

**A Monsieur le Professeur Constans,**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Je vous remercie de m'avoir fait découvrir votre métier de Gériatre.

**A Monsieur le Professeur Maillot,**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.

**A Madame le Docteur Crinière,**

Tu me fais l'honneur de juger ce travail.

Mes sincères remerciements pour l'intérêt porté à ce travail mais surtout pour m'avoir enseigné l'endocrinologie au lit du malade.

Je remercie Mme Anne-Marie Vauchelles de m'avoir prouvé qu'on peut vivre heureuse de sa curiosité et de m'avoir attirée dans cette voie.

Je remercie le Dr Maxime Chireux d'avoir entretenu la flamme de cette curiosité et de l'avoir cadrée pour coller avec l'esprit de l'Ecole. Il n'est jamais trop tard pour devenir médecin !

Je remercie le Pr Anne Barlier de m'avoir accueillie dans son équipe et autorisée quelques aller-retour éclairs Marseille-Lyon, alors même que les souris avaient besoin de moi. Sans vous, sans vos conseils, sans votre appui, je ne serais pas là aujourd'hui !

Merci aux BioGeeK de maintenir mes neurones en éveil. Merci pour les échanges, l'émulation, l'humour. Merci de me comprendre.

Merci Jess de m'avoir offert l'opportunité de vivre sur une autre planète ! C'est agréable de gratter un peu la pellicule sur le dessus et de se rendre compte de l'étendue des connaissances qui était juste là. Quand tu veux, on repart faire des trous astro-biologiques !

Merci au service d'endocrinologie du CHR Orléans de me rappeler souvent que le travail en équipe est possible et agréable. Vous contribuez à construire le médecin que je veux être : membre d'une équipe pluri-disciplinaire !

Merci Widad pour nos tête-à-tête pédalo ! Ta présence et ton écoute m'ont souvent permis de me maintenir hors de l'eau.

Merci à mes co-internes des ces 4 années à arpenter les hopitaux de Bourges, Orléans, Poitiers et Tours. Merci à Nathalie, Stéph, et Camille de m'avoir supportée au jour le jour pendant cette rédaction. A Choupette ! Ma Padawan !

Merci à Franck F. Vous m'avez appris l'importance de tout un pan de mon métier, et pas des moindres : la patience, l'écoute, la disponibilité.

"Il s'en balance complètement. Il [...] se sent bien dans sa peau quand il rêve assis sur son rocher".

Merci aux patients que j'ai croisés, soutenus, accompagnés durant cet internat. Vous êtes ma motivation pour avancer !

Merci Marianne, d'être là, d'être toi, et de savoir raviver mon rêve de Maison des Bisounours aux moments opportuns. Tu es une soignante formidable !

Merci à Yab et Flo de m'avoir tenue vivante.

*"Avec eux j'ai moins de failles, avec eux j'me sens de taille".*

Merci à Marine, Fabien, Gwen, Pierre, Flo, Perrine, Yab, Marie-Ca, Airelle, Yann, François, Hélène, Agnès et Arthur.

*" On a su dès nos débuts qu'y avait quelque chose de spécial  
Mes lascars m'ont convaincu que leur présence m'était cruciale  
Alors on se souffle dans le dos pour se porter les uns les autres"*

Merci Line ! J'adore toutes tes questions ! Tu vois, Linou, c'est maintenant que j'arrête d'aller à l'école !

Les liens tissés durant toutes ces années dans mes différents mondes, associatifs ou professionnels, sont tellement nombreux, divers et riches qu'il m'est impossible de remercier chacun nommément. Néanmoins :  
Merci à toi, pour nos expériences et discussions ! Tu me portes !

\*\*\*\*\*

Merci Martin ! Tu as su dompter le dragon, je crois.

Merci Vati ! Merci Mutti ! Cette page serait trop courte pour lister tout ce que vous m'avez apporté !  
Bisoux de VGFCPQVAEVA !  
A demain au petit-déj' !

Merci à Nico et Boun. Merci de vivre vos rêves !

Merci Nico pour les Petits Musclés et les Danettes si bien cachés, pour les toiles d'araignées et les tours en cartons au milieu du salon, pour ton intervention concernant le varan sur les ondes publiques, pour les paris et leurs rimes en -ette, et pour m'avoir ouvert la voie du doctorat ! (et prouvé que, malgré le baluchon familial, ça peut ché-mar !).

Merci Boun pour les pandas arrivés en même temps que toi, pour ton sommeil de plomb, de ne les avoir pas crus pour l'odeur de carotte, pour tes créations qui interpellent (dans ma chambre et ailleurs), de m'habiller pour le quotidien ou les occasions... comme aujourd'hui !

Merci à Soazic d'être un pingouin cherchant des congénères pour se réchauffer sur la banquise.

Et enfin, merci à vous, qui lisez ce manuscrit !

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

Professeur Patrice DIOT

**VICE-DOYEN**

Professeur Henri MARRET

**ASSESSEURS**

Professeur Denis ANGOULVANT, Pédagogie  
Professeur Mathias BUCHLER, Relations internationales  
Professeur Hubert LARDY, Moyens – Relations avec l'Université  
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, Médecine générale  
Professeur François MAILLOT, Formation Médicale Continue  
Professeur Philippe ROINGEARD, Recherche

**SECRETAIRE GENERALE**

Madame Fanny BOBLETER

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966  
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962  
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972  
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994  
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004  
Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

**PROFESSEURS EMERITES**

Professeur Alain AUTRET  
Professeur Catherine BARTHELEMY  
Professeur Jean-Claude BESNARD  
Professeur Patrick CHOUTET  
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL  
Professeur Guy GINIES  
Professeur Olivier LE FLOCH  
Professeur Etienne LEMARIE  
Professeur Chantal MAURAGE  
Professeur Léandre POURCELOT  
Professeur Michel ROBERT  
Professeur Jean-Claude ROLLAND

**PROFESSEURS HONORAIRES**

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P.BARDOS – J.L. BAULIEU  
C. BERGER – C. BINET – P. BONNET – P. BOUGNOUX – M. BROCHIER  
P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF  
J. FUSCIARDI – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE  
J. LANSAC – J. LAUGIER – Y. LEBRANCHU – P. LECOMTE – G. LELORD  
G. LEROY – Y. LHUINTRE - G. LORETTE – M. MARCHAND – C. MERCIER – J. MOLINE  
C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – P. RAYNAUD – A. ROBIER – P. ROULEAU  
A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-rhino-laryngologie
	BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
	DUCLUZEAU Pierre-Henri	Médecine interne, nutrition
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	EHRMANN Stephan	Réanimation d'urgence
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
	HANKARD Régis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, gériatrie
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie

MM.	LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
	MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
	MAILLOT François	Médecine interne, gériatrie
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
Mme	MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MM.	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
Mme	MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MM.	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	ODENT Thierry	Chirurgie infantile
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale, médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
	WATIER Hervé	Immunologie

## PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	LEBEAU Jean-Pierre
Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

## PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale
	ROBERT Jean	Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
M.	BAKHOS David	Physiologie
Mme	BERNARD-BRUNET Anne	Cardiologie
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
M.	BOISSINOT Éric	Physiologie
Mme	CAILLE Agnès	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
M.	DESOUBEUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mmes	DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	GATAULT Philippe	Néphrologie
Mmes	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
	GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
MM.	HOARAU Cyrille	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques

MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
	PLANTIER Laurent	Physiologie
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
MM.	SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
	TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

## MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile S	ciences du langage - orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
Mme	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

## MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mme	HUAS Caroline	Médecine Générale
M.	IVANES Fabrice	Cardiologie

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M.	BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	CHARBONNEAU Michel	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	GRANDIN Nathalie	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM.	KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
	MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
	RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme	RIO Pascale	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M.	SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

### *Pour la Faculté de Médecine*

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier (éthique médicale)
M.	BOULAIN Thierry	Praticien Hospitalier (CSCT)
Mme	CRINIERE Lise	Praticien Hospitalier (endocrinologie)
M.	GAROT Denis	Praticien Hospitalier (sémiologie)
Mmes	MAGNAN Julie	Praticien Hospitalier (sémiologie)
	MERCIER Emmanuelle	Praticien Hospitalier (CSCT)

### *Pour l'Ecole d'Orthophonie*

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

### *Pour l'Ecole d'Orthoptie*

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

# Sommaire

<b>Pages liminaires</b>	<b>1</b>
<b>Résumé</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Serment d'Hippocrate</b>	<b>3</b>
<b>Remerciements</b>	<b>4</b>
<b>Professeurs de la Faculté de Médecine</b>	<b>7</b>
 <b>I Contexte</b>	 <b>13</b>
<b>Syndrome métabolique</b>	<b>14</b>
Définition . . . . .	14
Physiopathologie . . . . .	15
Résistance à l'insuline . . . . .	15
Tissu adipeux viscéral . . . . .	15
Inflammation chronique . . . . .	16
Enjeu de santé publique . . . . .	16
Syndrome métabolique et pathologies hépatiques . . . . .	16
Stéatose hépatique . . . . .	17
Stéato-hépatite . . . . .	17
Epidémiologie . . . . .	17
Physiopathologie . . . . .	17
Traitement . . . . .	17
Syndrome métabolique et pathologies vasculaires . . . . .	17
Insuffisance cardiaque . . . . .	17
Syndrome métabolique et maladies cardio-vasculaires . . . . .	18
 <b>Ostéoprotégérine</b>	 <b>18</b>
Découverte . . . . .	18
Structure . . . . .	18
Fonction biologique . . . . .	18
Ostéoprotégérine et ostéoporose . . . . .	18
Ostéoprotégérine et pathologies vasculaires . . . . .	19
Ostéoprotégérine et calcifications vasculaires . . . . .	19
Ostéoprotégérine et athérome . . . . .	19
Ostéoprotégérine et AOMI . . . . .	19
Ostéoprotégérine et cardiopathie ischémique . . . . .	20
Ostéoprotégérine et AVC . . . . .	20
Ostéoprotégérine et mortalité . . . . .	20
Ostéoprotégérine et HTA . . . . .	20
Ostéoprotégérine et pathologies métaboliques . . . . .	21
Ostéoprotégérine et diabète . . . . .	21
Insulino-résistance . . . . .	21
Adiposité viscérale . . . . .	21
Ostéoprotégérine et syndrome métabolique . . . . .	21

<b>La place de notre travail</b>	<b>22</b>
Paramètres vasculaires . . . . .	22
Paramètres hépatiques . . . . .	22
Objectifs . . . . .	22
<b>Références</b>	<b>23</b>
 <b>II Article</b>	 <b>28</b>
<b>Abstract</b>	<b>29</b>
<b>Introduction</b>	<b>30</b>
<b>Research design and methods</b>	<b>30</b>
Study protocols and patient selection . . . . .	30
Clinical data . . . . .	30
Biological measurements . . . . .	30
Clinical outcomes . . . . .	31
Statistical analyses . . . . .	32
<b>Results</b>	<b>32</b>
OPG and anthropometric variables . . . . .	32
OPG and metabolic variables . . . . .	32
OPG and vascular variables . . . . .	32
OPG and hepatic variables . . . . .	32
<b>Discussion</b>	<b>32</b>
<b>Aknowledgments</b>	<b>33</b>
<b>Conflict of interests</b>	<b>33</b>
<b>References</b>	<b>33</b>
 <b>III Soumission de Thèse</b>	 <b>35</b>
<b>Signatures</b>	<b>36</b>
<b>Dépot de sujet de thèse et composition du jury</b>	<b>37</b>

Première partie  
**Contexte**

# Syndrome métabolique

## Définition

Le syndrome métabolique a été décrit pour la première fois dans les années 1920 par Kylin, un physicien suédois, comme étant l'association de l'hypertension, de l'hyperglycémie et de la goutte.<sup>1</sup>

Depuis la première définition officielle du syndrome métabolique par un groupe de travail de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999, d'autres définitions avaient été proposées. Toutefois, ces définitions différaient non seulement dans les variables proposées mais également dans les points critiques utilisés pour chaque variable. La multiplication des définitions au travers des différents travaux ne permettaient pas la comparaison des études ; ceci a donc apporté une certaine confusion. C'est pourquoi, il était important d'unifier les définitions, ce besoin s'étendant de la pratique clinique à la recherche.

A l'heure actuelle, les deux définitions les plus utilisées dans la pratique clinique pour diagnostiquer le syndrome métabolique ont été proposées par l'American Heart Association/ National Heart, Lung, Blood Institute (AHA/NHLBI) et la Fédération Internationale du Diabète (FID) (Voir Table 1).<sup>2</sup> Ces définitions impliquent la présence de plusieurs des cinq facteurs de risque cardiométabolique suivants : obésité abdominale, hypertension, glycémie à jeun élevée, taux élevé de triglycérides et/ou faible cholestérol HDL. La valeur prédictive de ces définitions peut dépendre de la prévalence de ces composants clés au sein d'une population donnée.

Pour diagnostiquer le syndrome, la définition de la FID impose l'obésité abdominale associée à au moins deux des quatre facteurs supplémentaires (Voir Table 1). Elle prévoit en outre des différences ethniques et nationales pour les seuils d'obésité abdominale (Voir Table 2). Des analyses récentes menées aux Etats-Unis (entre 1999 et 2002) ont montré que cette définition menait à des estimations de prévalence du syndrome métabolique plus élevées (39 %) que la définition basée sur les critères de l'AHA/NHLBI (34,5 %).<sup>3</sup>

**Table 1 : Définitions du syndrome métabolique de la Fédération Internationale du Diabète**

<b>Obésité centrale</b>	Tour de taille, propre au groupe ethnique
<i>Associée à deux des facteurs suivants :</i>	
<b>Taux élevé de triglycérides</b>	$\geq 1,7$ mmol/L (150 mg/dL) ou traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Faibles taux de cholestérol HDL</b>	$< 1,03$ mmol/L (40 mg/dL) chez les hommes $< 1,29$ mmol/L (50 mg/dL) chez les femmes ou traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Hypertension artérielle</b>	Systolique : $\geq 130$ mmHg ou diastolique : $\geq 85$ mmHg ou traitement d'une hypertension diagnostiquée précédemment
<b>Glycémie veineuse élevée</b>	Glycémie veineuse à jeûn $\geq 5,6$ mmol/L (100 mg/dL) ou diabète de type 2 diagnostiqué précédemment

**Table 2 : Valeurs spécifiques à l'origine ethnique pour le tour de taille**

Groupe ethnique	Tour de taille (cm)
Europoïdes	Hommes $\geq 94$
	Femmes $\geq 80$
Sud-asiatiques	Hommes $\geq 90$
	Femmes $\geq 80$
Chinois	Hommes $\geq 90$
	Femmes $\geq 80$
Japonais	Hommes $\geq 85$
	Femmes $\geq 90$

Pour les populations ethniques d'Amérique du Sud et Centrale, les recommandations relatives aux populations sud-asiatiques doivent être appliquées jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles. Pour les populations d'origine sub-saharienne et les populations de la Méditerranée orientale et arabes, les données des populations européennes doivent être utilisées jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles.

## Physiopathologie

La physiopathologie du syndrome métabolique est encore aujourd'hui partiellement comprise. Elle résulte vraisemblablement de la combinaison de facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. L'obésité viscérale abdominale, un état d'inflammation chronique de bas grade et un état de résistance à l'insuline sont les principaux processus susceptibles d'expliquer les différentes composantes de ce syndrome.<sup>4,5</sup>

### Résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline se définit comme une limitation de l'action physiologique de l'insuline sur ses cibles du fait d'altérations de sa voie de signalisation. Elle s'accompagne d'une hyperinsulinémie compensatrice initiale. Les conséquences de la résistance à l'insuline proviennent donc autant de la résistance à l'insuline en elle-même que de l'hyperinsulinémie chronique, et ces conséquences varient selon les différents tissus concernés. À chaque étape, ce processus peut être modulé par des variations génétiques individuelles.

**Hyperglycémie** L'hyperglycémie qui accompagne la résistance à l'insuline résulte d'une diminution du transport du glucose vers les tissus périphériques comme le muscle et le tissu adipeux, de la diminution de son stockage au niveau hépatique, d'altération de la glycogénolyse et d'une néoglucogenèse hépatique augmentée.<sup>6-8</sup>

**Troubles lipidiques** La résistance à l'insuline s'accompagne d'une diminution de la lipogenèse habituellement observée en situation d'hyperglycémie, d'une levée de l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux, et d'une réduction du transfert des acides gras non estérifiés (AGNE) des lipoprotéines circulantes vers le tissu adipeux. Les conséquences sont une augmentation des AGNE et une stabilisation de apoB qui entraînent une augmentation des VLDL riches en triglycérides avec diminution de la concentration en HDL-cholestérol et augmentation de celle en LDL-cholestérol athérogène, une altération des fonctions endothéliales et l'accumulation de graisse dans des localisations ectopiques (cœur, muscle, foie).<sup>9-11</sup>

**HTA** La résistance à l'insuline et l'hyperinsulinisme contribuent également à l'élévation de la tension artérielle<sup>12,13</sup> au travers de mécanismes impliquant l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, la perturbation du métabolisme hydrosodé, et la limitation de la vasodilatation périphérique liée au monoxyde d'azote.

**Obésité abdominale** Enfin la résistance à l'insuline est associée à l'obésité viscérale abdominale mais le sens du lien de causalité entre ces deux phénomènes reste débattu.<sup>14</sup>

Ainsi, l'essentiel des critères qui contribuent à définir le syndrome métabolique peuvent étre liés à l'insulino-résistance, mais celle-ci ne rend pas compte de toutes les anomalies observées chez ces patients et d'autres facteurs sont nécessairement impliqués.

### Tissu adipeux viscéral

Plus que l'obésité (mesurée par l'IMC), la localisation intra-abdominale du tissu adipeux permet d'identifier les individus à risque de présenter un syndrome métabolique.<sup>15</sup> Ce sous-groupe de patients obèses est celui chez lequel la résistance à l'insuline la plus sévère est observée.

Le surplus de triglycérides découle d'une vie sédentaire et d'un excès d'apport calorique. L'aptitude d'un individu à diriger ce surplus soit vers le tissu adipeux sous-cutané, soit dans le tissu adipeux viscéral et notamment dans le foie, les muscles et le cœur, pourrait conditionner sa susceptibilité à développer un syndrome métabolique. Parmi les facteurs associés à une accumulation viscérale préférentielle des graisses figurent des éléments de susceptibilité génétique, le tabagisme et un profil neuroendocrine en lien avec une réponse inadaptée au stress.<sup>16</sup>

Le tissu adipeux est spécialisé dans le stockage et la mobilisation des lipides. Cependant, son métabolisme varie selon qu'il est de localisation sous-cutanée ou viscérale. Contrairement à ceux du tissu adipeux sous-cutané, les adipocytes contenus au sein de la graisse viscérale sont drainés directement dans le système porte. Moins sensibles à l'action anti-lipolytique de l'insuline, ils sont, en cas d'obésité viscérale, le siège d'une lipolyse accrue.<sup>17</sup> Il en résulte une élévation du flux portal d'AGNE et ceci entraîne une élévation de la production hépatique de glucose ainsi que des altérations athérogènes du métabolisme des lipides et des lipoprotéines.<sup>16</sup>

En dehors de sa fonction de stockage, le tissu adipeux viscéral a une fonction sécrétrice. Les adipokines sont impliquées localement ou de manière endocrine dans un grand nombre de processus physiologiques : réponse immune et inflammatoire et régulation de la balance énergétique. Les adipokines ont un rôle d'interface entre l'obésité et les événements moléculaires qui conduisent à la résistance à l'insuline, l'inflammation, la dyslipémie, l'hypercoagulabilité et les anomalies endothéliales associées à l'athérosclérose et au syndrome métabolique.<sup>18,19</sup> Ces adipokines regroupent des molécules produites uniquement au sein du tissu adipeux ainsi que de nombreuses autres substances de source plus ubiquitaire.

### Inflammation chronique

L'inflammation est un élément pivot de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Les sujets qui combinent le plus grand nombre de caractéristiques du syndrome métabolique sont ceux qui ont les taux sériques les plus élevés de protéines de la phase aiguë de l'inflammation : CRP, acide sialique, orosomucoïde, cortisol, *etc.* La production hépatique de ces molécules est notamment induite par l'IL-6 dont la concentration sérique est également corrélée à une présence plus importante des différents critères du syndrome métabolique.<sup>20,21</sup>

Les processus qui conduisent à l'activation de l'inflammation dans le tissu adipeux ne sont que partiellement compris. L'accumulation d'AGNE dans les adipocytes viscéraux pourrait initier le processus en induisant un état de stress cellulaire. Plusieurs mécanismes semblent impliqués :

- Le premier découle d'un stress du réticulum endoplasmique qui est une structure particulièrement sensible à l'hypoxie et aux fluctuations d'énergie et de nutriments. L'obésité induit un stress du réticulum endoplasmique dans le tissu hépatique, adipeux et dans les macrophages qui l'infiltrent.<sup>22</sup>
- Le second mécanisme de stress cellulaire repose sur la production de radicaux libres suite à l'activation de la NADPH oxydase par l'accumulation lipidique.<sup>23</sup>
- L'activation de ces voies accroît la production par le tissu adipeux d'adipokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , leptine, *etc.*)

L'inflammation liée à l'exposition à des cytokines comme le TNF $\alpha$ , aux AGNE ou à des phénomènes de stress intracellulaire est une des sources du phénomène de résistance à l'insuline observée dans le syndrome métabolique. L'inflammation qui est également intimement liée à la pathogénie de l'athérosclérose,<sup>24</sup> paraît donc à l'interface entre l'obésité, le syndrome métabolique et ses conséquences notamment cardiovasculaires.

### Enjeu de santé publique

Le syndrome métabolique est en train de devenir un problème de santé publique au niveau mondial. Les personnes touchées sont exposées à un risque plus élevé de souffrir d'une crise cardiaque ou d'un accident cérébro-vasculaire – et d'en mourir – que les personnes non atteintes du syndrome. L'ensemble des facteurs qui le caractérise est étroitement lié à la progression du diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et d'autres maladies chroniques à l'échelle mondiale (néphropathies, cancer colo-rectaux, troubles neuro-cognitifs, incontinence, dépression par exemple). Les décès précoces et les invalidités associés menacent de paralyser les budgets de la santé des pays développés et en développement.<sup>25</sup>

### Syndrome métabolique et pathologies hépatiques

Les stéatopathies métaboliques regroupent l'ensemble des manifestations hépatiques associées au syndrome métabolique et à l'insulinorésistance. Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) comprennent un large spectre de manifestations hépatiques

allant de la stéatose hépatique au carcinome hépato-cellulaire en passant par la stéato-hépatite, la cirrhose et l'insuffisance hépatique.

### **Stéatose hépatique**

La stéatose hépatique est définie soit sur le plan histologique comme une concentration de plus de 5% de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, soit par résonance magnétique par un contenu de triglycérides hépatiques d'au moins 55 mg/g de foie.<sup>26</sup> La stéatose hépatique est bénigne et réversible.

### **Stéato-hépatite**

La stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) se caractérise par une infiltration graisseuse diffuse et une inflammation qui peuvent mener à une fibrose hépatique voire à une cirrhose.

### **Epidémiologie**

Les NAFLD ont une prévalence qui augmente de façon importante dans le monde (parallèlement à l'obésité), surtout dans les pays occidentaux. La NASH représente aujourd'hui la maladie du foie chronique la plus répandue, et devient donc un véritable enjeu de santé publique. Ainsi lors d'une étude d'observation de 5 ans dans la population générale allemande, il a été estimé que la NAFLD représente à elle seule une hausse des coûts de santé de 26%.<sup>27</sup>

L'obésité abdominale semble être un facteur de risque important.<sup>28</sup> Sa prévalence est de 9% chez les personnes ayant un IMC <25 au Etats-Unis.<sup>29</sup> La prévalence de NAFLD est augmentée par un facteur 7 chez les personnes obèses,<sup>28</sup> avec une prévalence de la NASH de 51% chez les individus avec un IMC >35 aux USA.<sup>29</sup>

Bien que dans la plupart des cas la stéatose hépatique ne progresse pas vers des maladies hépatiques plus sévères, environ 15-20% des patients porteurs de stéatose hépatique ont des signes histologiques de fibrose et nécro-inflammation, indiquant la présence de NASH.<sup>30</sup>

### **Physiopathologie**

Il était classiquement établi que le développement de la stéatose hépatique et de la NASH est étroitement lié à un excès d'acides gras libres provenant du tissu adipeux résistant à l'insuline, entraînant ainsi des dépôts de graisse ectopiques dans de nombreux organes, dont le foie. Plusieurs mécanismes ont été impliqués dont un dysfonctionnement mitochondrial, un stress du réticulum endoplasmique ou encore une activation des voies inflammatoires.<sup>31</sup>

L'hypothèse actuelle expliquant la progression de la maladie est un mécanisme en deux étapes : dans un premier temps, une résistance à l'insuline périphérique et hépatique qui conduirait à l'accumulation d'acides gras dans le foie (stéatose) puis un stress oxydatif (ballonisation des hépatocytes, mort cellulaire, inflammation et/ou dépôts de collagène).

### **Traitement**

La résistance à l'insuline est le facteur clé dans la pathogénicité du syndrome métabolique, dont la NASH est considérée comme la composante hépatique. Ainsi il n'existe pas de traitement pharmacologique spécifique de la stéatose hépatique non alcoolique. Il est essentiel d'aider les patients souffrant de ces complications hépatiques à reprendre ou majorer leur activité physique, qui est efficace pour diminuer la stéatose.

## **Syndrome métabolique et pathologies vasculaires**

### **Insuffisance cardiaque**

En cas de syndrome métabolique, l'insuffisance cardiaque sévère est plus souvent observée, et notamment lorsqu'elle est symptomatique. Le syndrome métabolique apparaît comme un facteur pronostique indépendant de survenue d'insuffisance cardiaque sévère après un infarctus du myocarde.<sup>32</sup>

## Syndrome métabolique et maladies cardio-vasculaires

Dans une méta-analyses incluant 87 études prospectives, Mottillo et ses collaborateurs ont mis en évidence que le syndrome métabolique est associé à une augmentation du risque de maladie cardio-vasculaire (risque relatif [RR] : 2.35; Intervalle de confiance à 95% [CI] : 2.02-2.73), de la mortalité cardio-vasculaire (RR : 2.40; CI 95% : 1.87-3.08), de la mortalité toutes causes (RR : 1.58; CI 95% : 1.39-1.78), des infarctus du myocarde (RR : 1.99; CI 95% : 1.61-2.46) et des AVC (RR : 2.27; CI 95% : 1.80-2.85). Ainsi les patients souffrant de syndrome métabolique (même sans diabète) sont à haut risque cardio-vasculaire.<sup>33</sup>

## Ostéoprotégérine

L'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine humaine codée par le gène TNFRSF11B<sup>34</sup> situé sur le chromosome 8 et composé de 5 exons. Il s'agit d'un récepteur de cytokine, membre de la super-famille des récepteurs aux TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Elle est également connue sous le nom de *Osteoclastogenesis Inhibitory Factor* (OCIF), ou de *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11B* (TNFRSF11B).

Elle est produite pas divers organes, dont le système cardio-vasculaire, les poumons, les reins, les cellules immunitaires, le tissu adipeux et l'os.

## Découverte

L'ostéoprotégérine a été découverte simultanément par deux équipes de recherche en 1997. Simonet et ses collaborateurs, en analysant une portion d'ADN complémentaire de rat, ont identifié un possible nouveau membre de la super-famille des recepteurs au TNF.<sup>34</sup> Ils l'ont nommé ostéoprotégérine pour ses effets protecteurs sur l'os.

Au même moment, Tsuda et ses collaborateurs trouvaient une nouvelle protéine inhibant l'ostéoclastogénèse et la nommaient OCIF.<sup>35</sup>

## Structure

L'ostéoprotégérine est une glycoprotéine comprenant 401 acides aminés. In vivo, elle est retrouvée sous deux formes : soit un monomère de 60 kDa, soit un dimère de 120 kDa comportant des ponts disulfures.<sup>36</sup>

Elle est structurée en 7 domaines. Les domaines 1-4, situés sur la portion N-terminale, sont structurellement proches des recepteurs au TNF et essentiels pour l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Les domaines 5-6 présentent une homologie avec des domaines induisant la mort cellulaire par apoptose. Le domaine 7, situé sur la portion C-terminale, est le site de nombreuses modifications post-traductionnelles et est responsable de la dimérisation (pont di-S).

## Fonction biologique

L'ostéoprotégérine est un récepteur de RANK-L (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand*). Lors de la liaison de RANK-L, l'ostéoprotégérine prévient l'activation de NF- $\kappa$ B médiée par RANK. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription central de gènes impliqués dans l'immunité : il s'agit d'un régulateur clé de l'inflammation, de l'immunité innée ainsi que de la survie et de la différenciation cellulaires. En se liant au RANK-L sur les ostéoblastes, l'ostéoprotégérine bloque l'interaction RANK/RANK-L entre les ostéoblastes et les précurseurs des ostéoclastes. Ainsi, la différenciation des ostéoclastes est inhibée. L'ostéoprotégérine réduit donc la production d'ostéoclastes en inhibant la différenciation de leurs précurseurs.

## Ostéoprotégérine et ostéoporose

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui assure le renouvellement de la matrice osseuse et le maintien de la quantité et de la qualité du tissu osseux. Ce processus débute par une phase de résorption par les ostéoclastes, suivie d'une phase de formation. Classiquement, le système

OPG/RANK/RANK-L est impliqué dans ce remodelage osseux : la différenciation et l'activité des ostéoclastes sont étroitement dépendantes de l'équilibre OPG/RANK-L.<sup>37</sup> L'ostéoprotégérine est donc impliquée dans la maladie ostéoporotique.

Les souris transgéniques qui sur-expriment le gène de l'OPG ont une masse osseuse augmentée.<sup>38</sup> L'administration d'OPG recombinante chez la souris normale augmente la masse osseuse au tibia et au fémur, et chez la souris ovariectomisée compense les effets osseux de la carence en estrogène. Les souris transgéniques déficientes en OPG (OPG<sup>-/-</sup>) développent une ostéoporose sévère avec une densité minérale osseuse réduite et des fractures multiples.<sup>39</sup>

L'augmentation de la résorption osseuse induite par l'élévation du ratio RANK-L/OPG fait envisager des traitements par administration d'OPG recombinante dans diverses affections. Une étude récente chez la femme post-ménopausée a confirmé son action *in vivo* sur la résorption osseuse : une simple injection mensuelle diminue de 80% les concentrations de deoxypyridinoline. De plus, l'administration d'OPG recombinante semble très bien tolérée.<sup>40</sup>

## **Ostéoprotégérine et pathologies vasculaires**

L'athérosclérose n'est plus considérée comme une simple accumulation de lipides au niveau artériel. Cette pathologie est de plus en plus vue comme une pathologie inflammatoire. Les gènes du système RANK/RANK-L/OPG, acteur essentiel du contrôle de la minéralisation osseuse, sont également exprimés et régulés dans les vaisseaux. Ainsi, l'ostéoprotégérine est exprimée dans les cellules vasculaires, comme les cellules du muscle lisse coronaire et les cellules endothéliales *in vitro*. De plus, la présence d'ostéoprotégérine a été démontrée par immuno-réactivité, non seulement au sein des parois de vaisseaux sains, mais également au sein de lésions précoces athéroscléreuses.<sup>41,42</sup> Ces découvertes suggèrent que l'ostéoprotégérine pourrait jouer un rôle important dans le développement de pathologies vasculaires.

## **Ostéoprotégérine et calcifications vasculaires**

Outre son rôle dans le métabolisme osseux, le système RANK/RANK-L/OPG joue un rôle clé dans le contrôle des calcifications vasculaires. La fonction précise de l'ostéoprotégérine dans les parois artérielles n'est pas connue. Cependant, l'action inhibitrice de cette molécule sur les calcifications artérielles est suggérée par le fait que les souris KO pour l'OPG développent ces calcifications.<sup>43</sup> De plus, les souris traitées par ostéoprotégérine recombinante présentent une réduction des lésions calcifiées.<sup>44</sup>

Plusieurs études cliniques ont montré le lien entre l'ostéoprotégérine et les calcifications vasculaires.<sup>45-47</sup> Chez des sujets diabétiques, les plus forts taux d'ostéoprotégérine sont associés aux calcifications coronaires y compris lorsqu'ils sont atteints d'insuffisance rénale pré-dialytique.<sup>48</sup> Le taux d'OPG est un facteur prédictif indépendant des calcifications vasculaires et de leur progression.<sup>52</sup> L'OPG est associée positivement avec les calcifications des artères coronaires.<sup>46,49</sup>

Chez des sujets séropositifs pour le VIH, l'ostéoprotégérine, mais pas le RANK-L, était associée avec les calcifications coronaires et les sténoses coronariennes. Cette étude contribue à la compréhension du risque vasculaire élevé des patients infectés par le VIH.<sup>50</sup>

Ainsi, des taux circulants élevés d'ostéoprotégérine pourraient refléter un mécanisme de compensation au cours duquel les lésions vasculaires entraîneraient un relargage d'OPG de la paroi vers la circulation.<sup>51</sup>

## **Ostéoprotégérine et athérome**

L'ostéoprotégérine pourrait participer à l'inflammation et à la rupture des plaques d'athérome. Elle est associée à la dysfonction endothéliale et à l'inflammation vasculaire.<sup>52,53</sup>

## **Ostéoprotégérine et AOMI**

Dans une étude étudiant 98 patients diabétiques de type 2, il a été montré que l'ostéoprotégérine était plus élevée chez les sujets porteurs d'artériopathie périphérique, mesurée par l'indice de pression systolique (IPS). L'OPG était également un facteur prédictif indépendant de la présence et de la sévérité de l'artériopathie des membres inférieurs.<sup>54</sup>

Yixin Niu et ses collaborateurs ont montré en 2015 dans une étude retrospective comportant 712 sujets diabétiques que des taux élevés d'ostéoprotégérine sont associés à la sévérité de l'artériopathie

oblitérante des membres inférieurs, même après ajustement sur les facteurs de risques cardio-vasculaires classiques.<sup>55</sup>

### **Ostéoprotégérine et cardiopathie ischémique**

L'ostéoprotégérine est associée aux événements cardio-vasculaires, notamment coronariens chez des sujets à haut risque<sup>56</sup> ainsi qu'à la présence et à la sévérité des coronaropathies.<sup>47,57</sup>

Dans une population de 40 patients porteurs de syndrome coronarien aigu (SCA) ST+ et de 40 patients porteurs d'angor stable ayant bénéficié d'une coronarographie, les taux d'ostéoprotégérine étaient corrélés à l'extension de l'athérome coronaire. De plus, l'ostéoprotégérine était significativement plus élevée dans le groupe de patients souffrant d'un SCA ST+.<sup>58</sup>

L'ostéoprotégérine est également associée au pronostic des coronaropathies. Dans une étude comportant 716 patients consécutivement inclus pour avoir présenté un SCA ST+, l'ostéoprotégérine était un facteur prédictif indépendant des complications à long terme du SCA ST+ : hospitalisation pour insuffisance cardiaque, récurrence d'infarctus ou décès.<sup>59</sup> L'ostéoprotégérine est également prédictive des complications intra-hospitalières dans les suites d'un infarctus du myocarde.<sup>60</sup>

### **Ostéoprotégérine et AVC**

Dans une cohorte de 107 patients, l'ostéoprotégérine était significativement plus élevée chez les patients présentant des plaques d'athérome cérébrales. Elle corrélait positivement avec le nombre d'artères intra-cérébrales athéromateuses. Enfin, après ajustement sur les facteurs de risque cardio-vasculaire habituels, des valeurs élevées d'OPG étaient associées avec la présence d'athérome intra-cérébral.<sup>61</sup> L'ostéoprotégérine plasmatique est donc associée à la présence et à la sévérité de l'athérosclérose intra-cérébrale. Ceci suggère que l'OPG joue un rôle dans les complications vasculaires également au niveau cérébral.

Si de nombreux auteurs se sont intéressés aux liens entre ostéoprotégérine et cardiopathie ischémique, ou AOMI, ou encore aux événements cardio-vasculaires majeurs,<sup>57</sup> plus rares sont ceux qui ont mis en évidence spécifiquement l'association entre ostéoprotégérine et accident vasculaire cérébral. Song et ses collaborateurs ont étudié la relation entre OPG et les types d'AVC, leur sévérité à l'admission et le pronostic fonctionnel à 3 mois chez 172 patients porteurs d'un AVC ischémique. L'ostéoprotégérine plasmatique était associée aux AVC plus sévères et aux pronostics défavorables.<sup>62</sup>

L'ostéoprotégérine dosée à l'admission en hospitalisation pour AVC ischémique est également associée à la mortalité à long terme.<sup>63</sup>

### **Ostéoprotégérine et mortalité**

**Mortalité cardio-vasculaire** Il existe une corrélation entre l'ostéoprotégérine sérique et la mortalité cardio-vasculaire, suggérant que l'OPG pourrait contribuer à la progression des coronaropathies chez des patients à haut risque.<sup>56,57,64,65</sup>

**Mortalité toutes causes** Lewis et ses collaborateurs ont démontré une association indépendante entre des valeurs élevées d'ostéoprotégérine sérique et la mortalité chez des femmes âgées.<sup>66</sup> Cette association a également été montrée chez des patients porteurs d'une insuffisance rénale chronique,<sup>67</sup> transplantés rénaux,<sup>56,68</sup> ou porteurs de coronaropathies.<sup>47,69</sup>

### **Ostéoprotégérine et HTA**

Les taux élevés d'OPG sont associés à l'hypertension artérielle, systolique ou diastolique. Les hypertendus présentent de plus forts taux d'OPG.<sup>70</sup> Des études avec des analyses multivariées montrent que l'inflammation, l'âge et l'HTA sont des prédicteurs de niveaux élevés d'OPG. L'OPG est également associée aux complications de l'HTA : calcifications coronaires, rigidité artérielle, hypertrophie ventriculaire *etc.*<sup>71</sup>

## Ostéoprotégérine et pathologies métaboliques

### Ostéoprotégérine et diabète

Des études cliniques montrent que l'ostéoprotégérine est un marqueur indépendant de pathologie vasculaire et du risque cardio-vasculaire chez les patients diabétiques. Plusieurs études cliniques ont montré que l'ostéoprotégérine était plus élevée chez les patients souffrant de diabète, que ce soit dans l'enfance ou à l'âge adulte.<sup>72-78</sup> L'OPG est d'autant plus élevée que le déséquilibre glycémique est important.<sup>79</sup>

**Complications microvasculaires** Plusieurs études de cohorte de diabétiques ont décrit une association entre l'OPG et les complications microvasculaires du diabète et leur sévérité,<sup>76</sup> telles que la néphropathie diabétique, la neuropathie ou la rétinopathie.<sup>77,80-85</sup>

**Complications macrovasculaires** L'OPG était également associée aux complications cardiovasculaires.<sup>80</sup> L'OPG est corrélée à la présence d'une ischémie myocardique silencieuse et à sa sévérité,<sup>75,86</sup> à la présence d'athérome carotidien et des membres inférieurs<sup>87</sup> ou l'amputation.<sup>88</sup> L'ostéoprotégérine est également associée à la mortalité cardio-vasculaires ou de toutes causes.<sup>86,88,89</sup>

### Ostéoprotégérine et insulino-résistance

Plusieurs auteurs étudient la relation existant entre l'ostéoprotégérine et l'insulino-résistance chiffrée par le HOMA-IR (Homeostatic model assessment for insulin resistance). Chez des sujets diabétiques de type 2, l'ostéoprotégérine est corrélée à l'insulinémie et à l'insulino-résistance.<sup>90</sup> O'Sullivan et ses collaborateurs ont montré que l'ostéoprotégérine était significativement plus élevée chez les sujets intolérants au glucose après une hyperglycémie provoquée par voie orale.<sup>91</sup>

L'insulino-résistance et les taux d'OPG ont également été étudiés chez les sujets obèses. Dans une population d'adolescents obèses, l'OPG et l'HOMA-IR étaient significativement plus élevés que chez des volontaires sains. De plus, une association positive significative entre ces deux paramètres était retrouvée.<sup>92</sup> Cependant, chez des femmes non ménopausées, obèses ou non, l'OPG circulante était corrélée négativement avec l'insuline et l'HOMA-IR,<sup>93</sup> tout comme au sein d'une population de sujets sains.<sup>94</sup>

### Ostéoprotégérine et adiposité viscérale

L'ostéoprotégérine est exprimée dans le tissu adipeux viscéral.<sup>95,96</sup> Cependant, dans la littérature, les données concernant le lien entre ostéoprotégérine et obésité sont discordantes. Holecki *et al.* ont trouvé, chez des femmes obèses en péri-ménopause, que l'ostéoprotégérine sérique était significativement plus basse que chez des sujets minces.<sup>97</sup> Cependant, Suliburska *et al.* ont montré que l'ostéoprotégérine était plus élevée chez des adolescents obèses que chez les sujets contrôles.<sup>92</sup>

### Ostéoprotégérine et syndrome métabolique

Le syndrome métabolique regroupe des pathologies métaboliques, dont la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, et l'obésité viscérale. Comme expliqué précédemment, chaque critère du syndrome métabolique pris séparément est corrélé positivement à l'ostéoprotégérine.

Dans les modèles animaux de syndrome métabolique (souris C57-BL6 nourries avec un régime "high-fat diet"), l'ostéoprotégérine est élevée et la sécrétion de cette protéine entraîne des changements pro-inflammatoires systémiques et du tissu adipeux en association avec des modifications métaboliques.<sup>98</sup>

Cependant, dans les études cliniques, les informations concernant le syndrome métabolique et l'OPG sont rares et contradictoires. Nabipour *et al.* n'ont pas trouvé de différence significative entre les taux d'ostéoprotégérine de femmes ménopausées avec ou sans syndrome métabolique.<sup>99</sup> De plus, dans une étude de soins primaires, Dallmeier et ses collaborateurs retrouvaient une association significative entre le syndrome métabolique et différentes molécules impliquées dans l'inflammation, excepté l'OPG.<sup>100</sup>

Akinci et ses collaborateurs ont montré que des femmes présentant un antécédent de diabète gestationnel et développant un syndrome métabolique ont des taux plus élevés d'ostéoprotégérine que les femmes sans syndrome métabolique.<sup>101</sup> Une cohorte plus importante (128 femmes) de patientes ayant

présenté un diabète gestationnel confirmait ces résultats et ajoutait que l'ostéoprotégérine était associée à l'obésité et à l'insulino-résistance.<sup>102</sup>

Plus récemment, une publication a mis en évidence la relation positive entre OPG et syndrome métabolique : elle montre des taux d'OPG plus élevés chez les sujets porteurs de syndrome métabolique et une association positive entre OPG et le nombre de facteurs de risques cardio-vasculaires.<sup>95</sup>

Dans une étude de Travintharan, les taux plus élevés d'ostéoprotégérine étaient associés avec le risque de syndrome métabolique. Après ajustement sur l'âge, le sexe, l'ethnicité, la glycémie et les complications micro-vasculaires, l'ostéoprotégérine restait un prédicteur indépendant du syndrome métabolique.<sup>103</sup>

## **La place de notre travail**

### **Paramètres vasculaires**

Nous avons vu que le syndrome métabolique est un problème de santé publique responsable de complications cardio-vasculaires. Ces complications sont plus fréquentes que la simple addition des risques de chaque paramètre qui le compose. Nous savons que l'inflammation joue un rôle important dans la pathologie cardio-vasculaire. L'ostéoprotégérine est un pivot de la réponse inflammatoire et est associée aux maladies cardio-vasculaires et métaboliques. Ainsi nous supposons que l'OPG joue un rôle dans le syndrome métabolique et ses complications cardiovasculaires.

### **Paramètres hépatiques**

Par ailleurs, la stéatose hépatique et ses complications font partie du syndrome métabolique. Peu d'auteurs ont étudié l'association entre l'obésité viscérale, la stéatose hépatique et l'ostéoprotégérine. Or l'ostéoprotégérine est exprimée par les cellules hépatiques et vasculaires. Les interactions entre ces cellules et leur rôle chez les sujets souffrant de syndrome métabolique nécessitent de plus amples explorations.

### **Objectifs**

L'objectif de notre travail au sein d'une population de sujets dysmétaboliques est donc de déterminer l'association existant entre l'ostéoprotégérine et les paramètres métaboliques, vasculaires mais aussi hépatiques. Nous étudions le lien entre OPG et obésité viscérale, hypertension artérielle, dyslipidémie, résistance à l'insuline, rigidité artérielle, et score de plaque athéromateuse. Dans un sous-groupe de 140 patients, nous étudions spécifiquement le lien entre ostéoprotégérine, adiposité viscérale et stéatose hépatique en IRM.

## References

- <sup>1</sup> Kylin E. Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurika miesyndrom. *Zentralblatt für Innere Medizin* 1923;44:105-27.
- <sup>2</sup> Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome: a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23(5):469-80.
- <sup>3</sup> Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the US. *Diabetes Care* 2005;28:2745-9.
- <sup>4</sup> Palaniappan L, Carnethon MR, Wang Y, Hanley AJ, Fortmann SP, Haffner SM, Wagenknecht L; Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 2004;27(3):788-93.
- <sup>5</sup> Das UN. Metabolic syndrome X: an inflammatory condition? *Curr Hypertens Rep* 2004;6(1):66-73.
- <sup>6</sup> Bonadonna RC, Del Prato S, Saccomani MP, Bonora E, Gulli G, Ferrannini, *et al.* Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1993;92:486-94.
- <sup>7</sup> Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, *et al.* Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 2000;49:1367-73.
- <sup>8</sup> Virtanen KA, Iozzo P, Hallsten K, Huupponen R, Parkkola R, Janatuinen T, *et al.* Increased fat mass compensates for insulin resistance in abdominal obesity and type 2 diabetes: a positron-emitting tomography study. *Diabetes* 2005;54:2720-6.
- <sup>9</sup> Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2006;116:1813-22.
- <sup>10</sup> Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 2002;45:623-34.
- <sup>11</sup> Taskinen MR. Type 2 diabetes as a lipid disorder. *Curr Mol Med* 2005;5:297-308.
- <sup>12</sup> Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2009-23.
- <sup>13</sup> Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 2005;47:201-10.
- <sup>14</sup> Gastaldelli A, Sironi AM, Ciociaro D, Positano V, Buzzigoli E, Giannessi D, *et al.* Visceral fat and beta cell function in non-diabetic humans. *Diabetologia* 2005;48:2090-6.
- <sup>15</sup> Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881-7.
- <sup>16</sup> Arner P. Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity. *Ann Med* 2001;33:542-6.
- <sup>17</sup> Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 2000;49:883-8.
- <sup>18</sup> Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006;580:2917-21.
- <sup>19</sup> Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444:875-80.
- <sup>20</sup> Pickup JC. Inflammatory markers and type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2006;8:1-6.
- <sup>21</sup> Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92.
- <sup>22</sup> Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-61.
- <sup>23</sup> Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
- <sup>24</sup> Dandona P, Aljada A, Mohanty P. The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia* 2002;45:924-30.
- <sup>25</sup> Florez H, Palacio A, Tamariz L. Syndrome métabolique, diabète et maladies cardiovasculaires : un lien avéré. *Diabetes Voice* 2008;53.
- <sup>26</sup> Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, *et al.* Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E462-468.
- <sup>27</sup> Baumeister SE, Volzke H, Marschall P, *et al.* Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation. *Gastroenterology* 2008;134:85-94.

- <sup>28</sup> Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990;12:1106-1110.
- <sup>29</sup> Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.
- <sup>30</sup> Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2714-2724.
- <sup>31</sup> Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2009;13:545-563.
- <sup>32</sup> Zeller M, Steg PG, Ravisy J, Laurent Y, Janin-Manificat L, L'Huillier I, Beer JC, Oudot A, Rioufol G, Makki H, Farnier M, Rochette L, Vergès B, Cottin Y; Observatoire des Infarctus de Côte-d'Or Survey Working Group. Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2005;165(10):1192-8.
- <sup>33</sup> Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(14):1113-32.
- <sup>34</sup> Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-19.
- <sup>35</sup> Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 May 8;234(1):137-42.
- <sup>36</sup> Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(4):549-53.
- <sup>37</sup> Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292(4):490-5.
- <sup>38</sup> Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, *et al.* The murine mutation osteopetrosis in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990;345: 442-4.
- <sup>39</sup> Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, *et al.* Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-8.
- <sup>40</sup> Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi HM, Leese PT, Dunstan CR. Osteoprotegerin has potent and sustained antiresorptive activity in post menopausal women. *J Bone Miner Res* 2001;16(2):348-60.
- <sup>41</sup> Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4104-12.
- <sup>42</sup> Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1998-2003.
- <sup>43</sup> Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12(9):1260-8.
- <sup>44</sup> Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D *et al.* Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr*(-/-) mice. *Circulation* 2008;117(3):411-20.
- <sup>45</sup> Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, Jain T, Gruntmanis U, McGuire DK, de Lemos JA. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol*. 2007;99(4):513-8.
- <sup>46</sup> Anand DV, Lahiri A, Lim E, Hopkins D, Corder R. The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47(9):1850-1857.
- <sup>47</sup> Jono S, Otsuki S, Higashikuni Y, Shioi A, Mori K, Hara K, Hashimoto H, Ikari Y. Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2010;8(6):1170-5.
- <sup>48</sup> Mikami S, Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Matsuhisa M, Ito T, Imai E, Hori M. Serum osteoprotegerin as a screening tool for coronary artery calcification score in diabetic pre-dialysis patients. *Hypertens Res* 2008;31(6):1163-70.

- <sup>49</sup> Anand DV, Lim E, Darko D *et al.* Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes: role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;50(23):2218–2225.
- <sup>50</sup> Ketlogetswe KS, McKibben R, Jacobson LP, Li X, Dobs AS, Budoff M, Witt MD, Palella FJ Jr, Kingsley L, Margolick JB, Post WS, Brown TT. Osteoprotegerin (OPG), but not Receptor Activator for Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL), is Associated with Subclinical Coronary Atherosclerosis in HIV-infected Men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015.
- <sup>51</sup> Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2005;48(3):561-8.
- <sup>52</sup> Shin JY, Shin YG, Chung CH. Elevated serum osteoprotegerin levels are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(7):1664-6.
- <sup>53</sup> Dessein PH, López-Mejias R, González-Juanatey C, Genre F, Miranda-Filloo JA, Llorca J, González-Gay MA. Independent relationship of osteoprotegerin concentrations with endothelial activation and carotid atherosclerosis in patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2014;41(3):429-36.
- <sup>54</sup> Esteghamati A, Aflatoonian M, Rad MV, Mazaheri T, Mousavizadeh M, Nakhjavani M, Noshad S. Association of osteoprotegerin with peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;108(8-9):412-419.
- <sup>55</sup> Yixin Niu, Weiwei Zhang, Zhen Yang, Xiaoyong Li, Jie Wen, Suijun Wang, Hongmei Zhang, Xuanchun Wang, Houguang Zhou, Wenjun Fang, Li Qin, and Qing Su. Association of plasma osteoprotegerin levels with the severity of lower extremity arterial disease in patients with type 2 diabetes. *BMC Cardiovasc Disord* 2015;15:86.
- <sup>56</sup> Svensson M, Dahle DO, Mjøen G, Weihsrauch G, Scharnagl H, Dobnig H, März W, Jardine A, Fellström B, Holdaas H. Osteoprotegerin as a predictor of renal and cardiovascular outcomes in renal transplant recipients: follow-up data from the ALERT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2571-5.
- <sup>57</sup> Vik A, Mathiesen EB, Brox J, Wilsgaard T, Njolstad I, Jorgensen L, Hansen JB. Serum osteoprotegerin is a predictor for incident cardiovascular disease and mortality in a general population: the Tromsø Study. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):638-44.
- <sup>58</sup> Margonato A, Gorla R, Macchi A, Buzzetti F, Franzoni I, Pedrighi MC, Rosa I, Sirtori M, Villa I, Rubinacci A. Role of plaque calcification regulators osteoprotegerin and matrix Gla-proteins in stable angina and acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2015;16(3):156-62.
- <sup>59</sup> Pedersen S, Mogelvang R, Bjerre M, Frystyk J, Flyvbjerg A, Galatius S, Sorensen TB, Iversen A, Hvelplund A, Jensen JS. Osteoprotegerin predicts long-term outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Cardiology* 2012;123(1):31-8.
- <sup>60</sup> Canga A, Durakoglugil ME, Erdogan T, Kirbas A, Yilmaz A, Cicek Y, Ergül E, Cetin M, Kocaman SA. Elevated serum osteoprotegerin levels predict in-hospital major adverse cardiac events in patients with ST elevation myocardial infarction. *J Cardiol* 2012;60(5):355-60.
- <sup>61</sup> Kim J, Song TJ, Yang SH, Lee OH, Nam HS, Kim YD, Kim EH, Lee HS, Nam CM, Heo JH. Plasma osteoprotegerin levels increase with the severity of cerebral artery atherosclerosis. *Clin Biochem* 2013;46(12):1036-40.
- <sup>62</sup> Song TJ, Kim J, Yang SH, Park JH, Lee HS, Nam CM, Lee OH, Kim YD, Nam HS, Heo JH. Association of plasma osteoprotegerin levels with stroke severity and functional outcome in acute ischaemic stroke patients. *Biomarkers* 2012;17(8):738-44.
- <sup>63</sup> Jensen JK1, Ueland T, Atar D, Gullestad L, Mickley H, Aukrust P, Januzzi JL. Osteoprotegerin concentrations and prognosis in acute ischaemic stroke. *J Intern Med* 2010;267(4):410-7.
- <sup>64</sup> Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:2175-80
- <sup>65</sup> Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(3):1024-8.
- <sup>66</sup> Ueland T, Wilson SG, Amirul Islam FM, Mullin B, Devine A, Bollerslev J, Zhu K, Prince RL. A cohort study of the effects of serum osteoprotegerin and osteoprotegerin gene polymorphisms on cardiovascular mortality in elderly women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;71(6):828-33.
- <sup>67</sup> Sigrist MK, Levin A, Er L, McIntyre CW. Elevated osteoprotegerin is associated with all-cause mortality in CKD stage 4 and 5 patients in addition to vascular calcification. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(10):3157-62.
- <sup>68</sup> Hjeltnesaeth J, Ueland T, Flyvbjerg A, Bollerslev J, Leivestad T, Jenssen T, Hansen TK, Thiel S, Sagedal S, Roislien J, Hartmann A. Early posttransplant serum osteoprotegerin levels predict long-term (8-year) patient survival and cardiovascular death in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(6):1746-54.

- <sup>69</sup> Omeland T, Ueland T, Jansson AM, Persson A, Karlsson T, Smith C, Herlitz J, Aukrust P, Hartford M, Caidahl K. Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(6):627-33.
- <sup>70</sup> Stepień E, Wypasek E, Stopyra K, Konieczyska M, Przybyło M, Pasowicz M. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clinical Biochemistry* 2011;44(10):826-831.
- <sup>71</sup> Stepień E, Fedak D, Klimeczek P *et al.* Osteoprotegerin, but not osteopontin, as a potential predictor of vascular calcification in normotensive subjects. *Hypertension Research* 2012;35(5):531-538.
- <sup>72</sup> Augoulea A, Vrachnis N, Lambrinoudaki I *et al.* Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in diabetic patients. *International Journal of Endocrinology* 2013;2013, Article ID 182060.
- <sup>73</sup> Xiang GD, Sun HL, Zhao LS. Changes of osteoprotegerin before and after insulin therapy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007;76(2):199-206.
- <sup>74</sup> Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA *et al.* Osteoprotegerin is associated with cardiovascular risk in hypertension and/or diabetes. *European Journal of Clinical Investigation* 2012;42(5):548-556.
- <sup>75</sup> Guzel S, Seven A, Kocaoglu A *et al.* Osteoprotegerin, leptin and IL-6: association with silent myocardial ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2013;10(1):25-31.
- <sup>76</sup> Chang YH, Lin KD, He SR, Hsieh MC, Hsiao JY, Shin SJ. Serum osteoprotegerin and tumor necrosis factor related apoptosis inducing-ligand (TRAIL) are elevated in type 2 diabetic patients with albuminuria and serum osteoprotegerin is independently associated with the severity of diabetic nephropathy. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2011;60(8):1064-1069.
- <sup>77</sup> Terekci HM, Senol MG, Top C *et al.* Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 2009;117(3):119-123.
- <sup>78</sup> Chen WJY, Rijzewijk LJ, van der Meer RW *et al.* Association of plasma osteoprotegerin and adiponectin with arterial function, cardiac function and metabolism in asymptomatic type 2 diabetic men. *Cardiovascular Diabetology* 2011;10:article 67.
- <sup>79</sup> Altinova AE, Toruner F, Akturk M *et al.* Relationship between serum osteoprotegerin, glycemic control, renal function and markers of atherosclerosis in type 2 diabetes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2011;71(4):340-343.
- <sup>80</sup> Rasmussen LM, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A. Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *European Journal of Endocrinology* 2006;154(1):75-81.
- <sup>81</sup> Wang ST, Xu JM, Wang M, Chen FL, Ding G. Increased plasma osteoprotegerin concentrations in Type 1 diabetes with albuminuria. *Clinical Nephrology* 2013;79:192-198.
- <sup>82</sup> Nybo M, Poulsen MK, Grauslund J, Henriksen JE, Rasmussen LM. Plasma osteoprotegerin concentrations in peripheral sensory neuropathy in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 2010;27(3):289-294.
- <sup>83</sup> Tavintharan S, Pek LT, Liu JJ *et al.* Osteoprotegerin is independently associated with metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2014;11(5):359-362.
- <sup>84</sup> Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, Andersen NH, Mogensen CE, Rasmussen LM. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *European Journal of Endocrinology* 2003;149(1):39-42.
- <sup>85</sup> Yu G, Ji X, Jin J, Bu S. Association of serum and vitreous concentrations of osteoprotegerin with diabetic retinopathy. *Annals of Clinical Biochemistry* 2015;52:232-236.
- <sup>86</sup> Avignon A, Sultan A, Piot C *et al.* Osteoprotegerin: a novel independent marker for silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30(11):2934-2939.
- <sup>87</sup> Poulsen MK, Nybo M, Dahl J *et al.* Plasma osteoprotegerin is related to carotid and peripheral arterial disease, but not to myocardial ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology* 2011;10:article 76.
- <sup>88</sup> Gordin D, Soro-Paavonen A, Thomas MC *et al.* Osteoprotegerin is an independent predictor of vascular events in Finnish adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013;36(7):1827-1833.
- <sup>89</sup> Reinhard H, Lajer M, Gall MA *et al.* Osteoprotegerin and mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2010;33(12):2561-2566.
- <sup>90</sup> Yaturu S, Rains J, Jain SK. Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF- $\alpha$  levels in men with type 2 diabetes. *Cytokine* 2008;44(1):168-171.

- <sup>91</sup> O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C *et al.* A comparison of osteoprotegerin with adiponectin and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as a marker for insulin resistance. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2013;62(1):34–38.
- <sup>92</sup> Suliburska J, Bogdanski P, Gajewska E, Kalmus G, Sobieska M, Samborski W. The association of insulin resistance with serum osteoprotegerin in obese adolescents. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2013;69(4):847–853.
- <sup>93</sup> Ugur-Altun B, Altun A. Circulating leptin and osteoprotegerin levels affect insulin resistance in healthy premenopausal obese women. *Archives of Medical Research* 2007;38(8):891–896.
- <sup>94</sup> Ashley DT, O'Sullivan EP, Davenport C *et al.* Similar to adiponectin, serum levels of osteoprotegerin are associated with obesity in healthy subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2011;60(7):994–1000.
- <sup>95</sup> Perez de Ciriza C, Moreno M, Restituto P *et al.* Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clinical Biochemistry* 2014;47(18):272–278.
- <sup>96</sup> An JJ, Han DH, Kim DM *et al.* Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue. *Yonsei Medical Journal* 2007;48(5):765–772.
- <sup>97</sup> Holecki M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J *et al.* Osteoprotegerin: does it play a protective role in the pathogenesis of bone loss in obese perimenopausal women? *Endokrynologia Polska* 2007;58(1):7–10.
- <sup>98</sup> Bernardi S, Fabris B, Thomas M *et al.* Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014;394(1-2):13–20.
- <sup>99</sup> Nabipour I, Kalantarhormozi M, Larijani B, Assadi M, Sanjdideh Z. Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism* 2010;59(5):742–747.
- <sup>100</sup> Dallmeier D, Larson MG, Vasan RS *et al.* Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers: a community-based cross-sectional study at the Framingham Heart Study. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 2012;4:article 28.
- <sup>101</sup> Akinci B, Demir T, Celtik A *et al.* Serum osteoprotegerin is associated with carotid intima media thickness in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008;82(2):172–178.
- <sup>102</sup> Akinci B, Celtik A, Yuksel F *et al.* Increased osteoprotegerin levels in women with previous gestational diabetes developing metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;91(1):26–31.
- <sup>103</sup> Tavintharan S, Pek LT, Liu JJ *et al.* Osteoprotegerin is independently associated with metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2014;11(5):359–362.

Deuxième partie

**Article**

# Associations between visceral adipose tissue, liver steatosis, atherosclerosis and plasma osteoprotegerin levels in dysmetabolic adults

Mathilde Monseu, Jérôme Boursier, Christophe Aubé, Frédérique Gagnadoux, Georges Lefthériotis, Pierre-Henri Ducluzeau

## Abstract

**Introduction:** Obesity and metabolic syndrome are accompanied by increased visceral adipose tissue as well as liver steatosis, both leading to increased cardiovascular risk. High plasma osteoprotegerin has been recently associated with cardiovascular diseases. However, less is known about the associations between visceral adipose tissue (VAT), liver fat content (LF) and plasma osteoprotegerin (OPG) in dysmetabolic subjects. The objective is to determine the association between VAT, LF, and other markers of metabolic syndrome (*i.e.* hypertension, dyslipidemia and insulin resistance) and OPG in dysmetabolic adults.

**Patients and methods:** 314 subjects from the NUMEVOX cohort were included on the basis of at least one metabolic syndrome criterion. They underwent a thorough metabolic and cardiovascular evaluation including: arterial stiffness and atherosclerotic plaques, HOMA insulin resistance index (HOMA-IR), liver enzymes, ferritin, waist circumference and BMI. Plasma OPG were assessed by Elisa technique. Visceral adipose tissue and liver fat content were measured by magnetic resonance imaging in a subgroup of 140 patients. Ultrasound examination of arteries and arterial stiffness (pulse wave velocity) were recorded. Age and gender adjusted paired correlation were calculated.

**Results:** BMI, waist circumference, and MRI-based VAT correlated with OPG ( $r=0.19$ ,  $p=0.006$ ;  $r=0.18$ ,  $p=0.001$ ;  $r=0.24$ ,  $p=0.004$  respectively) while subcutaneous fat did not correlated. Liver fat content correlated with OPG ( $r=0.25$ ,  $p=0.003$ ) as well as ALT ( $r=0.39$ ,  $p<0.001$ ),  $\gamma$ -GT ( $r=0.35$ ,  $p<0.001$ ), ferritinemia ( $r=0.18$ ,  $p=0.002$ ) and triglyceridemia ( $r=0.17$ ,  $p=0.004$ ). HOMA-R was strongly correlated with OPG ( $r=0.39$ ,  $p<0.0001$ ), as well as leptinemia ( $r=0.28$ ,  $p<0.0001$ ) and adiponectinemia ( $r=-0.12$ ,  $p=0.05$ ). Plasma OPG correlated to arterial stiffness ( $r=0.19$ ,  $p=0.04$ ). In the whole cohort OPG correlated weakly with the number of atherosclerotic sites ( $r=0.12$ ,  $p=0.03$ ).

**Conclusion:** Plasma OPG levels were positively associated with VAT and liver steatosis, as well as insulin resistance and adipokines. The significant association between OPG and some of the major components of the metabolic syndrome suggests a possible link with the vascular complications associated to the metabolic syndrome.

## Introduction

Osteoprotegerin (OPG) is an inflammatory cytokine receptor implicated in bone remodeling. It is a soluble glycoprotein from tumour necrosis factor receptor superfamily, responsible for osteoclastogenesis inhibition. Osteoprotegerin is expressed in vivo by endothelial cells, vascular smooth muscle cells, hepatic cells, and osteoblasts (1).

Studies in OPG knockout mice show early onset of osteoporosis and severe vascular medial calcification (2). Isolation of osteoprotegerin has been a key factor for the understanding of the close relationship between bone mineralization and vascular pathology.

While this suggests a possible protective effect of OPG on vascular endothelium, clinical studies suggest that OPG could also become a risk factor of progressive atherosclerotic cardiovascular disease (3). Indeed, osteoprotegerin has been associated with increased risk and severity of atherosclerotic diseases in general population (4). OPG correlates positively with intima-media thickness (5), coronary artery calcification (6), and the existence of coronary artery disease (7). Moreover, circulating OPG is an independent predictor of long-term mortality and heart failure development in acute coronary syndromes patients (8). Patients with higher OPG levels have higher major adverse cardiac events (MACE) rates in midterm follow-up (9). In the Copenhagen City Heart Study, Mogelvang *et al.* showed that, after multivariate adjustment, for each doubling of the plasma OPG concentration, the risk for subclinical peripheral atherosclerosis increased by 50% (10). All together, these results suggest that OPG plays a clinical key role in atherosclerosis progression and plaque destabilization.

Metabolic syndrome comprises a constellation of vascular risk factors including obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension, and insulin resistance, and leads to an increased cardiovascular risk (11). It is accompanied by an increased visceral adipose tissue as well as liver steatosis (12). Chronic inflammation has been identified as an important component of metabolic syndrome (13). As osteoprotegerin modifies inflammatory response, we suggest that osteoprotegerin plays a role in metabolic syndrome and its associated vascular risks.

Furthermore, little is known about the associations between visceral adipose tissue (VAT), liver fat content (LF) and plasma OPG in dysmetabolic subjects. With OPG being expressed in vascular and hepatic cells, the crosstalk of these cells and their role in metabolic syndrome and vascular com-

plications need further exploration. The objective of our work is to determine the association between vascular variables, VAT, LF, and OPG in a French adult cohort displaying metabolic criteria.

## Research design and methods

### Study protocols and patient selection

Subjects from the NUMEVOX cohort were included. The objective of this cohort (registered on clinicaltrials.gov: NCT00997165) was to describe the impact of fat distribution on the vascular and metabolic evolution in patients with at least one metabolic syndrome criterion.

Patients included were referred for metabolic exploration in the Department of Nutrition of the Angers University Hospital, in France. Patients included in the cohort did not present any of the following exclusion criteria: age <18 years or >80 years, BMI >40 kg/m<sup>2</sup>, poorly controlled diabetes with HbA1c >9%, insulin-treated diabetes, uncontrolled severe arterial hypertension (>180/120 mmHg), severe hypertriglyceridaemia (TG >10g/L), severe renal failure (creatinine clearance <30mL/min) or any contraindication for MRI. No patient presented obvious acute disease at the time of evaluation.

Patients received their usual medications and were treated, if needed, by antihypertensive medications and statins.

The presence of the metabolic syndrome was defined according to the IDF 2005 criteria (14).

The study was approved by the institutional ethics committees, and for each patient oral and written consent was obtained in a process validated by the Ethical Research Committee of Angers University Hospital.

### Clinical data

During hospitalization, a clinical examination was carried out including weight, height, and waist measurements, and a 15-min brachial blood pressure test using an automatic blood pressure cuff.

### Biological measurements

Samples were taken during fasting, before any medications had been taken. For each patient, fasting glucose, insulin, HbA1c, liver enzymes, creatinine, micro-albuminuria, CRP, ferritin, leptin, adiponectin, cholesterol levels, and triglycerides were measured. The HOMA insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated as described previously (15).

**Table 1** – Baseline characteristics of the study population

Variables	N	
Sex: men/women n (%)	314	227 (72%)/87 (28%)
Age (years)	314	54.3 $\pm$ 9.7
Active smoking n (%)	312	56 (18%)
Type 2 diabetes n (%)	245	95 (39%)
IDF criteria n	314	2.86 $\pm$ 1.19
Osteoprotegerin (pmol/L)	314	14.2 $\pm$ 5.0
Anthropometric variables		
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	314	31.4 $\pm$ 5.3
Waist circumference (cm)	314	104.8 $\pm$ 12.9
Hips circumference (cm)	314	107.7 $\pm$ 10.6
VAT (cm <sup>2</sup> )	150	186.9 $\pm$ 92
SAT (cm <sup>2</sup> )	150	242.4 $\pm$ 124.3
Metabolic variables		
Glycemia (g/L)	314	1.1 $\pm$ 0.2
HbA1C (%)	313	6.1 $\pm$ 0.7
Insulin (mIU/L)	300	17.2 $\pm$ 10.8
HOMA-IR (mU/L)	300	4.8 $\pm$ 3.5
Leptin ( $\mu$ g/mL)	297	20 $\pm$ 18.4
Adiponectin ( $\mu$ g/mL)	294	7.2 $\pm$ 3.4
HDL-C (g/L)	313	0.6 $\pm$ 0.2
LDL-C (g/L)	313	1.1 $\pm$ 0.4
Triglycerides (g/L)	313	1.6 $\pm$ 1.0
Hepatic variables		
Liver fat content (%)	145	13.5 $\pm$ 13.4
$\gamma$ -GT (U/L)	313	62.2 $\pm$ 70.5
ALT (U/L)	313	38.5 $\pm$ 23.2
Bilirubin ( $\mu$ mol/L)	308	4.4 $\pm$ 4.0
Ferritin ( $\mu$ g/mL)	306	290.2 $\pm$ 251.7
Vascular variables		
Systolic blood pressure (mmHg)	314	129.5 $\pm$ 13.7
Diastolic blood pressure (mmHg)	314	77.9 $\pm$ 9.6
Intima-media thickness	290	0.63 $\pm$ 0.09
Arterial stiffness	129	8.46 $\pm$ 2.86
Plaque score	296	2.53 $\pm$ 1.94

Quantitative variables are described by mean  $\pm$  standard deviation. Abbreviations: IDF = international diabetes federation, VAT = visceral adipose tissue, SAT = subcutaneous adipose tissue, HOMA-IR = insulin resistance index.

Biochemical analyses were performed in our institution's Referral Laboratory. Serum total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were measured using an automatized autoanalyzer (Roche COBAS INTEGRA 700). Serum CRP was measured by latex turbidimetric immunoassay method. Serum adiponectin was measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DRG, Marburg, Germany). Leptin was measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Millipore, Billerica, MA, USA).

Plasma OPG was measured using a highly sensitive quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (BioVendor, Modrice, Czech Republic).

## Imaging

Ultrasound examination of arteries and arterial stiffness (pulse wave velocity) were recorded using a laser doppler velocity analysis. Plaque score was established by counting the number of arterial site presenting atherosclerosis (from 0 to 5).

Liver fat content, intra- and retroperitoneal VAT and SAT were assessed from an abdominal MRI in a subset of 140 patients. Both individuals that had and not had the MRI had similar age and BMI. Imaging was carried out on a 1.5 Tesla MRI with a phased-array surface coil. Visceral and abdominal subcutaneous fat areas were quantified in slices at the level of the L3–L4 intervertebral disc. Liver fat, area calculations of visceral and subcutaneous fat used validated software developed in cooperation with the Radiology Department of the University Hospital of Angers (16).

## Statistical analyses

All analyses used R version 2.10.0 (Free Software Foundation, Boston, MA, USA), and a two-sided  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Spearman correlation coefficients ( $r$ ) were determined for OPG with markers of metabolic syndrome, hepatic and vascular variables, or MRI-assessed LF, VAT and SAT. All the correlations were adjusted for age and sex. All quantitative variables showed an asymmetrical distribution and were therefore log-transformed before entering into the models.

**Table 2** – Spearman correlation coefficients ( $r$ ) between anthropometric, metabolic, hepatic, and vascular variables and plasma osteoprotegerin, adjusted on age and sex

Variables	$r$	$p$
Anthropometric variables		
Body Mass Index	0.195	<b>0.0006</b>
Waist circumference	0.183	<b>0.001</b>
Hips circumference	0.150	<b>0.008</b>
VAT	0.241	<b>0.004</b>
SAT	0.145	0.09
Metabolic variables		
HbA1C	0.197	<b>0.0005</b>
Insulin	0.368	<b>&lt;0.0001</b>
HOMA-IR	0.394	<b>&lt;0.0001</b>
Leptin	0.285	<b>&lt;0.0001</b>
Adiponectin	-0.114	<b>0.05</b>
HDL-C	-0.072	0.21
LDL-C	-0.006	0.92
Triglycerides	0.165	<b>0.004</b>
Hepatic variables		
Liver fat content	0.252	<b>0.003</b>
$\gamma$ -GT	0.351	<b>&lt;0.0001</b>
ALT	0.392	<b>&lt;0.0001</b>
Bilirubin	0.021	0.72
Ferritin	0.181	<b>0.002</b>
Vascular variables		
Systolic blood pressure	0.068	0.24
Diastolic blood pressure	0.051	0.38
Intima-Media thickness	0.050	0.40
Arterial stiffness	0.193	<b>0.04</b>
Plaque score	0.125	<b>0.003</b>

Abbreviations: IDF = international diabetes federation, VAT = visceral adipose tissue, SAT = subcutaneous adipose tissue, HOMA-IR = insulin resistance index.

## Results

314 subjects (72% men) were considered for the present analysis. Baseline characteristics of the study population are shown in Table 1. The mean age was  $54.3 \text{ years} \pm 9.7$ . The mean BMI was  $31.4 \text{ kg/m}^2 \pm 5.3$ . Blood pressure was on average  $130/78 \text{ mmHg}$ . Participants had on average 2.86 metabolic syndrome IDF criterions, and 70% of patients had at less 3 criterions. 39% of patients suffered of type 2 diabetes. The mean plasma OPG was  $14.2 \text{ pmol/L} \pm 5.0$  (Table 1).

Among the cohort, 105 patients had no metabolic syndrome according to the IDF definition. The mean plasma OPG was  $13.2 \text{ pmol/L} \pm 4.6$  in this group. 123 patients had a metabolic syndrome without diabetes and a mean plasma OPG of  $14.9 \text{ pmol/L} \pm 5.3$ . 86 patients had a metabolic syndrome and a known diabetes. Their plasma OPG was  $14.2 \text{ pmol/L} \pm 4.9$ .

After adjustment on age and sex, circulating OPG correlated with anthropometric variables such as BMI, waist and hips circumferences, and MRI-based visceral adipose tissue while subcutaneous fat did not correlated (Table 2).

Furthermore, circulating OPG correlated with metabolic variables. HOMA-IR was strongly correlated with OPG, as well as leptinemia, adiponectinemia, and triglyceridemia (Table 2). No correlation was found between OPG and cholesterol profile.

Moreover, circulating OPG correlated with vascular variables. Plasma OPG correlated to arterial stiffness (pulse wave velocity) and with the number of atherosclerotic sites, but not with blood pressure or intima-media thickness (Table 2).

Finally circulating OPG correlated with hepatic variables. MRI based liver fat content correlated with OPG as well as ALT,  $\gamma$ -GT, and plasma ferritin level (table 2). Bilirubin did not correlated with OPG.

## Discussion

In our cohort of dysmetabolic subjects, plasma OPG levels were positively associated with visceral adipose tissue as well as insulin resistance and adipokines. OPG were also associated with arterial stiffness and the number of atherosclerotic sites. Interestingly, we showed for the first time that OPG was also associated with liver steatosis.

Previous studies that investigated the association between OPG and metabolic syndrome revealed contrasting findings. On one hand, no relationship were found between OPG and metabolic syndrome, for example in sub-Saharan African population (17) or in post-menopausal women (18). No significant correlations were found between OPG and body mass index, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, triglycerides, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, leptin, and adiponectin in both the obese and non-obese subjects (19).

On the other hand, higher OPG levels were associated with the risk of metabolic syndrome in type 2 diabetes patients (3) as well as in women with previous gestational diabetes (20). In these

cases, serum OPG levels were associated with BMI, insulin resistance, serum CRP level and carotid intima-media thickness (20). As chronic inflammation has been identified as an important component of the metabolic syndrome, relationships between OPG and both HOMA index and CRP were described by Gannagé-Yared *et al* (19). And finally, an association between OPG and adiponectin was first described by Pérez de Ciriza *et al* (21).

Our results show that circulating OPG is associated with major components of the metabolic syndrome such as waist circumference, resistance to insulin, or hypertriglyceridemia. OPG was also associated with adipokines.

Otherwise, osteoprotegerin is known to regulate bone mineral metabolism and to be associated with cardiovascular disease and mortality. Recent evidences support a relationship between serum OPG level and atherosclerosis: Ciccone *et al* investigated the relationship between intima-media thickness of the common carotid artery and OPG levels in patients with acute coronary syndrome and chronic coronary artery disease (5). OPG correlated with intima-media thickness. Patients with atheroma plaques had higher OPG and also those with coronary artery calcification (22). Major adverse cardiac events occurred more commonly in patients with higher baseline OPG levels (9).

Furthermore, despite the increasing number of reports linking OPG to a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease, OPG was not found to be related to unfavorable lipid profile in our study, like in other (19).

The expression of OPG was established in human normal vascular smooth muscle and endothelial cells and atherosclerotic lesions. However, its role in the vasculature remains unclear as OPG could represents a compensatory mechanisms to counteract the atherosclerotic process as well as being an active compound in the atherosclerotic process. The finding of a link between OPG and CRP suggests a possible involvement of OPG in the process of atherosclerosis through an inflammatory process. One proposed mechanism for this increased rate of plaque instability and poor cardiovascular outcome is the up-regulated expression of OPG in endothelial cells, in the presence of proinflammatory cytokines, which in turn increases the expression of endothelial cell adhesion molecules. Thereby, inflammatory cells are up-regulated and activity of matrix metalloproteinase is increased. This leads to degradation of the extracellular matrix and reduced thickness of the fibrous cap, the erosion of which causes thrombus formation (23).

Finally, to the best of our knowledge, our study is the first to describe an association between OPG

and hepatic variables, including liver fat content in dysmetabolic subjects. The results of our study extend the relationship between OPG and adverse outcomes of metabolic syndrome even further to liver steatosis.

There are limitations that need to be addressed regarding this study. The sample size is relatively small compared with other studies on metabolic syndrome. Furthermore, we could not study cardiovascular events or mortality but only intermediate outcomes.

In conclusion, in our study, the significant association between OPG and some of the major components of the metabolic syndrome suggests a possible link with the vascular and hepatic complications associated to the metabolic syndrome. Further research is needed to study whether OPG may be a useful biomarker to help identify metabolic patients at risk of those complications and whether further exploration of this pathway may lead to discovery of new therapeutic targets.

## Aknowledgments

We thank all patients followed up for their kind participation in this research.

## Conflict of interests

All authors declare that there are no conflicts of interest related to this manuscript.

## References

- Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004;95:1046–1057.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, *et al*. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260–1268.
- Tavintharan S, Sharon Pek LT, Liu JJ, *et al*. Osteoprotegerin is independently associated with metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2014;11(5):359–362.
- Hosbond SE, Poulsen TS, Diederichsen AC, Nybo M, Rasmussen LM, Mickley H. Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis: a systematic update. *Scand Cardiovasc J* 2012;46(4):203–11.
- Ciccone MM, Scicchitano P, Gesualdo M, Zito A, Carbonara R, Locorotondo M, Mandurino C, Masi F, Bocalini F, Lepera ME. Serum osteoprotegerin and carotid intima-media thickness in acute/chronic

- coronary artery diseases. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2013;14(1):43-8.
- <sup>6</sup> Pérez de Ciriza C, Moreno M, Restituto P, Bastarrika G, Simón I, Colina I, Varo N. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem* 2014;47(18):272-8.
  - <sup>7</sup> Luo ZR, Zheng WX, Huang MF, Chen H, Wang ZQ. A study of relationship between dialectical classification according to traditional Chinese medicine of acute coronary syndrome with serum osteoprotegerin and its ligand. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2013;25(11):673-6.
  - <sup>8</sup> Jansson AM, Hartford M, Omland T, Karlsson T, Lindmarker P, Herlitz J, Ueland T, Aukrust P, Caidahl K. Multimarker risk assessment including osteoprotegerin and CXCL16 in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(12):3041-9. 9
  - <sup>9</sup> Ghaffari S, Yaghoubi A, Baghernejad R, Sepehrvand N, Sokhanvar S, Haghighi AG. The value of serum osteoprotegerin levels in patients with angina like chest pain undergoing diagnostic coronary angiography. *Cardiol J* 2013;20(3):261-7.
  - <sup>10</sup> Mogelvang R, Pedersen SH, Flyvbjerg A *et al.* Comparison of osteoprotegerin to traditional atherosclerotic risk factors and high-sensitivity C-Reactive Protein for diagnosis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2012;109:515-520.
  - <sup>11</sup> Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(14):1113-32.
  - <sup>12</sup> Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009;13(1):9-19.
  - <sup>13</sup> Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* 2010.
  - <sup>14</sup> Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-1062.
  - <sup>15</sup> Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
  - <sup>16</sup> Ducluzeau PH, Boursier J, Bertrais S, Dubois S, Gauthier A, Rohmer V, Gagnadoux F, Leftheriotis G, Cales P, Andriantsitohaina R, Roullier V, Aubé C. MRI measurement of liver fat content predicts the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2013;39(4):314-21.
  - <sup>17</sup> Ayina Ayina CN, Boudou P, Fidaa I, Balti EV, Sobngwi E, Etoundi Ngoa LS, Gautier JF. Osteoprotegerin is not a determinant of metabolic syndrome in sub-Saharan Africans after age adjustment. *Ann Endocrinol (Paris)* 2014;75(3):165-70.
  - <sup>18</sup> Nabipour I, Kalantarhormozi M, Larijani B, *et al.* Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism* 2010;59:742-747.
  - <sup>19</sup> Gannagé-Yared MH, Yaghi C, Habre B, Khalife S, Noun R, Germanos-Haddad M, Trak-Smayra V. Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. *Eur J Endocrinol* 2008;158(3):353-9.
  - <sup>20</sup> Akinci B, Celtik A, Yuksel F, *et al.* Increased osteoprotegerin levels in women with previous gestational diabetes developing metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;91:26-31.
  - <sup>21</sup> Gannagé-Yared MH, Fares F, Semaan M, Khalife S, Jambart S. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(6):652-8.
  - <sup>22</sup> Pérez de Ciriza C, Moreno M, Restituto P, Bastarrika G, Simón I, Colina I, Varo N. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem* 2014;47(18):272-8.
  - <sup>23</sup> Venuraju SM, Yerramasu A, Corder R, Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2049-2061.

Troisième partie

## Soumission de Thèse

## Signatures

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Doyen de la Faculté de Médecine de Tours

# FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

**MONSEU Mathilde**

Nombre de pages : 38  
Nombre de tableaux : 4  
Nombre de figures : aucune

## Résumé

**Introduction** L'obésité et le syndrome métabolique sont souvent accompagnés d'une augmentation du tissu adipeux viscéral et de la stéatose hépatique. Ces deux phénomènes conduisent à une augmentation du risque cardio-vasculaire. Cependant, l'association entre le tissu adipeux viscéral, le contenu lipidique du foie, et l'ostéoprotégérine (OPG) chez les sujets dysmétaboliques est peu décrite. L'objectif de notre étude est de déterminer l'association entre le tissu adipeux viscéral, la teneur lipidique du foie et d'autres marqueurs du syndrome métabolique (*i.e.* hypertension artérielle, dyslipidémie et insulino-résistance) avec l'ostéoprotégérine chez des patients souffrant de syndrome métabolique.

**Patients et Méthodes** 314 sujets de la cohorte NUMEVOX, présentant au moins un critère de syndrome métabolique, ont été inclus. Chaque patient a bénéficié d'une évaluation métabolique et cardio-vasculaire détaillée incluant une évaluation de la rigidité artérielle, du score de plaque, un calcul du score d'insulino-résistance HOMA, un dosage des enzymes hépatiques, de la ferritine, une mesure du tour de taille et une évaluation de l'IMC. L'ostéoprotégérine plasmatique était dosée par une technique ELISA. Le tissu adipeux viscéral et le contenu lipidique du foie étaient évalués par IRM chez un sous-groupe de 140 patients. La rigidité artérielle et le score de plaque étaient évalués par échographie doppler. Les corrélations ont ensuite été calculées, avec un ajustement sur l'âge et le genre.

**Résultats** L'IMC, le tour de taille et le tissu adipeux viscéral évalué par IRM étaient associés à l'ostéoprotégérine, contrairement au tissu adipeux sous-cutané. Le contenu lipidique du foie était associé à l'ostéoprotégérine, de même que les ALAT, les  $\gamma$ -GT, la ferritine et les triglycérides. L'indice d'insulino-résistance HOMA était formellement corrélé à l'ostéoprotégérine, tout comme les dosages de leptine et d'adiponectine. L'ostéoprotégérine était également corrélée à la rigidité artérielle et au score de plaque.

**Conclusion** L'ostéoprotégérine plasmatique est associée positivement au tissu adipeux viscéral et à la stéatose hépatique, ainsi qu'à l'insulino-résistance et les adipokines. L'association significative entre l'ostéoprotégérine et la plupart des composants du syndrome métabolique suggère un lien entre cette hormone et les complications vasculaires associées au syndrome métabolique.

**Mots clés** Ostéoprotégérine - Syndrome métabolique - Stéatose hépatique - Tissu adipeux viscéral - Risque vasculaire

## Jury

Monsieur le Professeur	Thierry	CONSTANS
Monsieur le Professeur	<u>Pierre-Henri</u>	<u>DUCLUZEAU</u>
Monsieur le Professeur	François	MAILLOT
Madame le Docteur	Lise	CRINIERE

**Date de la soutenance :**

26 Octobre 2015