



HAL
open science

Effets comparatifs de protocoles de course sur la qualité et la réparation osseuse chez le rat Wistar

Céline Bourzac

► **To cite this version:**

Céline Bourzac. Effets comparatifs de protocoles de course sur la qualité et la réparation osseuse chez le rat Wistar. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7061 . tel-03098338v2

HAL Id: tel-03098338

<https://hal.science/tel-03098338v2>

Submitted on 26 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

Ecole doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

Laboratoire *Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie OstéoArticulaires,*

UMR CNRS 7052, INSERM U1271

Effets comparatifs de protocoles de course sur la qualité et la réparation osseuse chez le rat Wistar

Par Céline Bourzac

Thèse de doctorat de **Biothérapies**

Dirigée par Hugues Portier
Et par Morad Bensidhoum

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2020

Devant un jury composé de :

Sheila LAVERTY , Professeur, Université de Montréal	Rapporteur
Anne PELLÉ , Professeur, Université Sorbonne Paris Nord	Rapporteur
Georges CARLE , Directeur de Recherche CNRS, Université Côte d'Azur	Président
Katia COLLOMP , Professeur, Université d'Orléans	Examineur
Christelle JAFFRÉ , Professeur, Université de Picardie	Examineur
Stéphane PALLU , Maître de conférences, Université d'Orléans	Examineur
Morad BENSIDHOUM , Chargé de recherche CNRS, Université de Paris, Codirecteur de thèse	
Hugues PORTIER , Maître de conférences, Université d'Orléans	Directeur de thèse



Titre : Effets comparatifs de protocoles de course sur la qualité et la réparation osseuse chez le rat Wistar

Résumé :

Il est désormais bien établi que la pratique d'un exercice physique a des effets bénéfiques sur le tissu osseux et son métabolisme. Cependant, aucun consensus n'a encore été établi en ce qui concerne les effets ostéogéniques de l'exercice sur l'os sain ou en cours de réparation. L'objectif de ce travail est d'une part d'évaluer les effets de deux protocoles de course (continue vs. intermittente) sur les paramètres de la qualité osseuse et le métabolisme osseux, d'autre part d'évaluer les effets de la pratique préventive de ces protocoles de course sur la réparation osseuse chez le rat Wistar.

Ces travaux mettent en évidence un effet bénéfique de la course intermittente avec intervalles de haute intensité sur la qualité de l'os cortical tandis que la course continue modérée a des effets bénéfiques sur la qualité de l'os trabéculaire mais néfastes sur l'os cortical. Ces effets dépendent également de l'os étudié (tibia vs. fémur). De plus, nos données suggèrent que les deux protocoles de course accélèrent la réparation d'un défaut osseux de taille non critique dans le tibia mais pas dans le fémur, probablement par modulation de la résorption osseuse.

La pratique de différents types de course serait plus bénéfique à la santé osseuse qu'un seul. Dans le cadre du raffinement des modèles animaux, l'utilisation du tibia serait plus adaptée à l'étude de la guérison osseuse que le fémur.

Mots clefs : *qualité osseuse, métabolisme osseux, réparation osseuse, défaut osseux non critique, ostéoclaste, ostéocyte, rat, exercice physique*

Title: Comparative effects of running protocols on bone quality and bone repair in Wistar rats

Abstract:

It is now well established that physical exercise has unquestionable beneficial effects on bone tissue and metabolism. However, no consensus regarding the osteogenic effects of exercise on healthy or healing bone has been reached yet. The objective of this work is (i) to evaluate the effects of two running protocols (continuous vs. intermittent) on the parameters of bone quality and bone metabolism, and (ii) to evaluate the preventive effects of these running protocols on bone repair in Wistar rats.

We demonstrated here that high-intensity interval-running has positive effects on cortical bone quality, while moderate continuous running has beneficial effects on trabecular bone but is detrimental to cortical bone. These effects also depend on the bone (tibia vs. femur). In addition, our data suggest that both running protocols accelerate the repair of a non-critical bone defect in the tibia but not in the femur, possibly by modulating bone resorption.

Associating different types of running is more beneficial to bone health than just one. As part of the refinement of animal models, the use of the tibia would be more suitable to study bone healing than the femur.

Keywords: *Bone quality, bone metabolism, bone repair, non-critical sized bone defect, osteoclast, osteocyte, rat, physical exercise*

Remerciements

Ce travail a été mené au sein du Laboratoire de « Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie OstéoArticulaires », unité CNRS 7052, Inserm U1271, à Paris et dirigé par le Dr Hervé Petite. Ce projet a été financé par l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (EnvA Appel à projet 2018) et le CNRS (DEFI CNRS Mécanobiologie).

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements au Dr Hervé Petite pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces 4 années. Merci pour ses conseils avisés, sa bienveillance et son aide.

Mes plus sincères remerciements sont destinés au Dr Hugues Portier, mon directeur de thèse pour son encadrement, son indéfectible soutien, son aide précieuse et sa compréhension. Merci pour les tableaux Excel et les analyses statistiques, qui n'ont (presque !) plus de secrets pour moi. Merci pour ton aide dans les expérimentations, les analyses et les articles, et pour m'avoir guidée efficacement durant ces 4 ans.

Vivent la valine et l'isoleucine et à bas le glucose ! Mais je ne renoncerai pas pour autant au chocolat !

Un grand merci au Dr Morad Bensidhoum, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir guidée dans ce projet et m'avoir aidée à dompter ces deux machines que sont les microscanners et les logiciels qui s'y rattachent. Merci également de m'avoir réinitié à l'extraction d'ARN.

Merci à l'EnvA et au CNRS pour leur soutien financier.

Je remercie chaleureusement le Pr Anne Pellé pour avoir accepté d'être rapporteur sur ma thèse.

J'adresse mes plus vifs et mes plus sincères remerciements au Pr Sheila Laverty, Professeur à la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint Hyacinthe, Université de Montréal, pour avoir accepté d'être rapporteur sur ma thèse et surtout pour m'avoir permis de faire mes premiers vrais pas dans la Recherche. Et dire que je vous avais soutenu que je ne ferais jamais de PhD, que ce n'était pas pour moi, et que je voulais faire une spécialisation en chirurgie ! Quelques années plus tard, je suis Dipl. ACVS-LA, et sur le point de soutenir ma thèse... Comme quoi, l'un n'était pas exclusif de l'autre...

Merci de m'avoir montré qu'avec volonté et détermination, on peut accomplir beaucoup (je continue cependant à croire que vous avez 9 vies) et allier clinique, recherche et vie de famille équilibrée. Vous êtes un véritable modèle pour moi.

Je remercie le Dr Georges Carle, Directeur de recherche au CNRS de Nice pour avoir accepté la présidence du jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie le Pr Christelle Jaffré, Professeur à l'Université de Picardie, et le Pr Katia Collomb, Professeur à l'Université d'Orléans pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance de thèse.

Merci au Dr Stéphane Pallu, Maître de conférences à l'Université d'Orléans, pour ses précieux conseils et la découverte de l'univers Synchrotron, ce petit coin isolé où le temps s'arrête (sauf le temps de faisceau, encore que...). Petites pauses bienvenues pour couper de la Clinique, elles ont donné une autre dimension à la définition de « garde de nuit ». Je garderai un souvenir impérissable de nos parties de Monopoly-Game of Thrones...

Merci à l'ensemble du laboratoire pour votre présence et vos conseils avisés, et merci particulièrement à Hanane El-Hafci, Delphine Logeart-Avramoglou, Esther Potier et Christine Chappard pour leur aide précieuse dans ce projet.

Merci à Alexandra Breton, Victoria Tessier, Rokia Wazzani, Stéphanie Uk, Cyprien Denoeud, Lionel Quentin, Manon Maroquenne, et Marine Vermot des Roches, pour leur précieuse contribution dans ce projet. Merci à Pauline Wosinski pour la « chasse au trésor ».

Merci au secrétariat de l'Ecole Doctorale pour leur compréhension et leur aide précieuse.

Merci à Ariane pour les bons moments, le partage des frustrations et les non-dits.

Merci à Brasse pour m'avoir initiée patiemment un week-end à Grenoble à la manipulation des rats (ce n'était pas gagné !). Trop tard pour les consultations NAC à l'ENVL mais indispensable pour ce projet. Dommage que tu ne sois plus là pour en voir le fruit.

Pour finir, je voulais remercier toute ma famille, notamment mes parents, qui m'ont toujours encouragée, soutenue au quotidien et d'entreprendre tout ce que je souhaitais, y compris dans mon exil de plusieurs années au Canada.

Merci à Laurent, pour qui cette thèse a dû être aussi difficile que pour moi. Merci pour avoir géré l'intendance à la maison, et la petite boule d'énergie qui nous a rejoint pendant cette thèse. Merci pour ta présence, ton soutien et pour ta manipulation experte des tableurs Excel (encore eux) ... Et je te libère enfin ton bureau.

Merci à ma petite boule d'énergie Enola, pour ta participation active à la rédaction de ce manuscrit. Je suis soulagée cependant que tu ne maîtrises pas encore le clic « vider la corbeille ». Tu as été pendant cette thèse (et tu seras toujours !) mon petit rayon de soleil.

À tous ceux que je n'ai pas cité et qui ont eu une pensée pour moi pendant ce travail.

Liste des publications et communications sur le sujet

- ARTICLES ACCEPTES DANS UNE REVUE INTERNATIONALE A COMITE DE LECTURE

- *ARTICLE ORIGINAL :*

Bourzac C., Bensidhoum M., Manassero M., Chappard C., Michoux M., Pallu S., Portier H. Preventive continuous running-exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in male Wistar rats: a pilot study using μ CT. *Life*, 2020, 10 (12), 308- (Annexe 1)

George D., Allena R., **Bourzac C.**, Pallu S., Bensidhoum M., Portier H., Rémond Y. A new cellular activation model for the prediction of bone density variation under medium and high mechanical load. *Mathematics and Mechanics of Complex Systems*, Vol. 8 (4) p287-306 (Annexe 2)

- *REVUE :*

Bourzac C., Bensidhoum M., Pallu S., Portier H. Use of adult mesenchymal stromal cells in tissue repair: impact of physical exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2019, 317 (4), C642-C654 (Annexe 3)

- *ABSTRACT :*

Bourzac C., Bensidhoum M., Manassero M., Pallu S., Portier H. Running-exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in male Wistar rats. Abstracts of the ECTS Congress 2019: ECTS 2019 11-14 May 2019, Budapest, Hungary 46th European Calcified Tissue Society Congress, *Calcif Tissue Int.* 2019 Apr 19;1-167

- PRESENTATIONS LORS DE CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

- *PRESENTATION ORALE :*

George D., **Bourzac C.**, Pallu S., Allena R., Rémond Y., Portier H. First results on bone density variation under high loads through the competition between osteoblasts and osteoclasts. E-Workshop of the IRP Coss&Vita, ELADYN-BIO, 12-13 novembre 2020

George D., Allena R., **Bourzac C.**, Pallu S., Bensidhoum M., Portier H. Rémond Y. How mechanobiological modeling of cellular activities can predict bone density evolution? Conférence de la Société de Biomécanique, octobre 2020, Metz, France

Bourzac C., Bensidhoum M., Germain P., Pallu S., Portier H. Effets de différents protocoles de course sur la microarchitecture et le métabolisme osseux chez les rats Wistar mâles. 18^{ième} congrès de l'ACAPS, 28-31 octobre 2019, Paris, France

Bourzac C., Bensidhoum M., Manassero M., Pallu S., Portier H. Les exercices préventifs de course à pied améliorent la guérison des défauts osseux de taille non critique chez les rats Wistar mâles. 18^{ième} congrès de l'ACAPS, 28-31 octobre 2019, Paris, France

Germain A., Germain P., **Bourzac C.**, Pallu S., Portier H., Pichon C. Incidence de la course sur l'apparition de FHL2 au sein des cellules de la moelle osseuse. 18^{ième} congrès de l'ACAPS, 28-31 octobre 2019, Paris, France

Bourzac C., Bensidhoum M., Portier H. Intérêt de la pratique d'un exercice physique dans la réparation de défaut osseux. Université de Paris, Journées de l'Ecole doctorale HOB; 15-16 mai 2019

Bourzac C., Bensidhoum M., Portier H. Intérêt de la pratique d'un exercice physique dans la réparation de défaut osseux. Université de Paris, 18 décembre 2018

– *COMMUNICATION AFFICHEE :*

Bourzac C., Pallu S., Wazzani R., Bensidhoum M., Portier H. Effects of exercise on bone histological parameters: Continuous vs. intermittent running in Wistar rats. 47th European Calcified Tissue Society Congress, 20-23 octobre 2020, Marseille, France (Annexe 4).

Bourzac C., Bensidhoum M., Manassero M., Pallu S., Portier H. Running-exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in male Wistar rats. 46th European Calcified Tissue Society Congress, 11-14 May 2019, Budapest, Hungary (Annexe 5).

Sommaire

REMERCIEMENTS	7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SUR LE SUJET	11
SOMMAIRE	13
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	17
TABLE DES FIGURES.....	23
LISTE DES TABLEAUX	25
INTRODUCTION.....	27
1. PREMIERE PARTIE : ETAT DE L'ART	29
1.1. CHAPITRE 1 : LE TISSU OSSEUX.....	29
1.1.1. <i>Fonctions de l'os</i>	29
1.1.1.1. Fonctions mécaniques.....	29
1.1.1.1.1. Protection.....	29
1.1.1.1.2. Mouvement.....	30
1.1.1.2. Fonctions biologiques.....	30
1.1.1.2.1. Homéostasie phosphocalcique	30
1.1.1.2.2. Production de cellules sanguines	31
1.1.1.2.3. Rôle endocrine	31
1.1.1.2.3.1. Métabolisme énergétique	31
1.1.1.2.3.2. Ostéo-immunologie.....	32
1.1.1.2.3.3. Fertilité chez le mâle	33
1.1.1.2.3.4. Autres fonctions biologiques	33
1.1.2. <i>Propriétés de l'os et qualité osseuse</i>	34
1.1.2.1. Propriétés matérielles de l'os.....	34
1.1.2.2. Facteurs déterminant la qualité osseuse.....	35
1.1.2.2.1. Géométrie osseuse.....	35
1.1.2.2.2. Microarchitecture osseuse.....	37
1.1.2.2.2.1. Os cortical.....	37
1.1.2.2.2.2. Os trabéculaire	40
1.1.2.2.3. Propriétés tissulaires	42
1.1.2.2.3.1. Matrice extracellulaire	42
1.1.2.2.3.2. Activité cellulaire osseuse	47
1.1.3. <i>Modelage et remodelage osseux</i>	55
1.1.3.1. Phase d'initiation.....	57
1.1.3.2. Phase de résorption	58
1.1.3.3. Phase intermédiaire	58
1.1.3.4. Phase de formation osseuse.....	59
1.1.4. <i>Formation et réparation osseuse</i>	62
1.1.4.1. Ontogenèse	62
1.1.4.1.1. Ossification intramembraneuse	62
1.1.4.1.2. Ossification endochondrale.....	63
1.1.4.2. Réparation osseuse	64
1.1.4.2.1. Cicatrisation par seconde intention	65
1.1.4.2.1.1. Phase inflammatoire	65
1.1.4.2.1.2. Phase de réparation	66
1.1.4.2.1.3. Phase de remodelage	68
1.1.4.2.1.4. Cicatrisation par première intention	69
1.2. CHAPITRE 2 : EFFETS DE L'EXERCICE PHYSIQUE ET TISSU OSSEUX	72
1.2.1. <i>Différents types d'exercices physiques</i>	72
1.2.2. <i>Effets généraux des exercices physiques sur la qualité osseuse chez le rat sain</i>	73
1.2.3. <i>Effets de la course sur tapis roulant sur les paramètres de la qualité osseuse</i>	75

1.2.3.1.	Effets de la course sur la densité minérale osseuse	79
1.2.3.2.	Effets de la course sur la microarchitecture osseuse	81
1.2.3.3.	Effets de la course sur les cellules osseuses	82
1.2.3.3.1.	Effets sur la lignée ostéoblastique	82
1.2.3.3.2.	Effets sur la lignée ostéoclastique.....	83
1.2.3.4.	Effets de la course sur les paramètres biomécaniques	83
1.2.3.5.	Synthèse des mécanismes d'action de la course sur l'os	85
1.2.3.6.	Effets de la course sur tapis sur la réparation osseuse.....	88
1.3.	HYPOTHESES ET OBJECTIFS	92
2.	DEUXIEME PARTIE : EFFETS DE LA COURSE SUR TAPIS ROULANT SUR LA QUALITE DU TISSU OSSEUX SAIN ET LA CICATRISATION OSSEUSE CHEZ LE RAT	93
2.1.	CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES	93
2.1.1.	<i>Animaux</i>	93
2.1.2.	<i>Protocole expérimental</i>	93
2.1.2.1.	Protocole de course.....	94
2.1.2.1.1.	Acclimatation au tapis de course	94
2.1.2.1.2.	Test de vitesse maximale aérobie	95
2.1.2.1.3.	Entraînement	95
2.1.2.1.4.	Suivi des paramètres corporels et de la quantité de nourriture ingérée	96
2.1.2.1.5.	Modèle de défaut osseux de taille non critique (étude 2)	96
2.1.2.1.5.1.	Anesthésie	97
2.1.2.1.5.2.	Procédure chirurgicale	97
2.1.2.1.5.3.	Suivi	98
2.1.2.1.6.	Analyses in vivo de la microarchitecture et de la densité minérale osseuse (étude 2)	98
2.1.2.1.6.1.	Paramètres de l'acquisition	99
2.1.2.1.6.2.	Reconstruction tridimensionnelle	99
2.1.2.1.6.3.	Volume d'intérêt	99
2.1.2.1.6.4.	Calibration et densité minérale osseuse	100
2.1.2.1.6.5.	Seuillage et paramètres évalués.....	100
2.1.2.1.7.	Analyses ex vivo	101
2.1.2.1.7.1.	Macroarchitecture.....	101
2.1.2.1.7.2.	Dosages sanguins	101
2.1.2.1.7.3.	Analyses ex vivo de la microarchitecture osseuse et de la densité minérale osseuse (étude 1)	102
2.1.2.1.7.4.	Analyses histologiques par microscopie (étude 1)	105
2.1.2.1.7.5.	Analyses de l'expression génique par RT-PCR	109
2.1.3.	<i>Statistiques</i>	110
2.2.	CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION DES ETUDES	111
2.2.1.	<i>Effets comparatifs de deux protocoles de course sur la qualité osseuse (Etude 1)</i>	111
2.2.1.1.	Résultats	111
2.2.1.1.1.	Paramètres corporels et consommation de nourriture	111
2.2.1.1.2.	Test de vitesse maximale aérobie	112
2.2.1.1.3.	Géométrie osseuse.....	112
2.2.1.1.3.1.	Macroarchitecture osseuse	112
2.2.1.1.3.2.	Macroarchitecture corticale.....	113
2.2.1.1.4.	Microarchitecture osseuse.....	114
2.2.1.1.4.1.	Microarchitecture trabéculaire fémorale et tibiale	114
2.2.1.1.4.2.	Microarchitecture corticale tibiale	115
2.2.1.1.5.	Propriétés tissulaires	116
2.2.1.1.5.1.	Densités minérales osseuses tibiales trabéculaire et corticale	116
2.2.1.1.5.2.	Occupation des lacunes ostéocytaires	117
2.2.1.1.5.3.	Apoptose ostéocytaire	118
2.2.1.1.5.4.	Activité ostéoclastique	119
2.2.1.1.6.	Paramètres sanguins	120
2.2.1.2.	Discussion	121
2.2.2.	<i>Effets comparatifs de deux protocoles de course sur la guérison d'un défaut osseux de taille non critique (Etude 2)</i>	125
2.2.2.1.	Résultats	125
2.2.2.1.1.	Paramètres corporels et consommation de nourriture	125
2.2.2.1.2.	Test de vitesse maximale aérobie	126
2.2.2.1.3.	Macroarchitecture	126
2.2.2.1.4.	Evolution de la guérison du défaut osseux évaluée au microscanner in vivo	127

2.2.2.1.5.	Paramètres sanguins	132
2.2.2.2.	Discussion	134
2.2.3.	<i>Résultats et discussion complémentaires : données non finalisées, complications et limitations</i> 137	
2.2.3.1.	Eléments communs aux deux études	137
2.2.3.1.1.	Les RT-PCR.....	137
2.2.3.1.2.	Les vitesses maximales aérobie.....	138
2.2.3.1.3.	La moelle osseuse et les cellules souches	139
2.2.3.2.	Etude sur la qualité osseuse	139
2.2.3.2.1.	Microarchitecture fémorale au micro-scanner	139
2.2.3.2.2.	Marquage du front de minéralisation	139
2.2.3.2.3.	Marqueurs du remodelage osseux.....	140
2.2.3.3.	Etude sur la guérison osseuse	140
2.2.3.3.1.	Détermination du volume d'intérêt pour évaluation du tissu cicatriciel	140
2.2.3.3.2.	Evaluation histologique du tissu cicatriciel	141
2.2.3.3.3.	Mécanismes propres à l'exercice impliqués dans la guérison osseuse	141
3.	TROISIEME PARTIE : PERSPECTIVES ET CONCLUSION	143
3.1.	COMMENT L'AMELIORATION DE LA QUALITE OSSEUSE FAVORISE LA GUERISON OSSEUSE ?	143
3.2.	PERSPECTIVES ET APPLICATION CHEZ L'HOMME.....	144
3.3.	INTEGRATION AUX THEMATIQUES DU LABORATOIRE B3OA.....	145
	BIBLIOGRAPHIE	147
	ANNEXE 1 : ARTICLE REPARATION OSSEUSE	175
	ANNEXE 2 : ARTICLE REMODELAGE OSSEUX	193
	ANNEXE 3 : REVUE EXERCICE ET CELLULES SOUCHES	213
	ANNEXE 4 : POSTER ECTS 2020	227
	ANNEXE 5 : POSTER ECTS 2019	227

Liste des principales abréviations

-A-

Acp5 : gène de la phosphatase acide tartrate résistante

ACTH : « adenocorticotropin hormone », hormone corticotrope, adénocorticotropine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

Alp : gène de la phosphatase alcaline

Agpt-1 : gène de l'angiopoïétine-1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr 18S: acide ribonucléique ribosomal de l'unité 18S

-B-

bFGF : « basic fibroblast growth factor »

Bglap : gène de l'ostéocalcine

BMP : « bone morphogenetic protein », protéine morphogénétique osseuse

BMU : unité de remodelage osseux

BRC : « bone remodeling compartment »

BRU : « bone remodeling unit »

BS/BV : surface osseuse dans le volume osseux

BSP : « bone sialoprotein », sialoprotéine osseuse

BV/TV : fraction volumique d'os trabéculaire

-C-

CC : course continue

CI : course intermittente

CIHI : course par intervalles de haute intensité

CMO : contenu minéral osseux

Col1a1 : gène du collagène de type I

CSF-1 : « colony stimulating factor 1 »

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSM : cellules souches mésenchymateuses

Ct.Po : porosité corticale

-D-

DAB : diaminobenzidine

DKK1 : Dickkopf 1

DMO : densité minérale osseuse

DMO_c : densité minérale osseuse corticale

DMO_t : densité minérale osseuse trabéculaire

DMP1 : « dentin matrix acidic phosphoprotein 1 »

-E-

ELISA : « enzyme-linked immunosorbent assay »

-F-

FGF : « fibroblast growth factor »

FGF-23 : « fibroblast growth factor 23 »

-H-

HA : hydroxyapatite

h : heure

Htr3a : gène de l'« hydroxytryptamine receptor 3A »

-I-

IGF-1 : « insulin-like growth factor 1 »

IL-1 : interleukine 1

IL-6 : interleukine 6

IL-10 : interleukine-10

-J-

j : jour

-L-

LCN2 : lipocaline 2

Lrp5 : gène du « lipoprotein receptor-related protein »

-M-

m : mètre

MC2R : « melanocortin 2 receptor », récepteur à la mélanocortine 2

MC4R : « melanocortin 4 receptor », récepteur à la mélanocortine 4

M-CSF : « macrophage-colony stimulating factor », facteurs stimulant les colonies de macrophages

MEC : matrice extracellulaire

MEPE : phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire

µCT : « micro computed tomography », microtomographie à rayons X

min : minute

MMP : « matrix metalloproteinase », métalloprotéinase de la matrice

-N-

NTx : « N-terminal telopeptide », télopeptide N-terminal du collagène de type I

-O-

OC: ostéocalcine

OPG : ostéoprotégérine

OSF-1 : « osteoblast-stimulating factor-1 »

Osx : Osterix

-P-

PBS : « phosphate-buffered saline », tampon phosphate salin

PCR : « polymerase chain reaction »

PDGF : « platelet-derived growth factor »

Pdnp (Enpp) : gène de la « ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase »

PMMA : polyméthylmétacrylate

Po.Dm : diamètre des pores

Po.N : nombre de pores

Po.Sp : espace entre les pores

Ptgs2 : gène de la prostaglandine synthase 2

PTH : parathormone

-R-

RANK : « receptor activator of nuclear factor kappa-B », récepteur activateur du NF-κB

RANKL : « receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand », ligand du récepteur activateur du NF-κB

RLC : réseau lacuno-canaliculaire

ROI : « region of interest », région d'intérêt

rpm : rotation par minute

RT-PCR : « real-time polymerase chain reaction »

Runx2 : « Runt-related transcription factor 2 »

-S-

SDF-1 : « stromal cell-derived factor-1 »

SED : sédentaire

SIBLINGS : « small integrin binding ligand N-linked glycoprotein »

SMI : « structure model index »

SNC : système nerveux central

Sost : gène de la sclérostine

Sp7 : gène Osterix

Sparc : gène de l'ostéonectine

Spp1 : gène de l'ostéopontine

-T-

Tb.N : nombre de trabécules osseuses

Tb.Pf : « trabecular pattern factor »

Tb.Sp : espace entre les trabécules osseuses

TBST : tampon Tris et phosphate salin

TGF- β : « transforming growth factor β »

TNF- α : « tumor necrosis factor α »

Tnfrsf11b : gène de l'ostéoprotégérine

TNFSF11 : « tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 »

TRAP : « tartrate-resistant acid phosphatase », phosphatase acide résistante au tartrate

-V-

VEGF(a) : vascular endothelial growth factor (a)

VMA : vitesse maximale aérobie

Vmax : vitesse maximale de course

VOI : « volume of interest », volume d'intérêt

Table des figures

Figure 1 : Fonctions de l'os.....	33
Figure 2 : Courbe contrainte-déformation caractéristique du tissu osseux	35
Figure 3 : Exemples d'influence de la géométrie d'un matériel sur ses propriétés mécaniques	37
Figure 4 : Organisation générale de l'os cortical chez l'Homme.....	38
Figure 5 : Organisation de l'os cortical de rat vue en microscopie optique.....	39
Figure 6 : Représentation tridimensionnelle de la porosité corticale tibiale chez le Rat femelle	40
Figure 7 : Organisation générale de l'os trabéculaire en microscanner	41
Figure 8 : Organisation de la matrice extracellulaire minéralisée.....	43
Figure 9 : Courbe contraintes-déformation (test de flexion en 3 points) du fémur en fonction de son degré de minéralisation	46
Figure 10 : Différentes cellules osseuses	48
Figure 11 : Ostéocyte et réseau lacuno-canaliculaire.....	50
Figure 12 : Communication cellulaire : mécano-transduction ostéocytaire.....	51
Figure 13 : Différentiation des ostéoclastes	53
Figure 14 : Contrôle de la masse osseuse et de la qualité osseuse par les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes.....	55
Figure 15 : Cycle du remodelage osseux	57
Figure 16 : Représentation du processus d'ossification intramembraneuse	63
Figure 17 : Ossification endochondrale (A) et croissance en longueur des os longs (B)	64
Figure 18 : Déroulement de la cicatrisation osseuse par seconde intention.....	66
Figure 19 : Etat de la guérison d'un défaut osseux de taille non critique (A) et d'un défaut de taille critique 6 semaines après ostéotomie du fémur chez le Rat.....	68
Figure 20 : Cicatrisation par contact lors de cicatrisation osseuse par seconde intention	70
Figure 21 : Facteurs déterminant la force et la fragilité osseuse.....	71
Figure 22 : Influence de la région osseuse du fémur sur les effets de la course continue sur la densité minérale osseuse (DMO)	79
Figure 23 : Os sous chondral cortical en coloration au bleu de Toluidine chez un Rat sédentaire (A) et chez un rat pratiquant la course intermittente (B)	82
Figure 24 : Effet de l'exercice sur la courbe contrainte-déformation du fémur.....	84
Figure 25 : Effets de la course continue sur la réparation d'un défaut osseux de taille non critique chez le Rat femelle.....	89
Figure 26 : Effets bénéfiques et néfastes de la course sur tapis roulant sur la qualité et la réparation osseuse	91
Figure 27 : Protocole expérimental général en deux phases	94
Figure 28 : Forage du défaut osseux non critique dans le fémur droit.....	97
Figure 29 : Appareil microscanner <i>in vivo</i> à haute résolution (Skyscan® 1176).....	99
Figure 30 : Etapes de la sélection du volume d'intérêt pour analyse microarchitecturale.....	100
Figure 31 : Analyses planifiées sur les os dans la phase 1 de l'étude	101
Figure 32 : Appareil microscanner <i>in vitro</i> à haute résolution (Skyscan® 1172).....	102
Figure 33 : Détermination des régions d'intérêt pour analyse des microarchitectures corticale et trabéculaire (exemple du tibia).....	105
Figure 34 : Coloration au bleu de Stevenel et picrofuchsine de Von Gieson pour comptage des lacunes ostéocytaires	106
Figure 35 : Mesure de l'épaisseur corticale dans la diaphyse tibiale selon 8 axes	107

Figure 36 : Marquage de la caspase 3 clivée pour comptage dans 3 zones du cortex	109
Figure 37 : Epaisseur corticale tibiale (zone diaphysaire) en fonction de la localisation anatomique	114
Figure 38 : Occupation des lacunes ostéocytaires.....	117
Figure 39 : Apoptose ostéocytaire par marquage à la caspase 3 clivée	118
Figure 40 : Activité ostéoclastique par marquage TRAP.....	119
Figure 41 : Paramètres sanguins chez les rats à T8.....	120
Figure 42 : Evolution de la guérison du défaut osseux de taille non critique dans le tibia (A) et le fémur (B) évaluée au microscanner <i>in vivo</i> (de T9 à T12).....	128
Figure 43 : Evolution de la guérison d'un défaut osseux non critique dans le tibia et le fémur	131
Figure 44 : Paramètres sanguins chez les rats à T12.....	133
Figure 45 : Gènes mécanosensibles d'intérêt identifiés par RT-PCR (étude 1).....	138
Figure 46 : Bilan des effets de protocoles de course sur tapis roulant sur la qualité osseuse du tibia et la guérison osseuse de défauts osseux de taille non critique dans le fémur et le tibia	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire osseuse.....	45
Tableau 2 : Récapitulatif des facteurs locaux, systémiques et centraux intervenant sur le remodelage osseux	60
Tableau 3 : Effets positifs (vert) et négatifs (rose) des protocoles de course sur la microarchitecture et les propriétés biomécaniques en fonction de la durée des protocoles.....	76
Tableau 4 : Protocole de mesure de la vitesse maximale de course (Vmax) pour la détermination de la vitesse maximale aérobie chez les rats	95
Tableau 5 : Paramètres corporels des rats à l'entraînement (étude 1).....	111
Tableau 6 : Consommation d'aliment et d'eau pendant la période d'entraînement (étude 1)	112
Tableau 7 : Vitesse maximale aérobie en début (T1) et fin (T8) d'entraînement (étude 1)...	112
Tableau 8 : Paramètres de macroarchitecture des fémurs et des tibias (étude 1).....	113
Tableau 9 : Microarchitecture trabéculaire du fémur distal et du tibia proximal.....	115
Tableau 10 : Microarchitecture corticale du tibia proximal	116
Tableau 11 : Densité minérale osseuse trabéculaire et corticale dans le tibia en fin d'entraînement (T8).....	116
Tableau 12 : Paramètres corporels des rats à l'entraînement (étude 2).....	125
Tableau 13 : Consommation d'aliment et d'eau pendant la période d'entraînement (étude 2)	125
Tableau 14 : Vitesse maximale aérobie en début (T1) et fin (T8) d'entraînement (étude 2).	126
Tableau 15 : Paramètres de macroarchitecture de fémurs et des tibias (étude 2)	127
Tableau 16 : Fraction du volume osseux (BV/TV, %) dans le tissu de réparation	129
Tableau 17 : Paramètres microarchitecturaux du tissu de réparation.....	130

Introduction

Alors que l'espérance de vie augmente dans les pays industrialisés, le nombre d'affections osseuses liées au vieillissement, et notamment l'ostéoporose, ne cesse aussi d'augmenter (Reginster and Burlet 2006). Plus de 40 % des femmes et plus de 20 % des hommes atteints d'ostéoporose souffriront d'une fracture au cours de leur vie (Lane *et al.* 2006). Or chez les personnes âgées, la survenue d'une fracture réduit de 6 ans leur espérance de vie (Center *et al.* 1999). La prévention de l'ostéoporose et du risque de fracture associé est donc cruciale pour améliorer la qualité de vie.

L'os est un tissu dynamique qui se remodèle en fonction des contraintes mécaniques (Wolff 1986) auquel il est soumis. Il est capable de s'adapter à ces contraintes, afin d'allier résistance et économie d'énergie (Bonewald 2007). Il est également capable de se régénérer sans cicatrice, en cas de fracture. Comme le muscle, le tissu osseux a besoin d'être stimulé pour se renforcer. Par exemple, le développement de la masse osseuse est estimé à seulement 30 à 50 % de son potentiel lorsque l'os n'est pas soumis à des contraintes (Turner *et al.* 2006). De plus, en situations d'immobilisation ou d'hypogravité, la masse osseuse diminue (Alexandre and Vico 2011, Sibonga 2013). Au contraire, l'exercice physique génère des contraintes sur l'os, par le biais des contractions musculaires mais aussi des impacts au sol ou des chocs, qui affectent directement les qualités de l'os (Rubin and Lanyon 1985), et notamment sa masse (Schoutens *et al.* 1989).

Il est maintenant bien reconnu que l'exercice physique a des effets bénéfiques sur le squelette et sur le métabolisme osseux (Bonewald and Johnson 2008). Ces effets sont prolongés pendant plusieurs années, même après l'arrêt de l'exercice (Anderson 2000, Fuchs *et al.* 2001). Divers types d'exercice ont été recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé pour leurs effets bénéfiques sur la santé en général et sur la santé de l'os, en particulier dans le cadre de l'ostéoporose. Il n'existe cependant, à l'heure actuelle, aucun consensus sur les effets de différents exercices sur l'homéostasie osseuse et notamment sur leur caractère plus ou moins ostéogénique. Il nous semblait donc pertinent d'étudier les effets de deux protocoles de course, un exercice qui ne demande aucun équipement ou investissement particulier, sur les caractéristiques du tissu osseux et de juger, par l'utilisation d'un modèle de guérison osseuse, du caractère ostéogénique de ces deux protocoles.

Les relations entre métabolisme osseux, régénération osseuse et exercice physique sont complexes. En préambule de la présentation des résultats de l'étude expérimentale effectuée dans le cadre de cette thèse, la revue bibliographique qui suit s'intéresse à la relation composition-organisation-qualité de l'os, à ses capacités de remodelage et de réparation, et à la modulation de ces paramètres par l'exercice physique.

1. Première partie : Etat de l'art

Le premier chapitre de cette revue bibliographique présente le tissu osseux en détaillant ses fonctions, la notion de qualité osseuse à travers la composition et l'organisation du tissu osseux, ainsi que ses capacités de remodelage et de régénération.

Le deuxième chapitre s'intéresse à l'exercice physique, et plus particulièrement la course sur tapis roulant, et à ses effets sur les paramètres de la qualité osseuse et sur la réparation osseuse.

1.1. Chapitre 1 : Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif hautement spécialisé. Caractérisé par de nombreux éléments cellulaires inclus dans une matrice extracellulaire minéralisée (calcifiée), c'est un tissu capable d'auto-renouvellement, remplissant un rôle à la fois biologique et mécanique. Les propriétés mécaniques de l'os, et donc la notion de qualité osseuse, sont grandement liées à la composition et la microarchitecture du tissu osseux.

1.1.1. Fonctions de l'os

Les fonctions de l'os peuvent se résumer en deux grandes classes : les fonctions mécaniques, afin d'assurer la protection des organes et le mouvement, et les fonctions biologiques de maintien de l'homéostasie et de production des cellules sanguines.

1.1.1.1. Fonctions mécaniques

1.1.1.1.1. Protection

Les os, par leur morphologie, leur structure et leurs caractéristiques de solidité et de résistance aux contraintes mécaniques externes, ont une fonction de protection des structures vitales. C'est le cas des os plats, par exemple, comme ceux de la boîte crânienne et les vertèbres qui protègent le système nerveux central, ou les côtes qui protègent l'appareil cardio-pulmonaire. Les os abritent également la moelle osseuse dans leur cavité médullaire.

1.1.1.1.2. Mouvement

Le squelette est un organe qui permet à la fois le soutien et les mouvements du corps. A la fois résistants, mais aussi dans une certaine mesure élastiques, les os permettent à l'organisme de supporter les effets de la gravité. Par les attaches qu'ils offrent aux tendons et le jeu des articulations entre segments osseux, ils constituent également des bras de levier permettant la réalisation de mouvements complexes.

1.1.1.2. Fonctions biologiques

Les fonctions d'homéostasie phosphocalcique et de production des cellules sanguines sont sans doute les fonctions biologiques de l'os les plus connues. Mais de récentes études ont montré que l'os est impliqué dans des fonctions métaboliques comme le développement cérébral, le métabolisme énergétique, l'immunologie ou la fonction reproductrice (Oury *et al.* 2011, Oury *et al.* 2013, Obri *et al.* 2018).

1.1.1.2.1. Homéostasie phosphocalcique

En raison de la composition chimique de la composante inorganique de la matrice cellulaire osseuse, l'os constitue un réservoir important de calcium, de phosphore et de magnésium (Parfitt 1987, Chen *et al.* 2004). Chez l'Homme, l'os renferme 99 % du calcium et 90 % du phosphore de l'organisme (Doyle and Jan de Beur 2008). Ce réservoir permet d'assurer une mobilisation rapide du calcium et du phosphore par les ostéoclastes, activés par des hormones du métabolisme comme la parathormone (PTH), et d'en maintenir les concentrations plasmatiques. Ainsi, l'hypocalcémie induit la production de PTH par les parathyroïdes, qui à son tour agit sur les ostéoblastes. Cette cascade entraîne le relargage de calcium et de phosphore à partir du réservoir osseux (Talmage *et al.* 1977), de façon indirecte, probablement par l'activation de RANKL, le signal de déclenchement de l'ostéoclastogenèse émis par les ostéoblastes. En effet, une action directe de la PTH sur les ostéoclastes est incertaine (Ma *et al.* 2001), puisqu'aucun récepteur à la PTH n'a été mis en évidence à la surface des ostéoclastes.

La PTH stimule également la production de la forme active de la vitamine D (Rizzoli *et al.* 1976). En réponse à l'augmentation de la vitamine D, les ostéocytes produisent le « fibroblast growth factor 23 » (FGF-23) (Tsujiikawa *et al.* 2003), qui agit sur les reins et la glandes parathyroïdes via la protéine Klotho, et induit ainsi une réduction de la phosphatémie (Nabeshima 2008).

1.1.1.2.2. Production de cellules sanguines

La moelle osseuse, localisée dans l'os spongieux, contient les cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'origine de la production des cellules des lignées érythrocytaire, leucocytaire (dont les précurseurs des ostéoclastes) et thrombocytaire (Arvidson *et al.* 2011). Extra-osseuse au cours du développement, l'hématopoïèse se produit exclusivement dans la moelle osseuse après la naissance, dans les côtes, les corps vertébraux et les métaphyses humérales et fémorale, à partir de niches situées à la surface de l'endoste, à proximité des vaisseaux sinusoides médullaires. Les ostéoblastes de l'endoste, les cellules stromales (adipocytes, fibroblastes notamment), mais également les ostéocytes et les ostéoclastes jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse (survie, renouvellement, prolifération et maturation des cellules hématopoïétiques) par le biais de médiateurs sécrétés ou membranaires (Heissig *et al.* 2002, Taichman 2005, Ponte *et al.* 2007, Sharkey *et al.* 2010, Sato *et al.* 2013).

1.1.1.2.3. Rôle endocrine

Comme bien d'autres organes, l'os peut se comporter comme un organe endocrine, par le biais de la sécrétion d'hormones spécifiques de l'os appelées « ostéokines ».

1.1.1.2.3.1. Métabolisme énergétique

Le tissu osseux régule le métabolisme énergétique de différentes façons. La moelle osseuse participe au métabolisme des lipides en stockant les triglycérides issus de la circulation sanguine. Elle constitue alors un réservoir qui peut être mobilisé, au besoin (Gimble *et al.* 2006). Les lipides de la moelle osseuse fourniraient ainsi l'énergie nécessaire au fonctionnement des compartiments mésenchymateux et hématopoïétique de la moelle osseuse (Ducy 2011). Mais c'est surtout par son rôle endocrine que l'os intervient dans le métabolisme énergétique :

- Des adipokines, comme la leptine et l'adiponectine, sont produites par le tissu osseux, et les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) expriment des récepteurs à ces adipokines, liant l'os et le métabolisme des lipides (Krings *et al.* 2012). La leptine régule la prise calorique, alors que l'adiponectine régule la sensibilité à l'insuline des tissus mous.
- L'ostéocalcine (OC) et la lipocaline 2 (LCN2), hormones sécrétées par les ostéoblastes (Fulzele *et al.* 2010, Mosialou *et al.* 2017) interviennent dans la régulation du métabolisme du glucose. L'OC décarboxylée, libérée par la matrice extracellulaire lors du processus de résorption osseuse, stimule la production et la sécrétion d'insuline

pancréatique. Elle participe également à l'adaptation du métabolisme énergétique à l'exercice en favorisant l'utilisation du glucose et des acides gras par les muscles (Mera *et al.* 2018). La LCN2 régule le métabolisme énergétique en activant dans l'hypothalamus le signal de satiété via les récepteurs à la mélanocortine 4 (MC4R) (Mera *et al.* 2018). Elle agit aussi directement sur les cellules β du pancréas, favorisant leur prolifération et la production d'insuline (Mera *et al.* 2018). OC et LCN2, augmentent également la sensibilité des tissus adipeux, musculaire et hépatique à l'insuline (Lee *et al.* 2007, Mosialou *et al.* 2017). Cependant, ce mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé à ce jour.

- Les ostéocytes, par un mécanisme inconnu, seraient impliqués dans la régulation de la masse adipeuse, en association avec l'hypothalamus (des souris dépourvues d'ostéocytes perdent de la masse adipeuse, en particulier les graisses méésentérique et sous-cutanée). Ce phénomène s'accompagne d'une diminution de l'OC (Sato *et al.* 2013).

1.1.1.2.3.2. Ostéo-immunologie

Les cellules du tissu osseux sont liées au système immunitaire et participent à sa régulation :

- Les ostéoblastes sont impliqués dans le processus d'engagement et de différenciation des CSH en lymphocytes de type B, probablement via la sécrétion d'interleukine 7 et du « stromal cell-derived factor 1 » (SDF-1) (Egawa *et al.* 2001, Miller *et al.* 2002, Zhu *et al.* 2007).
- Les ostéocytes interviennent également dans la régulation de la lymphopoïèse puisque leur suppression engendre une lymphopénie sévère. Cette lymphopénie serait liée à une perte du tissu stromal, support de la lymphopoïèse, à la fois dans la moelle osseuse et dans le thymus (Sato *et al.* 2013).
- Les ostéoclastes participent à la mobilisation des CSH en les privant de leurs sites de liaison dans la niche osseuse via la sécrétion de cathépsine K (Kollet *et al.* 2006). Ils interviennent également dans la lymphopoïèse, puisqu'en cas d'activité ostéoclastique limitée, un blocage de la maturation des lymphocytes B est observé. L'activation des lymphocytes T est également compromise (Blin-Wakkach *et al.* 2004).

1.1.1.2.3.3. Fertilité chez le mâle

C'est encore par le biais de l'OC décarboxylée que le tissu osseux intervient dans la régulation de la fertilité masculine : elle favorise la production de testostérone par le biais du récepteur GPRC6A, exprimé dans les cellules de Leydig dans les testicules, et inhibe l'apoptose de ces cellules (Oury *et al.* 2011). Il a même été démontré que l'OC joue son rôle dans l'axe pancréas-os-testicule, puisque la synthèse de testostérone stimulée par l'OC est régulée de façon positive via un signal par l'insuline dans les ostéoblastes (Oury *et al.* 2013). Cette régulation se fait indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

1.1.1.2.3.4. Autres fonctions biologiques

L'OC décarboxylée intervient dans la régulation du développement cérébral et cognitif (Oury *et al.* 2013, Obri *et al.* 2018).

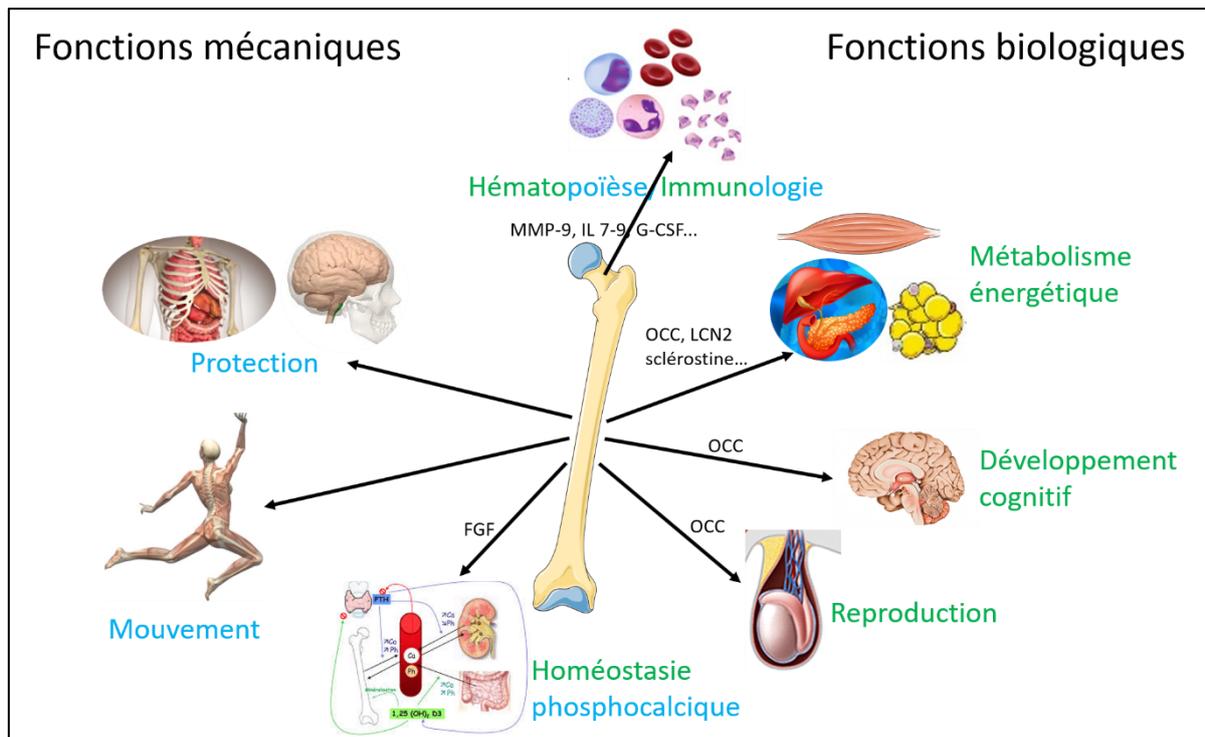


Figure 1 : Fonctions de l'os

L'os remplit des fonctions squelettique (bleu) et extra-squelettique (vert) par l'action de facteurs sécrétés par les cellules du tissu osseux (OCC = ostéocalcine carboxylée, G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, LCN2 = lipocaline 2, MMP = métalloprotéinase matricielle)

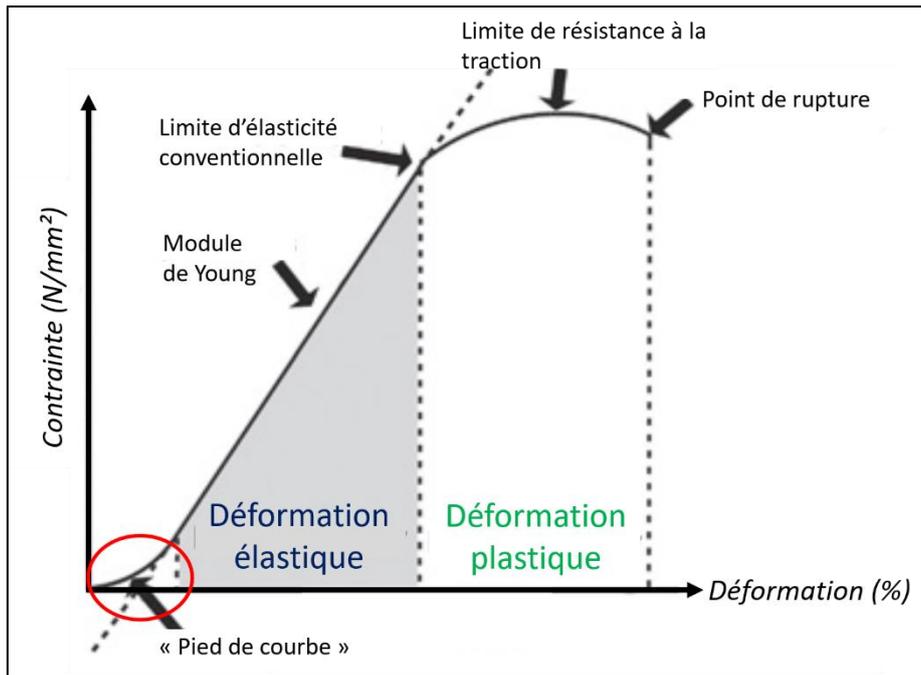
1.1.2. Propriétés de l'os et qualité osseuse

La qualité, la résistance osseuse, ont longtemps été associées à la densité minérale osseuse (DMO) (Melton *et al.* 2009). Pourtant, l'augmentation de DMO ou du contenu en calcium, engendrée par l'exercice par exemple, n'est pas nécessairement associée à une amélioration des propriétés biomécaniques de l'os (Shiga *et al.* 2003). Il est maintenant bien établi que la qualité osseuse dépend de nombreux facteurs, organisés de façon hiérarchique à différentes échelles et liés les uns aux autres. La qualité osseuse repose sur la géométrie générale de l'os, et sur la proportion et les propriétés (biophysiques et biomécaniques) des composants organiques (eau, collagène de type I, protéines non collagéniques) et inorganiques (hydroxyapatite, HA) du tissu osseux. Ainsi, les 3 grands paramètres déterminant la qualité osseuse incluent la géométrie osseuse, la microarchitecture osseuse et les propriétés tissulaires (Fonseca *et al.* 2014).

1.1.2.1. Propriétés matérielles de l'os

L'os est une structure hiérarchisée qui repose sur un arrangement optimal (quoiqu'irrégulier) de ses composants. Cet arrangement lui confère ses propriétés anisotropiques (les propriétés mécaniques dépendent de l'orientation des forces auquel l'os est soumis) (Bonfield 1971, Morgan *et al.* 2018, Lopez 2019). Le tissu est en effet très résistant en compression, de moindre résistance en cisaillement, et très fragile en traction (Lopez 2019).

Les propriétés mécaniques de l'os sont déterminées par des tests *ex vivo*, comme le test de flexion en trois points permettant de mesurer la résistance des os longs, et le test de compression permettant de mesurer la résistance des vertèbres (Iwaniec and Turner 2013). L'analyse mathématique des mesures de déformation de l'os en fonction de la contrainte exercée permet de déterminer des paramètres décrivant les propriétés mécaniques de l'os, comme la force maximale avant rupture, la rigidité (module de Young) par exemple (Cole and van der Meulen 2011) (Figure 2).



D'après Bone biology and fracture healing, Equine surgery, 5ième édition

Figure 2 : Courbe contrainte-déformation caractéristique du tissu osseux

La courbe de déformation de l'os se caractérise par un segment non linéaire initial (« pied de courbe ») correspondant à la réorientation des fibres de collagène. La zone ascendante linéaire correspond à la déformation plastique (caractère de rigidité) pour laquelle la déformation est réversible quand la contrainte disparaît (étirement des fibres de collagène). La pente de la courbe correspond au module élastique de Young (plus il est élevé, plus l'os est rigide). Dans la zone de déformation plastique, la déformation persiste malgré le retrait de la contrainte (Lopez 2019).

1.1.2.2. Facteurs déterminant la qualité osseuse

La qualité osseuse se définit à de multiples échelles. Les paramètres déterminant la qualité osseuse sont présentés ci-dessous de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique.

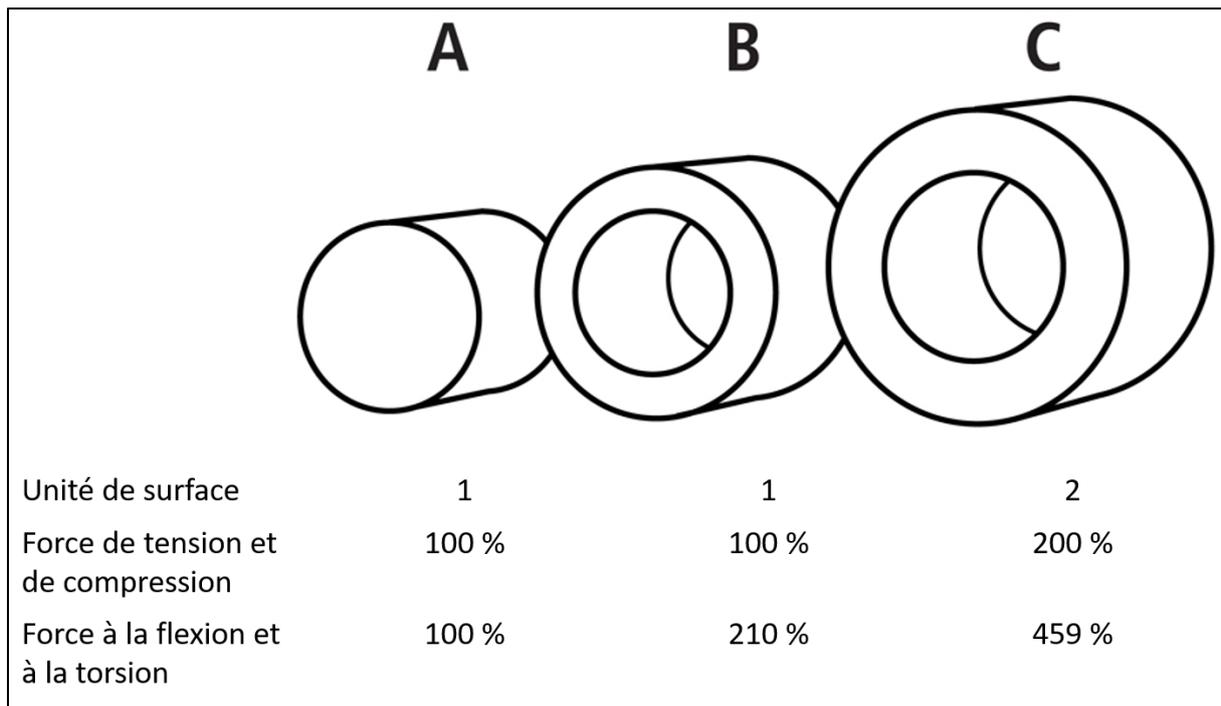
1.1.2.2.1. Géométrie osseuse

La géométrie osseuse recouvre la taille et la forme de l'os, sa surface en section transversale, ainsi que l'épaisseur corticale et la notion de moment d'inertie (répartition de la matière dans un solide) ; elle est étroitement associée à la notion de force osseuse et de fracture (Alele *et al.* 2011, Fonseca *et al.* 2012).

Par exemple, chez le Rat, l'accroissement de l'épaisseur corticale ou du périmètre cortical se traduit par un moindre risque de fracture (Ejered *et al.* 2009). Dans une étude chez l'Homme, le risque de fractures radiales ou tibiales était associé à une réduction de l'épaisseur ou de la surface corticale, mais pas à la DMO une fois standardisée par le volume osseux (Taes *et al.* 2010). Si l'os long est assimilé à un cylindre creux, le périmètre cortical est un paramètre crucial pour la force osseuse : en effet, une augmentation du diamètre (et donc du périmètre) d'un cylindre creux se traduit par une augmentation de la résistance à la flexion ou à la torsion de façon exponentielle, sans augmentation de la masse osseuse (Turner and Burr 1993) (Figure 3).

Cependant, une augmentation de diamètre de l'os pourrait également être un phénomène compensatoire à la détérioration d'autres paramètres de la qualité osseuse (comme la microarchitecture ou la masse osseuse), comme ce qui est observé avec l'âge ou chez les femmes ménopausées (Russo *et al.* 2006). Ainsi, il a été suggéré qu'une augmentation de diamètre de l'os serait plus un signe de faiblesse que de force osseuse (Fonseca *et al.* 2014).

Autre exemple, la force du col du fémur est associée à sa forme (Nakamura *et al.* 2009). Il est reconnu que le risque de fracture du col fémoral est associé à une faible masse osseuse dans le col (Cummings *et al.* 1993). Dans l'étude de Nakamura (2009) pourtant, bien que la masse osseuse du col fémoral des femmes japonaises soit inférieure à celle des femmes blanches-américaines, la résistance du col fémoral à des forces correspondant à une chute est en moyenne 40 % plus élevée chez les femmes japonaises que celle observée chez les femmes blanches-américaines. Cette plus grande résistance est associée à un col fémoral plus court et un angle du col fémoral plus faible. Un col fémoral long est associé à un « moment de flexion » plus élevé lors d'une chute, et donc à un risque plus important de fracture. (Nakamura *et al.* 2009).



D'après TeamBone (05/09/2020)

Figure 3 : Exemples d'influence de la géométrie d'un matériel sur ses propriétés mécaniques

Bien qu'ayant la même surface (unité arbitraire 1) et la même longueur, la force à la flexion et à la torsion de B est plus élevée que A car B est creux et de plus grand diamètre extérieur. C, de masse (ou de surface en coupe) deux fois plus importante est le plus fort.

1.1.2.2.2. Microarchitecture osseuse

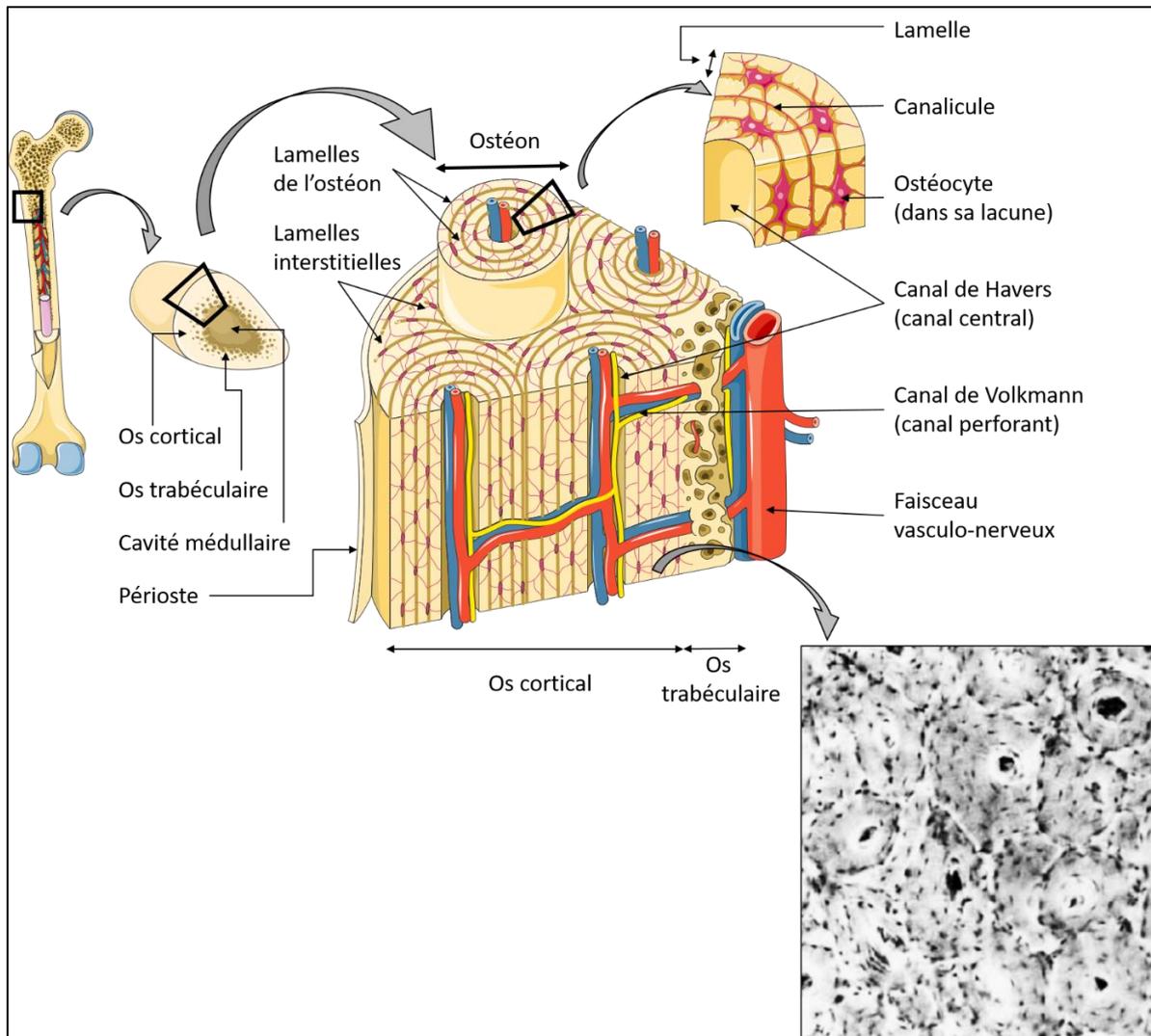
La microarchitecture osseuse correspond à la façon dont le tissu osseux est organisé dans l'espace à l'échelle microscopique. L'os « lamellaire », typique du tissu osseux adulte, est caractérisé par une disposition parallèle des fibres de collagène (Cf. partie 1.1.2.2.3.1.), formant des lamelles de 2 à 10 µm d'épaisseur. Cette organisation contribue aux propriétés mécaniques de l'os.

Selon l'agencement tridimensionnel des lamelles, se distinguent deux principaux types de microarchitecture osseuse : l'os cortical et l'os spongieux.

1.1.2.2.2.1. Os cortical

L'os cortical (os compact) correspond à la partie externe des os et constitue la plus grande partie de la diaphyse des os longs. L'unité de constitution de l'os cortical est, chez

l'Homme, l'ostéon. L'ostéon est formé par l'agencement concentrique de lamelles de collagène, entre lesquelles se situent les ostéocytes dans leurs lacunes ; il est centré autour d'un canal central, le canal de Havers, qui contient le faisceau vasculo-nerveux. Les ostéons sont traversés par les canaux de Volkmann qui relient les canaux haversiens entre eux, au périoste et à l'os trabéculaire (Figure 4). L'os cortical se caractérise par espace conjonctif réduit. Il est limité par le périoste sur sa surface externe et l'endoste sur sa surface interne. Les ostéons sont alignés dans l'axe des contraintes mécaniques maximales, parallèlement à la diaphyse.

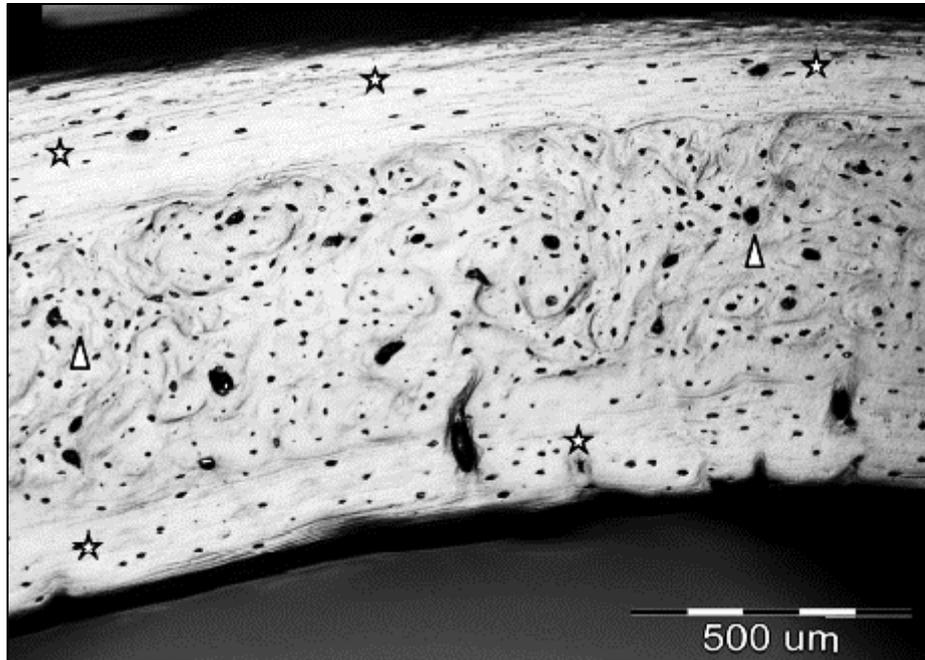


Modifié d'après (Tortora and Derrickson 2017) – Servier Medical Art, encart d'après (Sommerfeldt and Rubin 2001)

Figure 4 : Organisation générale de l'os cortical chez l'Homme

Encart : Organisation des ostéons vue en microscopie optique (x350). Les cercles noirs centraux correspondent au canal haversien et les tâches noires aux ostéocytes dans leur lacunes

Certaines espèces, comme les rongeurs (Rat, Souris), ne présentent pas ce système haversien mais un os fibrolamellaire, résultant de l'emprisonnement des vaisseaux sanguins dans la matrice, suite à une croissance rapide (Pearce *et al.* 2007) (Figure 5).



D'après (Shipov et al. 2012)

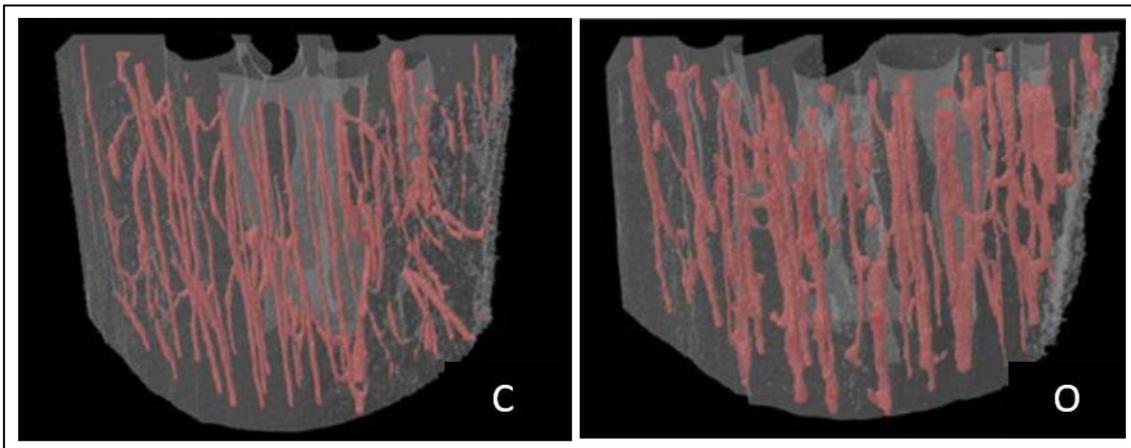
Figure 5 : Organisation de l'os cortical de rat vue en microscopie optique

Les régions de l'endoste et du périoste sont constituées d'os lamellaire organisé de façon circonférentielle (étoiles), alors qu'entre ces deux régions, l'organisation est plus aléatoire.

L'os cortical représente une grande proportion de la masse osseuse et permet aux os longs de résister à la pression induite par le poids du corps (Tortora and Derrickson 2017). Par conséquent une détérioration des paramètres de la microarchitecture corticale est susceptible d'entraîner une fragilité osseuse.

La porosité de l'os cortical (Figure 6) est un paramètre essentiel dans l'évaluation de la force osseuse (Fonseca *et al.* 2014). Elle se définit à différentes échelles et inclut, de la plus grande à la plus petite, la cavité médullaire, les foramens nourriciers qui traversent le cortex, la porosité vasculaire dans le cortex (canaux de Havers et canaux de Volkmann), la porosité liée au réseau lacuno-canaliculaire et enfin la « nano-porosité » (à l'échelle du collagène et des cristaux d'HA) (Cooper *et al.* 2016). Les paramètres associés à la porosité incluent le nombre de pores, l'espace entre les pores et le rapport surface/volume des pores. La structure anatomique derrière la notion de « pore » dépend alors de l'échelle à laquelle la porosité est

analysée. Ainsi en microtomographie à rayons X (μ CT) par exemple, pour une taille de pixel de 11 μ m, la porosité corticale évaluée correspond à la porosité vasculaire (Zebaze *et al.* 2010), alors qu'à la résolution de 1 μ m, il est possible d'apprécier également la porosité lacunaire (Lane *et al.* 2006, Palacio-Mancheno *et al.* 2014). Chez l'Homme, l'augmentation de la porosité corticale (porosité liée au réseau vasculaire dans le cortex (Cooper *et al.* 2016)) avec l'âge provoque une diminution de la rigidité du tibia d'environ 6 %. De plus, elle entraîne un transfert des contraintes de l'os cortical vers l'os trabéculaire lui-même affaibli (Burghardt *et al.* 2009). Des modifications de la porosité corticale peuvent se faire indépendamment de changement de la DMO (Nicks *et al.* 2012).



D'après (Sharma et al. 2018)

Figure 6 : Représentation tridimensionnelle de la porosité corticale tibiale chez la Rate

Rate saine (C) et rate avec ostéoporose hormono-induite (O).

1.1.2.2.2. Os trabéculaire

L'os trabéculaire (os spongieux) est localisé dans les métaphyses et épiphyses des os longs ou à l'intérieur des os plats et courts. Il est de porosité plus importante que l'os cortical. L'unité de constitution de l'os spongieux est la trabécule ou travée osseuse. Elle se présente sous la forme d'une plaque ou d'un cylindre osseux constitué de lamelles osseuses. Les trabécules sont organisées en réseau irrégulier (Tortora and Derrickson 2017) et orientées en fonction des contraintes auquel l'os est soumis (Barak *et al.* 2010). La composition de l'os trabéculaire est similaire à celle de l'os cortical (ostéocytes, lacunes, canalicules, entre autres) mais il se caractérise par un espace conjonctif plus important. Les paramètres couramment

employés pour l'étude de la microarchitecture trabéculaire incluent la fraction osseuse trabéculaire (BV/TV), l'épaisseur des trabécules (Tb.Th), et le nombre de trabécules (Tb.N). Le « structure model index » (SMI) et « trabecular pattern factor », indicateurs de la forme et de la connectivité, respectivement, des trabécules peuvent également être rapportés (Hildebrand and Rüegsegger 1997, Xu *et al.* 2016).

L'organisation tridimensionnelle des trabécules (Figure 7) en fait une grande surface d'échange (grand ratio surface/volume), ce qui favorise le renouvellement rapide de cet os et explique son rôle majeur dans le métabolisme osseux et l'homéostasie. L'os trabéculaire répond plus rapidement aux changements métaboliques que l'os cortical, et la modification de son contenu minéral osseux (CMO) est bien plus importante que celle de l'os cortical, pour une même période de temps.



D'après (Chappard 2012)

Figure 7 : Organisation générale de l'os trabéculaire en microscanner

Exemple de plaques (A) et de poutres (B) sur une reconstruction tridimensionnelle de tête fémorale.

Ceci implique également que l'os trabéculaire est rapidement affecté par une augmentation de la résorption osseuse. Les trabécules deviennent alors plus fines, passant d'une

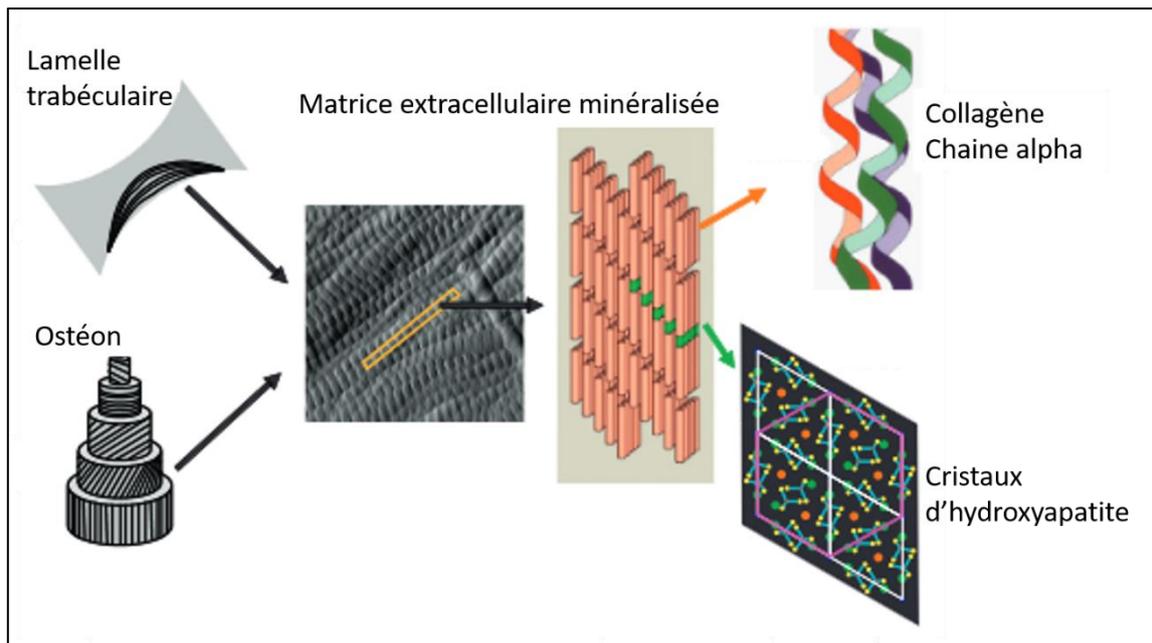
forme en plaque à une forme en poutre, et la séparation entre les trabécules augmente. Elles se perforent progressivement, induisant une perte de connexion entre les trabécules, et leur nombre diminue. Tous ces phénomènes résultent en la détérioration de la microarchitecture trabéculaire (Laib *et al.* 2001, Siu *et al.* 2004, Boyd *et al.* 2006), compromettant ainsi la résistance osseuse, en particulier dans les régions où l'os trabéculaire prédomine (extrémités des os longs, corps vertébraux). Chez les Souris par exemple, des variations dans la microarchitecture et le volume osseux trabéculaire expliquent 91 % de la variabilité observée dans la résistance à la compression des vertèbres (Borah *et al.* 2002). De plus, l'influence de la microarchitecture trabéculaire sur la résistance osseuse se fait indépendamment de la DMO (Legrand *et al.* 2000) ou des changements dans l'os cortical (Fields *et al.* 2009).

1.1.2.2.3. Propriétés tissulaires

Les propriétés tissulaires de l'os dépendent de la densité cellulaire, de l'intégrité du réseau ostéocytaire, du degré de minéralisation du tissu et de cristallinité, du degré d'hydratation du tissu et enfin des propriétés du collagène de la matrice extracellulaire constituant le tissu osseux (Fonseca *et al.* 2014). Ces propriétés dépendent donc de l'organisation de la matrice osseuse et de l'activité cellulaire qui s'y déroule.

1.1.2.2.3.1. Matrice extracellulaire

La nature biphasique de la matrice osseuse (composante organique/composante inorganique) permet à l'os d'absorber les contraintes mécaniques en se déformant de façon élastique et de subir des contraintes élevées avant de fracturer (Figure 8). La composante inorganique est responsable de la capacité de l'os à résister à la déformation (rigidité) alors que la composante organique permet, par ses propriétés d'élasticité et de flexibilité, une absorption de l'énergie (solidité). Ainsi une modification dans ces composantes peut affecter les propriétés mécaniques de l'os.



D'après (Burr and Akkus 2014)

Figure 8 : Organisation de la matrice extracellulaire minéralisée

- Composante organique

La composante organique de la matrice extra-cellulaire (MEC) correspond à 20-30 % du tissu sec dans l'os adulte de mammifère. Elle contient :

- Du collagène : de type I majoritairement, il représente 90-95 % de la composition organique de la MEC osseuse (Marks and Hermey 1996). La molécule de collagène est une triple hélice, chaque hélice étant une chaîne polypeptidique α dont la séquence est une répétition des acides aminés Glycine-X-Y, avec une forte proportion d'acides aminés proline ou hydroxyproline (van der Rest and Garrone 1991). Elle est stabilisée par des modifications post-traductionnelles et des ponts disulfures. Secrétée dans la matrice sous forme de procollagène, les extrémités N- et C-terminales de la protéine sont clivées, ce qui permet leur autoassemblage en fibrilles de collagène, stabilisé par des liaisons. Ces modifications sont un élément essentiel des propriétés biomécaniques du collagène puisqu'elles permettent le maintien de la structure fibrillaire (Viguet-Carrin *et al.* 2006). Des anomalies de structure sont responsables d'un risque plus élevé de fracture, comme dans la maladie d'ostéogenèse imparfaite (Oxlund *et al.* 1995, Banse *et al.* 2002, Kasper *et al.* 2007, Martin and Shapiro 2007). Les fibrilles sont associées en fibres non jointives laissant un espace pour la nucléation lors de la minéralisation de la MEC (McCance 1957).

Dans le tissu osseux adulte, les fibres de collagène sont disposées parallèlement, formant des lamelles de 2 à 10 µm d'épaisseur, et contribuant aux propriétés biomécaniques de l'os. L'orientation des fibres de collagène est un prédicteur important de la force en tension de l'os (Martin and Ishida 1989).

Du collagène des types III, V et X, est également présent, à l'état de trace.

- Des protéines non collagéniques : elles représentent 5-10 % du contenu protéique osseux (Marks and Hermey 1996). Leurs fonctions sont résumées dans le Tableau 1.

- Composante inorganique

La matrice inorganique représente environ 70 % du tissu osseux sec. Elle est composée d'HA (phosphate de calcium), de carbonate de calcium, de petites quantités d'hydroxyde de magnésium, de fluorure et de sulfate (Hing 2004).

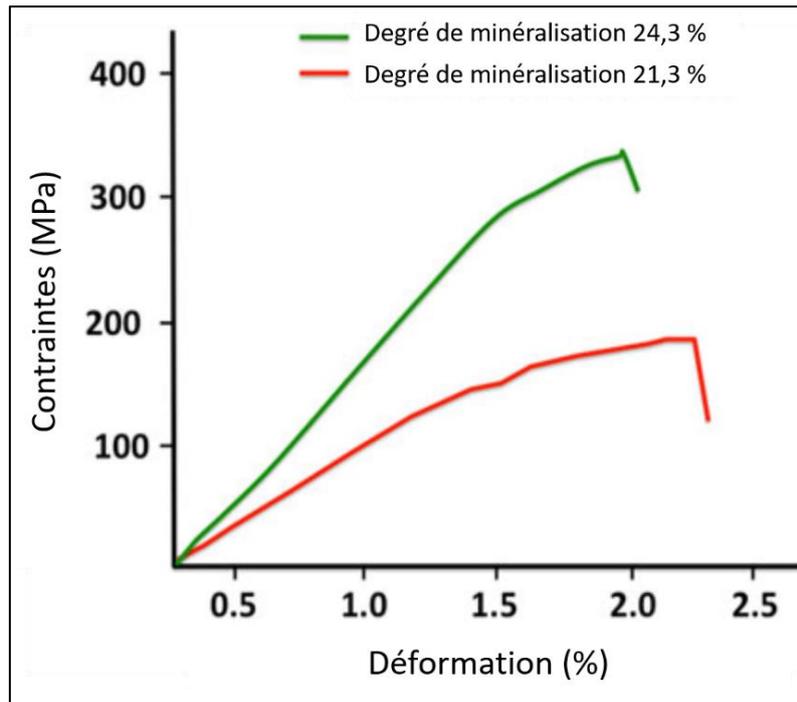
La matrice inorganique participe à la résistance, dureté et solidité du tissu osseux (Fratzl *et al.* 2004, Follet *et al.* 2004, Seeman and Delmas 2006) : le degré de minéralisation de la MEC est corrélé au module de Young et à la force maximale que peut subir l'os (Figure 9), même après avoir pris en compte le volume osseux (Cf. partie 1.1.2.2.1.) et la microarchitecture (Cf. 1.1.2.2.2.) (Follet *et al.* 2004).

Tableau 1 : Principales protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire osseuse

Composants	Fonction
<p>Protéines carboxylées sur les résidus acide glutamique</p> <ul style="list-style-type: none"> • « <i>Gla-protéine matricielle</i> • <i>Ostéocalcine</i> • <i>Protéine S (vitronectine)</i> <p>Protéines SIBLINGS</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ostéopontine</i> • <i>Sialoprotéine osseuse (BSP)</i> • <i>MEPE</i> 	<p>Inhibition de la minéralisation</p> <p>Régulation des ostéoclastes, inhibition de la minéralisation</p> <p>Attachement cellulaire</p> <p>Inhibition de la minéralisation et du remodelage</p> <p>Initiation de la minéralisation</p> <p>Régulation du métabolisme du phosphate</p>
<p>Protéines non SIBLINGS</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Phosphatase alcaline</i> • <i>Ostéonectine</i> 	<p>Hydrolyse des inhibiteurs du dépôt d'HA</p> <p>Régulation du diamètre/arrangement des fibrilles de collagène</p>
Thrombospondine	Protéine d'adhérence
Fibronectine	Protéine d'adhérence
<p>Glycosaminoglycanes/Protéoglycanes</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Décorine</i> • <i>Biglycane</i> • <i>Versicane</i> • <i>Hyaluronane</i> • <i>Aggrécanne</i> 	<p>Opposition aux forces de compression, régulation des facteurs de croissance, cytokines, organisation de la matrice</p> <p>Régulation du diamètre des fibrilles de collagène, liaison au TGF-β</p> <p>Liaison au collagène, TGF-β, déterminant génétique du pic de masse osseuse</p> <p>Définition de la zone destinée à devenir du tissu osseux</p> <p>Association au versicane pour définition de la zone destinée à devenir de l'os</p> <p>Organisation de la matrice, rétention Ca, P</p>
Facteurs de croissance (BMP, TGF-β, VEGF, bFGF, IGF-1)	
Métalloprotéinases de la matrice (MMP)	Dégradation de la matrice

SIBLINGS : small integrin binding ligand N-linked glycoprotein, MEPE : matrix extracellular phosphoglycoprotein, Ca : calcium, P : phosphore

Daprès (Clarke 2008) et (Gentili and Cancedda 2009)



D'après (Fonseca et al. 2014)

Figure 9 : Courbe contraintes-déformation (test de flexion en 3 points) du fémur en fonction de son degré de minéralisation

Lorsque le degré de minéralisation augmente, le module de Young (pente de la courbe) et les contraintes que peut supporter l'os augmentent également.

La minéralisation (dépôt progressif de cristaux dans la matrice collagénique) s'effectue dans les espaces vides entre les fibres de collagène. Bien que non consensuel (Glimcher 1989, Bonucci 2002, Anderson 2005, Golub 2009), le mécanisme le plus souvent décrit se déroule en plusieurs phases : établissement d'une matrice minéralisée par nucléation *in situ*, expansion puis maturation du cristal aboutissant à une structure d'HA ou de dérivés suivant la composition ionique. L'association des minéraux à la MEC contribue à donner son aspect lamellaire à l'os. Le degré de minéralisation de la matrice dépend du rythme de remodelage osseux (Boivin *et al.* 2000). Au cours de la formation osseuse, la MEC organique fonctionne comme un support à la minéralisation primaire, puis la minéralisation se poursuit progressivement avec une augmentation de la taille et du nombre des cristaux pendant la phase de minéralisation secondaire (Golub 2009). Si le remodelage s'effectue de manière trop intense, la phase de minéralisation secondaire ne se déroule pas efficacement ; elle n'a en effet pas le temps d'aboutir avant qu'un nouveau cycle ne se mette en place. Il en résulte une diminution de la

minéralisation et une perte de rigidité de l'os (Boivin and Meunier 2002). Mais si la perte de minéralisation a des effets négatifs sur la force de l'os, il en est de même pour une minéralisation trop importante, qui diminue ses propriétés d'élasticité. Ce phénomène est observable, par exemple, lors de traitements aux biphosphonates, où la réduction du remodelage osseux résulte en une accumulation de « vieil » os minéralisé et endommagé (Mashiba *et al.* 2001). L'os devient plus friable, moins déformable et donc moins enclin à absorber l'énergie (Currey 1990).

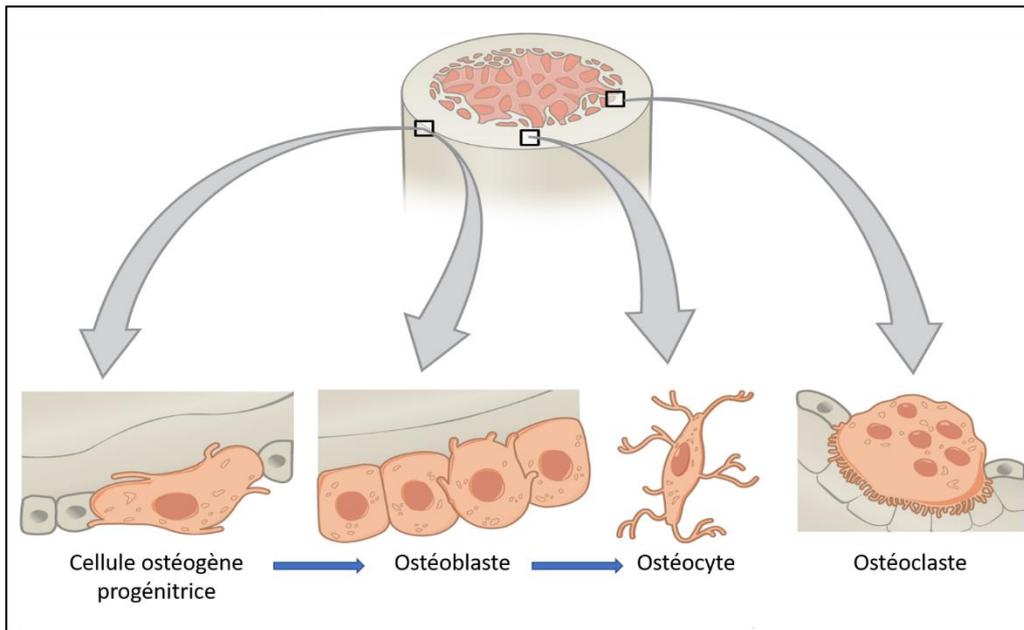
En plus du degré de minéralisation, la taille, la forme des cristaux d'HA et le degré de cristallinité ont également leur importance dans la résistance osseuse. En effet, une plus grande hétérogénéité des cristaux d'HA est associée à une plus grande résistance (Khosla *et al.* 1997, Boskey 2003, Yerramshetty and Akkus 2008).

- Contenu en eau

Un fort contenu en eau confère à l'os un caractère moins friable (Nyman *et al.* 2006). Par exemple l'hydratation de l'os cortical multiplie par 2,5 sa résistance (Liebschner and Keller 2005) et influence sa dureté (Yeni *et al.* 1998). L'hydratation assure également la stabilité de la matrice collagénique (Rochdi *et al.* 1999).

1.1.2.2.3.2. *Activité cellulaire osseuse*

Les cellules spécifiques du tissu osseux proviennent de deux grands types cellulaires : les cellules ostéoblastiques (ostéoblastes, ostéocytes, cellules bordantes) et les cellules ostéoclastiques (Figure 10). Les péricytes, cellules sous-endothéliales à la surface des vaisseaux, participeraient à la formation osseuse de manière directe, en se différenciant en ostéoblastes, et indirecte par une action paracrine (Collett and Canfield 2005, Caplan and Correa 2011). Les cellules osseuses interviennent dans le remodelage osseux, qui prévient l'accumulation des dommages osseux et autorise la réparation de « microcracks » (microfractures), permettant ainsi la conservation des propriétés mécaniques de l'os.



D'après Bone structure (Oregon State University, 2020)

Figure 10 : Différentes cellules osseuses

Cellules ostéogènes, ostéoblastes et ostéocytes sont issues de la même lignée, les cellules souches mésenchymateuses, alors que les ostéoclastes sont issus des cellules souches hématopoïétiques.

- **Ostéoblastes**

Les ostéoblastes sont des cellules différenciées et spécialisées de 20 à 30 µm de diamètre, contenant un seul noyau polarisé de grande taille. Présents en faible quantité dans la matrice osseuse, ils jouent un rôle majeur dans la formation et la régénération du tissu osseux.

Plusieurs facteurs de transcription sont exprimés au cours de la différenciation cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ostéoblastes, dont Runx2 et Osterix (Osx). Cette différenciation est caractérisée par l'expression séquentielle de gènes précoces (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine) ou tardifs (BSP, ostéocalcine) (Rocheffort *et al.* 2010). Dans un premier temps, les ostéoblastes synthétisent la matrice ostéoïde (collagène de type I, diverses protéines matricielles, des facteurs d'adhésion qui interagissent avec les intégrines, de protéoglycanes et des facteurs de croissance), puis les ostéoblastes matures contrôlent la minéralisation par le biais de la phosphatase alcaline. Ils participent au renouvellement de la matrice au cours du processus de remodelage, tout au long de la vie. Dans le processus de formation de la matrice osseuse, à la fin d'une phase de prolifération,

l'ostéoblaste peut se différencier (ostéocyte), entrer en quiescence (cellule bordante), ou rentrer en apoptose (mort programmée) (Kular *et al.* 2012).

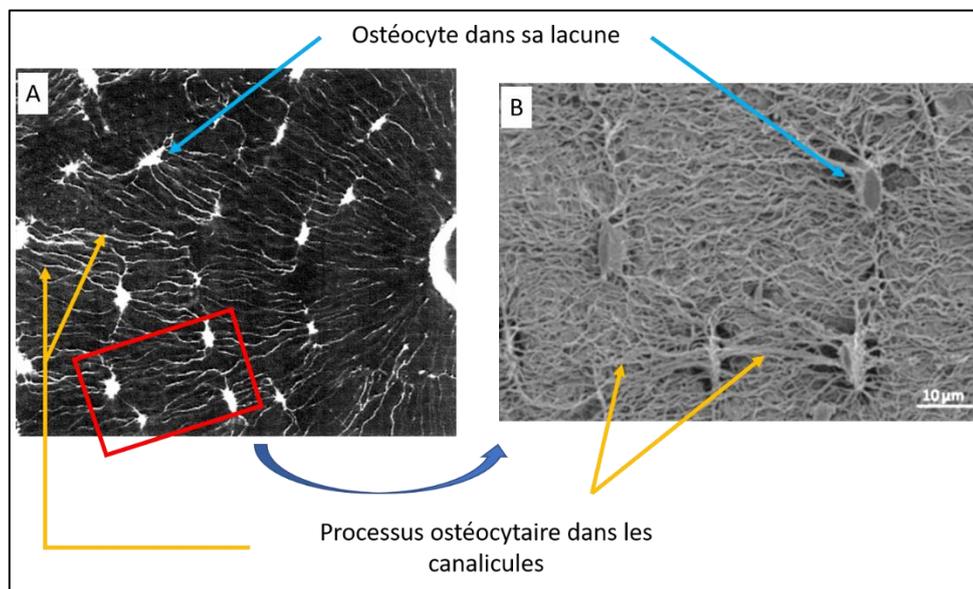
Les ostéoblastes sont également impliqués dans le processus de résorption osseuse par la sécrétion de facteurs comme RANKL dont l'action est d'activer les ostéoclastes (Martin and Ng 1994, Udagawa *et al.* 1999).

Enfin, une autophagie est induite dans les ostéoblastes durant le processus de minéralisation, les vacuoles d'autophagie étant utilisées pour le transport dans l'ostéoblaste et la sécrétion des cristaux d'apatite (Nollet *et al.* 2014). Or, il a récemment été démontré chez la Souris que la perte de l'autophagie (processus impliqué dans le turn-over des éléments du cytoplasme) des ostéoblastes était associée à une diminution de la masse osseuse, à la fois pendant le développement et à l'âge adulte. Cette perte osseuse se manifestait par une diminution du volume trabéculaire, et était attribuée à la fois une diminution de la différenciation des ostéoblastes et de la minéralisation de la matrice, mais aussi à une augmentation du nombre des ostéoclastes et de la surface couverte par les ostéoclastes (Li *et al.* 2018). Chez des souris incapables d'autophagie, la minéralisation de la matrice osseuse est réduite et la sécrétion de TNFSF11/RANKL, impliqués dans le recrutement des ostéoclastes, est augmentée.

- Ostéocytes :

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes (> 90 %) de la matrice. Ils mesurent environ 10 x 20 µm chez l'Homme (Rocheffort *et al.* 2010). Plus petits que les ostéoblastes, ils ont un rapport nucléocytoplasmique plus élevé. Ils proviennent de la différenciation des ostéoblastes (10 à 20 % d'entre eux (Aubin and Turksen 1996)), lorsqu'ils sont emmurés dans la matrice pendant le processus de minéralisation de la matrice (Dallas and Bonewald 2010). Au cours de sa différenciation, la cellule subit une modification morphologique (appareil de Golgi étendu, nombreux ribosomes, réticulum endoplasmique très développé) associée à une modification de l'expression des marqueurs membranaires, cytoplasmiques et nucléaires (Dallas and Bonewald 2010). Par exemple, les expressions de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine, du collagène de type I et de Runx2 sont diminuées, alors que celle de l'ostéopontine est maintenue, tandis que celle des CD44 augmente fortement. De nouveaux marqueurs comme la DMP-1 et la MEPE apparaissent (Rocheffort *et al.* 2010). Lorsque la matrice ostéoïde est minéralisée, la taille du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi diminue car la synthèse des protéines est plus faible dans l'ostéocyte.

Les ostéocytes sont localisés dans les lacunes de la matrice osseuse et leur grand axe est orienté dans l'axe des lamelles osseuses. De morphologie similaire à celle des neurones, ils présentent des prolongements cytoplasmiques (dendrites) dans les canalicules de la matrice (Figure 11). Ces dendrites permettent d'une part la communication inter-ostéocytaire ou avec les ostéoblastes environnants, d'autre part avec les cellules de la surface osseuse, par l'intermédiaire de jonctions-gap (Figure 12). Ainsi, lacunes et canalicules forment un réseau interconnecté représentant une surface d'échange 400 fois supérieure à celle des canaux de Havers et de Volkmann (Bronner 1992). Corps cellulaires et dendrites ostéocytaires baignent dans du liquide interstitiel (Klein-Nulend *et al.* 2005).



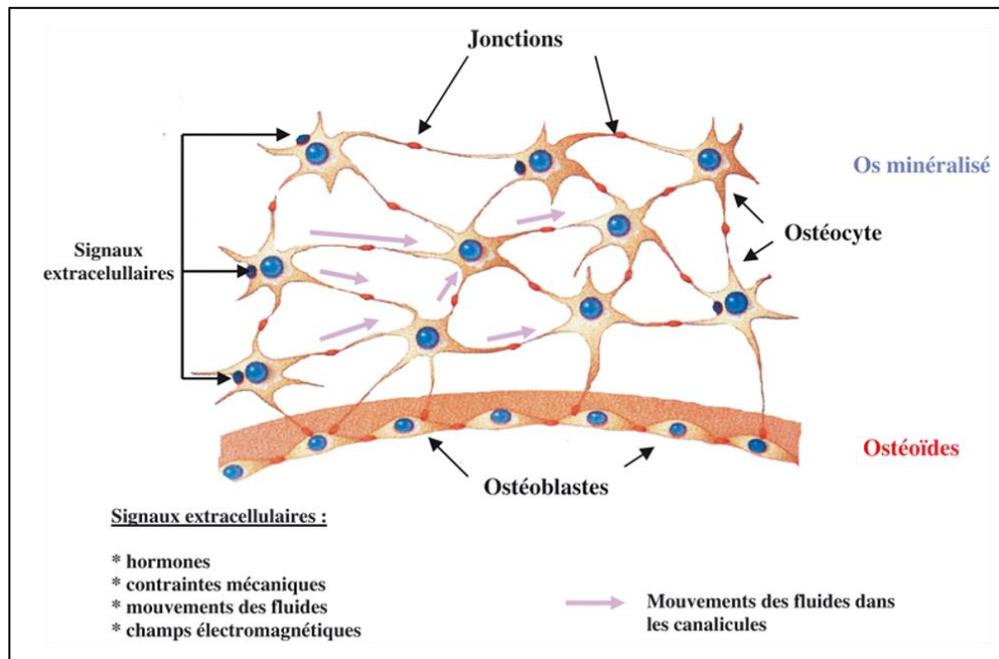
D'après (Marotti *et al.* 1995) (A) et (Kubek *et al.* 2009) (B)

Figure 11 : Ostéocyte et réseau lacuno-canaliculaire

(A) Ostéocyte et canalicule issus d'un ostéon de tibia humain en microscopie polarisée (échelle non fournie), (B) Ostéocyte et processus ostéocytaire en microscopie électronique à balayage.

Les ostéocytes présentent une activité métabolique intense et tiennent le rôle de chef d'orchestre dans la réponse aux contraintes mécaniques et dans le remodelage osseux (Bonewald 2011). Les ostéocytes sont très sensibles à la stimulation mécanique, sur laquelle repose même leur viabilité. En effet, en absence de stimulation, la mort ostéocytaire est observée, probablement par hypoxie (Dodd *et al.* 1999). D'ailleurs, *in vitro*, les contraintes de

cisaillement engendrées par la circulation d'un fluide sur les ostéocytes entraînent l'expression de gènes anti-apoptotiques (Bakker *et al.* 2004).



D'après (médicale (Inserm) 2008)

Figure 12 : Communication cellulaire : mécano-transduction ostéocytaire

Au sein du réseau lacuno-canaliculaire, les variations de pression et de charges mécaniques stimulent les ostéocytes, qui en retour émettent un message chimique vers les cellules en surface (Klein-Nulend *et al.* 2005, Bonewald and Johnson 2008, Rochefort *et al.* 2010). Ces messages chimiques, qui modulent l'activité ostéoblastique ou la minéralisation de la MEC, incluent l'oxyde nitrique, les prostaglandines, la sclérostine, la DMP1, et bien d'autres molécules (Ajubi *et al.* 1999, Toyosawa *et al.* 2001, Poole *et al.* 2005, Vatsa *et al.* 2006). Les signaux mécaniques sont détectés par les ostéocytes soit par mouvement du fluide interstitiel, soit par contrainte directe (Rath Bonivitch *et al.* 2007, Liu *et al.* 2010). Ce message est propagé selon deux voies non exclusives : par diffusion des molécules produites (oxyde nitrique par exemple) dans le réseau lacuno-canaliculaire et par transmission via des jonctions-gap (prostaglandines par exemple) qui forment un syncytium fonctionnel en connectant le cytoplasme de deux cellules adjacentes (Siller-Jackson *et al.* 2008, Rochefort *et al.* 2010). Les ostéocytes pourraient stimuler la différenciation des ostéoblastes et la formation d'ostéocytes par l'expression du facteur OSF-1 (osteoblast-stimulating factor-1) ou encore par la sécrétion de sclérostine, un antagoniste de la voie Wnt- β caténine (Tezuka *et al.* 1990, Imai *et al.* 1998,

Galli *et al.* 2010). La voie Wnt régule négativement l'activité des ostéoblastes et des protéines SIBLINGS.

Les ostéocytes ne sont pas seulement importants durant leur vie, leur apoptose est en effet perçue par les cellules en surface et un message d'initiation du remodelage osseux incluant l'activation des ostéoclastes, est envoyé aux cellules ostéoprogénitrices (Verborgt *et al.* 2000). Cependant, en cas de mort ostéocytaire augmentée, la résorption osseuse devient excessive par rapport à la formation osseuse, entraînant une augmentation de la porosité corticale. Ceci compromet donc la force osseuse (Tatsumi *et al.* 2007). De même, une atteinte de l'intégrité du réseau lacuno-canaliculaire affecte la qualité osseuse, soit en raison d'une résorption osseuse trop importante, soit en empêchant la réparation de l'os endommagé (Dunstan *et al.* 1993).

Plusieurs études ont identifié l'ostéocyte comme marqueur de qualité osseuse (Boudenot *et al.* 2014, Iijima *et al.* 2015, Volpon *et al.* 2015). Il existe une forte association entre densité ostéocytaire et qualité osseuse. En effet, l'ablation des ostéocytes du tissu osseux conduit à une réduction de la force de l'os (Tatsumi *et al.* 2007), comme ce qui est observé avec l'âge (Vashishth *et al.* 2000), la déficience oestrogénique (Emerton *et al.* 2010), les traitements aux glucocorticoïdes (O'Brien *et al.* 2004) ou la consommation d'alcool (Maurel *et al.* 2011). Ainsi, une faible viabilité est synonyme de fragilité osseuse et le nombre de lacunes ostéocytaires vides est indicateur de mort ostéocytaire. La densité ostéocytaire est également associée au statut d'hydratation. En effet, la majorité de l'eau contenue dans l'os est localisée dans le système canaliculaire (Wilson *et al.* 2006). Ainsi, la mort ostéocytaire et la destruction de la matrice environnante peuvent affecter l'état d'hydratation de l'os (Weinstein *et al.* 2010).

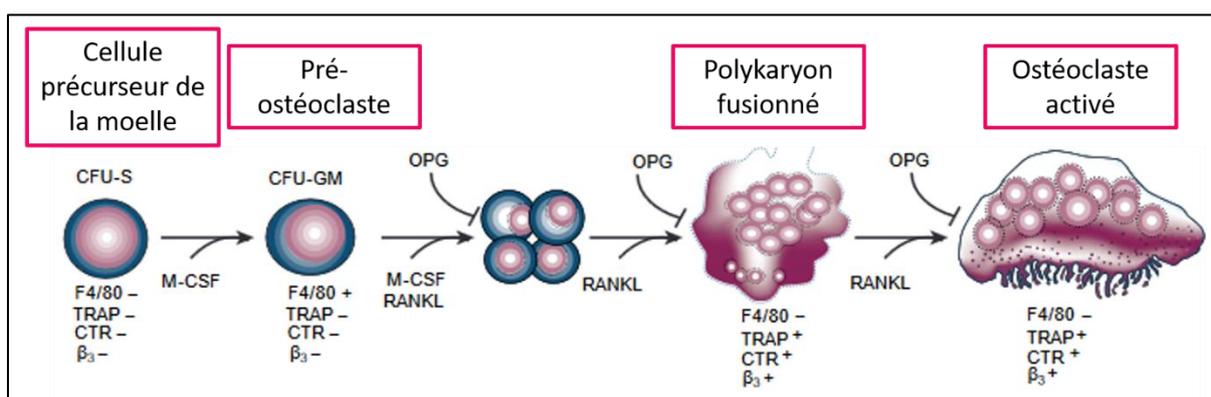
- Cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des cellules aplaties, localisées en surface dans des zones qui ne sont pas soumises au remodelage osseux. Elles correspondent à des ostéoblastes rentrés en quiescence. Elles participent à l'initiation de la résorption osseuse, en se détachant de la matrice sous l'influence de signes locaux ou systémiques. Elles libèrent alors une zone permettant l'adhérence des ostéoclastes (Kular *et al.* 2012, Marie 2012). Ces cellules peuvent également redevenir des ostéoblastes actifs (Chow *et al.* 1998).

- Ostéoclastes

Les ostéoclastes dérivent des monocytes, eux-mêmes issus des CSH (Chambers 2010). Les ostéoclastes activés sont des cellules géantes de 70 à 100 µm, multi-nuclées, avec une polarité nucléaire. Ils sont localisés au périoste, à la surface de l'endoste et des canaux de Havers (Pazzaglia *et al.* 2007).

La différenciation des ostéoclastes (Figure 13) est caractérisée par l'expression séquentielle de gènes et est gouvernée par des interactions avec les cellules ostéoblastiques, par l'intermédiaire du couple récepteur/ligand RANK/RANKL, ainsi que du facteur M-CSF et de l'ostéoprotégérine (OPG) qui stimule et inhibe respectivement la différenciation ostéoclastique en interagissant avec le couple RANK/RANKL. Les pré-ostéoclastes prolifèrent dans moelle osseuse, et sont guidés en surface de l'os vers les sites devant être résorbés par des mécanismes encore mal connus, puis fusionnent avec les ostéoclastes.



D'après (Boyle et al. 2003)

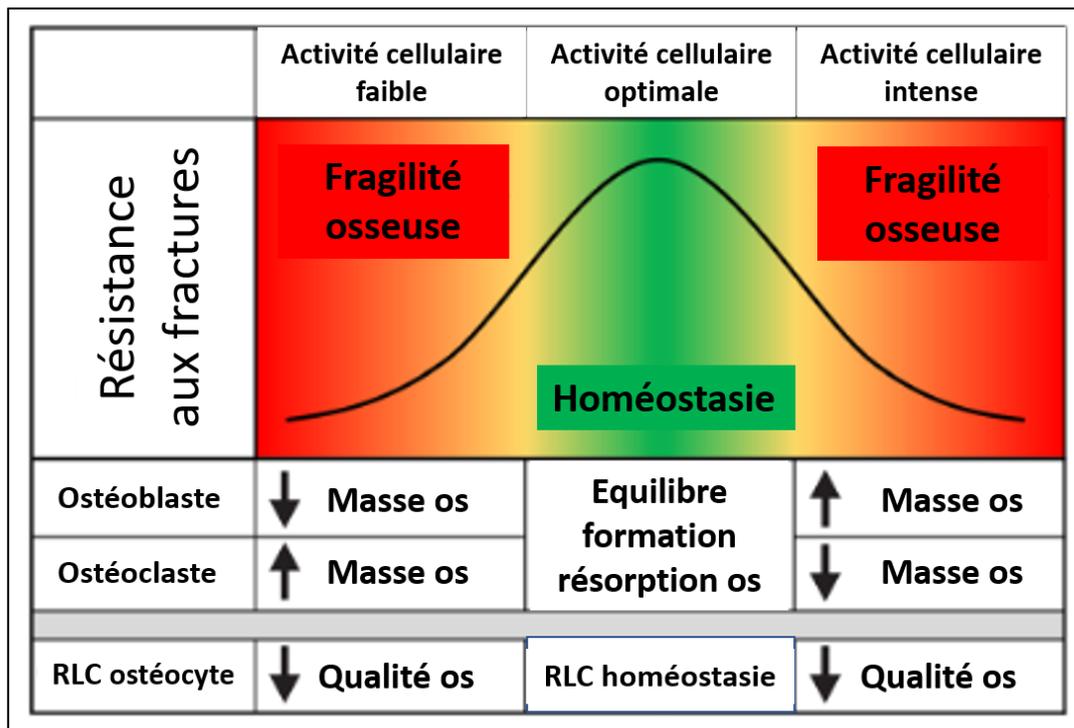
Figure 13 : Différenciation des ostéoclastes

Les précurseurs des ostéoclastes, localisés dans la moelle osseuse (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage) se différencient en pré-ostéoclastes puis en ostéoclastes sous l'action du couple RANK/RANKL.

Les ostéoclastes sont impliqués dans la résorption osseuse de l'os minéralisé. Ils se fixent à la matrice osseuse par des récepteurs d'adhérence, les intégrines. Leur cytoplasme présente des replis membranaires ("bordure en brosse") qui augmentent la surface de contact avec la matrice osseuse (Marks and Odgren 2002). Ils sécrètent des ions hydrogène qui dissolvent la matrice minérale osseuse en diminuant le pH, et des enzymes lysosomales

(collagénases, cathépsine K, MMP et phosphatases acides) qui dégradent la matrice organique (Behonick *et al.* 2007, Moriishi *et al.* 2012, Kular *et al.* 2012, Marie 2012). La dégradation de la matrice génère des espaces contenant des fragments de collagène appelés lacunes d'Howship. La résorption osseuse constitue une étape obligatoire de la croissance osseuse, du remodelage et de la réparation. Elle se déroule selon un phénomène cyclique alternant une phase de migration des ostéoclastes le long de la surface osseuse et une phase de dégradation de la matrice. Après un certain nombre de cycle, les ostéoclastes entrent en apoptose et disparaissent (Väänänen and Zhao 2002).

De plus, les ostéoclastes, en tant que précurseurs des macrophages, sont capables de synthétiser et de libérer l'adénocorticotropine (ACTH) (Zhong *et al.* 2005). Cette hormone, outre son rôle dans la production de cortisol par les glandes surrénales, intervient dans le métabolisme osseux (Isales *et al.* 2010). Elle se lie à des récepteurs spécifiques de la famille des récepteurs à la mélanocortine (MC2R), récepteurs exprimés par les cellules de la lignée ostéoblastique, et en particulier dans les sites de formation osseuse active (Isales *et al.* 2010). L'ACTH stimule alors la prolifération des ostéoblastes (Isales *et al.* 2010). Ainsi, même si l'importance de cette source reste à déterminer, les ostéoclastes auraient un rôle paracrine dans la modulation du processus de formation osseuse.



D'après (Yee et al. 2019)

Figure 14 : Contrôle de la masse osseuse et de la qualité osseuse par les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes

Les effets sur la qualité osseuse des activités ostéoblastique, ostéocytaire et ostéoclastique ne sont pas linéaires. RLC : remodelage lacuno-canaliculaire

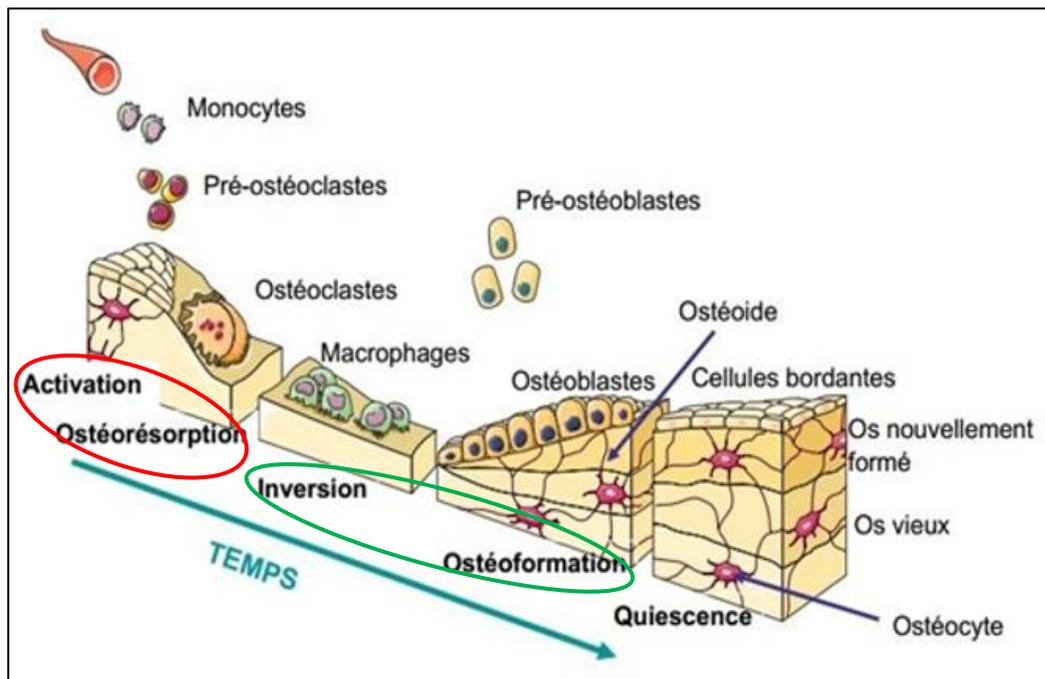
1.1.3. Modelage et remodelage osseux

L'os est un organe dynamique faisant l'objet d'un remaniement continu, grâce à un couplage entre formation osseuse, assurée par les ostéoblastes, et résorption osseuse, assurée par les ostéoclastes. Ce remodelage osseux, en résorbant quelques zones de la structure osseuse et en les remplaçant par de l'os nouveau (Raggatt and Partridge 2010), prévient l'accumulation des dommages et autorise la réparation de microfractures. Ainsi, il permet la conservation des propriétés mécaniques de l'os et l'adaptation aux contraintes mécaniques. Il assure également l'homéostasie osseuse en permettant la mobilisation et les échanges phosphocalciques avec le reste de l'organisme. Il se déroule sous contrôle de facteurs biochimiques, hormonaux et mécaniques. L'équilibre entre formation et résorption repose sur la fréquence, l'intensité et la durée de ces stimuli mécaniques (Rubin and Lanyon 1985).

L'os est également le siège d'un modelage, faisant intervenir des mécanismes similaires au remodelage osseux, mais dans lequel la formation osseuse n'est pas nécessairement couplée à la résorption osseuse. Ce modelage intervient dans l'adaptation de l'os aux contraintes biomécaniques environnementales et se traduit par un renforcement des travées trabéculaires et de l'os cortical dans les zones de compression (les stimulations mécaniques ont un rôle anabolique) et une résorption osseuse dans les zones en décharge (diminution de masse permettant une économie d'énergie) (Wolff 1986, Nicoletta *et al.* 2006). Il affecte également la forme et la taille de l'os et se déroule tout au long de la vie.

Frost a été le premier à énoncer une théorie détaillée sur l'adaptation des propriétés biomécaniques de l'os aux contraintes mécaniques environnementales (théorie du mécanostat de Frost (Frost 1987)). Dans cette théorie, le stimulus responsable de l'adaptation de l'os est l'amplitude des contraintes, mais la fréquence des contraintes mécaniques (Marcus 2002), la présence d'un temps de repos entre chaque cycle de charge et la distribution des contraintes à travers la structure osseuse (Skerry 2002) joueraient également un rôle. Le mécanisme sensitif est constitué par les ostéocyte et les ostéoblastes (Whitfield 2003, Tatsumi *et al.* 2007).

Le remodelage osseux est un processus cyclique qui se déroule dans une structure appelée BMU (Basal Multicellular Unit), centrée sur le canal vasculaire central de l'ostéon pour l'os cortical, ou dans des BRC (bone remodeling compartment) ou BSU (basic structural unit) associées à un sinus veineux dans l'os spongieux (Stout and Crowder 2012). Ces unités multicellulaires couplent le travail des ostéoblastes et des ostéoclastes, mais également des ostéocytes et des cellules bordantes. Il se déroule en plusieurs phases (Figure 15).



D'après (Funck-Brentano and Cohen-Solal 2010)

Figure 15 : Cycle du remodelage osseux

Phases de résorption osseuse (rouge) et de formation osseuse (vert)

Ces phases sont régulées par des facteurs endogènes et exogènes qui modifient la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules osseuses. En plus des contraintes mécaniques interviennent diverses hormones et cytokines (Raggatt and Partridge 2010). Ces facteurs locaux, systémiques et centraux intervenant dans le remodelage osseux sont résumés dans le Tableau 2.

1.1.3.1. Phase d'initiation

La phase d'initiation correspond à la formation, au recrutement et à l'activation des ostéoclastes à partir de progéniteurs ostéoclastiques hématopoïétiques issus de la micro-vascularisation périphérique. Elle transforme une surface quiescente en une surface de remodelage, sous le contrôle des ostéoblastes, des ostéocytes, des cellules bordantes et de facteurs systémiques (Ott 2002).

Les ostéoblastes produisent du M-CSF (dont le CSF-1), responsable du recrutement des progéniteurs ostéoclastiques et de l'expression des récepteurs RANK à leur surface. Des facteurs systémiques (interleukine (IL)-1 et IL-6, prostaglandines, calcitonine, parathormone, vitamine D, calcitonine, oncostatine M, notamment) et mécaniques (microfractures) induisent

l'expression du facteur RANKL par les ostéoblastes. L'association du récepteur RANK et du facteur RANKL induit l'expression de protéines membranaires à la surface des progéniteurs ostéoclastiques, permettant leur fusion et leur activation (Xing *et al.* 2012).

L'apoptose ostéocytaire active localement les ostéoclastes de deux façons : perte d'inhibition des ostéocytes sur les ostéoclastes via l'OPG (Gu *et al.* 2005) et relargage de facteurs stimulant les ostéoclastes (Kurata *et al.* 2006, Kogianni *et al.* 2008).

Les cellules bordantes, détachées suite à l'action de collagénases, libèrent une zone permettant l'adhérence et l'activité ostéoclastique. La déstructuration de la matrice forme alors un compartiment de remodelage osseux (Ott 2002).

La phase d'initiation est régulée par des facteurs paracrines (TGF- β , IL-1 et -6, OPG, par exemple) sécrétés par les cellules ostéoblastiques et par des facteurs systémiques (parathormone, vitamine D, calcitonine) qui bloquent l'interaction RANK-RANKL. Les protéines de la famille Wnt régulent la différenciation des ostéoblastes et l'inhibition de la formation des ostéoclastes. L'activation d'une voie alternative, indépendante de la β -caténine, entraîne l'effet inverse en amplifiant la formation des ostéoclastes et la production de cytokines inflammatoires (TNF- α , entre autres). Des médiateurs (comme l'ostéocalcine, les fragments de collagène de type I, le VEGF, le SDF-1, notamment) produits par les ostéoblastes, les ostéocytes, et les cellules bordantes, ont un rôle chimiotactique pour les progéniteurs ostéoclastiques (Kobayashi *et al.* 2008, Galli *et al.* 2010).

1.1.3.2. Phase de résorption

Les ostéoclastes, alors activés et adhérant à la surface osseuse, libèrent des enzymes lysosomiales (TRAP, MMP 9, MMP 13, cathépsine K, notamment) qui dégradent la matrice dans un milieu acidifié. Ainsi l'action des ostéoclastes libère de nombreux facteurs emprisonnés dans la matrice (BMP, PDGF, FGF, TGF- β , IGF, entre autres) (Pneumaticos *et al.* 2010). Ces facteurs, en activant les précurseurs ostéoblastiques, initient la formation osseuse.

1.1.3.3. Phase intermédiaire

Appelée « phase d'inversion », elle correspond, dans le processus de résorption osseuse, au moment où la profondeur maximale de résorption par les ostéoclastes est atteinte. Les ostéoclastes se détachent alors de la surface érodée, et rentrent en apoptose. Des macrophages,

qui phagocytent les débris libres de la matrice, et des ostéoblastes viennent combler les lacunes (Wu *et al.* 2003).

C'est durant cette phase que la communication est la plus intense entre ostéoclastes et ostéoblastes.

1.1.3.4. Phase de formation osseuse

Elle correspond à la sécrétion et à la minéralisation de la matrice organique. La différenciation ostéoblastique est orchestrée par la libération de facteurs matriciels par les ostéoclastes, ainsi que par une communication directe entre les ostéoclastes et les ostéoblastes d'une part, et entre ostéoblastes d'autre part. Cette phase est la plus longue du remodelage osseux.

Les BMP libérées dans la matrice déclenchent une cascade intracellulaire dont l'issue est l'activation de facteurs de transcription, dont Runx2, responsables de la surexpression de gènes spécifiques à l'activité ostéoblastique (comme la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'OC, la BSP, notamment). La voie canonique Wnt, l'IGF et le FGF pourraient également être impliqués dans cette activation (Pneumaticos *et al.* 2010). Les ostéoblastes sont responsables de la production de la matrice, du dépôt de la substance ostéoïde et de sa minéralisation. Environ 50 à 70 % des ostéoblastes rentrent ensuite en apoptose, alors que les 30 à 50 % persistant se différencient en cellules bordantes ou en ostéocytes incorporés dans les lacunes de la matrice.

La différenciation et l'activation des ostéoblastes sont contrôlées par des facteurs autocrines (cardiotroponine, glutamate, osteoclast inhibitory lectin, entre autres), paracrines produits par les ostéocytes (sclérostine) (Sims and Gooi 2008, Galli *et al.* 2010, Tu *et al.* 2012) et systémiques (parathormone, vitamine D, œstrogènes, hormone de croissance, cortisol, par exemple) (Arvidson *et al.* 2011).

Ce système de remodelage correspond au remodelage haversien, propre aux espèces présentant un os organisé en ostéons, comme l'Homme. Chez les Rongeurs, le remodelage se fait toutefois de manière similaire, c'est-à-dire avec une chronologie de phases identique, bien que plus rapide, dans des cavités de résorption vascularisées (Nunamaker 1998, Pearce *et al.* 2007).

Tableau 2 : Récapitulatif des facteurs locaux, systémiques et centraux intervenant sur le remodelage osseux

Facteurs locaux			
Facteurs	Origines	Rôles	Références
RANK/ RANKL/ Ostéoprotégérine	Ostéoclastes (précurseurs et mature) Ostéoblastes (membrane), thymus, poumon Ostéoblastes	Ostéoclastogenèse Inhibition ostéoclastogenèse	(Trouvin and Goëb 2010)
Voie Wnt/ β -caténine	Ostéocytes	Régulation masse osseuse Différentiation/prolifération/apoptose cellules osseuses	(Bonewald and Johnson 2008)
Ostéocalcine	Ostéoblastes	Fixation Ca à matrice	(Papapoulos 2011)
DKK1	Ostéocytes (membranes)	Inhibiteur voie Wnt (co-récepteur LRP5)	(Kawano 2003)
Sclérostine	Ostéocytes, chondrocytes	Inhibiteur voie Wnt	(Poole <i>et al.</i> 2005)
M-CSF	Ostéoblastes Cellules stromales	Différentiation/prolifération/survie ostéoclastes Augmentation résorption	(Hodge <i>et al.</i> 2011)
PTHrP	Os	Différentiation/activation ostéoblastes (récepteur à EphB4/ephrineB2)	(Takyar <i>et al.</i> 2013)
TGF- β 1		Différentiation CSM (ostéoblastes, chondrocytes) Maintien masse osseuse (différentiation ostéoblastes) Formation/minéralisation matrice	(Kosmacheva <i>et al.</i> 2008)
TNF- α	Ostéoblastes Macrophages	Stimulation ostéoclastogenèse (RANKL) Inhibition fonction ostéoblastes Suppression recrutement ostéoblastes	(Nanes 2003)
IGF-1	Foie Ostéoblastes	Activation ostéoclastes (avec hormone de croissance) Régulateur fonction ostéoblastes/ostéoclastes	(Courtland <i>et al.</i> 2011)
IL-1		Cascade de régulation activant NF κ B (survie ostéoclastes)	(Kwan Tat <i>et al.</i> 2004)
IL-6	Ostéoblastes Cellules stromales	Différentiation CSM en ostéoblastes (avec oncostatine) Régulation ostéoclastogenèse/résorption (stimulation RANK)	(Kwan Tat <i>et al.</i> 2004)

Facteurs systémiques			
Facteurs	Origines	Rôles	Références
Parathormone	Glandes parathyroïdes	Augmentation [Ca] (Calcium) (relargage par os et réabsorption par rein) Stimulation expression RANKL sur ostéoblastes Maturation et activité ostéoclastes	(Aleksyniene and Hvid 2004)
Vitamine D	Peau	Maintien [Ca] (absorption intestin et transformation CSH en ostéoclastes)	(Christakos 2002)
Calcitonine	Cellules C thyroïde	Inhibition résorption (rétrécissement ostéoclastes)	(Galson and Goldring 2002)
Hormones thyroïdiennes	Thyroïde	Prolifération/différentiation ostéoblastes	(Ishida <i>et al.</i> 1995)
Hormone de croissance	Hypophyse	Maintien et augmentation masse osseuse Augmentation remodelage (ostéoblaste)	(Rosen and Yakar 2002)
Stéroïdes sexuels œstrogènes, androgènes progestérone	Gonades	Renfort couplage ostéoblastes/ostéoclastes Maintien masse/architecture osseuse Pic de masse osseuse Diminution résorption Maintien masse osseuse	(Clarke and Khosla 2010)
Glucocorticoïdes	Glandes surrénales	Différentiation ostéoblastes/ostéoclastes	(Kream and Luckert 2002)
Leptine	Adipocytes	Prolifération/différentiation ostéoblastes Régulation développement ostéoclastes (RANK/RANKL/OPG) Diminution masse osseuse par SNC	(Elefteriou 2005, Reid 2010)
Adiponectine		Prolifération/différentiation ostéoblastes Inhibition ostéoclastogénèse	(Reid 2010)
Facteurs centraux			
α -calcitonin gene-related peptide	SNC Ostéoblastes (surface)	Prolifération ostéoblastes, synthèse collagène, formation osseuse Inhibition résorption osseuse	(Elefteriou 2005)
Vasointestinal peptide	Nerfs, ostéoclastes	Inhibition ostéoclastogénèse	(Lerner 2002)
Substance P	Neurones sensoriels os	Différentiation ostéoblastes Formation colonies osseuses	(Liu <i>et al.</i> 2007)
Récepteurs β -adrénergiques	Ostéoblastes	Diminution formation osseuse Modification expression RANKL Différentiation ostéoclastes	(Elefteriou 2005)
Neuropeptide Y	Hypothalamus	Diminution activité ostéoblastes	(Driessler and Baldock 2010)
Neuromédine U	Hypothalamus Intestin grêle	Diminution masse osseuse	(Driessler and Baldock 2010)
Sérotonine	Ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes	Détection charge mécanique Régulation formation/réparation osseuse Régulation ostéoclastogénèse	(Elefteriou 2005, Ducey and Karsenty 2010)
Glutamate	Ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes	Différentiation/fonction ostéoblastes/ostéoclastes (<i>in vitro</i>)	(Skerry 2008)
Dopamine	Système nerveux central	Augmentation masse osseuse	(Bliziotis <i>et al.</i> 2000)

1.1.4. Formation et réparation osseuse

La réparation osseuse est un phénomène complexe qui résume et récapitule les processus impliqués à la fois dans la formation (ontogénèse) osseuse au cours de l'embryogénèse et dans les mécanismes du remodelage osseux (Gerstenfeld *et al.* 2003).

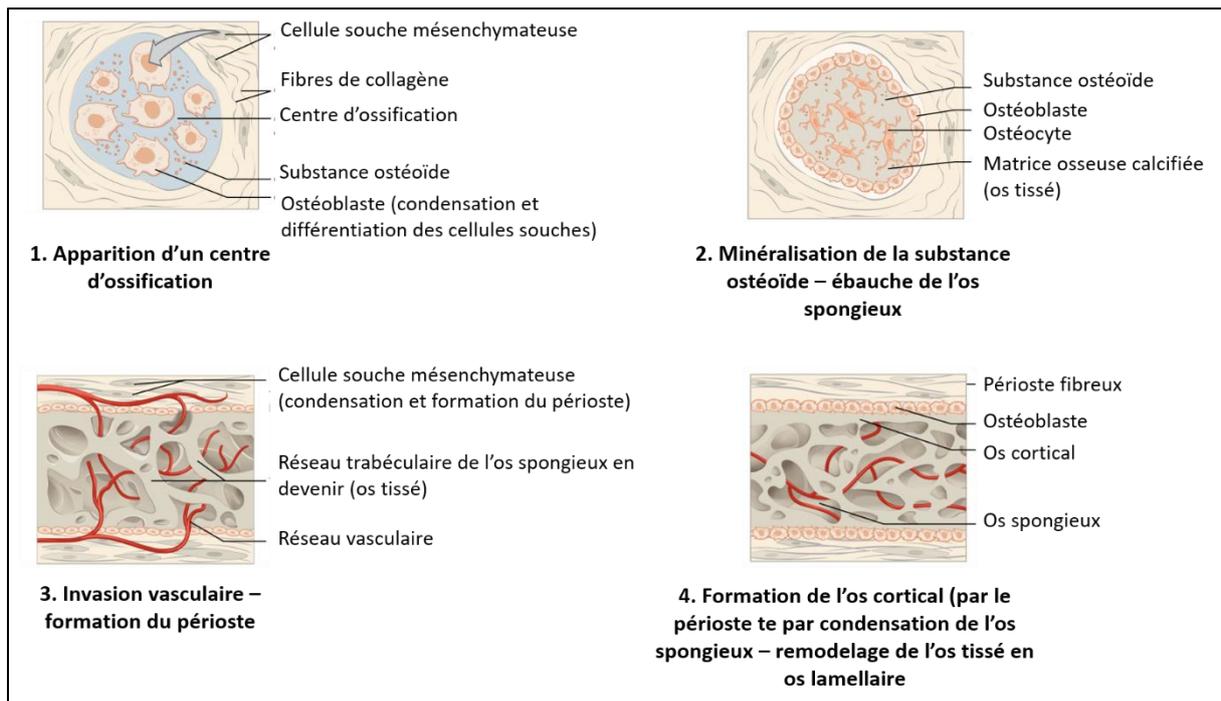
1.1.4.1. Ontogénèse

L'os est formé au cours d'un processus qui implique la différenciation des CSM. Selon que cette différenciation se fasse initialement en ostéoblastes ou en chondroblastes, l'ossification est dite respectivement intramembraneuse ou endochondrale. L'orientation de cette différenciation est en grande partie sous la dépendance de la voie canonique de signalisation Wnt (Kobayashi *et al.* 2008) pour la voie ostéoblastique.

La voie Indian Hedgehog intervient surtout dans l'ossification intramembraneuse, associée ou non à la voie Wnt (Day and Yang 2008, Arvidson *et al.* 2011).

1.1.4.1.1. Ossification intramembraneuse

L'ossification intramembraneuse est une ossification directe liée à la condensation et à la différenciation des CSM en ostéoblastes qui produisent la MEC et sont à l'origine de sa minéralisation. Ce type d'ossification permet la formation de la partie spongieuse, puis de la partie corticale de l'os, et est associé à une invasion vasculaire progressive du tissu. L'os est initialement produit sous sa forme tissée (fibres de collagène organisées de façon aléatoire, entrecroisées, avec de nombreux et larges ostéocytes dans les lacunes), puis est secondairement remodelé en os lamellaire mature où les fibres sont organisées linéairement (Figure 16). Cette ossification permet la formation des os plats et la mise en place de la corticale par le péricondrium et le périoste ainsi que dans la croissance circonférentielle de l'os (Karaplis 2002).



D'après (Biga et al. 2019)

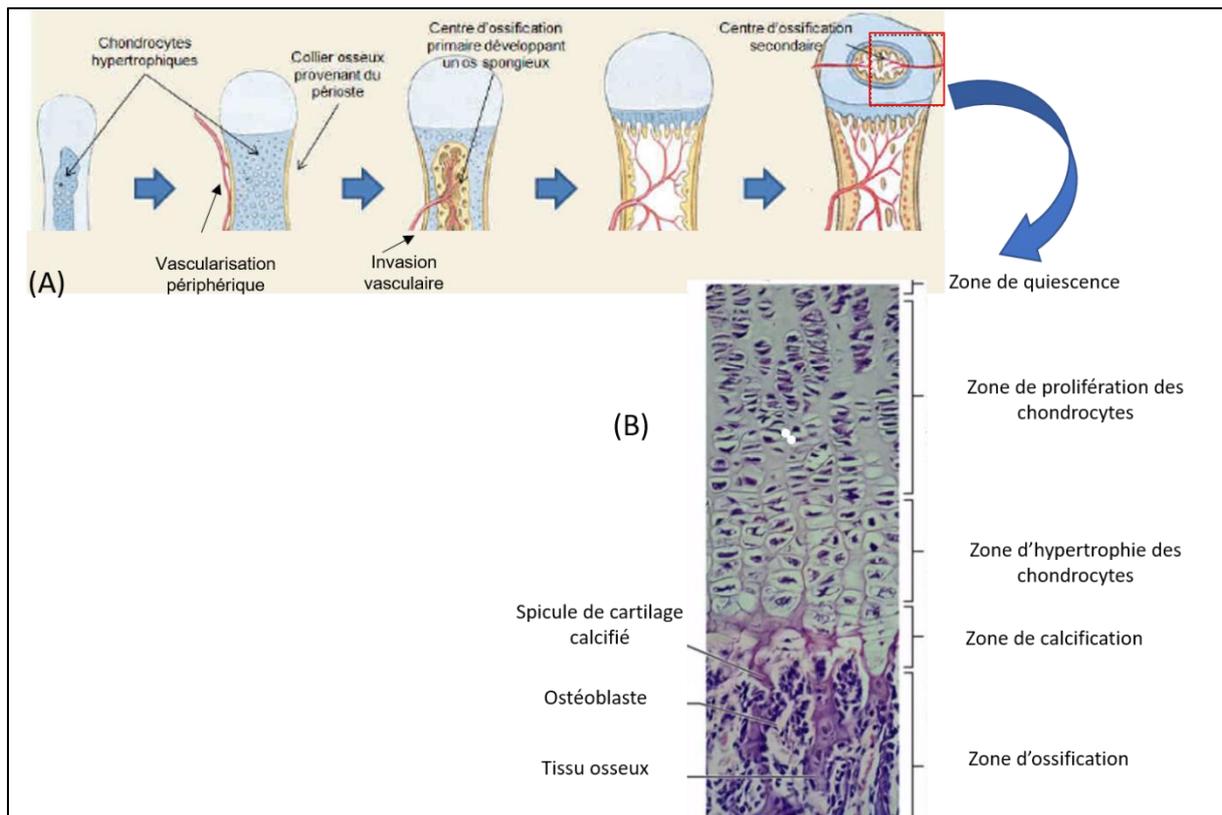
Figure 16 : Représentation du processus d'ossification intramembraneuse

1.1.4.1.2. Ossification endochondrale

Lors du développement, l'ossification endochondrale (Figure 17 (A)) permet la formation de l'os par remplacement progressif d'une matrice cartilagineuse, initialement peu ou pas vascularisée et formée par condensation des CSM, par une matrice osseuse. Les CSM issues du mésoderme migrent vers les sites des os futurs. Dans ces sites, la condensation des CSM permet la formation de la matrice qui délimite les contours du futur os. Les CSM se différencient ensuite en chondrocytes, qui prolifèrent et forment une matrice cartilagineuse. Parallèlement, en périphérie de cette matrice, d'autres cellules se condensent, formant le périoste (ou périoste plus tard). Ce dernier est à l'origine de la formation d'un collier osseux qui entoure la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes s'hypertrophient (leur prolifération est alors arrêtée), puis rentrent alors en apoptose. Le réseau vasculaire périphérique envahit les lacunes apoptotiques et la matrice cartilagineuse (cartilage hypertrophique) est dégradée par les ostéoclastes et les chondroclastes (à la jonction ostéo-cartilagineuse de la plaque de croissance interviennent des septoclastes, cellules phagocytaires mononuclées, riches en cathépsine K) (Odgren *et al.* 2016). Le réseau vasculaire est également la source des précurseurs ostéoblastiques qui (avec les ostéoblastes qui affluent à partir du périoste (Colnot *et al.* 2004)) sont à l'origine de la mise en place progressive de l'os spongieux, et des

cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et hématopoïétiques à l'origine de la moelle osseuse (Maes *et al.* 2010).

Ce type d'ossification est à l'origine de la formation et de la croissance en longueur des os longs pour leur partie spongieuse (Figure 17 (B)). Chez le jeune en croissance, le cartilage de croissance épiphysaire qui est richement vascularisé (Spira and Farin 1967). La croissance radiale de la partie corticale diaphysaire se fait également par ossification endochondrale, et à partir du périoste par ossification intramembraneuse.



Modifié d'après (Pearson Education Inc., Publishing as Benjamin Cummings, 2006)

Figure 17 : Ossification endochondrale (A) et croissance en longueur des os longs (B)

1.1.4.2. Réparation osseuse

La réparation osseuse correspond à un ensemble de processus permettant de restaurer l'intégrité osseuse, suite à une solution de continuité (rupture dans la continuité d'un tissu). C'est un phénomène complexe impliquant la coordination spatiale et temporelle de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Alors que la réparation récapitule et résume les étapes de la formation osseuse et du remodelage osseux, la différence essentielle entre ces processus réside

dans l'existence d'une phase inflammatoire et l'implication très importante de facteurs vasculaires (la mise en place de la microcirculation capillaire et des vaisseaux permet l'apport de précurseurs ostéoblastiques et ostéoclastiques, de cytokines et permet la différenciation cellulaire en fournissant une matrice (Das and Botchwey 2011), toute déficience dans la vascularisation compromet la cicatrisation (Oetgen *et al.* 2008)) et mécaniques.

Les différentes phases de la réparation osseuse incluent la phase inflammatoire qui initie la réparation (recrutement de cellules inflammatoires et de progéniteurs osseux), suivie par une phase de différenciation cellulaire et de dépôt de matrice extracellulaire, et enfin une phase de remodelage de la matrice nouvellement formée.

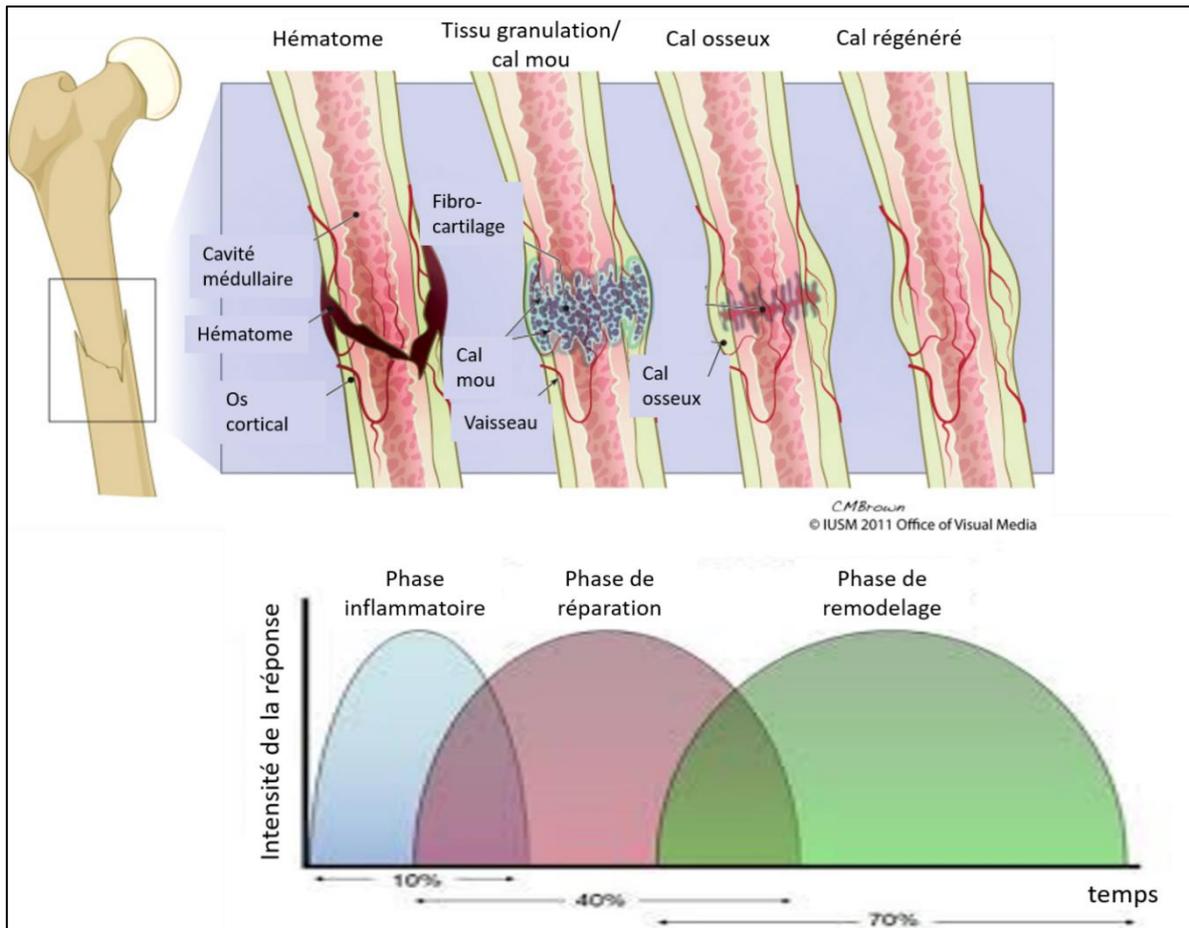
1.1.4.2.1. Cicatrisation par seconde intention

Bien qu'exposées de façon consécutive, les différentes phases de la cicatrisation osseuse sont interdépendantes et se chevauchent temporellement (Figure 18).

1.1.4.2.1.1. Phase inflammatoire

La phase inflammatoire est la phase la plus critique du processus de réparation, car si elle est perturbée, la cicatrisation s'en trouve compromise (Hunt 1984). Elle débute immédiatement après le traumatisme et se caractérise par l'activation de la cascade de coagulation et par le comblement de l'espace fracturaire par un hématome. Les lésions vasculaires liées au traumatisme entraînent une extravasation sanguine à l'origine de l'hématome et sont associées à une ischémie et une nécrose locale.

La production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules osseuses locales entraîne un afflux de thrombocytes (qui initie la néo-angiogenèse et la prolifération des CSM) ainsi que de cellules inflammatoires (macrophages, granulocytes, lymphocytes et mastocytes) qui détruisent et phagocytent les bactéries (en cas de fracture ouverte). Ces cellules stimulent la réparation grâce à la libération de facteurs angiogéniques (d'autres cellules locales libèrent également des facteurs pro-inflammatoires et des facteurs de croissance), ainsi qu'au recrutement de nouvelles cellules inflammatoires et d'ostéoprogéniteurs issus du périoste (Colnot *et al.* 2004). Cette phase dure 7 jours environ avec un pic à 24 h (Marsell and Einhorn 2011).



D'après (Li et al. 2019)

Figure 18 : Déroulement de la cicatrisation osseuse par seconde intention

1.1.4.2.1.2. Phase de réparation

Cette phase se superpose et suit la phase inflammatoire. Elle se caractérise par le remplacement de l'hématome par du tissu de granulation. Elle implique la migration et la multiplication des cellules ostéoprogénitrices issues du périoste (Colnot 2009) sous l'action des BMP (notamment BMP 2, 4, 7 et 8), ainsi que la mise en place d'une néovascularisation extraosseuse par l'action du VEGF et de l'angiopoïétine. Les cellules progénitrices, associées aux fibroblastes et aux macrophages, initient la formation du tissu de granulation, riche en collagène de types I, II, III, IX, puis I uniquement, donnant au tissu sa résistance à la traction et à l'élongation.

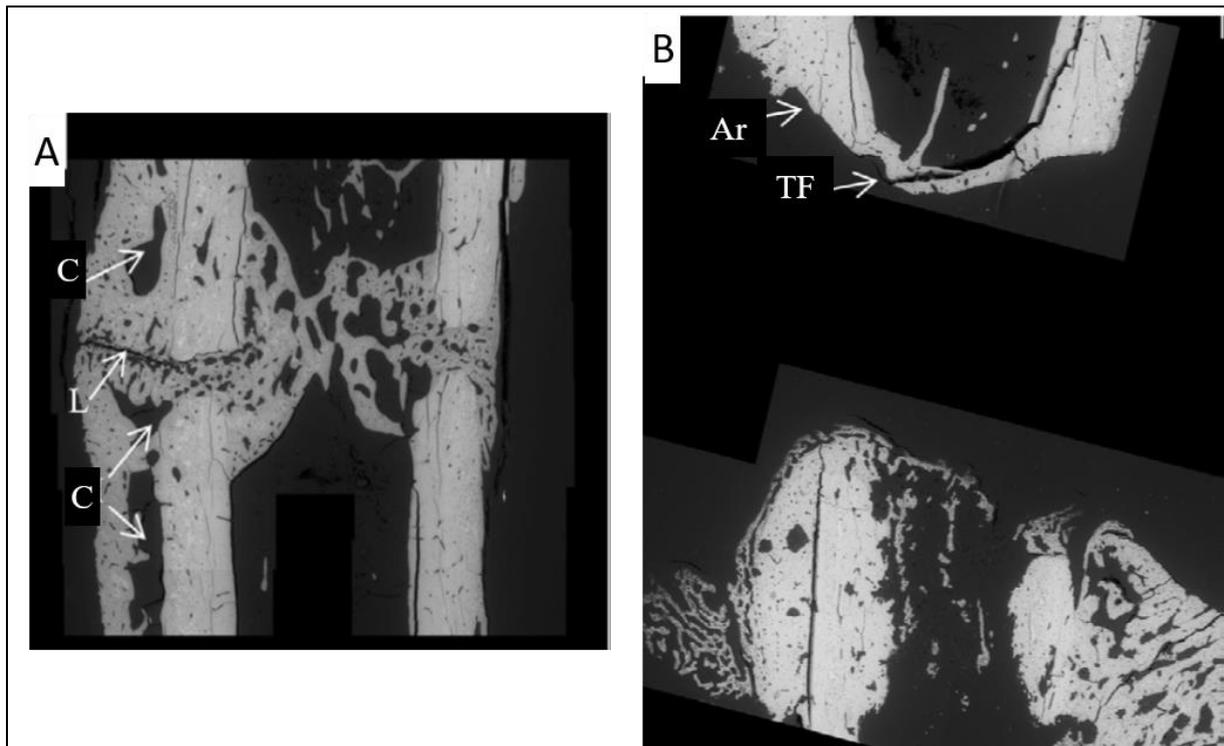
Aux abouts fracturaires, les cellules ostéoprogénitrices issues du périoste prolifèrent et se différencient en chondroblastes, sous l'action combinée des fortes contraintes mécaniques, de la faible pression partielle en oxygène et des cytokines comme le TGF- β et des BMP (2 et 4).

Ce processus engendre la formation d'un cal cartilagineux (cal « mou » ou cal primaire ») à l'endoste (qui obstrue la cavité médullaire) et au périoste, initialement moins résistant à la traction que le tissu de granulation, dans les 2 à 4 semaines suivant la fracture (Ghiasi *et al.* 2019).

Avec l'augmentation progressive de la stabilité au site fracturaire, une néovascularisation se met en place, sous l'action du VEGF (Street *et al.* 2002), de l'angiopoïétine et des MMP-9 produites par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes (Marsell and Einhorn 2011). Cette étape est primordiale dans le processus de cicatrisation osseuse, l'ischémie entraînant des retards à la cicatrisation (Lu *et al.* 2011).

La matrice cartilagineuse est dégradée, à partir du 14^{ième} jour après la traumatisme, par l'action des ostéoclastes et des MMP (MMP 9, 13 puis 2) (Ortega *et al.* 2003, Lieu *et al.* 2011). Les ostéoblastes issus du périoste, de l'endoste et de la moelle osseuse produisent une matrice minéralisée en remplacement de la matrice cartilagineuse, formant un cal osseux constitué d'os tissé (Marsell and Einhorn 2011). En parallèle, les cellules ostéoprogénitrices issues de l'endoste initient une ossification de type intramembraneuse (Phillips 2005). Le pontage osseux se fait dans un premier temps dans le cal endosté puis la micro- et la nano-architecture progresse vers une organisation corticale ordonnée (Hoerth *et al.* 2014). Le cal osseux obtenu présente une faible résistance à l'élongation.

Dans le cadre d'un défaut osseux de taille critique (qui ne peut guérir, malgré une bonne stabilisation, sans intervention chirurgicale comme une greffe osseuse par exemple (Hollinger and Kleinschmidt 1990, Keating *et al.* 2005)), aucun pont ne se forme entre les deux bouts fracturaires, en revanche un pont osseux ferme la cavité médullaire (Figure 19). Bien que la plupart du temps les mécanismes de réparation osseuse ne soient pas altérés, ces défauts de taille critique sont d'une grande importance clinique car les taux de complications et de réinterventions chirurgicales sont élevés et le pronostic fonctionnel réservé (Schemitsch 2017). De plus, il n'y a, à l'heure actuelle, aucun vrai consensus sur la meilleure façon de les traiter (Nauth *et al.* 2018).



Modifié d'après (Hoerth et al. 2014)

Figure 19 : Etat de la guérison d'un défaut osseux de taille non critique (A) et d'un défaut de taille critique 6 semaines après ostéotomie du fémur chez le Rat.

Dans la figure A, L indique la ligne de séparation résiduelle où les bouts osseux proximaux et distaux entrent en contact, et constituée de cartilage. Un pont osseux est formé entre les deux bouts. C indique des cavités dans le cal périosté, rempli de moelle. La cavité médullaire est obstruée par du tissu qui va être recanalisé lors du remodelage. Dans la figure B, TF indique le tissu osseux fermant la cavité médullaire, et Ar souligne l'arrondissement des bouts osseux. Ici le tissu fermant la cavité ne sera pas remodelé.

1.1.4.2.1.3. Phase de remodelage

La phase de remodelage, phase finale de la cicatrisation osseuse par seconde intention, débute à partir de 3 à 4 semaines après la fracture et dure de plusieurs mois à plusieurs années. C'est la phase la plus longue du processus de réparation osseuse (70 % du temps total) (Marsell and Einhorn 2011). Elle se caractérise par la résorption du cal périosté, qui disparaît, et par le remodelage du cal endosté qui permet la reperméabilisation de la cavité médullaire dans le cas d'un défaut de taille non critique. L'os tissé est progressivement remplacé par de l'os lamellaire selon un processus similaire au remodelage osseux décrit précédemment. En revanche, dans le cadre d'un défaut de taille critique, le pont osseux qui se développe vient fermer la cavité

médullaire, les marges corticales s'arrondissent, aboutissant à la non union des abouts fracturaires (Hoerth *et al.* 2014) (Figure 19).

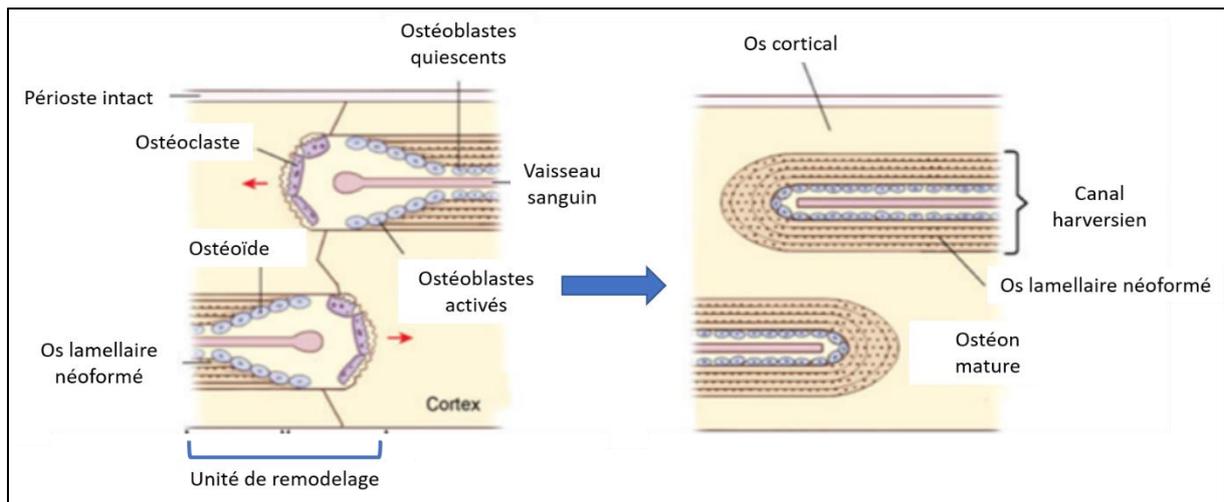
1.1.4.2.1.4. Cicatrisation par première intention

La cicatrisation par première intention consiste en le comblement de la solution de continuité par les ostéoblastes issus de la moelle osseuse, du périoste et de l'endoste, sans formation de tissu de granulation ou de cal.

Les phases décrites dans la cicatrisation par seconde intention sont identiques mais la cicatrisation par première intention ne peut se mettre en place que dans un environnement mécaniquement stable, avec une réduction de la fracture parfaite et dans des régions anatomiques où la pression partielle en oxygène est suffisamment élevée.

Deux cas de figures sont possibles :

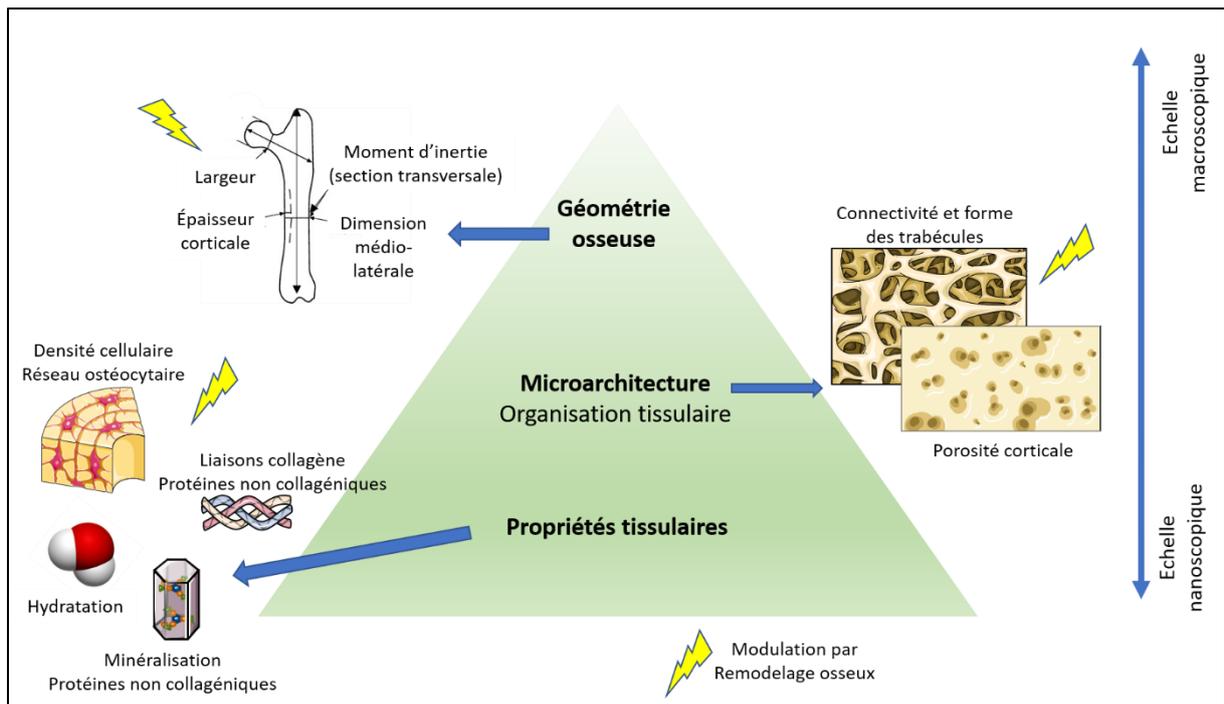
- Soit les abouts fracturaires peuvent être mis en compression (avec une solution de continuité $< 10 \mu\text{m}$) et la déformation engendrée par les contraintes mécaniques $< 2\%$: auquel cas, la cicatrisation se fait uniquement par remodelage osseux avec la mise en place de l'os lamellaire dans l'axe fonctionnel de l'os. Il s'agit d'une cicatrisation « de contact ». L'activation d'unité de remodelage aboutit à un dépôt de tissu osseux de façon concomitante à la résorption par les ostéoclastes. L'os néoformé est constitué d'ostéons moins denses que dans le tissu natif, mais la succession de remodelages sur plusieurs mois à années permet la maturation complète de l'os (Figure 20) (Marsell and Einhorn 2011).
- Soit la solution de continuité est inférieure 1 mm et les contraintes $< 2\%$, auquel cas la cicatrisation est dite « de défaut ». Elle s'opère par la condensation des progéniteurs, aboutissant au comblement du foyer fracturaire. Puis, les progéniteurs se différencient et une ossification intramembraneuse, sous la dépendance des BMP 2, 4, et 7 se met en place. Les ostéoblastes déposent de l'os tissé et lamellaire, puis les unités de remodelage réorganisent le tissu en os lamellaire mature, c'est-à-dire dans l'axe fonctionnel de l'os, au bout de 3 à 8 semaines (Bostrom *et al.* 1995, Marsell and Einhorn 2011).



Modifié d'après (Stroncek, J.D. et al, 2008)

Figure 20 : Cicatrisation par contact lors de cicatrisation osseuse par seconde intention

En résumé, l'os est un tissu conjonctif spécialisé dont les qualités de force reposent sur des paramètres multi-échelles : la géométrie générale de l'os, la microarchitecture des compartiments cortical et trabéculaire, et les propriétés tissulaires intrinsèques basées notamment sur le degré de minéralisation de la matrice, de la stabilité du collagène et de l'équilibre entre les activités cellulaires ostéoblastiques et des ostéoclastiques (Figure 21). L'os est également un tissu dynamique, en perpétuel remodelage. Le chef d'orchestre de ce remodelage est l'ostéocyte, une cellule sensible aux contraintes mécaniques. Ainsi pour se renforcer, l'os a besoin d'être stimulé par des contraintes mécaniques. L'exercice physique est un exemple de contrainte mécanique.



Modifié d'après (Fonseca et al. 2014)

Figure 21 : Facteurs déterminant la force et la fragilité osseuse

1.2. Chapitre 2 : Effets de l'exercice physique et tissu osseux

L'os est un tissu dynamique qui se modèle et se remodèle en fonction des contraintes mécaniques. Comme pour le muscle, l'exercice est nécessaire au renforcement osseux. L'exercice physique est maintenant largement reconnu pour ses effets bénéfiques sur l'os (Marques *et al.* 2012, Musumeci *et al.* 2013, Daly *et al.* 2014).

1.2.1. Différents types d'exercices physiques

L'activité physique est définie comme tout mouvement du corps qui fait travailler des muscles et qui nécessite plus d'énergie que l'activité de repos. Elle inclut, par exemple, la marche, la course, la nage, mais aussi le jardinage ou les tâches ménagères (Organisation mondiale de la Santé n.d.).

Dans la littérature sont décrites quatre formes principales d'exercice physique :

- Les exercices en aérobie (endurance) sollicitent les systèmes cardiovasculaire et respiratoire et se caractérisent par une forte consommation d'oxygène et la production d'énergie. Ils correspondent, par exemple, à la marche, la course à pied, la danse, la nage ou encore le vélo. Leur intensité se définit par rapport au pourcentage de consommation (ou capacité) maximale aérobie (VO_{2max}) à laquelle ils sont effectués, la vitesse pour laquelle le sujet consomme le maximum d'oxygène. Ces activités peuvent se pratiquer :
 - de façon continue, c'est-à-dire à intensité globalement constante, sur une période plus ou moins longue. C'est le mode d'exercice le plus connu ;
 - de façon fractionnée (intermittente, par intervalle), c'est-à-dire par alternance de phases d'exercice à vitesse élevée (efforts très intenses), et de phases de récupération, qu'elles soient actives (intensité de l'exercice plus faible) ou passive (arrêt complet de l'exercice). Ce mode d'exercice existe sous 3 formes (Daniels and Scardina 1984):
 - intervalle court (intervalle de haute intensité), s'effectuant de 100 à 120 % de la VO_{2max} pendant une durée d'une seconde à une minute (Billat *et al.* 2000, Guiraud *et al.* 2010);

- intervalle moyen, s'effectuant de 90 à 100 % de la VO_{2max} pendant une durée d'une à trois minutes ;
 - intervalle long, s'effectuant de 85 à 90 % de la VO_{2max} pendant une durée de trois à quinze minutes.
- Les exercices de renforcement (muscultation), c'est-à-dire des exercices dits de force ou de résistance. Réalisés avec des poids ou des bandes de résistance par exemple, ils permettent d'augmenter la masse musculaire et la force, d'améliorer la posture et la stabilité.
 - Les exercices d'étirement (souplesse) consistent en l'étirement des muscles et en la mobilisation des articulations. Il s'agit par exemple du yoga et du Pilates. Ils permettent le maintien de l'autonomie chez la personne.
 - Les exercices d'équilibre, comme le yoga et le tai-chi par exemple, permettent de prévenir les chutes.

Les modalités d'exercice physique sont donc très variées mais de nombreuses études ont montré les effets bénéfiques dans la régularisation, l'amélioration et le maintien de la santé osseuse.

1.2.2. Effets généraux des exercices physiques sur la qualité osseuse chez le rat sain

Les effets de l'exercice sur l'os ont été rapportés de manière anecdotique dans différents modèles animaux : le Hamster (Tomljenović Borer and Kuhns 1977, Koistinen *et al.* 2014), le Lapin (van der Meulen *et al.* 2009, Wang *et al.* 2016), le Cochon (Anderson *et al.* 1971) et le Mouton (Skerry and Lanyon 1995), mais ce sont chez les Rongeurs et le Cheval (à la fois modèle expérimental (Henry *et al.* 2003) ou modèle clinique (Firth 2006, Olive *et al.* 2010, Rubio-Martínez *et al.* 2010)) que les études sont les plus nombreuses. Si les modèles grands animaux présentent l'avantage de la taille et des similarités avec l'Homme, les modèles petits animaux sont les plus souvent utilisés en raison des similarités physiologiques avec l'Homme, de leur facilité de maintenance et de raisons éthiques (Angelis *et al.* 2017). De plus, avec les animaux comme les Hamsters ou les Lapins, une récompense est généralement nécessaire pour

les motiver à pratiquer l'exercice (Angelis *et al.* 2017). Le Rat étant donc un modèle expérimental validé pour les études portant sur le tissu osseux (Lelovas *et al.* 2008), c'est dans ce modèle que sera exposé ici l'état des connaissances sur les effets de l'exercice sur la qualité et la guérison osseuses.

Les effets généraux des exercices sur la qualité osseuse ont récemment fait l'objet d'une revue chez le Rat (Portier *et al.* 2020). Ces exercices incluaient l'exercice libre dans une roue, la course sur tapis roulant, la nage, avec ou sans charge supplémentaire, le saut ou l'escalade, et la plaque vibrante. Les résultats ci-dessous sont obtenus chez des rats de toutes souches, mâles ou femelles, et sains. Les os étudiés incluent le tibia, le fémur et les vertèbres lombaires. Les paramètres évalués incluent les paramètres de qualité osseuse (géométrie osseuse, microarchitecture et propriétés tissulaires) décrits par (Fonseca *et al.* 2014).

La course en roue libre a la particularité de ne présenter aucun stress pour l'animal, puisqu'il court quand il le veut, dans son propre environnement. Elle génère une augmentation de la DMO, une amélioration des paramètres trabéculaires et une augmentation de l'activité ostéoblastique. Elle présente cependant des effets négatifs sur le métabolisme osseux (diminution du nombre et de l'activité ostéoblastique, augmentation de l'activité ostéoclastique) chez les rats âgés (Sipos *et al.* 2008).

Les exercices de résistance (saut notamment) semblent favoriser la formation osseuse, plus que les exercices comme la course. Ces effets se traduisent par une augmentation de la DMO, une amélioration des paramètres trabéculaires et une augmentation de la résistance osseuse (Portier *et al.*, 2020). De plus, ces effets ne semblent pas nécessiter la réalisation de nombreuses répétitions (Umemura *et al.* 1997), et un long intervalle entre deux sauts génère un effet anabolique osseux plus important qu'un intervalle court (Umemura *et al.* 2002). Certaines études rapportent une absence d'effet, mais pas de détérioration des paramètres de qualité osseuse (Portier *et al.* 2020).

La nage, en revanche, a des effets controversés. C'est également la modalité d'exercice caractérisée par le plus grand pourcentage d'effets négatifs (DMO, paramètres trabéculaires et propriétés biomécaniques), à la fois chez les rats mâles et femelles (Portier *et al.* 2020).

La plateforme vibrante n'a pas d'effet ostéogénique chez les rates (Tezval *et al.* 2011) et provoque même une réduction de la DMO, une détérioration des paramètres trabéculaires et une diminution de la résistance osseuse chez des rates ovariectomisées (Xie *et al.* 2006).

La course sur tapis roulant est une modalité bien reconnue et fréquemment utilisée pour l'étude de l'os chez le Rat (Yeh, Aloia, Tierney, *et al.* 1993, Iwamoto *et al.* 2005). Ces effets sur la qualité osseuse sont détaillés ci-après.

1.2.3. Effets de la course sur tapis roulant sur les paramètres de la qualité osseuse

Dans la littérature, les effets de la course sur tapis roulant sur les paramètres osseux ont majoritairement été étudiés avec des protocoles de course à intensité constante et continue. Les effets sur l'os d'une nouvelle modalité de course, la course intermittente, ont fait l'objet d'études plus récentes (Nakajima *et al.* 2001, Boudenot *et al.* 2015). Les protocoles de course sont caractérisés par la durée des sessions, la fréquence des sessions, la durée globale du protocole, l'intensité de course et la pente du tapis (montante ou descendante). Afin de générer un exercice plus intense, une charge peut être appliquée. Les rats peuvent également être stimulés à la course, par exemple par l'utilisation de grille électrique ou de jets d'air.

Le Tableau 3 récapitule les résultats des études rapportant les effets positifs ou négatifs des protocoles de course sur la microarchitecture et les propriétés mécaniques.

Tableau 3 : Effets positifs (vert) et négatifs (rose) des protocoles de course sur la microarchitecture et les propriétés biomécaniques en fonction de la durée des protocoles

Durée	Protocole	Rat	Os	Paramètres	Refs
4 sem	Intermittent (30 s 25 m/min/ 30 s repos), 10 cycles/j	Mâle Wistar 7 semaines	Fémur	- CMO et DMO - Résistance à la flexion, module élastique de Young	(Chen <i>et al.</i> 2011)
5 sem	Continu 90 min/j 30 m/min	Mâle Wistar 7 semaines	Tibia proximal	- BV/TV, Tb.N and Tb.Th	(Yao <i>et al.</i> 2004)
6 sem	Continu 30 min/j 20 m/min 20° montée / descente	Femelle (SD) 6 semaines	Fémur	- DMO trabéculaire	(Hamann <i>et al.</i> 2012)
6 sem	Continu 30 min/j 20 m/min 20° descente	Femelle (SD) 6 semaines	Fémur	- Module de Young	(Hamann <i>et al.</i> 2012)
8 sem	Continu 30 min/j 15 m/min	Femelle Wistar 8 semaines	Tibia	- DMO trabéculaire	(Hagihara <i>et al.</i> 2009)
	Continu 60 min/j 22 m/min	Mâle Wistar 7 semaines	Fémur	- Energie ultime avant fracture	(Huang <i>et al.</i> 2008)
	Continu 30 min/j 15 m/min ≥ 5 j	Femelle Wistar 6 semaines	Fémur Tibia Vertèbres	- DMO (pas d'effet)	(Hagihara <i>et al.</i> 2005)
	Continu 15 min/j 12 m/min Charge 12 % poids	Femelle Wistar 4 semaines	Fémur	- DMO, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp,	(Gao <i>et al.</i> 2017)
	Continu 12 m/min Charge 5-12%	Femelle Wistar 5 semaines	Fémur	- Module élastique de Young, Nano-indentation corticale - BV/TV	(Fang <i>et al.</i> 2019)
	Continu 12 m/min Charge 26 %	Femelle Wistar 5 semaines	Fémur	- Module de Young, Nano-indentation corticale - BV/TV, Tb.N, TB.Sp	(Fang <i>et al.</i> 2019)
9 sem	Continu 60 min/j 17 m/min	Femelle 14 mois	Tibia/fibula Vertèbre	- CMO, DMO - DMO	(Yeh, Aloia, Tierney, <i>et al.</i> 1993)

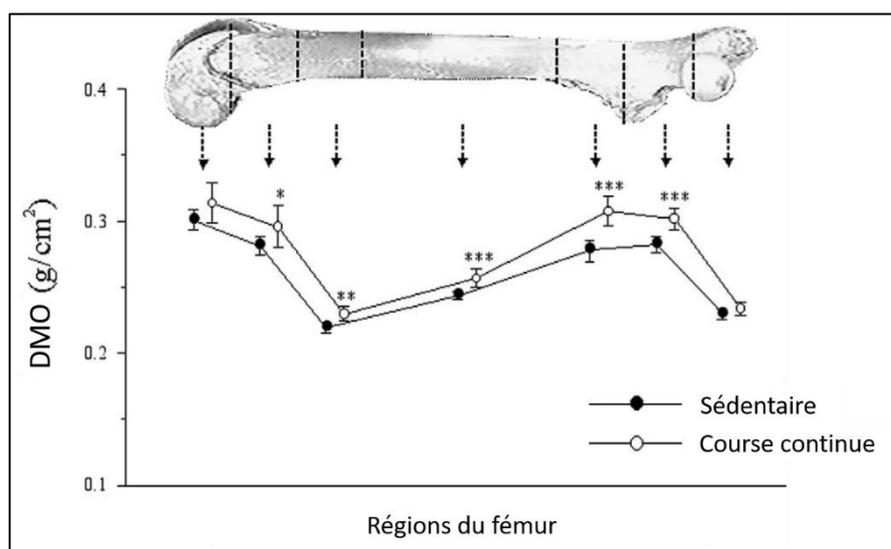
10 sem	Continu 60 min/j 24 m/min	Mâle Wistar 3 semaines	Tibia métaphyse proximale	- BV/TV, Tb.Th	(Huang <i>et al.</i> 2002)
	Continu 60 min/j 30 m/min	Mâle Wistar 3 semaines	Fémur	- DMO (sauf épiphyse) -BV/TV, Tb.N, Tb.Th -Charge maximale et rigidité	(Joo <i>et al.</i> 2003)
	Intermittent 60 min/j	Mâle Wistar 4 semaines	Fémur Corps entier	- DMO	(Boudenot <i>et al.</i> 2015)
	Continu 20 min/j 29 m/min, 12 % pente	Femelle SD 8 semaines	Fémur	- Charge maximale	(Hou <i>et al.</i> 1990)
11 sem	Continu 60-70 min/j 27-30 m/min	Mâle Wistar 5 semaines	Fémur	- Résistance à la rupture - Résistance à la rupture (standardisée avec le poids sec) -Energie à la fracture (standardisée)	(Takeda <i>et al.</i> 2012)
	Continu 60 min/j 10-27 m/min 5-17,5°	Femelle Wistar 3 mois	Fémur, Vertèbre L5	-CMO, DMO	(Seco <i>et al.</i> 1998)
	Continu intense	Mâle 5 semaines	Tibia	- DMO, BV/TV, Tb.N	(Bourrin <i>et al.</i> 1994)
	Continu	Femelle Wistar 3 mois	Fémur, Vertèbre	- DMO, CMO,	(Rico, Gervas, <i>et al.</i> 1999, Rico, Aznar, <i>et al.</i> 1999a)
12 sem	Continu 45 min/j 25 m/min 15 % montée	Femelle SD 4 mois	Tibia proximal Diaphyse tibiale	-BV/TV, Tb.Th, Tb.N - DMO corticale	(Swift <i>et al.</i> 2012)
	Continu 60 min/j 15 m/min	Mâle Wistar 15 mois	Fémur Corps entier	- DMO	(Davicco <i>et al.</i> 1999)

12 sem	Continu 5 min/j 18 m/min 5° à 30°	Femelle SD 47 semaines	Fémur (col)	- DMO	(Leppänen <i>et al.</i> 2008)
	Continu 5 min/j 18 m/min 5° à 30°	Femelle SD 90 semaines	Fémur	- Résistance maximale (col et corps)	(Leppänen <i>et al.</i> 2008)
	Continu 4-5 h/j 7,5 m/min	Femelle Fischer 2 mois	Fémur (col)	- Resistance osseuse -BV/TV	(Søgaard <i>et al.</i> 2009)
13 sem	Continu 60 min/j 30 m/min	Mâle Wistar 8 semaines	Fémur	- Charge de rupture	(52)
14 sem	Continu 10 min/j 12-18 m/min 5° à 30°	Mâle Wistar 5 semaines	Fémur (col)	Standardisée avec la masse musculaire : - DMO - Résistance maximale	(Pajamäki <i>et al.</i> 2003)
	Continu 10 min/j 18 m/min 5° à 30°	Mâle SD 75 semaines	Fémur (col)	- DMO	(81)
	Continu 10 min/j 12-18 m/min	Mâle SD 33 semaines	Fémur	Standardisée avec la masse musculaire : - DMO - Résistance maximale	(Järvinen <i>et al.</i> 2003)
16 sem	Continu 60 min/j 17 m/min	Femelle SD 14 mois	Tibia métaphyse proximale Vertèbre L5	- DMO et CMO - DMO	(Yeh, Aloia, Tierney, <i>et al.</i> 1993)
17 sem	Continu 2 x 30 min/j 10 m/min	Femelle SD 12 semaines	Fémur (col)	- Charge à la rupture	(Peng <i>et al.</i> 1994)
	Continu 15-30 min/j 20 m/min Charge 20 %	Femelle Wistar 5 mois	Extrémité distale	- BMC, masse osseuse	(van der Wiel <i>et al.</i> 1995)
40 sem	Continu 4-5 h/j 7,5 m/min	Femelle Fischer 2 mois	Fémur (col)	- Resistance osseuse -BV/TV	(Søgaard <i>et al.</i> 2009)

1.2.3.1. Effets de la course sur la densité minérale osseuse

De nombreuses études se sont intéressées aux effets de la course sur le DMO, et ces effets dépendent largement de l'âge, du genre de l'animal, du protocole de course utilisé, par exemple.

Chez des rats mâles, âgés de 4 mois, la course continue (CC, de 30 m/min, 60 min/j, 5 j/semaine pendant 10 semaines) augmente la DMO dans la diaphyse, les métaphyses proximale et distale, et la zone sous-trochantérique du fémur par rapport aux rats sédentaires. Cependant, ce n'était pas le cas pour les épiphyses proximale et distale, ce qui suggère une distribution des contraintes variable en fonction des sites (Figure 22) (Joo *et al.* 2003).



D'après (Joo *et al.* 2003)

Figure 22 : Influence de la région osseuse du fémur sur les effets de la course continue sur la densité minérale osseuse (DMO)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au groupe sédentaire

Chez des rates âgées de 5 mois, la CC (avec des paramètres similaires à ceux cités précédemment) pendant 9 semaines se traduisait par une augmentation de la DMO dans les vertèbres. Après 16 semaines, les gains de DMO et CMO dans le tibia et la fibula étaient respectivement 9 et 5 fois supérieurs à ceux des rats sédentaires (Yeh, Aloia, Chen, *et al.* 1993).

Chez des rates en croissance, la CC (vitesse moyenne de 15 m/min 30 min/jour pendant 8 semaines) augmente la DMO dans le tibia et le fémur (mais pas dans les vertèbres lombaires, ce qui indique une spécificité de site dans la réponse osseuse) pour des fréquences de 4 ou 7 jours par semaine (Hagihara *et al.* 2005). Cependant, pour des protocoles de moindre fréquence (< 4 j/semaine), ces effets n'étaient pas observés.

Cette augmentation de la DMO était également observée pour des protocoles plus courts (4-6 semaines) (Chen *et al.* 2004, Hamann *et al.* 2012), ou des séances plus courtes (5 à 15 min par jour) (van der Wiel *et al.* 1995, Pajamäki *et al.* 2003, Järvinen *et al.* 2003) mais sur tapis avec une inclinaison négative (en descente) (Pajamäki *et al.* 2003, Järvinen *et al.* 2003, Leppänen *et al.* 2008), y compris chez des rates matures (Leppänen *et al.* 2008) ou avec des charges supplémentaires (van der Wiel *et al.* 1995). De même avec une pente de -20° (20 m/min, 30 min/jour, 5 jours/semaine, pendant 6 semaines), la CC augmentait la DMO trabéculaire (mais pas corticale) fémorale (Hamann *et al.* 2012).

A l'inverse, à cette vitesse et sur une piste inclinée à $+17,5^\circ$ (en montée), la course continue engendrait une diminution de la croissance longitudinale (mesurée sur le fémur) et une sévère ostéopénie axiale et appendiculaire (diminution du CMO) (Seco *et al.* 1998).

L'ajout d'une charge lors de la CC chez des rats de 5 semaines, correspondant à 12 % du poids de l'animal, se traduisait par des bénéfices supplémentaires dans l'os sous-chondral fémoral par rapport à la course sans charge, incluant augmentation de la formation osseuse. Cependant, au-delà de cette charge, ces effets bénéfiques n'étaient plus observés (Gao *et al.* 2017). En revanche, chez des rats de 5 mois, l'ajout d'une charge correspondant à 19-20 % du poids de l'animal se traduisait par une augmentation du CMO des membres postérieurs (van der Wiel *et al.* 1995). Ainsi, la réponse de l'os aux stimulations mécaniques induites par la course dépend également du stade de croissance de l'animal.

A contrario, d'autres études rapportent une absence d'effet de la CC (10-30 m/min, 60 min/jour, pendant 2-27 semaines) sur la DMO fémorale ou tibiale (Notomi *et al.* 2000, Yingling *et al.* 2001, Iwamoto *et al.* 2004, Yao *et al.* 2004, Tromp *et al.* 2006, Warner *et al.* 2006, Sipos *et al.* 2008). Pour des protocoles de CC de durée et d'intensité similaires (intense), la DMO décroissait à des valeurs inférieures à celles de rats sédentaires (Bourrin *et al.* 1994, Seco *et al.* 1998, Rico, Gervas, *et al.* 1999, Rico, Aznar, *et al.* 1999b, Swift *et al.* 2012) ; Une étude rapporte en revanche l'augmentation de la DMO corticale tibiale (Swift *et al.* 2012).

Lorsque la CC s'effectue sur des temps plus longs, que ce soit en durée de course quotidienne ou en durée de protocole, les effets sont mitigés. Chez la rate par exemple, la CC

d'intensité modérée pendant 4-5 h/j (distance de 2 km/jour), 5 j/semaine, pendant 4 à 10 mois, induit des effets positifs sur le fémur, comme une augmentation de la masse osseuse trabéculaire et une atteinte plus rapide du pic de masse osseuse qui persiste chez la rate mature. Cependant, une fermeture plus précoce des plaques de croissance est observée (Søgaard *et al.* 2009).

En ce qui concerne la course par intervalle de haute intensité (CIHI), une seule étude à ce jour s'est intéressée à ses effets sur la DMO. Ainsi, pour une durée de course 30 % plus courte, la CIHI induit une augmentation de la DMO corporelle et de la DMO fémorale 20 % supérieure à celle induite par la CC chez des rats (Boudenot *et al.* 2015).

1.2.3.2. Effets de la course sur la microarchitecture osseuse

De même que pour la DMO, il est difficile d'établir un protocole de course idéal permettant d'optimiser la microarchitecture osseuse.

La plupart des études sur la CC modérée, chez des rats mâles ou femelles en croissance (âgés de 5 à 8 semaines), à une vitesse moyenne de 15 m/min (jusqu'à 30 m/min) pendant 30 à 90 min sur des périodes de 8 à 12 semaines, mettent en évidence les effets bénéfiques de la CC sur la structure et la microarchitecture osseuse, à savoir une augmentation des croissances radiale et longitudinale des fémurs et des tibias, ainsi qu'une amélioration des paramètres de l'os trabéculaire (BV/TV, Tb.Th et Tb.N)) pour le tibia et le fémur distal (Bourrin *et al.* 1995, Iwamoto *et al.* 1999, Joo *et al.* 2003, Yao *et al.* 2004, Huang *et al.* 2008, Swift *et al.* 2012). Des résultats similaires sont observés chez les rates matures (Yeh, Aloia, Chen, *et al.* 1993). De même, l'ajout d'une charge supplémentaire (12 % du poids de l'animal) lors de CC d'intensité modérée se traduit par des bénéfices supplémentaires sur les paramètres BV/TV et Tb.Th, de l'os sous-chondral et de la métaphyse tibiale proximale par rapport à la course sans charge (Gao *et al.* 2017).

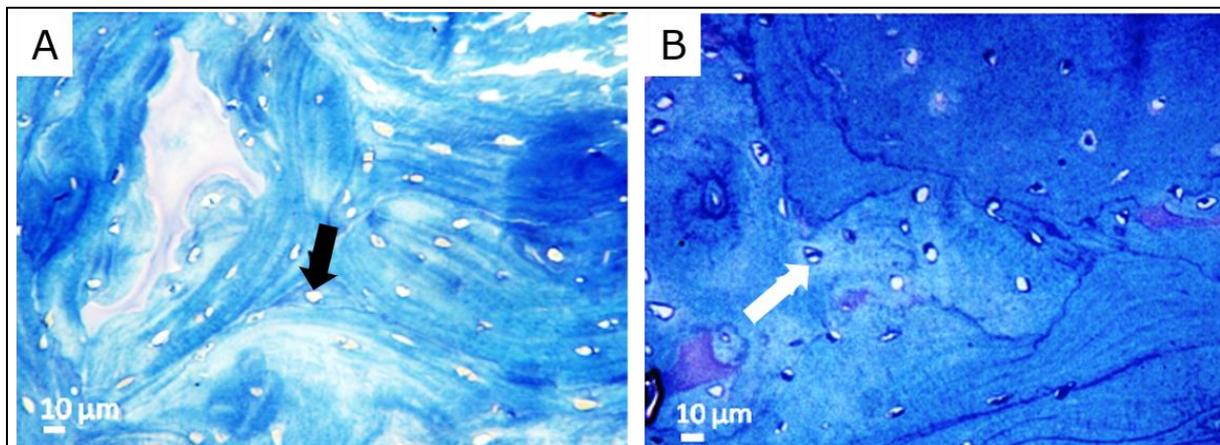
En revanche, certaines études ne rapportent aucun effet (Notomi *et al.* 2000, Hamann *et al.* 2012) de la CC sur la microarchitecture osseuse, voire même au contraire une dégradation (Bourrin *et al.* 1995, Sipos *et al.* 2008, Maurel *et al.* 2013) de cette microarchitecture, notamment dans les épiphyses tibiales proximales et les vertèbres.

Par ailleurs, aucune étude ne rapporte les effets de la course sur les paramètres de l'architecture corticale, à notre connaissance.

1.2.3.3. Effets de la course sur les cellules osseuses

1.2.3.3.1. Effets sur la lignée ostéoblastique

La littérature concernant les effets de la course spécifiquement sur les ostéocytes ou les ostéoblastes chez des rats en santé est limitée. Sont toutefois rapportés des effets positifs des protocoles de course modérée continue ou intermittente, notamment sur le nombre ou la viabilité des lignées ostéoblastiques ou ostéocytaires chez les rats mâles (Vicente *et al.* 2013, Boudenot *et al.* 2014), et de la course continue modérée sur la lignée ostéocytaire chez les femelles (Barengolts *et al.* 1994). Plus précisément, la course continue modérée (5 j/semaine pendant 3 mois) se traduit par une augmentation de l'activité ostéoblastique, mise en évidence par une augmentation du taux d'apposition minérale (Barengolts *et al.* 1994) ou par une augmentation de l'expression de l'ARNm du collagène de type I (Vicente *et al.* 2013). De plus, la CIHI (cycles alternant 5 min à 50 % de la VMA puis 2 min à 80 % de la vitesse maximale aérobie (VMA) puis 1 min de repos, 1 h/j, 5 j/semaine pendant 10 semaines) se traduit par une augmentation du taux d'occupation lacunaire et de la surface des lacunes occupées par un ostéocyte dans l'os sous-chondral tibial par rapport au groupe sédentaire (Figure 23).



D'après (Boudenot et al. 2014)

Figure 23 : Os sous-chondral cortical en coloration au bleu de Toluidine chez un rat sédentaire (A) et chez un rat pratiquant la course intermittente (B)

La flèche noire indique une lacune ostéocytaire vide et la flèche blanche une lacune avec un ostéocyte.

De même, chez la rate, un exercice de course intense (80-90 % de la VMA. 5 j/semaine pendant 10 semaines) induit une augmentation de la densité ostéocytaire dans la diaphyse tibiale, en particulier dans le cortex latéral et le cortex caudal (Li *et al.* 1991). En revanche aucun effet n'est observé sur l'apoptose ostéocytaire (Boudenot *et al.* 2014).

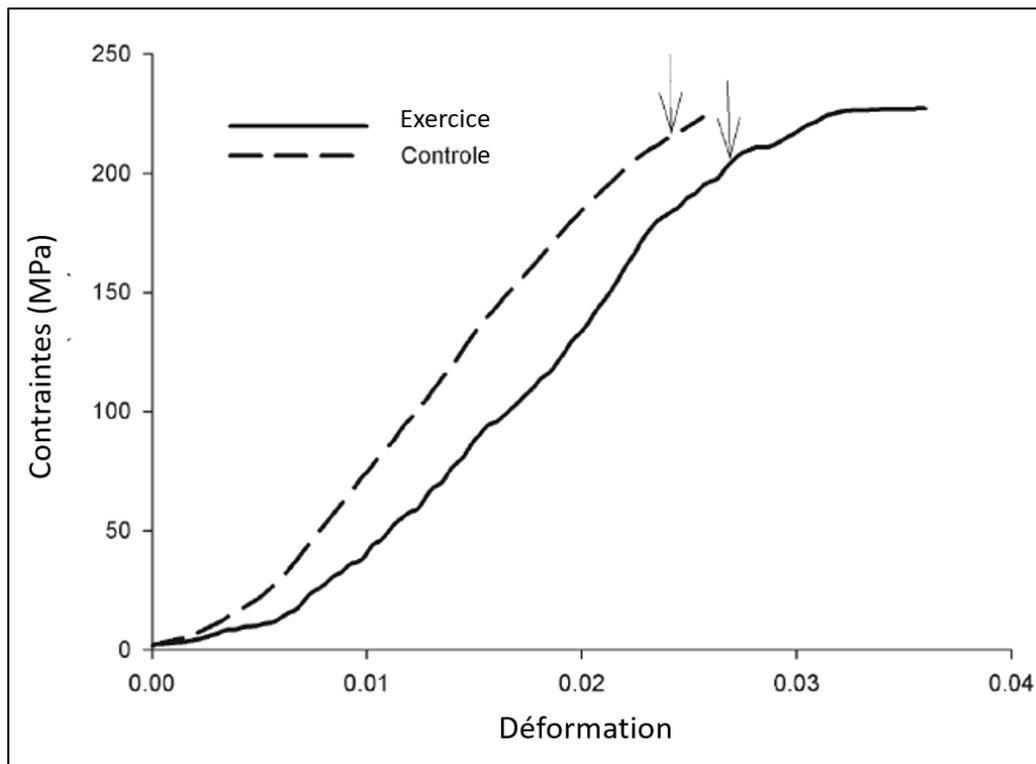
Une absence d'effet de la course continue modérée sur la lignée ostéocytaire chez les rates est également rapportée dans la littérature (Swift *et al.* 2012, Vicente *et al.* 2013).

1.2.3.3.2. Effets sur la lignée ostéoclastique

En ce qui concerne la lignée ostéoclastique, la littérature rapporte des effets positifs, c'est-à-dire une réduction du nombre d'ostéoclastes ou de l'activité ostéoclastique (en surface de coloration TRAP ou en expression d'ARN TRAP) induite par la course continue, à la fois chez le mâle et la femelle (Bourrin *et al.* 1995, Swift *et al.* 2012, Vicente *et al.* 2013) sains. Une absence d'effet (à la fois sur les paramètres de résorption osseuse sériques et locaux) est cependant rapportée dans certaines études pour des fréquences d'exercice de 5 jours par semaine (Barengolts *et al.* 1994) ou en deçà (Hagihara *et al.* 2005).

1.2.3.4. Effets de la course sur les paramètres biomécaniques

Les données sur les effets de la course sur les paramètres biomécaniques chez le rat sain sont plutôt rares. Une seule étude rapporte une augmentation de l'énergie élastique et de l'énergie maximale emmagasinée dans le fémur, suite à des protocoles de course continue modérée ou de course intermittente (distance parcourue identique, 60 min/j, 5 j/semaine pendant 8 semaines) chez des rats mâles âgés de 7 semaines (Figure 24) (Huang *et al.* 2008). Un protocole de CC plus long (4-5 h/j (distance de 2 km/jour), 5 j/semaine, pendant 4 à 10 mois) induit une amélioration des paramètres biomécaniques du col du fémur par rapport aux rates sédentaires (Søgaard *et al.* 2009).



D'après (Huang et al. 2008)

Figure 24 : Effet de l'exercice sur la courbe contrainte-déformation du fémur

La flèche indique la limite d'élasticité conventionnelle. Avec l'exercice, la limite d'élasticité conventionnelle augmente, ainsi que la ductilité.

Par ailleurs, l'ajout d'une charge jusqu'à 12 % du poids du corps ne modifiait pas, par rapport à la course sans charge, les qualités biomécaniques du fémur (Fang *et al.* 2019). Sans groupe contrôle sédentaire, il n'est pas possible d'évaluer les effets de l'exercice seul. Cependant, au-delà de cette charge, ces effets bénéfiques n'étaient plus observés ; au contraire, une augmentation de la charge induisait une diminution de la force du fémur et des propriétés biomécaniques de l'os cortical à l'échelle nanoscopique (Fang *et al.* 2019).

De même, la course pratiquée à forte intensité provoque une détérioration des paramètres osseux. Par exemple, pour une même distance parcourue que dans l'étude de Søggaard *et al.* (2009), mais avec une vitesse de course plus élevée (29 m/min) sur une durée plus courte (1 h), les effets sur le col du fémur de rates immatures se traduisaient par une détérioration des paramètres biomécaniques (Hou *et al.* 1990). Par ailleurs, à cette intensité pendant 10 semaines, la CC intense diminuait la force de tension dans le deuxième métatarse,

mais pas dans le tibia (Li *et al.* 1991). En descente (-20°, 20 m/min, 30 min/j, 5 j/semaine, pendant 6 semaines) la CC entraînait une diminution du module de Young par rapport à la course à plat chez des rates en croissance, sans modification de la microarchitecture corticale fémorale (Hamann *et al.* 2012).

Ainsi, il est difficile d'identifier un protocole de course qui améliorerait tous les paramètres de qualité osseuse (géométrie osseuse, microarchitecture, activité des cellules osseuses et propriétés biomécaniques) à la fois. Si globalement, par rapport à un exercice trop intense ou au contraire trop peu intense, un protocole de course continue modérée (en moyenne 15 m/min, 10 à 90 min/j, pendant au moins 8 semaines, chez des rats mâles ou femelles âgés de 5 à 8 semaines) semble avoir des effets positifs à la fois sur la géométrie et la microarchitecture du tibia et du fémur distal, certaines études pourtant réalisées dans des conditions similaires ne rapportent pas cet effet bénéfique sur la microarchitecture (Portier *et al.* 2020). De plus la grande majorité des études ne rapporte aucun effet bénéfique sur les paramètres biomécaniques. Les différences observées sur les différents paramètres de qualité osseuse peuvent être liées à des différences de protocole de course (type de course, durée, intensité, inclinaison, entre autres, et donc à l'amplitude des contraintes), de l'os (fémur, tibia, vertèbre, par exemple) (Iwamoto *et al.* 1999, Wallace *et al.* 2007), voire même du site osseux étudié (géométrie et architecture osseuse) (Holy and Zérath 2000, Joo *et al.* 2003). Mais alors que les caractéristiques (espèce, âge, sexe, notamment) des sujets expérimentaux influencent le remodelage osseux, ces mêmes paramètres pourraient également moduler les effets de l'activité physique sur le métabolisme osseux. Chez le Souris, il a été montré que la sensibilité de l'os à la contrainte était supérieure chez le jeune, que chez l'adulte ou l'animal âgé (Razi *et al.* 2015), et que la réponse dépendait de l'os lui-même (Wallace *et al.* 2007). Chez le Souris et le Rat, elle dépendait également du sexe de l'animal (Wallace *et al.* 2007, Vicente *et al.* 2013).

1.2.3.5. Synthèse des mécanismes d'action de la course sur l'os

Les effets de la course sur l'os sont en grande partie liés aux effets directs de la course sur les cellules osseuses, mais également à d'autres mécanismes.

Lors de la course, l'impact produit sur l'os induit une déformation de la matrice qui conduit à une circulation du liquide interstitiel dans le système lacuno-canaliculaire (Qin and Hu 2014). L'exercice favorise également la libération, en plus grande quantité, de molécules telles que le calcium, l'oxyde nitrique, les prostaglandines, les protéines Wnt (Bonewald and Johnson 2008, Kamel *et al.* 2010) dans le liquide interstitiel et connues pour favoriser la formation osseuse. Ainsi, dans la CIHI, l'intensité plus importante de la contrainte induirait une augmentation de cette circulation et une libération de ces molécules en plus grande quantité dans le liquide interstitiel. Ceci pourrait expliquer que la CIHI, qui s'effectue à des vitesses 10 à 40 % plus élevée que pour la CC, induit une augmentation de la DMO en un temps plus court que la CC (Boudenot *et al.* 2015). Enfin, dans les protocoles à intervalles de haute intensité, la période de repos qui suit la phase de course à haute intensité limite le phénomène de désensibilisation de l'ostéocyte et permet ainsi la réponse anabolique de l'os (Robling *et al.* 2001, Gross *et al.* 2004, Skerry 2006, Robling and Turner 2009).

La course pratiquée de manière intense est associée à des effets négatifs sur la DMO, liée principalement à une activité ostéoblastique altérée (Bourrin *et al.* 1994). Pratiquée en pente, la CC est considérée comme exercice intense ; en descente cependant, la réaction du sol (contrainte) est supérieure sur les membres antérieurs que sur les membres postérieurs (Butterfield *et al.* 2005). Ceci pourrait expliquer alors la différence effets positifs / effets négatifs sur l'os, selon que la course est pratiquée en descente (Pajamäki *et al.* 2003, Järvinen *et al.* 2003, Leppänen *et al.* 2008) ou en montée (Seco *et al.* 1998). Hamann *et al.* ont suggéré l'existence d'un seuil critique à partir duquel la formation osseuse est stimulée (Hamann *et al.* 2012). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'ajout d'une charge supplémentaire lors de la course augmente les effets positifs sur l'os. En revanche, le fait qu'au-delà d'une certaine charge les effets positifs ne sont plus observés (Gao *et al.* 2017) pourrait être lié à l'atteinte d'une intensité d'exercice trop importante.

Dans le remodelage osseux, les ostéocytes contrôlent la communication entre les cellules, probablement via la régulation de la sclérostine (Poole *et al.* 2005). Chez la Souris, la course modérée sur tapis roulant (5° d'inclinaison, 15 m/min, 30 min/j, 5 j/semaine pendant 5 semaines, souris âgées de 8 semaines au début du protocole) se traduit par une diminution de l'expression de la sclérostine et une augmentation de la masse osseuse par inhibition de la résorption osseuse (Gardinier *et al.* 2018). Ces effets sont mitigés par l'âge (Gardinier *et al.* 2018). A contrario, la décharge des membres inférieurs induit une augmentation de l'expression

de la sclérostine (Moriishi *et al.* 2012) et augmente également l'apoptose ostéocytaire, qui est suivie du recrutement des ostéoclastes et de la résorption de l'os (Aguirre *et al.* 2006).

En ce qui concerne l'activité ostéoclastique, régulée par RANKL et l'OPG (en se liant à RANKL, l'OPG prévient la fixation de RANKL sur son récepteur RANK, limitant alors le recrutement et la différenciation des ostéoclastes), les différents protocoles de course pourraient moduler la résorption osseuse en modifiant le ration RANKL/OPG. En effet, la course modérée contribuerait à augmenter l'expression de l'OPG et à diminuer l'expression de RANKL (Wang *et al.* 2013, Gardinier *et al.* 2018). Ces effets ont également été démontrés pour la course dans un modèle d'ostéopénie cortico-induite (Recker and Barger-Lux 2004) et dans un autre type d'exercice que la course (Notomi *et al.* 2014)

En plus des ostéocytes et des ostéoclastes, les contraintes induites par la course pourraient avoir des effets bénéfiques sur les CSM. Ces effets ont fait l'objet d'une récente revue (Bourzac *et al.* 2019) (Annexe 3). Bien que les effets de la course sur ces cellules dépendent essentiellement des paramètres de la course (type, durée, vitesse, par exemple), la CC modérée favorise la prolifération des CSM et réduit leur apoptose. La CC favorise également la différenciation des CSM vers la lignée ostéogénique et au contraire inhibe la différenciation vers la lignée adipogénique. En revanche, la course de haute ou faible intensité n'avait d'effet ni sur la prolifération, ni sur l'apoptose, ni sur la différenciation ostéogénique (Bourzac *et al.* 2019). Chez l'Homme, le sérum issu d'athlètes ayant effectué un exercice jusqu'à l'épuisement avait un effet chimiotactique les CSM (Schmidt *et al.* 2009).

Afin d'expliquer les effets anaboliques de la CC d'intensité modérée, une autre hypothèse avancée est celle d'une action anti-inflammatoire de l'exercice. Ainsi l'exercice physique engendre la production de myokines qui pourraient moduler l'inflammation associée à l'âge ou à la suppression hormonale (Sherk and Rosen 2019, Pagnotti *et al.* 2019). La CC ou la CIHI engendrent une production significative des interleukines anti-inflammatoires (IL-10, par exemple) pendant et après l'exercice (Cabral-Santos *et al.* 2015). Cette libération de facteurs anti-inflammatoires renforce l'effet de l'exercice et participe au maintien de la masse osseuse en retardant la résorption et en favorisant la formation osseuse (Zhang *et al.* 2014).

Il a également été montré que l'ACTH avait un effet sur la synthèse de collagène par les ostéoblastes et qu'elle stimulait de façon dose-dépendante la prolifération des ostéoblastes (Isales *et al.* 2010). En revanche, la balance entre formation et résorption osseuse peut, à la

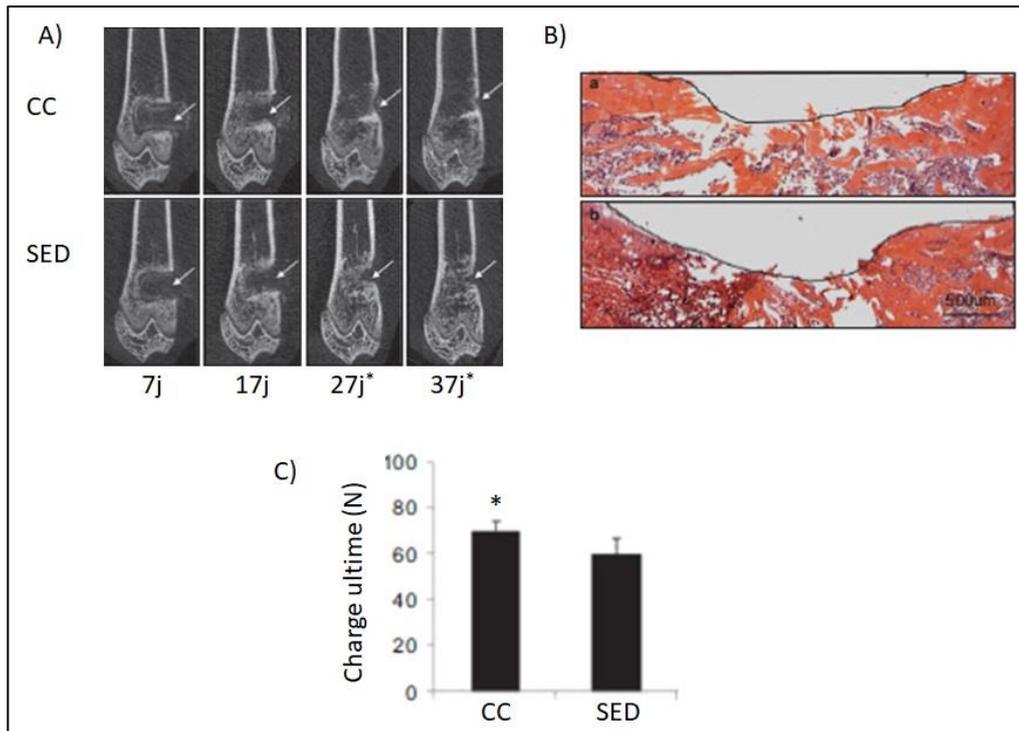
faveur d'un stress chronique, basculer en faveur de la résorption osseuse (Elefteriou 2018). Cette bascule vers un processus catabolique osseux serait liée à un état d'hypercortisolisme et d'hypogonadisme engendré par l'exercice, comme ce qui est rencontré chez les athlètes femmes (Lindholm *et al.* 1993).

Enfin, le mécanisme de formation osseuse, que ce soit de l'os cortical ou de l'os trabéculaire, serait également lié à un processus direct dans l'os dépendant de facteurs de croissance comme le VEGF. Au sein de l'os est observée une adaptation vasculaire (en termes de nombre, de taille de vaisseaux) induite par l'exercice (Yao *et al.* 2004). Des événements indirects, liés aux muscles adjacents, ne peuvent être exclus.

1.2.3.6. Effets de la course sur tapis sur la réparation osseuse

Les effets bénéfiques de la course sur tapis roulant sur la réparation tissulaire ont été étudiés dans de nombreux tissus, comme le myocarde (Lavorato *et al.* 2016), le tissu nerveux (Yi-Xian Zhang *et al.* 2015) ou le cartilage (Song *et al.* 2014, Yamaguchi *et al.* 2016). Alors que les bienfaits de la course sur les paramètres de qualité osseuse sont maintenant établis, ses effets dans le cadre de la guérison de défauts osseux sont très peu étudiés.

La plupart des études font état d'un effet de la course continue a posteriori, c'est-à-dire après que la lésion s'est produite. Ainsi, dans un modèle de défaut osseux de taille non critique traité par un ciment chez des rats femelles Sprague-Dawley de 10 semaines, la pratique de la course continue (faible intensité : 8 m/min, 45 min/jour pendant 30 jours consécutifs) initiée 7 jours après la chirurgie, se traduisait par une amélioration de la guérison osseuse en termes (i) de remplissage du défaut osseux (surface résiduel du défaut diminuée et vitesse de réparation augmentée) à partir de 27 jours de course et (ii) de résistance du tissu de réparation (charge ultime avant rupture augmentée) par rapport aux rates sédentaires (Figure 25) (Jie Zhang *et al.* 2015).



D'après Zhang et al., Bone Research (2015)

Figure 25 : Effets de la course continue sur la réparation d'un défaut osseux de taille non critique chez le Rat femelle.

A) Images microscanner indiquant la progression de la néoformation osseuse dans le défaut au cours du temps (flèche), B) Images représentatives du défaut osseux à 37 jours en coloration hématoxyline-éosine (a) course continue, b) sédentarité ; la ligne noire souligne le contour du défaut résiduel), C) Charge ultime avant rupture au test de flexion en 3 points. CC : course continue, SED : sédentarité ; * indique une différence significative entre le groupe CC et le groupe SED.

Ces résultats sur le remplissage du défaut sont corroborés dans un modèle de défaut osseux de taille non critique chez le rat Wistar mâle de 12 semaines, pour lequel la course d'intensité faible (10 min/jour, 3 jours) sur tapis débutée 24 h après la chirurgie augmentait la radio-opacité trabéculaire dans le défaut dès 14 jours d'exercice, comparativement à la nage (Rueff-Barroso *et al.* 2008).

Seulement deux études font état des effets de la course continue en amont sur la guérison osseuse chez les rongeurs, l'une dans un modèle de fracture tibiale chez la Souris (Heikkinen *et al.* 1974), l'autre dans un modèle de défaut osseux tibial de taille non critique chez le Rat (Nogueira *et al.* 2016). Les effets bénéfiques étaient observés à l'échelle moléculaire et se

traduisaient par une augmentation de la synthèse (Heikkinen *et al.* 1974) ou de l'expression du collagène de type I, de l'expression de l'ostéocalcine (Nogueira *et al.* 2016) et de la concentration en calcium (Heikkinen *et al.* 1974) dans le cal osseux par rapport aux animaux sédentaires, compatibles avec une amélioration de la formation osseuse engendrée par l'exercice. La DMO et le CMO étaient également augmentés par la pratique de l'exercice, mais ceux-ci étaient mesurés dans l'os complet et non limités au tissu de guérison (Nogueira *et al.* 2016). De plus l'évaluation des paramètres osseux étaient limitée à 14 jours maximum après le traumatisme.

Que ce soit avant ou après la survenue de la lésion osseuse, une finalité derrière l'amélioration de la guérison osseuse par l'exercice serait de réduire le temps de convalescence. Ainsi le temps de séjour à l'hôpital pourrait être diminué de même que les coûts associés. Un retour plus rapide du patient à ses activités usuelles est également escompté. Ainsi, bien que ne faisant pas intervenir la course comme exercice, la pratique d'exercices d'endurance (vélo stationnaire, vélo elliptique) et de flexibilité avant une chirurgie de prothèse de hanche ou de genou améliore la fonction motrice et réduit le temps de séjour en hôpital (Moyer *et al.* 2017).

En résumé, chez le Rat, la course sur tapis roulant engendre des effets positifs sur les différents paramètres de la qualité osseuse et sur la réparation osseuse (Figure 26). Les bénéfices observés sont le fruit de la réponse des cellules de la ligne ostéoblastique aux contraintes mécaniques engendrées par l'exercice, modulant les processus de formation et de résorption osseuse. Ces effets dépendent, entre autres des paramètres de la course (intensité, durée, notamment) mais aussi de paramètres physiologiques comme l'âge ou le genre. Cependant, alors qu'il a été montré que les exercices intermittents étaient plus efficaces que les exercices continus chez des rats atteints de syndrome métabolique (Haram *et al.* 2008), ils n'ont fait l'objet que de peu d'études dans le cadre de ses effets sur le tissu osseux et sa réparation.

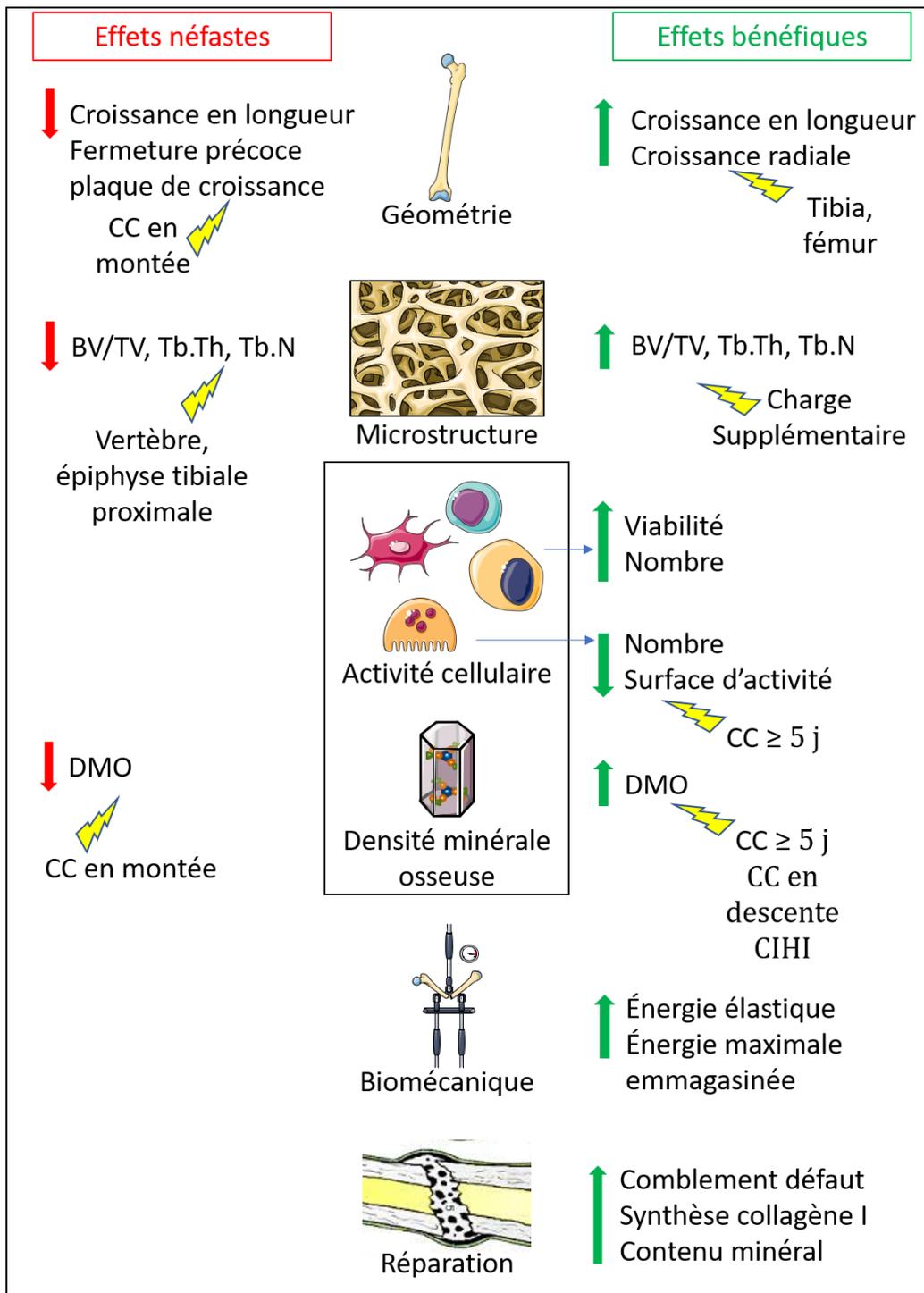


Figure 26 : Effets bénéfiques et néfastes de la course sur tapis roulant sur la qualité et la réparation osseuse

BV/TV : fraction du volume osseux, CC : course continue, CIHI : course par intervalle de haute intensité, DMO : densité minérale osseuse, Tb.Th : épaisseur trabéculaire, Tb.N : nombre de trabécules, « éclair » : amplification de l'effet par le paramètre associé

1.3. Hypothèses et objectifs

En raison de la multitude des protocoles décrits, que ce soit en termes de type de course (continu *vs.* intermittent), de vitesse, d'inclinaison (positive ou négative), intensité, de temps des sessions, de durée de protocole notamment, il est difficile de définir un protocole de course qui serait le plus « ostéogénique ». Les protocoles de faible intensité se révèlent d'ores et déjà les moins efficaces. Mais alors qu'une étude récente chez le Rat suggère, qu'à intensité globale similaire, la course intermittente engendre une adaptation de l'os aux contraintes plus rapide qu'avec la course continue et limite la fragilité osseuse (Boudenot *et al.* 2015), la majorité des études s'est intéressée à la course continue comme méthode efficace pour le maintien de la masse osseuse. Pourtant, aucune étude multi-échelle comparant les effets de ces deux types de course sur la qualité osseuse n'a été publiée à ce jour.

De plus, afin de préciser les propriétés ostéogéniques des protocoles de course, ces protocoles pourraient être évalués dans le cadre de la réparation osseuse. Or les modèles de réparation d'un défaut osseux ou de fracture induite sont très peu utilisés dans cette optique (Heikkinen *et al.* 1974, Nogueira *et al.* 2016).

Ainsi, il est nécessaire de clarifier les effets des différents protocoles de course sur l'os et la guérison osseuse afin d'établir et de proposer des protocoles adaptés permettant de prévenir la détérioration osseuse, voire dans certains cas favoriser sa régénération.

Les objectifs de ce travail étaient donc :

- De caractériser et comparer les effets de la course modérée continue et la course intermittente (par intervalle de haute intensité) sur les paramètres de la qualité osseuse à différentes échelles (géométrie, microarchitecture corticale et trabéculaire, activité cellulaire osseuse) (étude 1),
- De caractériser et comparer les effets de ces exercices pratiqués en amont sur la guérison d'un défaut osseux (étude 2).

Les résultats combinés de ces deux études devaient permettre de déterminer lequel des deux protocoles, continu ou intermittent, favorisait le plus la formation osseuse, c'est-à-dire lequel était le plus ostéogénique.

Les hypothèses étaient que la course en générale améliorerait la qualité osseuse et la guérison osseuse, mais que la course intermittente serait la plus ostéogénique.

2. Deuxième partie : Effets de la course sur tapis roulant sur la qualité du tissu osseux sain et la cicatrisation osseuse chez le Rat

2.1. Chapitre 1 : Matériels et méthodes

2.1.1. Animaux

Les expérimentations ont été conduites sur des rats mâles de la souche Wistar, provenant de l'élevage Janvier (Le Genet-St-Isle, France). Agés de 5 semaines et pesant entre 182 et 217 grammes à l'arrivée, les rats ont été acclimatés, 4 par cage, pendant deux semaines dans l'animalerie du laboratoire de Biologie, Bio-ingénierie et Bio-imagerie ostéoarticulaires (B3OA) à Paris ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, photopériode 12h/12h). Une alimentation d'entretien 1324 (Genestil, Royaucourt, France) contenant 11,3 % d'humidité, 19,2 % de protéines brutes, 4,1 % de matières grasses, 53,4 % de glucides, 6,1 % de cellulose brute, et 5,9 % de cendres brutes, ainsi que de l'eau, étaient distribués à volonté.

2.1.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique sur la recherche animale de Lariboisière/Villemin, Paris (comité n°9) et par le Ministère de l'Agriculture français (APAFIS # 9505), et conduit dans le respect de la Directive 2010/63/EU relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

L'étude était divisée en deux phases (Figure 27). La première phase incluait la pratique d'un protocole de course pendant 8 semaines consécutives, au terme desquelles la moitié des rats était sacrifiée pour analyse de la qualité osseuse. La seconde phase incluait une chirurgie de défauts osseux de taille non critique (c'est-à-dire pouvant cicatriser sans intervention) dans le fémur et le tibia, dont les cicatrisations étaient suivies pendant 4 semaines, au terme desquelles les rats étaient sacrifiés pour analyses.

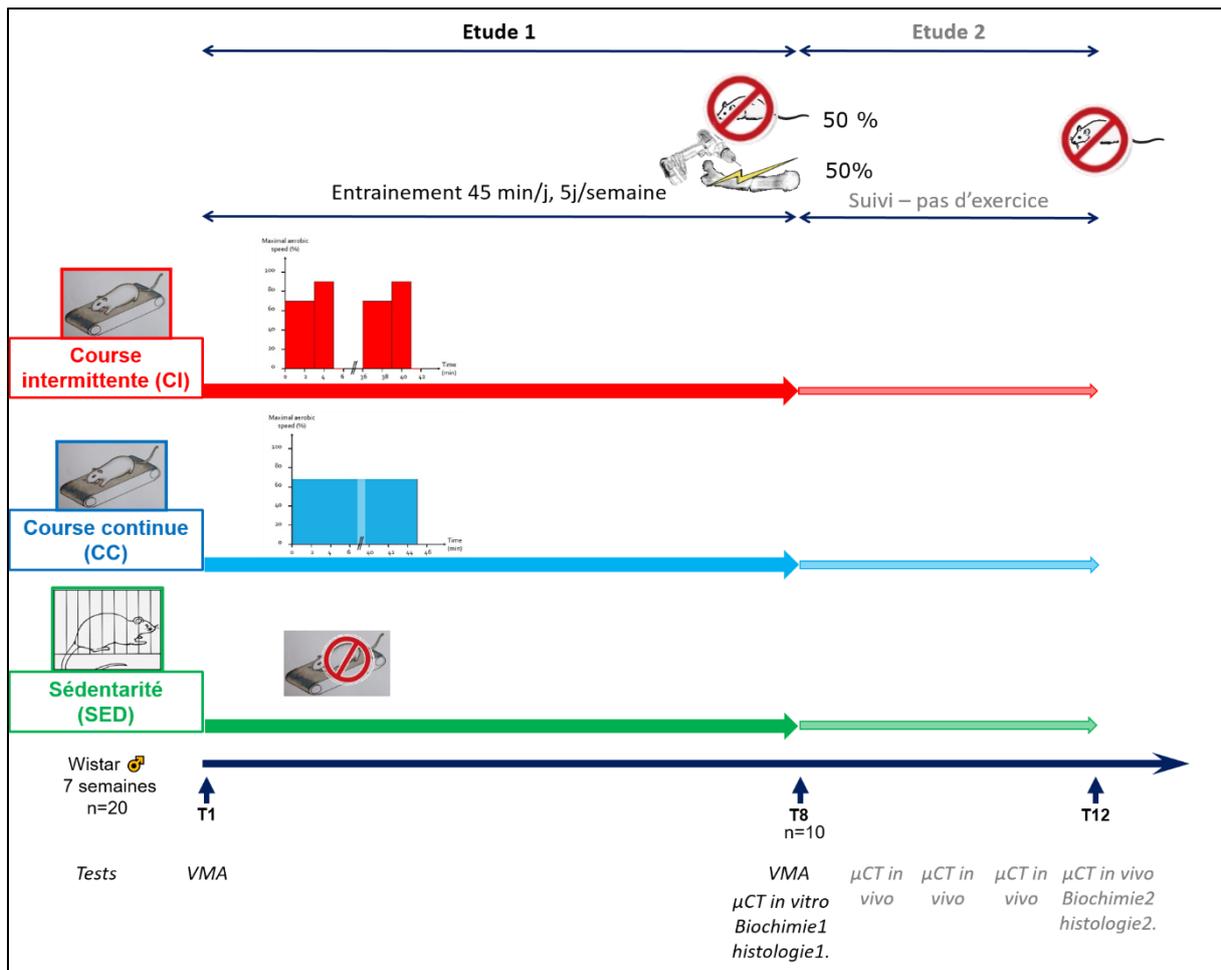


Figure 27 : Protocole expérimental général en deux phases

VMA : vitesse maximale aérobie ; μ CT : microscanner

2.1.2.1. Protocole de course

2.1.2.1.1. Acclimatation au tapis de course

Un tapis roulant comportant 10 couloirs, spécialement conçu pour la course des rats et validé dans d'autres études (Chennaoui *et al.* 2001, Chennaoui *et al.* 2008) était utilisé dans cette étude. Les rats étaient conditionnés au tapis roulant pendant les 5 derniers jours de la période d'acclimatation. Pendant la première journée, les rats étaient posés dans les couloirs, sans que le tapis ne soit mis en marche. Le deuxième jour, le tapis était utilisé à une vitesse correspondant à de la marche (2-5 m/min) pendant 10 minutes. Les troisième et quatrième jours, la vitesse et la durée d'entraînement étaient progressivement augmentées.

2.1.2.1.2. Test de vitesse maximale aérobie

Le 5^{ème} jour, un test de vitesse maximale aérobie (VMA) était réalisé. La VMA représente la vitesse pour laquelle le rat atteint sa consommation d'oxygène maximale. Le test était réalisé en débutant par un échauffement à vitesse moyenne (13 m/min) pendant 5 min, puis la vitesse était progressivement augmentée par incrémentation de 4 m/min toutes les 2 minutes jusqu'à 17 minutes de course, ensuite toutes les minutes et demie (Tableau 4). Si pendant un palier le rat venait se reposer sur la grille en arrière des couloirs de course et ne parvenait pas à réaccélérer plus de deux fois malgré des stimulations avec un jet d'air comprimé, le test était arrêté et la vitesse du palier immédiatement inférieur notée comme VMA. La VMA permettait de calculer la vitesse de course des rats.

Tableau 4 : Protocole de mesure de la vitesse maximale de course (Vmax) pour la détermination de la vitesse maximale aérobie chez les rats

Vmax	Pente 10°											
Temps (minutes)	0 à 5	5 à 7	7 à 9	9 à 11	11 à 13	13 à 15	15 à 17	17 à 18,5	18,5 à 20	20 à 21,5	21,5 à 23	23 à 24,5
Vitesse (m/min)	13	17	21	25	29	33	37	41	45	49	53	57

2.1.2.1.3. Entraînement

A l'issue du test de VMA, les rats étaient répartis aléatoirement en trois groupes de 20 rats, incluant un groupe contrôle (rats sédentaires, SED), un groupe de course modérée continue (CC) et un groupe de course intermittente (CI, course par intervalle de haute intensité). Les rats étaient âgés de 7 semaines au début de l'entraînement (temps T1, Figure 27).

Les séances d'entraînement sur le tapis se déroulaient à la même heure, en alternant le premier groupe à courir d'un jour sur l'autre. Les sessions de course se faisaient sur du plat (pas d'inclinaison du tapis) et duraient 45 min par jour, une fois par jour, 5 jours par semaine pendant 8 semaines consécutives. Les protocoles de course commençaient par 5 min d'échauffement à la vitesse de 12 m/min. Dans le groupe CC, l'échauffement était suivi de 40 min à la vitesse correspondant à 70 % de la VMA (soit 15 m/min). Dans le groupe CI, il était suivi de la répétition de 7 blocs de 6 minutes soit 3 min 12 m/min, suivi de 2 min à 100 % de la VMA (soit 21 m/min) et enfin une minute de repos (soit une vitesse de 0 m/min).

Comme il n'était pas possible d'adapter la vitesse de façon individuelle dans chacun des couloirs, les VMA utilisées pour le calcul des vitesses de course correspondaient à la VMA la plus faible dans chacun des groupes. Des stimulations à courir étaient effectuées au besoin avec un jet d'air comprimé en bouteille (bombe de nettoyage pour clavier d'ordinateur). En aucun cas n'a été utilisé un choc électrique, même si la grille en arrière de chaque couloir pouvait être électrifiée.

Les rats sédentaires n'avaient pas d'activité autre que les déplacements dans leur cage, aucune roue en accès libre n'était disponible.

Au terme des 8 semaines, un nouveau test de VMA était effectué.

2.1.2.1.4. Suivi des paramètres corporels et de la quantité de nourriture ingérée

Les consommations d'aliment et d'eau étaient enregistrées durant la période d'entraînement en isolant un rat de chaque groupe quotidiennement. Les poids corporels ont été enregistrés à 5 semaines d'âge (T0), et à 15 semaines d'âge (T8) pour l'étude 1, à T0 et à 19 semaines d'âge (T12) pour l'étude 2. Les longueurs des rats (du museau à l'anus) étaient mesurés à T0 et T8 pour l'étude 1, et à T0 et T12 pour l'étude 2, afin de calculer les index de masse corporel ($IMC = \text{poids (g)}/\text{taille}^2 \text{ (cm}^2\text{)}$) (Novelli *et al.* 2007) à T0 et T8 pour l'étude 1 et à T0 et T12 pour l'étude 2.

2.1.2.1.5. Modèle de défaut osseux de taille non critique (étude 2)

Au terme des 8 semaines d'entraînement, la moitié des rats de chaque groupe (soit 10 rats par groupe) était sacrifiée par exsanguination et les fémurs et tibias nettoyés des tissus mous et conservés à -80°C ou dans le formol pour analyses *ex vivo* (Cf. paragraphe 2.1.2.1.7). L'autre moitié subissait une chirurgie de défaut osseux bicortical dans la métaphyse distale du fémur et la métaphyse proximale du tibia droit. Le tibia et le fémur étaient choisis car ce sont des os porteurs subissant les contraintes générées par la course sur tapis roulant et composés à la fois de tissus osseux cortical et trabéculaire.

2.1.2.1.5.1. Anesthésie

L'anesthésie était induite dans une boîte d'induction avec de l'isoflurane à environ 5 % dans de l'oxygène à 100 %, puis maintenue au masque avec 3 % d'isoflurane dans 100 % d'oxygène. La température corporelle était maintenue par l'utilisation d'un tapis chauffant (maintenu à 37°C).

Les rats étaient ensuite prémédiqués avec une antibioprofylaxie (enrofloxacin, 10 mg/kg par voie sous cutanée) et de la buprénorphine (0,2 mg/kg par voir sous-cutanée) pour l'analgésie. Le membre pelvien droit était ensuite tondu, puis préparé et drapé de manière aseptique.

2.1.2.1.5.2. Procédure chirurgicale

Une approche para-patellaire était réalisée en face latérale du membre, avec l'incision cutanée centrée sur l'articulation fémoro-tibiale. Le fascia lata était incisé et les muscles rétractés caudalement. Un défaut cylindrique bicortical était alors réalisé avec un foret de 2 mm de diamètre et un outil rotatoire multifonction (Dremel 4300, Dremel, USA) préalablement stérilisé aux rayons ultra-violets, dans la métaphyse distale du fémur, à hauteur de l'insertion du ligament collatéral latéral, entre ce ligament et l'insertion du muscle extensor digitorum longus. Un deuxième forage était réalisé dans la métaphyse proximale du tibia, à hauteur de l'insertion du ligament collatéral latéral, entre ce ligament et le ligament patellaire (Figure 28).



Figure 28 : Forage du défaut osseux non critique dans le fémur droit

Du sérum physiologique était utilisé pour irriguer le site pendant la procédure de forage, afin de limiter le risque de nécrose thermique. Les défauts osseux étaient également irrigués en fin de forage afin d'éliminer les résidus osseux. Le fascia lata, le tissu sous-cutané et la peau étaient fermés en trois plans, avec un fil monofilament résorbable (Biosyn® 5-0, Covidien,

France). La plaie était irriguée entre chaque plan de fermeture avec de la lidocaïne 2 %, pour l'analgésie. Initialement, de la colle chirurgicale était appliquée sur les points afin de consolider la suture mais cette pratique a rapidement été abandonnée en raison du prurit et le risque de déhiscence de plaie qu'elle engendrait. Une administration de buprénorphine (0,1 mg/kg) était réalisée 12 h après la chirurgie, puis une fois par jour pendant 2 jours.

Le réveil de chirurgie s'est bien déroulé pour tous les rats. Un rat du groupe sédentaire, cependant, a présenté une déhiscence de plaie le lendemain de la chirurgie. La plaie a été débridée et de nouveau suturée, sans complication ultérieure.

2.1.2.1.5.3. Suivi

La convalescence des rats a duré 4 semaines, pendant lesquelles un examen au microscanner *in vivo* était réalisé de façon hebdomadaire afin de suivre l'évolution de la cicatrisation des défauts osseux (Cf. paragraphe 2.1.2.1.6). Pendant cette période de convalescence, aucun rat n'a montré des signes d'inconfort ou une boiterie du membre opéré. Au terme de ces 4 semaines, les rats de chaque groupe étaient sacrifiés par exsanguination sous anesthésie générale pour analyses *ex vivo*. Les fémurs et les tibias étaient nettoyés des tissus mous et conservés à -80°C ou dans le formol pour analyses ultérieures

2.1.2.1.6. Analyses *in vivo* de la microarchitecture et de la densité minérale osseuse (étude 2)

Ces mesures étaient obtenues par micro-tomographie (μ CT) à rayons X *in vivo*. La μ CT X est une technique de radiographie tridimensionnelle, à très petite échelle, avec une grande résolution, permettant d'analyser les structures internes de façon très précise, sans dommage pour ces structures.

Cette procédure était effectuée sous anesthésie générale, induite et maintenue comme décrit dans le paragraphe 2.1.2.1.5.1.). Les rats étaient maintenus dans le banc en décubitus latéral, le membre pelvien droit en extension, avec du ruban adhésif. Une caméra à l'intérieur de l'appareil permettait de surveiller la profondeur de l'anesthésie. Les images du fémur et du tibia droits étaient obtenues durant la même acquisition à l'aide d'un appareil μ CT haute résolution (Skyscan® 1176, Bruker Biospin, Belgique) (Figure 29), une fois par semaine, pendant 4 semaines consécutives (temps T9, T10, T11 et T12). Cette fréquence d'acquisition était basée sur le fait qu'un défaut cortical de 2 x 6 mm dans le fémur guérit chez le rat en environ 40 jours (Hulsart-Billström *et al.* 2015).

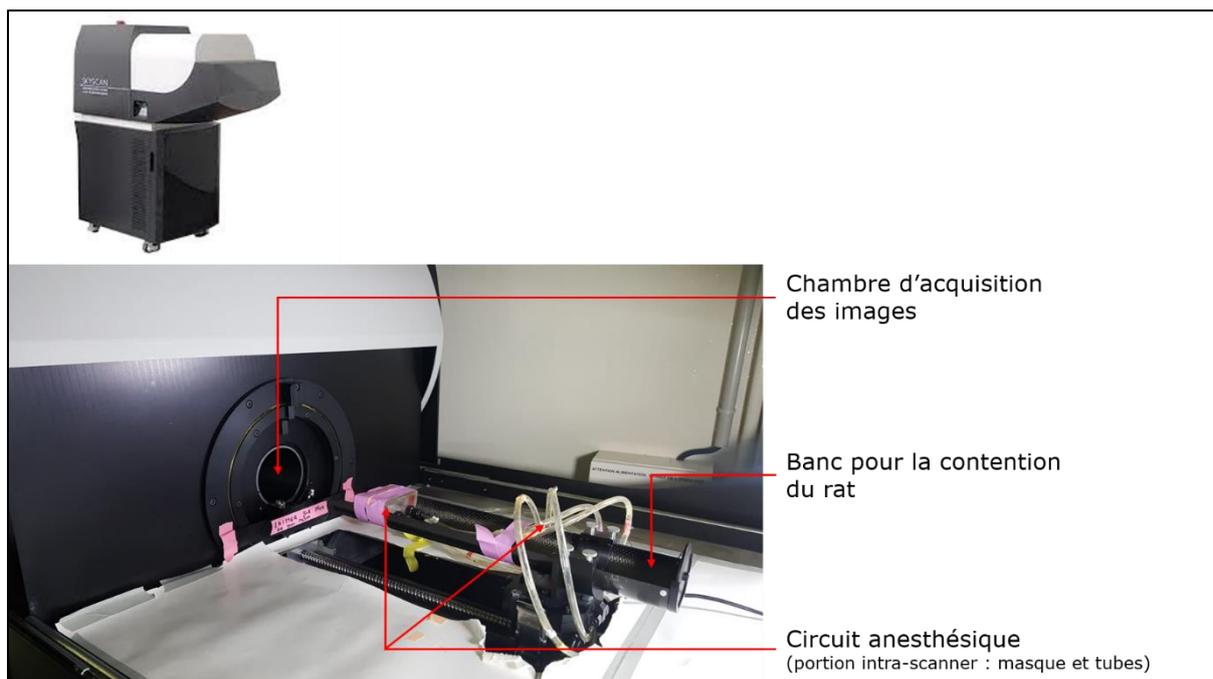


Figure 29 : Appareil microscanner *in vivo* à haute résolution (Skyscan® 1176)

2.1.2.1.6.1. Paramètres de l'acquisition

La tension et l'intensité de la source de rayons étaient réglées à 50 kV et 475 μ A, respectivement. Le temps d'exposition et le pas de rotation étaient fixés à 40 ms et 0,7° respectivement. Afin d'imager les os dans leur totalité, la rotation se faire sur 180°. Un filtre aluminium de 0,5 mm était également utilisé. La résolution choisie était de 35,6 μ m.

2.1.2.1.6.2. Reconstruction tridimensionnelle

Les images acquises étaient reconstruites, en séparant fémur et tibia, en utilisant le logiciel N-Recon (Skyscan®, Bruker, Biospin Belgique). Une segmentation binaire était appliquée afin de minimiser les biais entraînés par le traitement de l'image.

2.1.2.1.6.3. Volume d'intérêt

Afin d'analyser la formation osseuse dans les défauts du fémur et du tibia, toutes les reconstructions étaient réorientées avec le logiciel DataViewer (Skyscan®, Bruker Biospin, Belgique) afin que les défauts apparaissent comme un disque sur chacune des coupes consécutives. Les images étaient converties en images 8 bits et un cylindre d'intérêt de 2,3 mm de diamètre (de façon à ce que le cylindre soit de taille proche des marges du défaut osseux, mais sans les inclure) était défini, intéressant 75 % de la longueur du défaut, centré dans le défaut (ainsi 12,5 % de la longueur du défaut, à chaque extrémité du défaut osseux, n'était pas

inclus dans le volume d'intérêt (Figure 30)). Cette méthode n'a pour le moment été appliquée qu'aux groupes SED et CC.

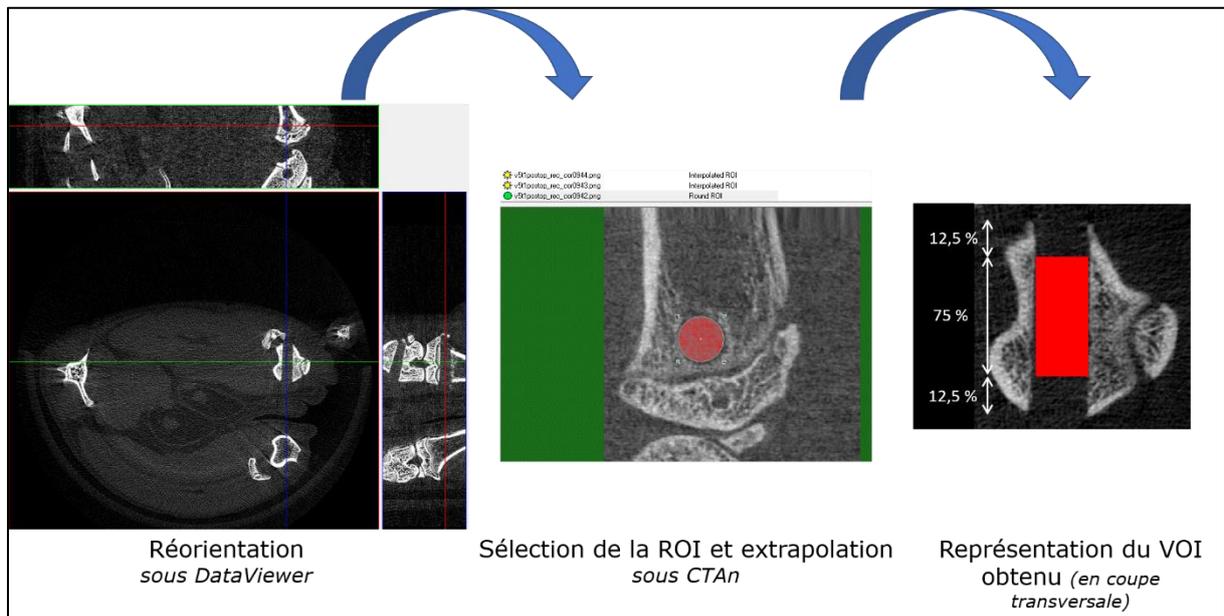


Figure 30 : Etapes de la sélection du volume d'intérêt pour analyse microarchitecturale

2.1.2.1.6.4. Calibration et densité minérale osseuse

La densité minérale osseuse était extraite du cylindre d'intérêt après calibration sur le logiciel CTAn (Skyscan®, Bruker Biospin, Belgique) de la mesure en utilisant des étalons d'hydroxyapatite (0,25 mgHA/cm³ et 0,75 mgHA/cm³) (Bouxsein *et al.* 2010).

2.1.2.1.6.5. Seuillage et paramètres évalués

Le seuillage permettait de séparer les niveaux de gris du tissu de réparation osseuse dans les défauts, des niveaux de gris correspondant au bruit de fond et à la moelle. Pour déterminer ce seuillage, un histogramme de gris était établi et adapté pour chaque échantillon par l'utilisateur. Suite à ces seuillages, les niveaux de gris choisis pour le tissu de réparation étaient compris entre 40 et 160.

La fraction du volume osseux (BV/TV, %), le rapport surface osseuse/volume osseux (BS/BV, %), le «structure model index» et le «trabecular pattern factor» (Tb.Pf, 1/mm) étaient alors extraits à chaque temps de suivi (de T9 à T12).

2.1.2.1.7. Analyses ex vivo

Les analyses planifiées sur les os pour l'étude 1 sont résumées dans la Figure 31.

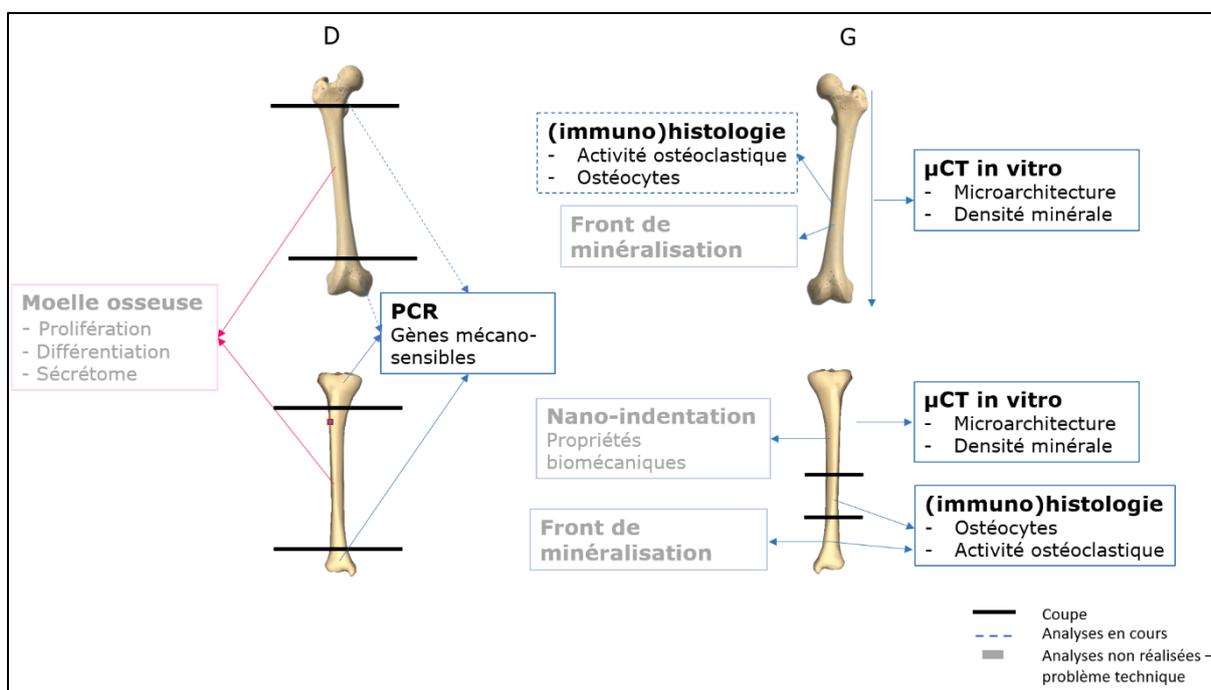


Figure 31 : Analyses planifiées sur les os dans la phase 1 de l'étude

2.1.2.1.7.1. Macroarchitecture

Immédiatement après le sacrifice et le nettoyage des tissus mous, différentes données morphométriques des fémurs et tibias gauches et droits étaient mesurées (étude 1 et étude 2), comme la longueur des os, ainsi que leur diamètre craniocaudal et leur diamètre latéromédial à la diaphyse, à l'aide d'un pied à coulisse mécanique.

2.1.2.1.7.2. Dosages sanguins

Le sang obtenu lors de l'exsanguination (étude 1 et étude 2) était collecté sur tube hépariné. Une mesure de la glycémie était immédiatement réalisée avec un glucomètre et ses bandelettes (Accu-check®, Roche Diagnostics, Meylan, France), et l'hématocrite mesuré avec un tube à micro-hématocrite centrifugé à 1 500 g pendant 10 min et un abaque (VIN Micro-Hematocrit Capillary Tube Reader n.d.). Ensuite le sang était centrifugé à 700 g à 4°C pendant 10 min et le plasma congelé à -80°C jusqu'à analyse.

Des marqueurs du métabolisme osseux étaient mesurés dans le plasma. La phosphatase alcaline (PAL), marqueur de la formation osseuse, était analysée au Biopôle, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, à l'aide d'un kit de cinétique enzymatique (ALP (DEA) SL, Elitech) et

d'un analyseur de laboratoire standard (Selectra xl, RELitech), en duplicata au cours d'une même procédure, selon les instructions du fabricant. La limite de détection était équivalente à 6 UI/L.

Le NTx (télopeptide N-terminal du collagène de type I), un marqueur de résorption osseuse, et la parathormone (PTH), une hormone-clé de la régulation du métabolisme phospho-calcique, étaient dosés en duplicat au laboratoire B3OA par des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) validés chez le Rat (Antibodies-online GmbH, Germany (Zhang *et al.* 2009), et Immunotopics, Inc., CA, USA (Schultz *et al.* 1995), respectivement), en suivant les recommandations établies par les fabricants.

La limite de détection du test était de 2,47 ng/mL et les coefficients intra- et inter-individuels inférieurs à 12 % pour le NTx. La limite de détection du test était de 3pg/mL et les coefficients intra- et inter-individuels inférieurs à 8,9 % pour la PTH.

2.1.2.1.7.3. Analyses ex vivo de la microarchitecture osseuse et de la densité minérale osseuse (étude 1)

Ces analyses concernaient les rats sacrifiés à la fin de la période d'entraînement (étude 1). Des images radiographiques de la métaphyse distale et diaphyse du fémur et de la métaphyse proximale et diaphyse du tibia étaient acquises avec un appareil μ CT haute résolution (Skyscan® 1172, Bruker Biospin, Belgique) (Figure 32).

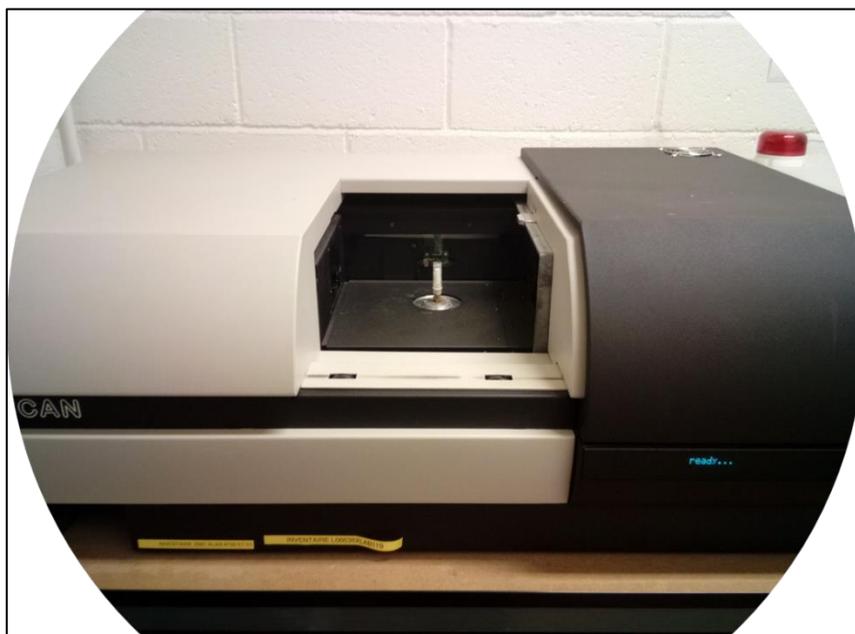


Figure 32 : Appareil microscanner *in vitro* à haute résolution (Skyscan® 1172)

- Zone d'étude et positionnement : pour les acquisitions, l'os était fixé entre deux fines plaques de polystyrène dans le corps d'une seringue de 5 mL afin de garantir sa stabilité. La région d'acquisition était positionnée proche du porte-échantillon.
- Paramètres d'acquisition :
 - Pour l'analyse de la microarchitecture trabéculaire et de la DMO trabéculaire et corticale, la tension et l'intensité de la source de rayons étaient réglées à 80 kV et 100 μ A, respectivement. Le temps d'exposition et le pas de rotation étaient fixés à 175 ms et 0,3° respectivement. Un filtre aluminium de 0,5 mm était également utilisé. La résolution choisie était de 9,81 μ m.
 - Pour l'analyse des paramètres de porosité corticale, les paramètres utilisés étaient identiques à ceux cités précédemment, à l'exception du temps d'exposition de 345 ms et la résolution de 5,00 μ m.
- Reconstruction tridimensionnelle : les images acquises étaient reconstruites en utilisant le logiciel N-Recon (Skyscan®, Bruker Biospin, Belgique). Une segmentation binaire automatique était appliquée en raison du faible bruit et de la bonne résolution des données, afin de minimiser les biais entraînés par le traitement de l'image.
- Régions d'intérêt :
 - Pour la microarchitecture trabéculaire et les DMO trabéculaire et corticale, 200 coupes étaient sélectionnées sur les images acquises à la résolution de 9,81 μ m, immédiatement proximales à la plaque de croissance distale pour le fémur et immédiatement distales à la plaque de croissance proximale pour le tibia. Une région d'intérêt (ROI) purement trabéculaire (sélectionnée en plaçant visuellement à l'écran un polygone à la limite de la zone corticale, toutes les 20 coupes en utilisant le logiciel CTAn (Skyscan®, Bruker Biospin, Belgique) pour les paramètres trabéculaires. Pour la DMO corticale, ces mêmes 200 coupes étaient utilisées mais la ROI tracée était purement corticale, en suivant les limites interne et externe du cortex (Figure 33). Le logiciel interpolait les polygones entre ceux positionnés par le chercheur, l'ensemble de ces ROI constituait le volume d'intérêt (VOI).
 - Pour les paramètres de porosité corticale, le volume d'intérêt était déterminé comme décrit précédemment pour la DMO corticale sur 100 coupes des images acquises à la résolution de 5 μ m, en commençant à 12 mm de la plaque de croissance.

- Calibration et DMO : la DMO trabéculaire (DMO_t) et la DMO corticale (DMO_c) étaient extraites du volume d'intérêt après calibration sur le logiciel CTAn de la mesure en utilisant des étalons d'hydroxyapatite ($0,25 \text{ mgHA/cm}^3$ et $0,75 \text{ mgHA/cm}^3$) (Bouxsein *et al.* 2010).
- Seuillage : pour l'étude des paramètres microarchitecturaux, des histogrammes de niveaux de gris étaient établis pour l'os trabéculaire et l'os cortical avec le logiciel CTAn.
 - Pour l'os trabéculaire, les niveaux de gris retenus étaient compris entre 50 et 255, tout niveau inférieur à 50 étant considéré comme du vide.
 - Pour l'os cortical, les niveaux de gris retenus étaient compris entre 0 et 111 une fois l'inversion réalisée pour obtenir les paramètres de porosité.

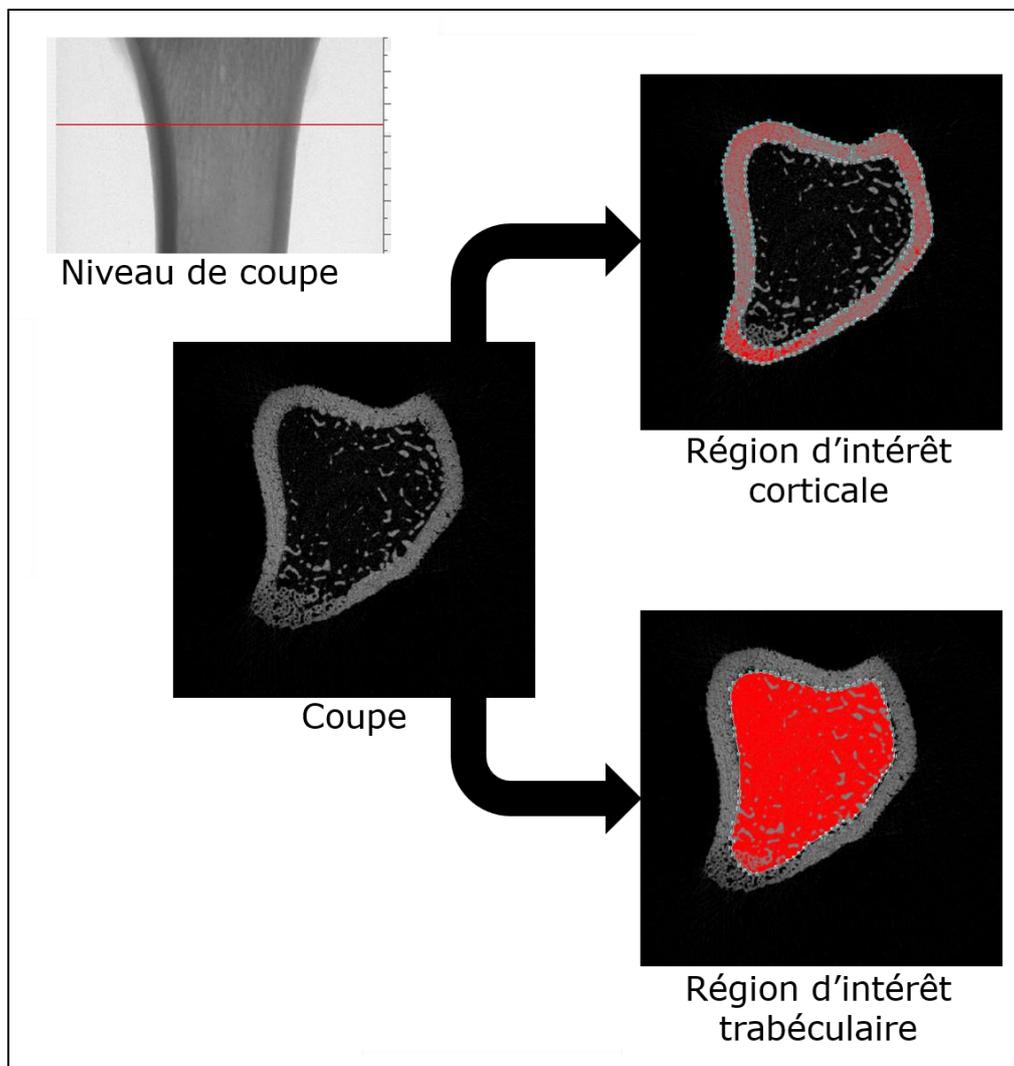


Figure 33 : Détermination des régions d'intérêt pour analyse des microarchitectures corticale et trabéculaire (exemple du tibia)

- Paramètres étudiés
 - Pour les paramètres trabéculaires, la fraction du volume trabéculaires (BV/TV) et le nombre de trabécules (Tb.N) étaient calculés la méthode du « mean intercept length » (MIL), et l'espacement entre les trabécules (Tb.Sp) et l'épaisseur des trabécule (Tb.Th) étaient calculés par la méthode de la sphère (Hildebrand and Rüegsegger 1997), avec le logiciel CTAn.
 - Pour les paramètres corticaux, la porosité corticale (Ct.Po; équivalent du BV/TV après inversion du seuillage), le nombre de pores (Po.N; équivalent du Tb.N), l'espacement entre les pores (Po.S; équivalent du Tb.Sp) et la densité de surface des pores (Po.S/Po.V; équivalent BS/TV) étaient calculés avec le logiciel CTAn. A la résolution de 5 µm, les pores correspondent aux canaux de Havers et de Volkmann.

2.1.2.1.7.4. *Analyses histologiques par microscopie (étude 1)*

Les analyses ont été réalisées en histologie non décalcifiée et en histologie décalcifiée.

- Préparation des échantillons pour l'histologie :

Après fixation dans le formol pendant au moins 4 jours, la moitié distale des tibias gauches étaient coupés en deux avec un outil rotatoire multifonction (Dremel 4300, Dremel, USA) avec une lame diamant.

 - Protocole d'histologie non décalcifiée : la portion diaphysaire était déshydratée dans une série de bains d'éthanol de concentrations croissantes, et incluse dans de la résine de polyméthylmétacrylate (PMMA). Des coupes transversales de la diaphyse, d'une épaisseur de 200 µm, étaient ensuite réalisées avec une scie à diamant. Les coupes obtenues étaient ensuite montées sur lame et polies à une épaisseur de 100 µm avec une solution de polissage contenant de l'alumine. Les lames étaient ensuite colorées au bleu de Stevenel (VWR Chemical, PanReac Appllichem ; colore le cytoplasme et les noyaux des ostéocytes en bleu) et à la picrofuchsine de Van Gieson (VWR Chemicals, RAL Diagnostics ; colore la matrice collagénique en rouge) (Likibi *et al.* 2005) (Figure 34).

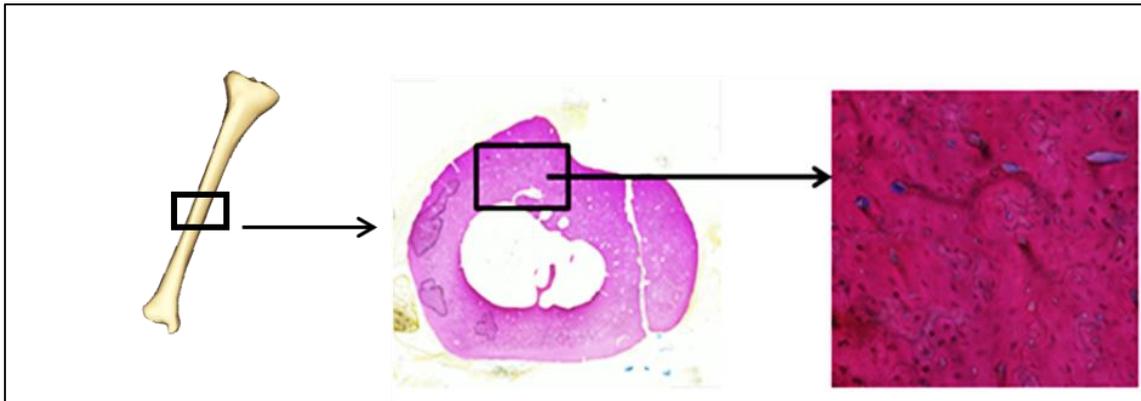


Figure 34 : Coloration au bleu de Stevenel et picrofuchsine de Von Gieson pour comptage des lacunes ostéocytaires

- Protocole d’histologie décalcifiée : la portion incluant métaphyse et épiphyse distales des tibias était décalcifiée dans l’EDTA 177 g/L, pH 7,0-7,3 (Osteosoft, Meck KGaA) pendant 4 semaines puis incluse dans la paraffine. Des coupes transversales de la métaphyse, d’une épaisseur de 4-5 μm , étaient obtenues à l’aide d’un microtome. Ces coupes fines permettent une analyse en microscopie optique et des traitements tels que l’immunomarquage.
- Acquisition des images au microscope et paramètres évalués (protocole non décalcifié) :
 - Les paramètres histomorphométriques (surface corticale et épaisseur corticale) étaient évalués sur des images de trois mêmes coupes transversales consécutives dans la diaphyse pour chaque rat, obtenues à l’aide d’un microscope numérique (Keyence, VHX-200) à un grossissement x 10. L’épaisseur corticale était mesurée avec le logiciel Image J (selon 8 axes (Figure 35) et la moyenne des valeurs obtenues sur les 3 coupes pour chacun des axes était enregistrée. La surface corticale était évaluée par mesure automatique avec le logiciel Image J (National Institute of Health, 1987) et la moyenne des surfaces pour les 3 coupes enregistrée. Les images faisaient toutes exactement la même taille.

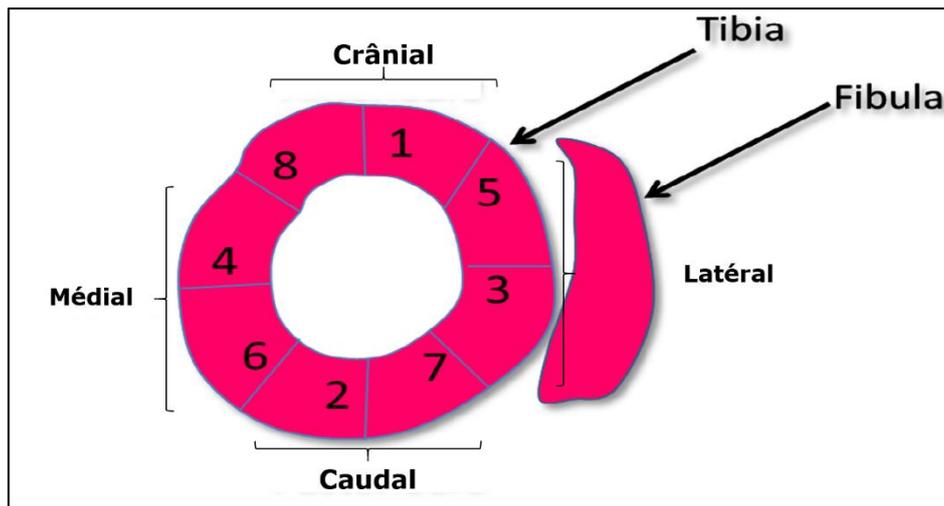


Figure 35 : Mesure de l'épaisseur corticale dans la diaphyse tibiale selon 8 axes

- Les paramètres de densité des lacunes ostéocytaires et de leur taux d'occupation étaient analysés sur des images des mêmes coupes utilisées précédemment, mais obtenues à l'aide d'un microscope numérique différent (Nikon, digital camera DXM 1200-F) au grossissement x 40. Pour chaque coupe, une image était prise aléatoirement dans chacune des 4 zones anatomiques suivantes : crâniale, caudale, latérale et médiale (soit 12 images par rats). Le nombre de lacunes pleines ainsi que le nombre de lacunes vides comptés avec le logiciel Image J afin de déterminer la densité lacunaire (en $1/\text{mm}^2$) et le taux d'occupation lacunaire (= nombre de lacunes avec un ostéocyte / (nombre de lacunes avec un ostéocyte + nombre de lacune sans ostéocyte) x 100, en %). Les résultats obtenus pour chaque zone anatomique étaient additionnés et la moyenne des 3 coupes enregistrée pour chaque rat. Toutes les images faisaient la même taille (soit $0,033 \text{ mm}^2$ chacune), ce qui permettait d'obtenir une aire de comptage identique pour chaque groupe expérimental.
- Acquisition des images au microscope et paramètres évalués (protocole décalcifié) :
 - Les paramètres de résorption osseuse étaient évalués par marquage tartrate-résistant acid phosphatase (TRAP ; Acide phosphatase kit, Sigman-Aldrich). Les phosphatases acides résistantes au tartrate ont une activité abondante dans les ostéoclastes et sont donc considérées comme un marqueur de résorption osseuse (Borferie *et al.* 1997). Après déparaffinage dans des bains successifs de xylène et d'alcool, la détection des phosphatases acides était réalisée avec une concentration définie en acide tartrique et en substrat (naphtol AS-TR). Une contre-coloration était ensuite réalisée avec de

l'hématoxyline. Lorsque ce marquage est positif, une coloration rouge indique une activité de résorption osseuse ostéoclastique. Des images étaient ensuite obtenues de façon aléatoire, dans 4 coupes transversales métaphysaires, une image pour chacune des 3 zones anatomiques (zone corticale, zone trabéculaire et zone intermédiaire corticomédullaire), après visualisation au microscope Keyence au grossissement x 500. La quantification du marquage TRAP se faisait par évaluation de la surface de résorption ostéoclastique (Kodama *et al.* 1993, Ballanti *et al.* 1997), par extraction manuelle d'un polygone délimitant la zone d'intérêt, avec le logiciel VHX. Les surfaces globales et par zone anatomique étaient enregistrées. Ces analyses ont été réalisées sur 7 rats par groupe, choisis de façon aléatoire. La surface totale d'intérêt représentait 0,33 mm² par groupe.

- Les paramètres d'apoptose ostéocytaire étaient évalués par marquage immunohistochimique de la caspase 3 clivée. Après déparaffinage, les coupes étaient incubées avec un anticorps primaire contre la caspase 3 clivée pendant la nuit à 4°C puis 3 gouttes d'un anticorps secondaire (péroxydase de raifort) étaient déposées directement sur la coupe puis rincées dans du TBST (tampon Tris et phosphate salin). De la diaminobenzidine (DAB) était ensuite ajoutée comme révélateur puis une contre-coloration à l'hématoxyline effectuée. Des images étaient ensuite obtenues de façon aléatoire au microscope Keyence au grossissement x 700, 4 pour chacune des localisations (crâniale, caudale, latérale et médiale) sur une seule lame par rat choisie de façon aléatoire. Le nombre d'ostéocytes apoptotiques (lacunes apparaissant avec une coloration brune) était compté dans une zone de 100 x 100 µm², pour chacune des régions suivantes : cortex externe, cortex central et cortex interne, et pour chacune des localisations (crâniale, caudale, latérale et médiale) (Figure 36). La surface de comptage totale était de 3,36 mm² par groupe.

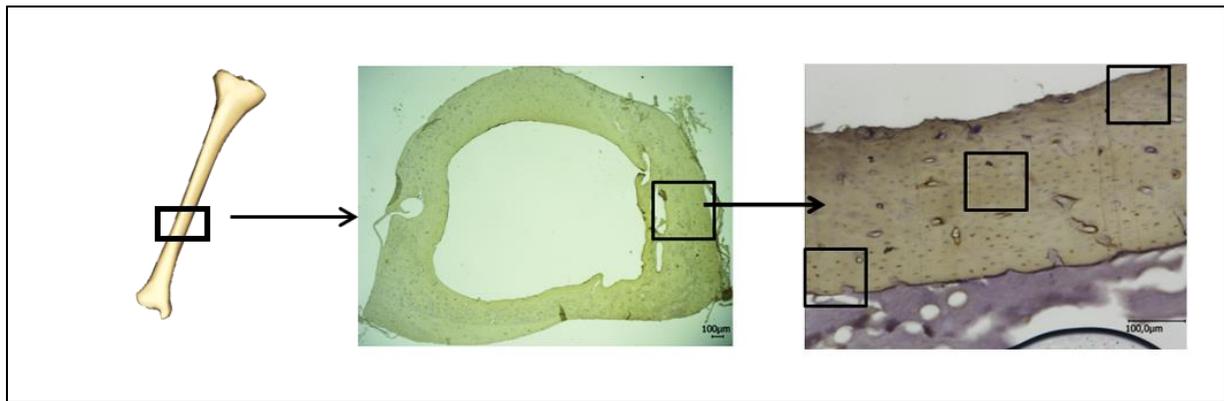


Figure 36 : Marquage de la caspase 3 clivée pour comptage dans 3 zones du cortex

2.1.2.1.7.5. Analyses de l'expression génique par RT-PCR

L'expression de gènes mécano-sensibles était ciblée.

- Préparation des échantillons : les épiphyses proximale et distale des tibias droits, conservées à -80°C , étaient plongées dans l'azote liquide puis pulvérisées en poudre à l'aide de billes de métal dans un broyeur tissulaire à billes (Vibro-broyeur MM301, Retsch). L'ARN était ensuite extrait par ajout de TRIzol® (Invitrogen) et de chloroforme. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C , la phase supérieure était récoltée puis précipitée avec de l'isopropanol à température ambiante. Après une nouvelle centrifugation, la précipitation d'ARN était vérifiée, le surnageant éliminé et le culot resuspendu dans de l'éthanol à 75° . Une centrifugation à 7 500 g pendant 5 min à 4°C était ensuite effectuée, le culot séché et resuspendu dans de l'eau dépourvue d'ARNase. L'ARN était ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation. La quantité et la pureté de l'ARN étaient évaluées par absorbance avec un spectrophotomètre (NanoDrop® 1000, Labtech France) à 260 and 280 nm. Tous les échantillons avaient un ratio $>1,7$ and étaient conservés pour les étapes ultérieures.
- Synthèse de l'ADN complémentaire : la rétrotranscription des ARN en ADNc était réalisée en utilisant le kit SuperScript® II Reverse transcriptase (Invitrogen). L'analyse quantitative de l'expression génique était ensuite réalisée par RT-PCR en utilisant les sondes Taqman® (Applied Biosystem) spécifiques du rat (dont Acp5, Alp, Runx2, Sost, Sp7, Sparc, Spp1, avec l'ARNr 18S humain) et le thermocycle iCycler® couplé au logiciel MyiQ® Single-Color (Bio-Rad). Le nombre absolu de copies géniques obtenu était standardisé en utilisant l'ARNr 18 S comme référence et l'expression relative des

gènes était calculée la méthode comparative des cycles-seuil comme indiqué par le fabricant.

2.1.3. Statistiques

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView ou Matlab. Les statistiques descriptives (données corporelles, données de consommation, VMA, macroarchitecture, microarchitecture, propriétés tissulaires et paramètres sanguines) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. La normalité de la distribution des valeurs pour chaque paramètre et pour chaque groupe a été testée avec le test de Shapiro-Wilk.

Dans l'étude 1 (comparaison des groupes SED, CC et CI), quand les conditions de normalité n'étaient pas réunies, des tests non paramétriques (test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Mann-Witney lorsque des différences significatives existaient) étaient choisis. Lorsque des comparaisons étaient réalisées au sein d'un même groupe, un test de Friedman suivi d'un test des rangs signés de Wilcoxon en cas de différences significatives, étaient utilisés. La significativité était acceptée pour des valeurs de p strictement inférieures à 0,05.

Dans l'étude 2, les différences entre les groupes SED et CC (pour les données corporelles, VMA, paramètres sanguins et DMO) étaient évaluées avec le test de Mann-Whitney. L'évolution dans le temps des paramètres BV/TV, BS/BV, SMI et Tb.Pf était dans un premier temps étudiée à l'aide de diagrammes à moustaches, puis une ANOVA à 4 voies était réalisée pour chaque paramètre d'intérêt pour évaluer les éventuelles différences entre « groupes », « os » (tibia vs. fémur) et temps (effets fixes) et « animal » (effet aléatoire). La fonction *ANOVAN* de Matlab était utilisée pour cette analyse. En raison des multiples comparaisons, une correction de Tukey-Kramer était appliquée.

2.2. Chapitre 2 : Résultats et discussion des études

Les résultats sont présentés en deux parties, correspondant aux deux phases de l'étude : effets de deux protocoles de course sur la qualité osseuse (étude 1) et effets de deux protocoles de course sur la guérison osseuse (étude 2).

2.2.1. Effets comparatifs de deux protocoles de course sur la qualité osseuse (Etude 1)

2.2.1.1. Résultats

2.2.1.1.1. Paramètres corporels et consommation de nourriture

Durant l'étude, les rats ont grandi et pris du poids adéquatement. Les IMC sont restés similaires entre les 3 groupes, tout au long de l'étude (Tableau 5).

Tableau 5 : Paramètres corporels des rats à l'entraînement (étude 1)

Paramètres	Temps	SED	CC	CI
Poids (g)	T0	199 ± 8	189 ± 9 *	197 ± 8
	T8	492 ± 36	486 ± 33	475 ± 32
Longueur (cm)	T0	19,8 ± 0,5	19,7 ± 0,4	19,9 ± 0,5
	T8	26,7 ± 1,1	26,4 ± 0,6	26,4 ± 0,7
IMC (g/cm ²)	T0	0,51 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,02
	T8	0,69 ± 0,01	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,02

* $p < 0,05$ vs. SED

Les consommations d'eau et d'aliment d'entretien étaient également similaires entre les 3 groupes (Tableau 6).

Tableau 6 : Consommation d'aliment et d'eau pendant la période d'entraînement (étude 1)

	SED	CC	CI
Aliment (g)	30 ± 8	25 ± 5	27 ± 3
Eau (mL)	42 ± 11	34 ± 7	38 ± 6

2.2.1.1.2. Test de vitesse maximale aérobie

En début d'entraînement (T1, Figure 27), aucune différence statistique de VMA n'était observée entre les trois groupes. A T8 en revanche, les VMA des groupes de course (CI, $p=0,004$ et CC, $p= 0,006$) étaient supérieures à celle du groupe SED. Aucune différence de VMA n'était observée entre les groupes CC et CI (Tableau 7). Bien que la VMA ait diminué dans le groupe SED, les VMA n'étaient pas différentes, dans aucun des groupes, entre T1 et T8.

Tableau 7 : Vitesse maximale aérobie en début (T1) et fin (T8) d'entraînement (étude 1)

		SED	CC	CI
VMA (m/min)	Temps			
	T1	28 ± 8	33 ± 7	32 ± 5
	T8	23 ± 6	35 ± 5 *	31 ± 11 *

* $p < 0,05$ vs. SED

2.2.1.1.3. Géométrie osseuse

2.2.1.1.3.1. Macroarchitecture osseuse

Les mesures des échantillons osseux sont résumées dans le Tableau 8. Aucune différence statistique n'était observée entre les groupes, pour aucun des paramètres mesurés.

Tableau 8 : Paramètres de macroarchitecture des fémurs et des tibias (étude 1)

Os	Mesure	SED	CC	CI
FG	L (mm)	37,9 ± 1,2	38,2 ± 1,4	38,6 ± 0,9
	CrCd (mm)	3,2 ± 0,7	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,5
	LM (mm)	3,9 ± 0,7	4,1 ± 0,9	4,0 ± 0,6
FD	L (mm)	38,2 ± 1,0	39,0 ± 1,7	38,5 ± 1,4
	CrCd (mm)	3,5 ± 0,7	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,7
	LM (mm)	4,2 ± 0,6	4,4 ± 0,5	4,2 ± 0,5
TG	L (mm)	43,2 ± 0,7	43,3 ± 1,2	43,2 ± 1,1
	CrCd (mm)	3,8 ± 0,7	4,1 ± 1,0	4,0 ± 0,5
	LM (mm)	2,8 ± 0,6	2,8 ± 0,7	2,7 ± 0,6
TD	L (mm)	43,2 ± 1,3	43,4 ± 1,0	43,7 ± 1,1
	CrCd (mm)	3,8 ± 0,6	3,9 ± 0,8	3,7 ± 0,7
	LM (mm)	2,6 ± 0,5	2,9 ± 0,8	2,5 ± 0,6

FG : fémur gauche, FD : fémur droit, TG : tibia gauche, TD : tibia droit

L : longueur, CrCd : diamètre crânio-caudal en diaphyse, LM : diamètre latéromédial en diaphyse

2.2.1.1.3.2. Macroarchitecture corticale

Pour la surface corticale tibiale, aucune différence statistique n'était observée entre les groupes.

Pour l'épaisseur corticale tibiale, elle était diminuée en face crâniale dans le groupe CC par rapport à celles des groupes SED (p=0,01) et CI (p=0,01), elle était également diminuée en face postérieure (p=0,009) par rapport à celle dans le groupe CI uniquement (Figure 37).

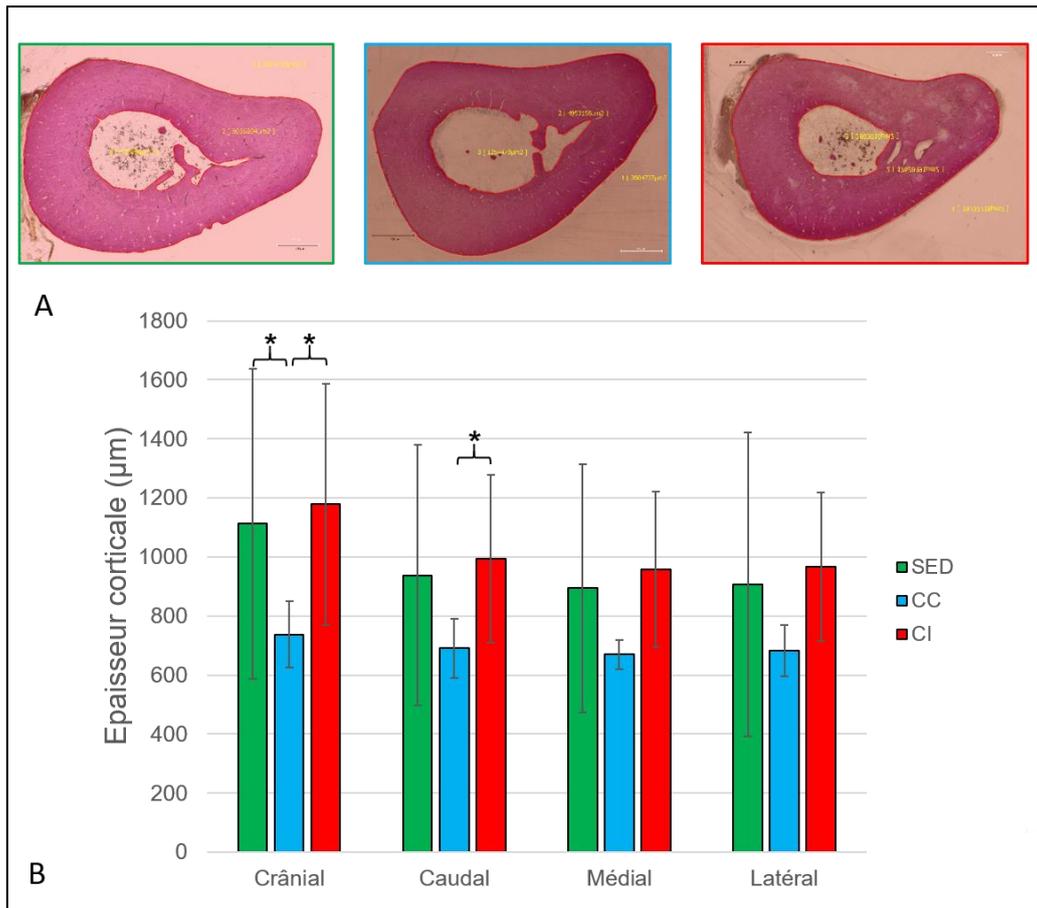


Figure 37 : Epaisseur corticale tibiale (zone diaphysaire) en fonction de la localisation anatomique

A) Images représentatives d'une coupe transversale corticale pour chaque groupe.

B) Epaisseur corticale moyenne pour chaque localisation anatomique

* $p < 0,05$

2.2.1.1.4. Microarchitecture osseuse

2.2.1.1.4.1. Microarchitecture trabéculaire fémorale et tibiale

Les résultats de la microarchitecture trabéculaire sont résumés dans le Tableau 9.

Dans le fémur distal, l'espace entre les trabécules était plus élevé dans le groupe CI que dans le groupe CC ($p=0,0004$) ou le groupe SED ($p=0,02$), indiquant un effet négatif de la course intermittente sur les trabécules.

Dans le tibia proximal, BV/TV, Tb.N et Tb.Th étaient plus élevés et Tb.Sp plus réduit dans le groupe CC que dans le groupe SED ($p=0,03$, $p=0,02$, $p=0,04$ et $p=0,04$ pour BV/TV,

Tb.N, Tb.Th et Tb.Sp respectivement), indiquant un effet positif de la course continue sur les trabécules. Aucune différence statistique n'était observée entre les groupes SED et CI ou CC et CI.

Tableau 9 : Microarchitecture trabéculaire du fémur distal et du tibia proximal

Os	Paramètres	SED	CC	CI
Fémur distal	BV/TV (%)	39,42 ± 6,81	39,89 ± 6,98	35,93 ± 5,11
	Tb.N (1/mm)	4,12 ± 0,55	4,28 ± 0,63	4,04 ± 0,57
	Tb.Th (mm)	0,40 ± 0,95	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01
	Tb.Sp (mm)	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,02 *, §
Tibia proximal	BV/TV (%)	23,59 ± 8,06	29,03 ± 5,03 *	25,81 ± 5,22
	Tb.N (1/mm)	2,92 ± 0,96	3,74 ± 0,45 *	3,28 ± 0,68
	Tb.Th (mm)	0,0806 ± 0,005	0,0774 ± 0,005	0,0790 ± 0,004
	Tb.Sp (mm)	0,21 ± 0,07	0,14 ± 0,03 *	0,19 ± 0,05

* $p < 0,05$ vs. SED ; § $p < 0,05$ vs. CC

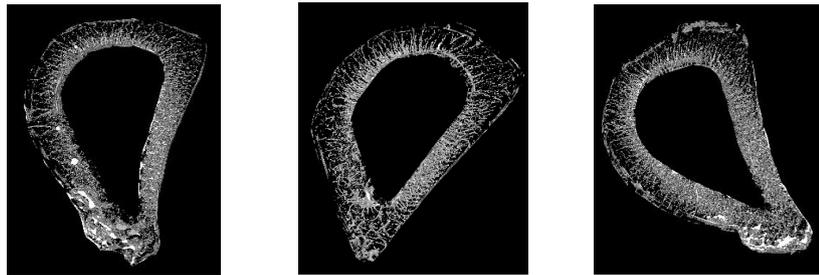
En raison de l'effet minime de l'exercice observé sur la microarchitecture trabéculaire fémorale, nous avons fait le choix de limiter les analyses ultérieures (porosité corticale, DMO, histologie et PCR au tibia).

2.2.1.1.4.2. Microarchitecture corticale tibiale

Les paramètres de porosité corticale tibiale sont résumés dans le Tableau 10.

La porosité corticale tibiale dans les groupes CC et CI était augmentée par rapport à celle du groupe SED ($p=0,02$ et $p=0,01$ pour CC et CI, respectivement).

Tableau 10 : Microarchitecture corticale du tibia proximal



	SED	CC	CI
Ct.Po (%)	43,28 ± 2,13	45,32 ± 2,21 *	45,50 ± 1,65 *
Po.Dm (mm)	0,022 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,021 ± 0,001
Po.Sp (mm)	0,023 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,001
Po.N (1/m)	20,15 ± 1,76	21,35 ± 2,12	21,86 ± 2,17

* $p < 0,05$ vs. SED

2.2.1.1.5. Propriétés tissulaires

2.2.1.1.5.1. Densités minérales osseuses tibiales trabéculaire et corticale

Aucune différence dans la DMO trabéculaire en fin d'entraînement n'était observée parmi les groupes. En revanche, les DMO corticales dans les groupes de course (CC, $p < 0,01$; CI $p < 0,001$) étaient inférieures à celle observée dans le groupe SED. Aucune différence n'était observée entre les groupes de course (Tableau 11).

Tableau 11 : Densité minérale osseuse trabéculaire et corticale dans le tibia en fin d'entraînement (T8)

	SED	CC	CI
DMO_t (g HA/cm³)	0,11 ± 0,09	0,16 ± 0,05	0,12 ± 0,06
DMO_c (g HA/cm³)	113 ± 4	109 ± 4 *	106 ± 4 *

* $p < 0,01$ vs. SED ; DMO_t : densité minérale osseuse trabéculaire, DMO_c : densité minérale osseuse corticale HA : hydroxyapatite

2.2.1.1.5.2. Occupation des lacunes ostéocytaires

Aucune différence dans la densité lacunaire (nombre total de lacunes par unité de surface) n'était observée entre les groupes. En revanche, le taux d'occupation lacunaire dans le groupe CC était bien inférieur (< 50 %) à celui des groupes SED ($p < 0,05$) et CI ($p < 0,05$). De plus le taux d'occupation dans le groupe CI était supérieur à celui dans le groupe SED ($p < 0,05$) (Figure 38).

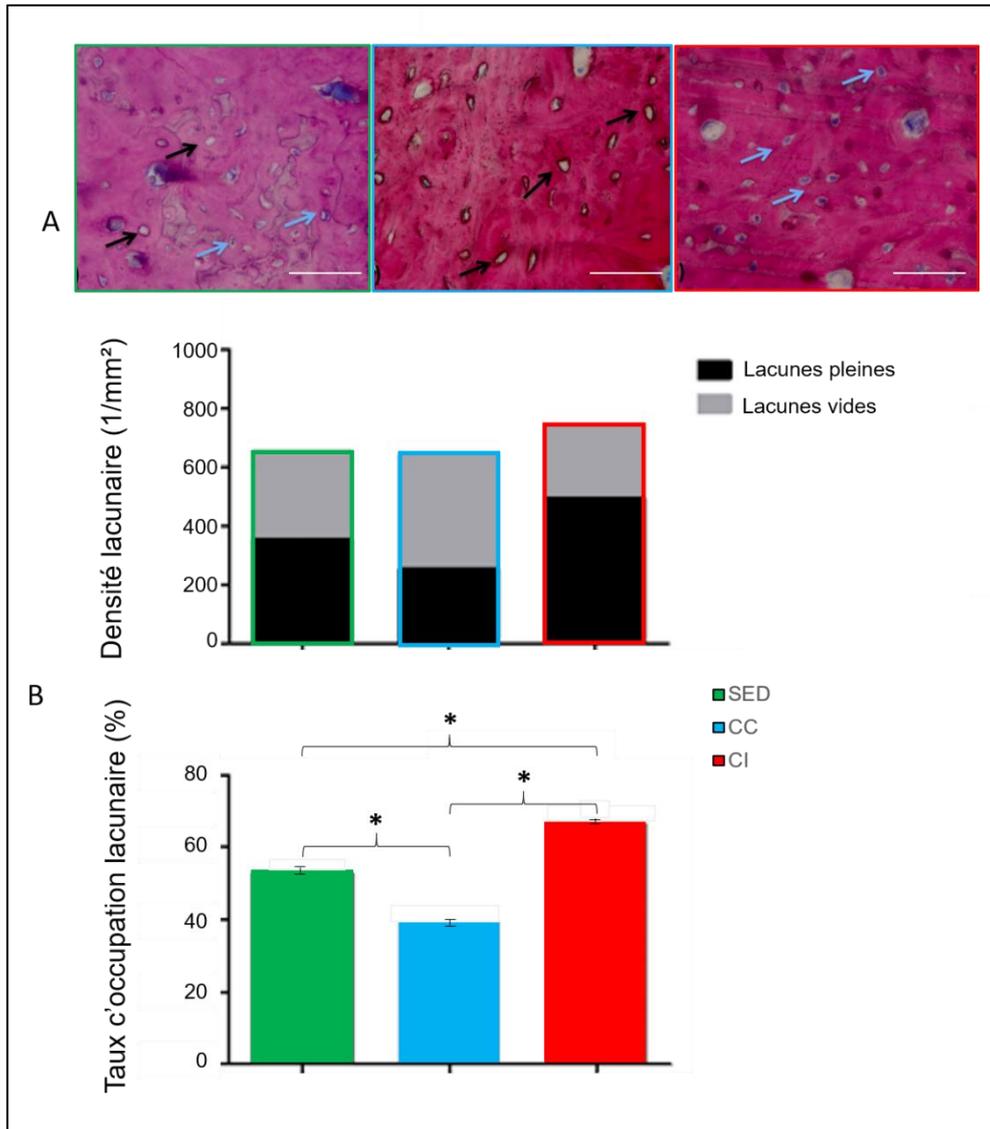


Figure 38 : Occupation des lacunes ostéocytaires

Panel A : Os cortical en coloration bleu de Stevenel et picrofuchsine dans les groupes SED, CC et CI ; flèche noire : lacune vide, flèche bleue : lacune avec ostéocyte ; La barre d'échelle représente 50 µm

Panel B : densité lacunaire et taux d'occupation lacunaire ; * $p < 0,05$

2.2.1.1.5.3. Apoptose ostéocytaire

Les résultats de l'analyse de l'apoptose ostéocytaire sont résumés dans la Figure 39.

De manière générale dans l'os cortical tibial, le taux d'apoptose ($3,3 \pm 3,0 \%$) dans le groupe CI était très inférieur à celui observé dans le groupe SED ($18,8 \pm 8,4 \%$, $p < 0,001$) et le groupe CC ($24,4 \pm 12,6 \%$, $p < 0,01$). Au sein du groupe CI, aucune différence n'était observée entre les différentes régions de l'os cortical. En revanche au sein des groupes SED et CC, le cortex interne était le siège de la plus forte apoptose relativement au cortex central et au cortex externe.

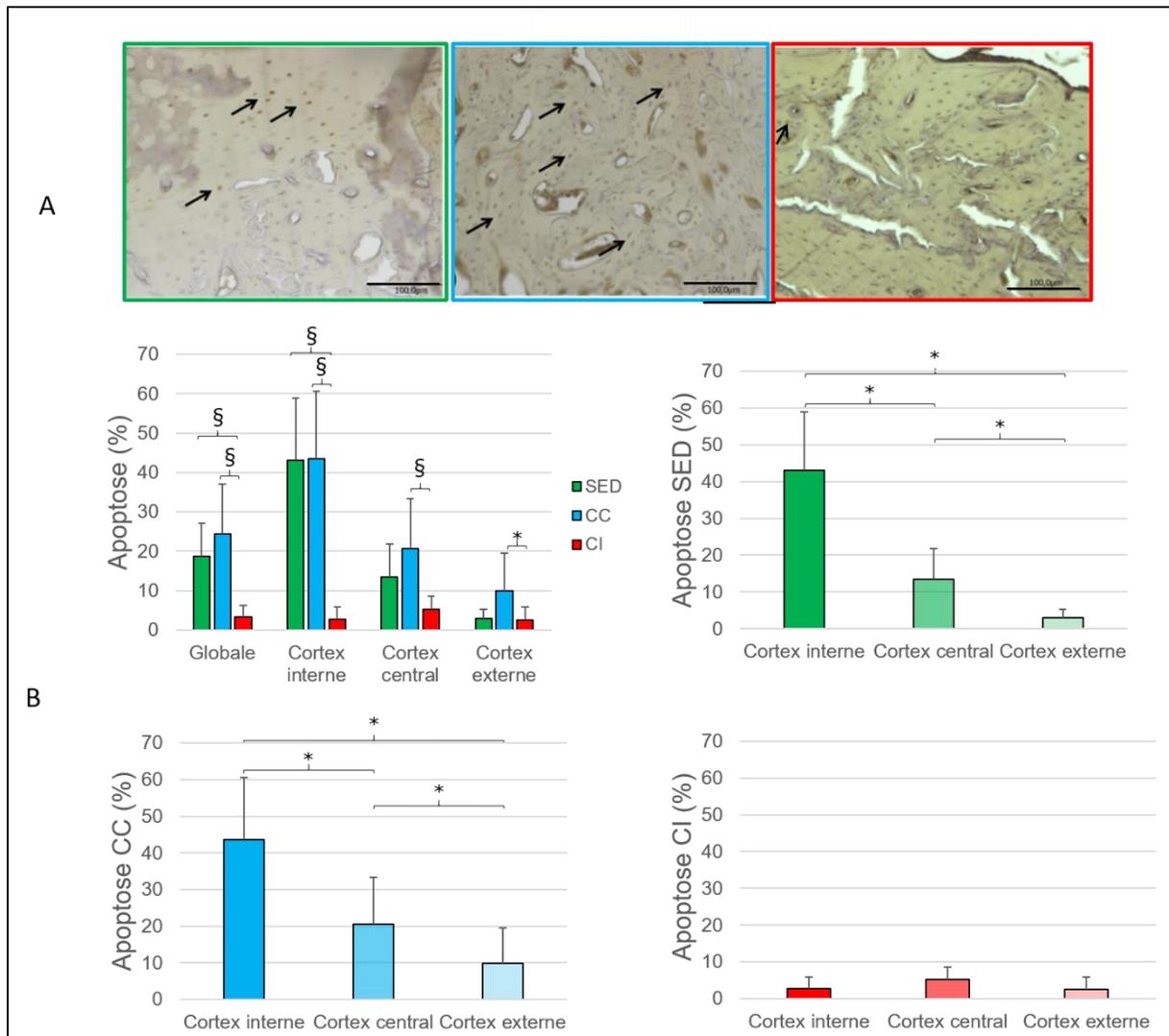


Figure 39 : Apoptose ostéocytaire par marquage de la caspase 3 clivée

Panel A : Os cortical après marquage de la caspase 3 clivée dans les groupes SED, CC et CI ; flèche noire : lacune avec ostéocyte apoptotique. La barre d'échelle correspond à 100 µm ; *Panel B* : Apoptose ostéocytaire par groupe et par site ; § $p < 0,001$ * $p < 0,05$

2.2.1.1.5.4. Activité ostéoclastique

Les résultats de l'analyse des surfaces d'activité ostéoclastique sont présentés dans la Figure 40.

La surface de marquage TRAP (et donc l'activité ostéoclastique) dans le groupe CC était bien plus élevée que dans les groupes CI et CC, et ce quelle que soit la région observée (CI : $p=0,0005$, $p=0,004$, $p=0,002$ et $p=0,002$ et SED : $p=0,0005$, $p=0,004$, $p=0,002$ et $p=0,005$, pour la surface globale, la zone corticale, la zone trabéculaire et la jonction cortico-trabéculaire du tibia respectivement). Au sein des groupes SED et CC, l'activité ostéoclastique était la plus élevée à la jonction cortico-trabéculaire par rapport aux trabécules, alors que dans le groupe CI, il s'agissait de la région corticale.

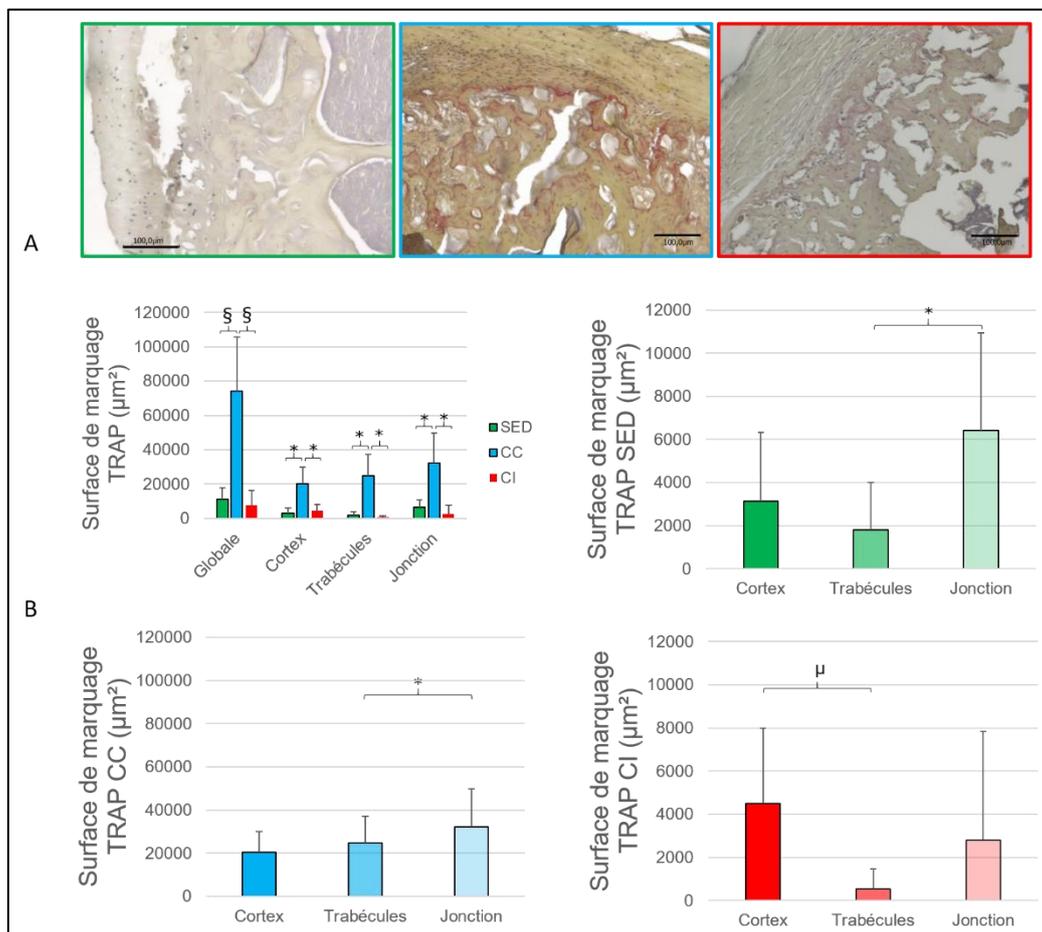


Figure 40 : Activité ostéoclastique par marquage TRAP

*Panel A : Marquage global TRAP dans les groupes SED, CC et CI. La barre d'échelle correspond à 100 µm ; Panel B : Marquage TRAP par groupe et par site. § $p < 0,001$; * $p < 0,01$; µ $p < 0,05$*

2.2.1.1.6. Paramètres sanguins

Les paramètres sanguins sont résumés dans la Figure 41. Quel que soit le paramètre étudié, aucune différence statistique n'était observée parmi les groupes.

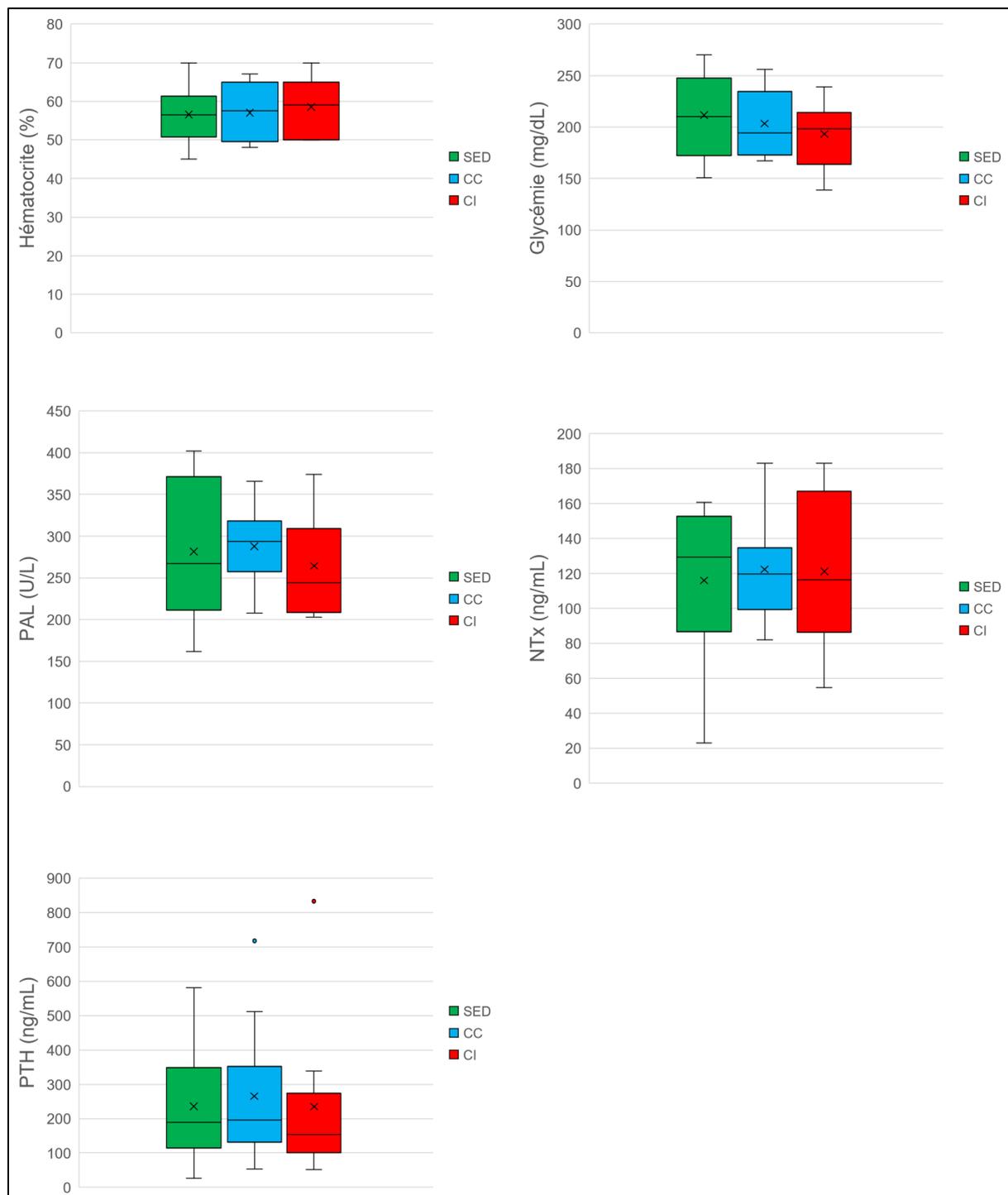


Figure 41 : Paramètres sanguins chez les rats à T8

2.2.1.2. Discussion

L'objectif de cette étude était de caractériser et comparer les effets de la course modérée continue et la course intermittente sur les paramètres de la qualité osseuse à différentes échelles (géométrie, microarchitecture corticale et trabéculaire, activité cellulaire osseuse).

Pour la microarchitecture trabéculaire, la course continue avait des effets positifs dans le tibia puisqu'elle entraînait un renforcement de ce tissu qui se traduisait par une augmentation du volume, de l'épaisseur et du nombre de trabécules, associée à une diminution de l'espace entre ces trabécules. Ce renforcement dans le groupe CC s'accompagnait d'une activité ostéoclastique plus élevée dans le tissu trabéculaire lui-même et à la jonction cortico-trabéculaires par rapport aux groupes SED et CI. Cette augmentation de l'activité ostéoclastique dans les trabécules est probablement le reflet du remodelage osseux responsable de ce renforcement du tissu trabéculaire. Un marquage de l'anabolisme osseux, par le biais de l'ostéocalcine par exemple, serait nécessaire afin de confirmer le bilan positif du remodelage. Aucun effet n'était observé dans le fémur. Les hypothèses quant à cette différence d'effets de la CC en fonction de l'os incluent (mais ne sont pas limitées à) (i) une atténuation des contraintes mécaniques par les ménisques et donc une intensité de contrainte insuffisante sur le fémur pour générer des modifications microarchitecturales (Le tibia chez le Rat est le premier os à subir l'impact du sol en course, il reçoit donc probablement les contraintes les plus importantes lors de l'exercice (Araújo *et al.* 2006)) ; (ii) une différence de réponse à l'exercice en fonction des sites osseux (Iwamoto *et al.* 1999), liée par exemple à une différence du volume et du nombre de trabécules entre fémur distal et tibia proximal (Tableau 8), bien qu'aucune étude de comparaison directe de ces paramètres entre fémur distal et tibia proximal n'ait été publiée à notre connaissance.

En revanche, la course intermittente engendrait des effets négatifs sur la microarchitecture trabéculaire fémorale, se traduisant par une augmentation de l'espace entre les trabécules. Malheureusement, nous n'avons pas de données histologiques (caspase 3 clivée, TRAP, occupation lacunaire) pour cet os, qui permettraient d'expliquer cet effet négatif. Les autres paramètres trabéculaires n'étaient cependant pas affectés. Aucun effet de la course intermittente n'était observé sur le tissu trabéculaire tibial.

Pour la microarchitecture corticale, les effets des deux protocoles de course se manifestaient par une augmentation de la porosité corticale et une diminution de la DMO corticale, sans que la DMO trabéculaire ne soit affectée. Une augmentation de la porosité

corticale est rapportée chez des rats soumis à la course continue pendant 5 semaines (30 min/j, 5 j/semaine) pour une vitesse de 16 m/min, mais pas pour des vitesses de 12 et 20 m/min (Liu *et al.* 2019). Cette vitesse de 16 m/min est similaire à la vitesse de 15 m/min utilisée dans notre étude. Dans l'étude de Liu (2019), la porosité corticale était mesurée dans le fémur et non dans le tibia (Liu *et al.* 2019). Une augmentation de la porosité corticale suite à la course continue est rapportée dans la littérature chez le rat, mais dans des modèles d'ostéoporose dans le fémur, et non chez le rat sain (Bonnet *et al.* 2007, Maurel *et al.* 2013). Aucune donnée sur la porosité corticale n'est disponible à notre connaissance dans le cadre de la course intermittente. Une augmentation de la porosité peut être liée à une augmentation du nombre de pores, une augmentation du diamètre des pores, ou les 2 (Cooper *et al.* 2016). Dans notre étude, ni l'un ni l'autre n'était augmenté. Cependant, la résolution utilisée de 5 µm pour l'acquisition au µCT pouvait être insuffisante pour évaluer de subtiles variations dans la microarchitecture corticale (Larriera *et al.* 2011). Une augmentation de la porosité corticale n'est cependant pas forcément synonyme de perte ou de détérioration osseuse, si elle ne s'accompagne pas d'une détérioration de la microarchitecture, de même qu'une diminution de la densité trabéculaire n'est pas synonyme de perte osseuse si elle ne s'accompagne pas d'une détérioration de la microarchitecture corticale (Zebaze *et al.* 2019).

La diminution de DMO corticale liée à la CC et la CI est plutôt surprenante ; dans la littérature, elle est en effet observée pour des sessions quotidiennes de course prolongées (Hagihara *et al.* 2009), ce qui n'était pas le cas de nos deux protocoles de course qui étaient d'intensité modérée. Pour une intensité modérée de course, une augmentation de la DMO corticale tibiale (Iwamoto *et al.* 2005) est même rapportée. Notable également, l'absence d'effet sur la DMO trabéculaire alors que le nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes y est plus important que dans le cortex. Une hypothèse pour la diminution de la DMO corticale serait un effet négatif de l'exercice sur les progéniteurs du périoste (qui comme les ostéoblastes ont une forte activité de formation osseuse (Allen *et al.* 2004)).

Pour la macroarchitecture corticale, la course continue engendrait une diminution de l'épaisseur des cortex crânial et caudal proximaux. De façon surprenante, cette diminution d'épaisseur dans le groupe CC ne se traduisait pas par une surface diaphysaire en coupe transversale plus faible, alors même que, bien que non statistiquement significatif, les épaisseurs dans l'axe latéromédial étaient également diminuées dans ce groupe. De plus, les diamètres latéromédiaux et craniocaudaux des tibias étaient similaires entre les groupes. Il est possible que la puissance de l'étude n'ait pas été suffisante pour le paramètre de surface

corticale, d'autant plus que sa variabilité dans le groupe SED était importante. Puisque le diamètre externe du cortex était similaire entre les groupes, la diminution de l'épaisseur dans le groupe CC s'effectue probablement à la jonction corticomédullaire.

Cette diminution de l'épaisseur corticale dans le groupe CC peut être reliée à la diminution du taux d'occupation lacunaire (viabilité ostéocytaire), en deçà des 50 % (c'est-à-dire une proportion supérieure de lacune vide) et à l'activité ostéoclastique augmentée dans ce groupe, notamment dans le cortex et à la jonction cortico-médullaire. L'apoptose ostéocytaire cependant était similaire à celle du groupe SED. Les résultats d'une manifestation des effets de la course plus prononcée en région de l'endoste sont compatibles avec une étude démontrant une mécano-sensibilité plus importante en région de l'endoste par rapport à la surface du périoste (Birkhold *et al.* 2016).

La course intermittente, en revanche, n'avait aucun effet sur la macroarchitecture corticale. Elle avait cependant des effets positifs sur le cortex, puisqu'elle augmentait le taux d'occupation lacunaire et diminuait très nettement l'apoptose ostéocytaire dans toutes les régions du cortex. L'activité ostéoclastique était similaire à celle observée dans le groupe SED, et plus intense dans le cortex que dans le tissu trabéculaire. Cette différence d'effet dans le cortex entre course intermittente et course continue pourrait s'expliquer à partir de la théorie du mécanostat de Frost : dans le groupe CC, la contrainte continue engendrée sur l'ostéocyte, mécano-sensible, pourrait être trop importante, induisant un déséquilibre du processus de remodelage en faveur de la résorption (Frost 1987). L'introduction d'une période de repos dans le groupe CI diminue, à temps égale d'exercice, la contrainte subie par l'os (Boudenot *et al.* 2015) et permettrait à l'ostéocyte de rétablir sa réceptivité aux contraintes mécaniques, favorable à la formation osseuse (Umemura *et al.* 1997).

Nous avons tenté d'expliquer les effets de la course sur le tissu osseux en analysant des marqueurs systémiques du remodelage osseux. Malheureusement, aucun de ces marqueurs n'était affecté par les protocoles de course étudiés. Nous avons cependant mis en évidence des différences dans les marqueurs locaux du remodelage, pour le processus catabolique (activité ostéoclastique évaluée par la TRAP).

Le remodelage osseux, par la nature des processus cellulaires qu'il implique, est un phénomène consommateur d'énergie qui par conséquent, dépend du statut énergétique de l'organisme tout entier (Misra and Klibanski 2011). Cependant dans notre étude, aucune différence n'a été observée, ni dans la consommation alimentaire ni dans la variation de poids corporels, parmi les groupes. Ces paramètres n'expliquent donc probablement pas les

différences observées dans les paramètres de géométrie, de microarchitecture et de métabolisme osseux.

Il ressort de cette étude que les effets de la course continue et de la course intermittente affectent différemment les paramètres de qualité osseuse, et que ces effets dépendent à la fois de l'os et du tissu osseux étudié. Alors que la course continue semble avoir des effets positifs sur le tissu trabéculaire, elle aurait au contraire des effets négatifs sur le tissu cortical. En revanche, la course intermittente aurait des effets bénéfiques sur le tissu cortical, mais des effets négatifs sur le tissu trabéculaire, ces derniers semblant limités au fémur.

2.2.2. Effets comparatifs de deux protocoles de course sur la guérison d'un défaut osseux de taille non critique (Etude 2)

Cette partie de l'étude a fait l'objet d'une publication dans *Life* (Annexe 1).

2.2.2.1. Résultats

2.2.2.1.1. Paramètres corporels et consommation de nourriture

Durant l'étude, les rats ont grandi et pris du poids adéquatement. Les IMC sont restés similaires entre les 3 groupes, tout au long de l'étude (Tableau 12), même si les rats du groupe CC étaient plus grands et plus lourds à T0.

Tableau 12 : Paramètres corporels des rats à l'entraînement (étude 2)

Paramètres	Temps	SED	CC	CI
Poids (g)	T0	195 ± 9	207 ± 8 *	194 ± 13 §
	T8	469 ± 41	495 ± 43	479 ± 42
	T12	521 ± 50	557 ± 29	557 ± 51
Longueur (cm)	T0	19,4 ± 0,6	20,6 ± 0,7 *	19,2 ± 0,6 §
	T12	27,0 ± 1,0	27,5 ± 0,9	27,7 ± 0,9
IMC (g/cm ²)	T0	0,52 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,53 ± 0,04
	T12	0,71 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,73 ± 0,06

* $p < 0,05$ vs. SED ; § $p < 0,05$ vs. CC

Les consommations d'eau et d'aliment d'entretien étaient également similaires entre les 3 groupes (Tableau 13).

Tableau 13 : Consommation d'aliment et d'eau pendant la période d'entraînement (étude 2)

	SED	CC	CI
Aliment (g)	25 ± 4	28 ± 3	29 ± 6
Eau (mL)	31 ± 3	38 ± 11	37 ± 9

2.2.2.1.2. Test de vitesse maximale aérobie

En début d'entraînement (T1), aucune différence statistique de VMA n'était observée entre les trois groupes. A T8 en revanche, les VMA des groupes de course (CI, $p=0,009$ et CC, $p=0,002$) étaient supérieures à celle du groupe SED. Aucune différence de VMA n'était observée entre les groupes CC et CI (Tableau 14). La VMA avait augmenté de 8 ± 7 m/min ($p=0,01$) dans le groupe CC, de 4 ± 7 m/min ($p>0,1$) dans le groupe CI, et diminué de 11 ± 10 m/min ($p=0,05$) dans le groupe SED.

Tableau 14 : Vitesse maximale aérobie en début (T1) et fin (T8) d'entraînement (étude 2)

	Temps	SED	CC	CI
VMA (m/min)	T1	23 ± 11	31 ± 5	29 ± 8
	T8	18 ± 5	$35 \pm 5^{*,\mu}$	$37 \pm 7^*$

* $p<0,05$ vs. SED ; $\mu<0,05$ vs. T1

2.2.2.1.3. Macroarchitecture

Les mesures des échantillons osseux sont résumées dans le Tableau 15.

Les longueurs des fémurs gauches et droits dans les groupes CC ($p=0,01$) et CI ($p=0,02$) étaient supérieures aux longueurs respectives mesurées dans le groupe SED. Aucune différence statistique n'était observée entre les groupes CC et CI. Dans le groupe CC, le fémur opéré (droit) était plus petit que le fémur non opéré.

Tableau 15 : Paramètres de macroarchitecture de fémurs et des tibias (étude 2)

Os	Mesure	SED	CC	CI
FG	L (mm)	39,5 ± 1,0	40,3 ± 0,5 *	40,5 ± 0,9 *
	CrCd (mm)	4,0 ± 0,5	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2
	LM (mm)	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,4	4,9 ± 0,7
FD	L (mm)	39,1 ± 0,1	39,6 ± 0,4 *, ^μ	39,9 ± 1,0 *
	CrCd (mm)	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,4
	LM (mm)	5,0 ± 0,5	5,2 ± 0,3	4,9 ± 0,8
TG	L (mm)	43,7 ± 2,0	45,1 ± 1,1	43,9 ± 1,6
	CrCd (mm)	4,3 ± 0,5	4,1 ± 0,2	4,2 ± 0,4
	LM (mm)	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,4
TD	L (mm)	44,0 ± 2,0	45,4 ± 1,3	44,4 ± 1,8
	CrCd (mm)	4,1 ± 0,5	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,3
	LM (mm)	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,5

FG : fémur gauche, FD : fémur droit, TG : tibia gauche, TD : tibia droit

L : longueur, CrCd : diamètre crânio-caudal, LM : diamètre latéromédial

* $p < 0,05$ vs. SED, $\mu p < 0,01$ vs Gauche

2.2.2.1.4. Evolution de la guérison du défaut osseux évaluée au microscanner in vivo

La Figure 42 présente des images représentatives de l'évolution du comblement du défaut osseux dans les 3 groupes, pour le tibia (A) et le fémur (B) respectivement. Juste après la chirurgie (T9), aucune différence statistique n'était observée pour la fraction de volume osseux (BV/TV) dans le défaut tibial entre les trois groupes. Il en était de même pour BV/TV dans le fémur.

Entre T9 et T12, BV/TV a augmenté quel que soit le groupe et quel que soit l'os étudié (Tableau 16) (tibia : $p=0,001$ pour SED, $p=0,003$ pour CC et $p=0,001$ pour CI ; fémur : $p=0,006$ pour SED, $p=0,005$ pour CC, et $p=0,007$ pour CI), indiquant un comblement au moins partiel du défaut osseux. De plus, les pourcentages de variation de BV/TV dans les groupes CI ($p=0,01$) et CC ($p=0,02$) étaient plus élevés que celui observé dans le groupe SED, indiquant un comblement plus avancé dans les groupes CI et CC. Aucune différence n'était cependant observée entre les deux groupes de couse.

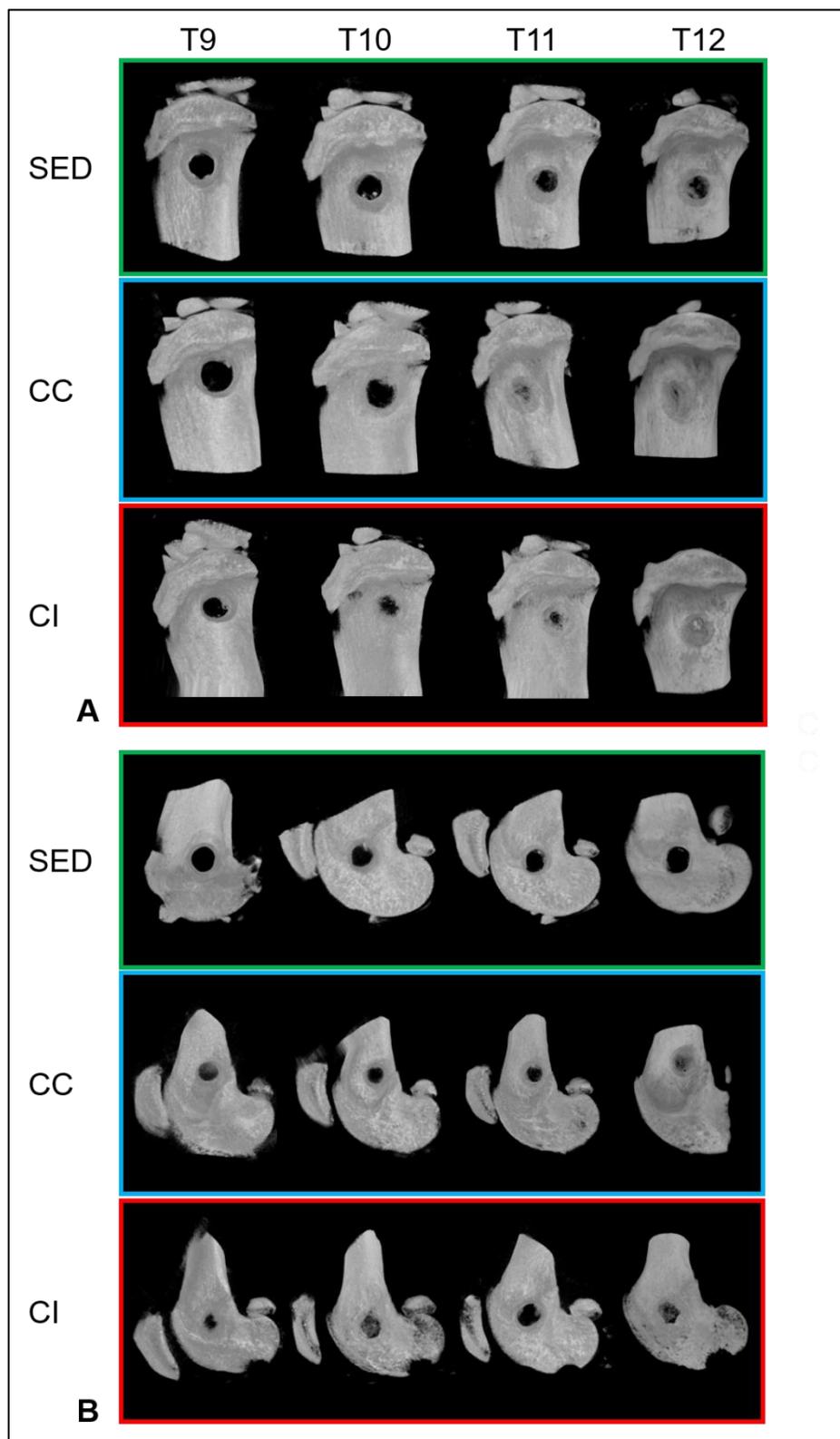


Figure 42 : Evolution de la guérison du défaut osseux de taille non critique dans le tibia (A) et le fémur (B) évaluée au microscanner *in vivo* (de T9 à T12)

Tableau 16 : Fraction du volume osseux (BV/TV, %) dans le tissu de réparation

Os	Temps	SED	CC	CI
Tibia	T9	16,1 ± 1,6	15,8 ± 1,7	14,7 ± 1,2
	T12	28,5 ± 3,3 ^μ	34,3 ± 3,0 ^{*,μ}	34,0 ± 5,4 ^{*,μ}
Fémur	T9	17,5 ± 1,2	18,5 ± 0,9	19,2 ± 1,5
	T12	29,3 ± 1,6 ^μ	30,1 ± 2,1 ^{μ,*,¥}	27,8 ± 2,7 ^{μ,¥}

* $p < 0,05$ vs. SED ; μ $p < 0,05$ vs. T9, ¥ $p < 0,05$ vs. tibia

Les éléments qui suivent ne sont disponibles que pour les groupes SED et CC, le groupe CI est en cours de traitement (Tableau 17 et Figure 43).

Pour les tibias, les BV/TV dans le groupe CC étaient supérieurs ($p=0,0012$) à ceux du groupe SED pour tous les temps de suivi (de T10 à T12). Pour les fémurs, seul le BV/TV dans le groupe CC à T12 était supérieur ($p < 0,0001$) à celui du groupe SED. Aucune différence statistique n'était observée pour les autres temps.

Dans le groupe CC, les BV/TV (Tableau 17) des tibias augmentaient de façon significative à chaque temps de suivi ($p < 0,0001$), alors qu'aucune différence statistique n'était observée pour les temps intermédiaires pour les fémurs. Dans le groupe SED, quel que soit l'os, les valeurs de BV/TV étaient également similaires pour les temps intermédiaires. De façon générale, dans le groupe sédentaire, aucune différence statistique n'était observée pour les valeurs de BV/TV entre fémurs et tibias pour tous les temps de suivi. En revanche pour le groupe CC, les BV/TV dans les tibias étaient supérieurs ($p=0,01$) aux valeurs respectives observées dans les fémurs à T11 et T12, indiquant un comblement plus avancé dans le tibia que dans le fémur dans le groupe exercice (Figure 43).

La Figure 43A regroupe des images représentatives de l'évolution de la guérison du défaut osseux dans le tibia. Une cinétique de guérison similaire était observée dans le groupe SED, quel que soit l'os étudié, alors que la cinétique était plus rapide pour le tibia que pour le fémur dans le groupe CC (Figure 43B). La cinétique de guérison était également plus rapide dans le groupe CC que dans le groupe SED pour le tibia, alors qu'elle était similaire entre SED et CC pour le fémur (Figure 43C).

Tableau 17 : Paramètres microarchitecturaux du tissu de réparation

Os Groups			Temps			
			T9	T10	T11	T12
BV/TV (%)	Tibia	SED	3.4 ± 1.5	8.6 ± 1.1	12.7 ± 3.3	16.3 ± 4.0 [¶]
		CC	2.9 ± 1.6	13.4 ± 4.1 [¥]	24.8 ± 6.8 [¥]	34.2 ± 12.3 ^{¥¶}
	Fémur	SED	4.8 ± 0.9	10.4 ± 1.0	12.2 ± 1.8	15.9 ± 2.9 [¶]
		CC	4.4 ± 0.9	11.1 ± 1.8	13.0 ± 2.4	22.0 ± 5.6 [¶]
BS/BV (1/mm)	Tibia	SED	57.6 ± 11.4	47.6 ± 9.3 [¥]	34.5 ± 6.1 [¥]	21.7 ± 3.4 ^{¥¶}
		CC	70.6 ± 26.6	43.6 ± 3.9 [¥]	31.9 ± 8.7 [¥]	16.4 ± 5.0 ^{¥¶}
	Fémur	SED	58.9 ± 10.7	43.0 ± 8.3 [¥]	39.1 ± 6.8	22.8 ± 3.8 ^{¥¶}
		CC	58.0 ± 7.4	44.3 ± 3.5 [¥]	40.8 ± 5.2	20.3 ± 3.¥ [¶]
SMI	Tibia	SED	2.78 ± 0.47	2.38 ± 0.18 [¥]	2.28 ± 0.24	2.01 ± 0.28 ^{¥¶}
		CC	2.83 ± 0.15	2.40 ± 0.37 [¥]	2.35 ± 0.56	1.97 ± 0.63 ^{¥¶}
	Fémur	SED	2.42 ± 0.21	2.43 ± 0.27	2.31 ± 0.19	2.06 ± 0.68 ^{¥¶}
		CC	2.54 ± 0.14	2.41 ± 0.27	2.57 ± 0.17	1.76 ± 0.36 ^{¥¶}
Tb.Pf (1/mm)	Tibia	SED	23.09 ± 9.02	12.75 ± 3.20 [¥]	9.56 ± 2.30	5.66 ± 1.48 [¶]
		CC	25.16 ± 6.75	12.02 ± 4.89	5.33 ± 5.50	3.59 ± 2.04 [¶]
	Fémur	SED	17.71 ± 5.55	12.46 ± 3.57 [¥]	10.19 ± 3.37 [¥]	4.57 ± 1.82 [¶]
		CC	19.03 ± 3.03	12.26 ± 3.66 [¥]	12.44 ± 1.74 [¥]	2.98 ± 1.89 [¶]
DMO (mg HA/cm ³)	Tibia	SED				125.3 ± 28.2
		CC				108.1 ± 11.6
	Fémur	SED				107.8 ± 5.1
		CC				114.0 ± 9.2*

* $p < 0.05$ vs. SED group, [¶] $p < 0,05$ vs. T9, et [¥] $p < 0,05$ vs. le temps immédiatement précédent ; HA: hydroxyapatite

Une interaction temps-os ($p < 0,0001$) était observée pour le Tb.Pf, suggérant que l'effet du temps sur la valeur de ce paramètre dépend de l'os pour lequel il est mesuré. En revanche, aucun effet de la course n'était observé (Tableau 17).

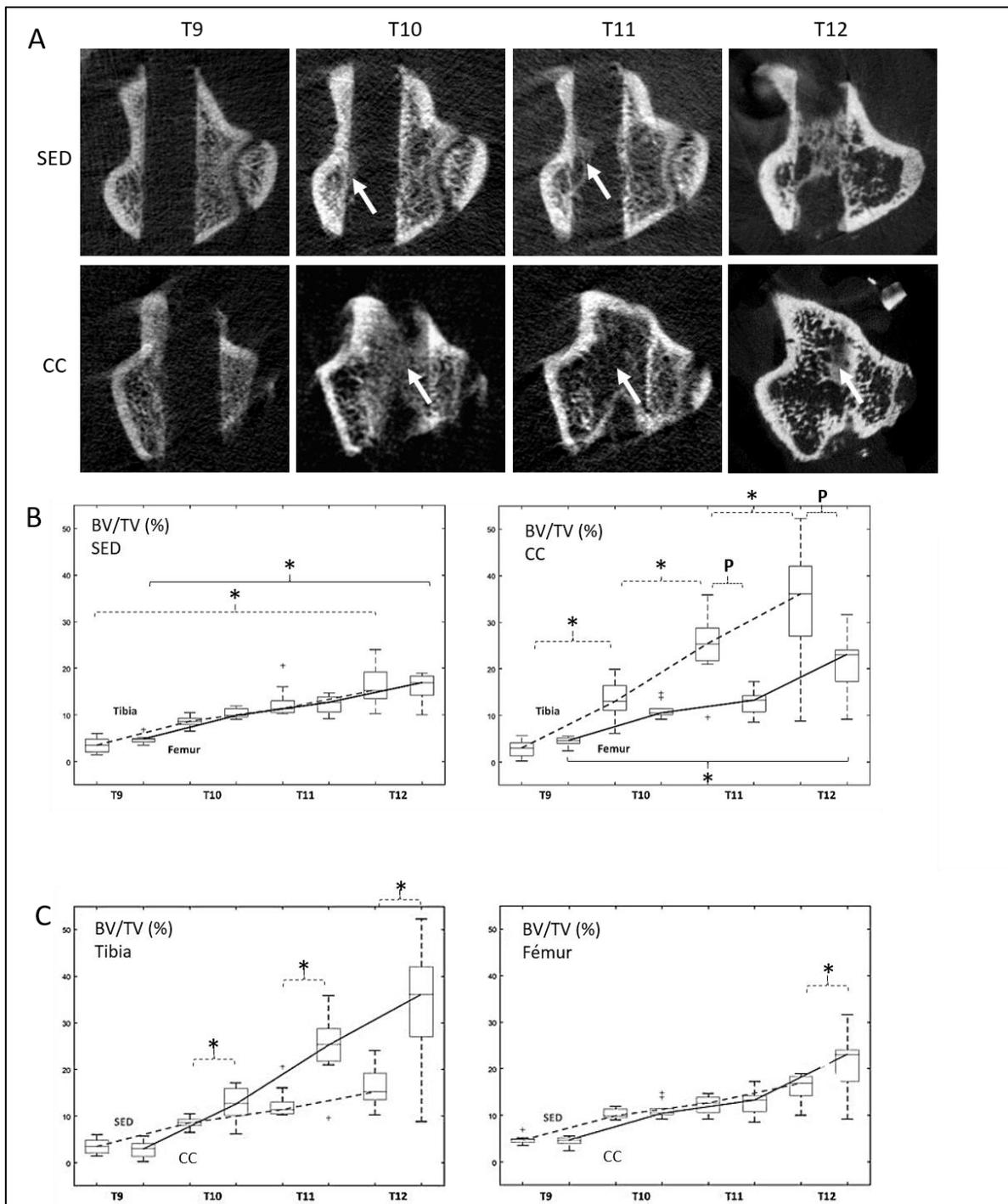


Figure 43 : Evolution de la guérison d'un défaut osseux non critique dans le tibia et le fémur

A) Images représentatives de la progression de la guérison dans le tibia (coupes transversales). La flèche blanche indique le tissu de guérison. B) Evolution de BV/TV (%), dans chaque groupe pour le tibia (--) et le fémur (-), * $p < 0,05$ entre les temps et **P** $p < 0,05$ entre les os. C) Evolution de BV/TV (%) pour chaque os dans les groupes SED (--) et CC (-). * $p < 0,05$ vs. SED.

Le BS/BV ($p < 0,0001$) et le SMI ($p < 0,001$) ne dépendaient que du paramètre temps, en particulier aucun effet de la course n'était observé (Tableau 15).

La DMO dans le tissu cicatriciel fémoral dans le groupe CC était supérieure ($p = 0,03$) à celle observée dans le groupe SED. Dans le tissu cicatriciel tibial en revanche, aucune différence statistique de DMO n'était observée entre les deux groupes (Tableau 16).

2.2.2.1.5. Paramètres sanguins

Les paramètres sanguins sont résumés dans la Figure 44.

La concentration plasmatique de NTx dans le groupe CC était inférieure ($p < 0,05$) à celle mesurée dans le groupe SED. Aucune différence statistique, en revanche, n'était observée entre les groupes CI et SED, et CI et CC.

Aucune différence statistique n'était observée pour l'hématocrite, la glycémie, et la concentration plasmatique des PAL entre les groupes. De même, alors que la concentration plasmatique de PTH des groupes CC et CI était plus élevée que celle du groupe SED, cette différence était non significative statistiquement.

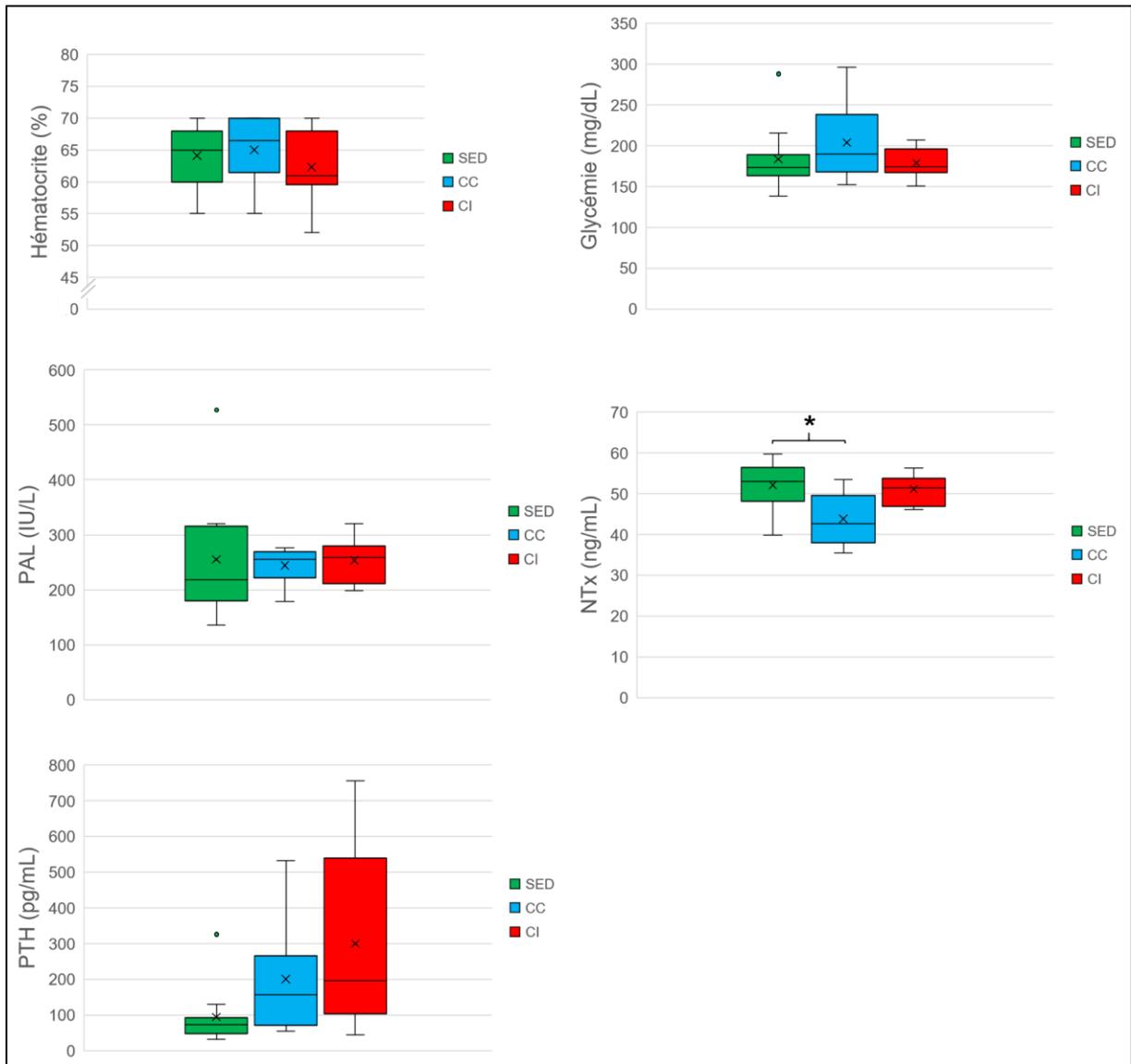


Figure 44 : Paramètres sanguins chez les rats à T12

2.2.2.2. Discussion

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de deux protocoles de course (continue et intermittente) sur la cicatrisation d'un défaut osseux de taille non critique chez le rat mâle, afin de déterminer si la pratique préventive de la course favorisait la cicatrisation osseuse, et si l'un des protocoles de course était plus efficace.

Nos résultats ont démontré que la pratique préventive de la course, qu'elle soit continue ou intermittente, améliorait la cicatrisation osseuse d'un défaut non critique dans le tibia et le fémur. Aucune différence cependant, n'a été observée entre les deux protocoles de course. Nos résultats ont également montré que la cicatrisation dans les groupes de course était plus avancée pour le tibia que le fémur.

Également, dans le cadre de la course continue (le groupe course intermittente n'a pas encore été traité sur ce point), la cinétique de guérison dans le tibia était globalement linéaire. A notre connaissance, il s'agit ici de la première étude longitudinale sur les effets prophylactiques de la course sur la guérison osseuse.

Ces résultats indiquent également que les effets de la course continue (la course intermittente n'a pas encore été traitée sur ce point) persistent plusieurs semaines après l'arrêt de celle-ci, puisque les différences observées entre les groupes SED et CC augmentaient avec le temps. Ces données sont compatibles avec celles d'une étude rapportant la persistance des effets bénéfiques de contraintes sur le tibia (3 jours par semaine, pendant 4 semaines) sur la fraction de volume osseux chez des Souris, 8 semaines après que l'exercice a cessé (Warden *et al.* 2014).

En revanche, aucun effet de l'exercice n'était observé sur les autres paramètres de microarchitecture du tissu cicatriciel.

Afin d'expliquer les différences observées dans les groupes de course, nous avons analysé des marqueurs du remodelage osseux. Aucune différence n'était observée pour la phosphatase alcaline, un marqueur précoce de l'ostéogénèse. Des résultats similaires étaient observés lorsque la nage ou la course était pratiquée dans le cadre de la guérison de défauts osseux ou d'ostéotomie (Guerino *et al.* 1999, Rueff-Barroso *et al.* 2008). En revanche, une diminution du NTx de 16 % était observé dans le groupe CC, par rapport au groupe SED. Ce résultat suggère que la CC améliore la cicatrisation osseuse, au moins en partie, en diminuant le phénomène de résorption osseuse, comme cela est décrit pour l'os sain (Hagihara *et al.* 2005). Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'une autre étude dans laquelle la CC pendant 4

semaines n'avait induit aucune modification de l'ostéoprotégérine et de la TRAP (autres marqueurs de résorption osseuse) dans le tissu cicatriciel d'un défaut osseux de taille non critique (Nogueira *et al.* 2016). Cette différence pourrait s'expliquer par un temps d'entraînement insuffisant pour engendrer un effet notable dans l'étude de Nogueira *et al.* (2016). Enfin, il est rapporté dans la littérature que l'administration de PTH favorise la guérison osseuse (Yamashita and McCauley 2019). De plus, la PTH, qui régule l'adaptation de l'os à l'exercice, augmente dans le plasma suite à la course (Bouassida *et al.* 2006, Gardinier *et al.* 2015, Kohrt *et al.* 2018). Or dans notre étude, aucun effet statistique de la CC n'était observé sur la concentration de PTH. Elle était cependant notablement supérieure dans le groupe CC. Le délai de 4 semaines après la fin de l'entraînement dans notre étude, alors qu'elle était mesurée immédiatement à la fin du protocole d'exercice dans les études citées ci-dessus, pourrait expliquer que les éventuels effets de l'exercice sur la PTH n'étaient plus détectables.

De plus, la consommation d'eau (et surtout d'aliment) et la variation des poids étaient similaires parmi les groupes. Ces paramètres n'expliquent donc probablement pas les différences de cinétique de guérison observées.

Il ne faut pas négliger l'importance du muscle fonctionnel dans la guérison osseuse (Utvåg *et al.* 2002, Harry *et al.* 2008, Hao *et al.* 2012). Son rôle peut être lié à une stimulation mécanique directe sur l'os. Le muscle est relié à l'os par l'intermédiaire du tendon dont les fibres se mêlent aux fibres du périoste. Or la couche interne du périoste est composée de cellules progénitrices qui construisent et réparent l'os de façon constante (Allen *et al.* 2004, Allen and Burr 2005). Ces cellules auraient d'ailleurs un potentiel de régénération osseuse supérieur à celui des cellules souches de moelle osseuse (Duchamp de Lageneste *et al.* 2018). Le rôle du muscle peut également être lié à une action biochimique par l'intermédiaire du sécrétome musculaire. Suite à un exercice, les fibres musculaires sécrètent dans la circulation des cytokines (« myokines » (Pedersen 2011), comme l'irisine qui a une effet anabolique sur l'os, notamment cortical (Colaïanni *et al.* 2015). D'autres myokines de nature inconnue semblent avoir des effets ostéoprotecteurs en maintenant la viabilité des ostéocytes (Jähn *et al.* 2012). Lorsqu'il se contracte, le muscle sécrète également des interleukines pro-inflammatoires (interleukines 6 et 17) intervenant dans la formation et/ou la résorption osseuse (Hamrick 2012).

Une trouvaille intéressante de notre étude était les différences d'effet de la CC en fonction de l'os étudié. Nous n'avons pas connaissance d'études antérieures ayant directement comparé la guérison osseuse dans ces deux os. Les hypothèses sur cette observation incluent (mais ne sont pas limitées à) (i) une intensité ou une répartition différente des contraintes entre

le fémur et le tibia, notamment en raison de la différence d'orientation de ces deux os au moment de l'impact au sol ou à leur différence de géométrie (Iwamoto *et al.* 2005) ; (ii) l'atténuation des contraintes mécaniques par les ménisques. D'ailleurs, chez le rat, le tibia est le premier os (après les os du pied) qui subit l'impact du sol lors de la course. C'est donc probablement l'os qui reçoit les contraintes les plus importantes lors de l'exercice, d'où une réponse plus forte du tibia à l'exercice physique (Arahão *et al.* 2006) ; (iii) une différence de réponse à l'exercice en fonction des sites osseux (Iwamoto *et al.* 1999), notamment liée à une différence de microarchitecture osseuse. D'ailleurs, les différences de densités osseuses, surtout en ce qui concerne l'os spongieux, sont plus marquées entre différents segments au sein d'une même espèce (par exemple fémur vs. vertèbre), qu'entre deux espèces (Liebschner 2004).

Un modèle de défaut osseux de taille non critique a été choisi dans cette étude afin de caractériser la nature ostéogénique de la course. Il était donc nécessaire d'avoir un modèle de défaut pouvant guérir spontanément. Alors que cliniquement les défauts osseux de taille critique représentent le véritable challenge thérapeutique, nous n'avons pas souhaité utiliser ce modèle, d'une part afin de s'affranchir des interactions possibles avec la greffe osseuse, d'autre part parce qu'il n'existe à ce jour aucune donnée indiquant que l'exercice seul permet d'améliorer au moins en partie la cicatrisation d'un défaut osseux de taille critique, sans greffe.

Ainsi cette étude démontre les effets positifs d'un programme prophylactique de 8 semaines de course (continue ou intermittente) sur la guérison d'un défaut osseux non critique chez le Rat mâle. Des différences de cinétique de guérison sont observées entre le tibia et le fémur, au moins avec la course continue.

2.2.3. Résultats et discussion complémentaires : données non finalisées, complications et limitations

2.2.3.1. Éléments communs aux deux études

2.2.3.1.1. Les RT-PCR

Il est rapporté dans la littérature l'expression de gènes mécanosensibles par les cellules souches lorsqu'elles sont soumises à des contraintes mécaniques *in vivo* (Becquart *et al.* 2016). Nous avons choisi ces gènes afin d'étudier leur expression dans le tissu osseux soumis à la course. La première étape consistant en un « screening » des gènes exprimés par l'analyse des « pools » (mélange des ADNc - pour chacun des groupes SED, CC et CI - des rats 1 à 5 d'une part et des rats 6 à 10 d'autre part, constituant 2 pools d'ADNc pour chacun des 3 groupes) a permis d'identifier quelques gènes d'intérêt (Agpt1 [angiopoïétine 1], Col 1a1 [collagène de type I], Lrp5 [lipoprotein receptor-related], Sost [sclérostine], Sp7 [Osterix], Sparc [ostéonectine], dans l'étude 1 par exemple, Figure 45).

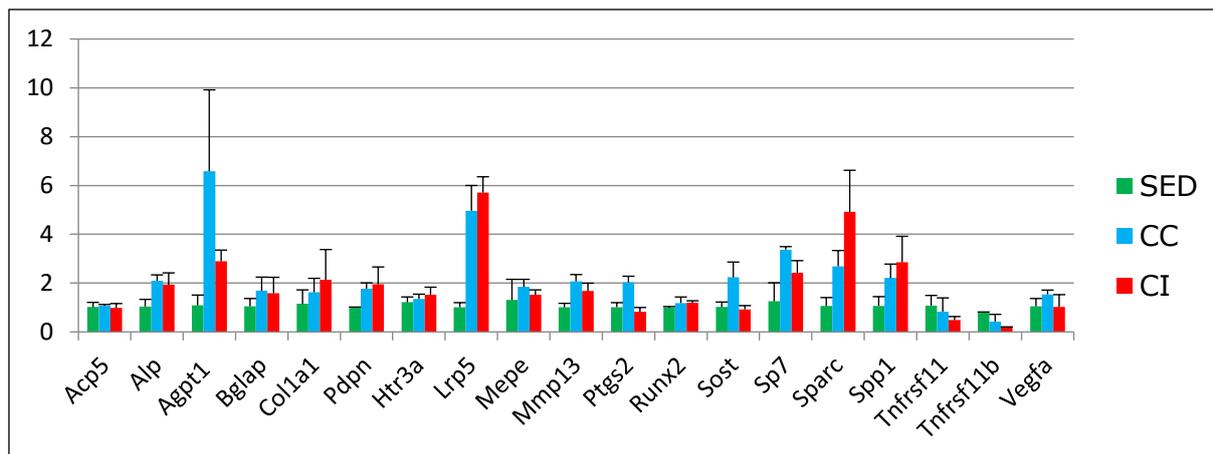


Figure 45 : Gènes mécanosensibles d'intérêt identifiés par RT-PCR (étude 1)

Acp5 : phosphatase acide tartrate résistante, *Alp* : phosphatase alcaline, *Agpt1* : angiopoïétine 1, *Bglap* : ostéocalcine, *Col1a1* : collagène de type 1, *Pdpn* : ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase, *Htr3a* : hydroxytryptamine receptor 3A, *Lrp5* : lipoprotein receptor-related protein, *Mepe* : phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire, *Mmp13* : métalloprotéinase de la matrice 13, *Ptgs2* : prostaglandine synthase 2, *Runx2* : runt-related transcription factor 2, *Sost* : sclérostine, *Sp7* : Osterix, *Sparc* : ostéonectine, *Spp1* : ostéopontine, *Tnfrsf11b* : ostéoprotégérine, *Vegfa* : vascular endothelium growth factor a

Des analyses statistiques ne peuvent pas être effectuées sur ces pools, une étape de PCR individuelle est nécessaire. Cette étape a été réalisée mais a cependant conduit à des résultats contradictoires et inattendus par rapport aux pools. Les manipulations ayant été réalisées par des personnes différentes à des temps différents et éloignés, les manipulations vont être reconduites afin d'éliminer ce biais.

2.2.3.1.2. Les vitesses maximales aérobie

S'il était nécessaire de le déterminer pour le calcul des vitesses de course, la variation de ce paramètre entre le début et la fin du protocole de course ne nous a pas permis de valider l'entraînement. Dans notre étude, la VMA des groupes de course était bien supérieure à celle du groupe sédentaire à la fin de l'entraînement, mais elle n'était pas (à l'exception du groupe CC dans le volet « guérison » de l'étude) supérieure à la VMA en début d'entraînement. La différence observée avec le groupe SED peut, au moins en partie, s'expliquer par une diminution (bien que non significative) de la VMA dans ce groupe entre le début et la fin du protocole. Une limite de cette détermination de la VMA repose sur le fait que ce soit une mesure ponctuelle, qui dépend de la disposition du rat à courir le jour J. Il n'en demeure pas moins que

des effets des protocoles de course sur la qualité osseuse ont été mis en évidence, ce qui est compatible avec l'hypothèse d'un effet seuil de stimulation à partir duquel la formation osseuse est favorisée (Hamann *et al.* 2012). Par ailleurs, l'objectif de l'étude n'était pas l'augmentation de performance physique, d'autant plus que la vitesse des couloirs de course ne pouvait de toute façon pas être individualisée.

2.2.3.1.3. La moelle osseuse et les cellules souches

Le projet prévoyait initialement la mise en culture des cellules de moelle osseuse extraite des fémurs et des tibias afin d'évaluer et de comparer les effets des deux protocoles de course sur la prolifération, la différenciation et le sécrétome des CSM juste après l'entraînement et en fin de période de guérison. En effet, la revue de littérature effectuée dans cette optique (Bourzac *et al.* 2019) (Annexe 3) révélait que la CC favorisait la différenciation ostéogénique, au détriment de la différenciation adipogénique. Les résultats auraient éventuellement contribué à déterminer si l'un des protocoles de course était plus ostéogénique. Malheureusement, une panne électrique a engendré la perte de l'ensemble des échantillons.

2.2.3.2. Etude sur la qualité osseuse

2.2.3.2.1. Microarchitecture fémorale au micro-scanner

Nous avons fait le choix de traiter en priorité les données relatives au tibia proximal et du fémur distal car c'est dans ces régions que les défauts osseux non critiques allaient être réalisés. Cependant, la littérature rapporte des différences, notamment une densité osseuse augmentée dans le fémur distal mais pas dans le fémur proximal ou dans la diaphyse fémorale chez des rats Sprague-Dawley mâles pratiquant la course volontaire dans une roue en accès libre (Shiga *et al.* 2003). Seules les données de microarchitecture trabéculaire dans le fémur proximal ont été extraites. Les données de DMO corticale et trabéculaire restent à déterminer.

2.2.3.2.2. Marquage du front de minéralisation

Si un double marquage a été effectué afin de calculer la vitesse d'apposition osseuse à la fin du protocole d'exercice, un « screening » rapide de quelques lames par groupe n'a pas permis de mettre en évidence de fluorescence permettant d'identifier le front de minéralisation. Le marquage a été réalisé par administration intrapéritonéale d'oxytétracycline et de bleu de calcéïne. Si l'injection intrapéritonéale est largement utilisée sur les animaux de laboratoire, le

taux d'échec rapporté est de 10 à 20 % et est lié à une injection dans le tissu adipeux, le cæcum ou encore la vessie (Gaines Das and North 2007). Le taux d'échec peut même augmenter lorsque l'injection est réalisée par un opérateur peu expérimenté.

2.2.3.2.3. Marqueurs du remodelage osseux

Comme évoqué précédemment, aucun effet de l'exercice sur les marqueurs systémiques du remodelage osseux n'a pas été mis en évidence. En revanche, un marqueur local de résorption (activité ostéoclastique TRAP) a permis une première approche de ce remodelage in situ. Lors de la quantification du marquage TRAP, nous nous sommes limités à la mesure de la surface de résorption. Ce paramètre peut cependant être associé au paramètre de densité des cellules ostéoclastiques. Cependant, ce comptage ne pouvait pas être effectué en raison de la mauvaise visualisation des noyaux ostéoclastiques.

De plus, aucun marqueur local de formation osseuse n'a été utilisé dans cette étude. Ainsi l'évaluation de l'ostéocalcine par technique d'immunohistochimie par exemple aurait permis d'explorer le processus anabolique du remodelage osseux (Malhan *et al.* 2018).

2.2.3.3. Etude sur la guérison osseuse

2.2.3.3.1. Détermination du volume d'intérêt pour évaluation du tissu cicatriciel

Dans la littérature, le modèle de course le plus utilisé et le mieux caractérisé par rapport à ses effets sur la qualité osseuse est celui de la course continue. Il nous paraissait donc important de bien caractériser les effets de la course intermittente sur la qualité osseuse avant d'étudier ses effets sur la guérison osseuse. De plus, nous avons rencontré des difficultés de méthodologie quant à l'établissement de notre volume d'intérêt pour l'étude de la cicatrisation du défaut osseux. Nous avons d'abord choisi un volume de diamètre fixe incluant la bordure du défaut osseux afin d'évaluer l'évolution du volume osseux (BV) dans le défaut au cours du temps comme décrit dans un défaut de calvaria (Caliaperoumal *et al.* 2018). Cependant, même si les repères anatomiques pour la chirurgie du défaut étaient respectés, les longueurs de défauts étaient variables d'un rat à l'autre en raison de subtiles différences dans la localisation du défaut lui-même. Le pourcentage de variation de la fraction osseuse d'un temps à l'autre avait également été envisagé afin de standardiser la mesure. Cependant si ce paramètre donnait une évaluation de la cinétique de comblement du défaut osseux, elle ne permettait pas directement

de déterminer si un groupe cicatrisait mieux qu'un autre. Nous avons donc choisi un volume d'intérêt situé au centre du défaut, donc la longueur représentait 75 % de la longueur totale du défaut (et non pas une longueur fixe), afin de s'affranchir des variations liées à la localisation du défaut et la croissance du rat. Nous avons donc appliqué cette méthode au groupe CC et au groupe SED, mais pas encore au groupe CI qui reste à finaliser.

2.2.3.3.2. Evaluation histologique du tissu cicatriciel

Les résultats présentés précédemment concernaient le suivi de la cicatrisation au microscanner *in vivo*. Cette étude devrait être complétée par l'évaluation du tissu de cicatrisation à l'histologie afin d'apprécier les éléments d'organisation tissulaire. Cette évaluation, initialement programmée sur le fémur uniquement, devra inclure le tibia en raison des différences constatées entre tibia et fémur au cours de l'étude au μ CT *in vivo*. Ces évaluations sont en cours.

2.2.3.3.3. Mécanismes propres à l'exercice impliqués dans la guérison osseuse

Notre étude n'avait pas pour optique d'éclaircir les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la réponse tissulaire associée à la course, lors de la réparation osseuse. Le but était plutôt de dégager les effets positifs ou négatifs de la course sur la guérison du tissu osseux. Ainsi, les effets de la course sur la vascularisation osseuse ou le processus de minéralisation, par exemple, mériteraient une attention particulière (Nogueira *et al.* 2016).

La figure 46 résume les résultats des deux études.

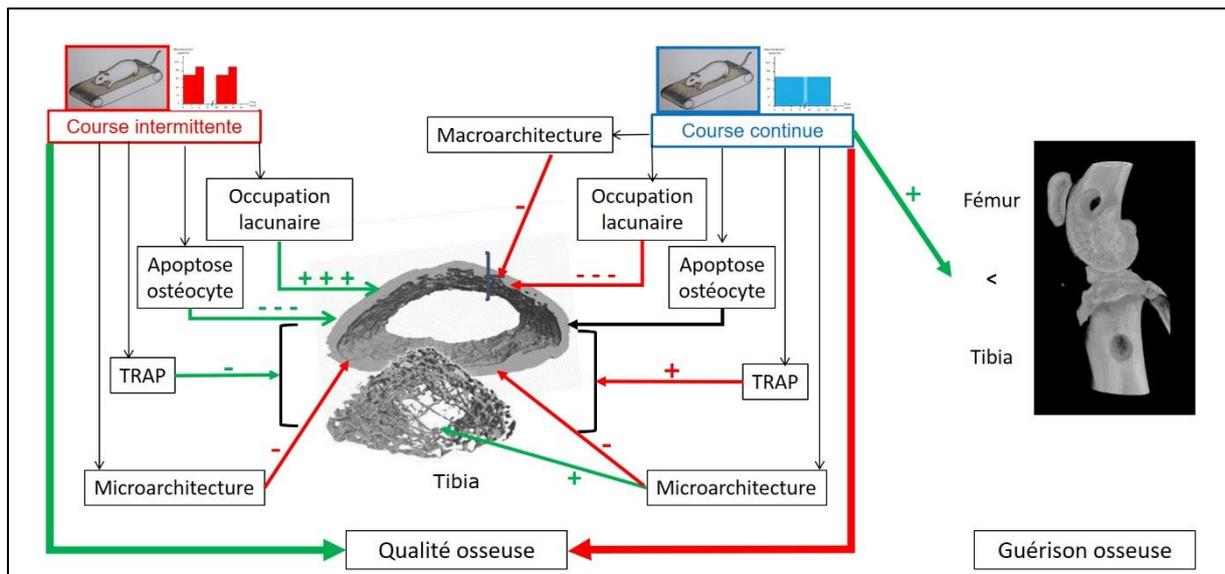


Figure 46 : Bilan des effets de protocoles de course sur tapis roulant sur la qualité osseuse du tibia et la guérison osseuse de défauts osseux de taille non critique dans le fémur et le tibia

Flèche verte : effet bénéfique, flèche rouge : effet néfaste

3. Troisième partie : Perspectives et conclusion

3.1. Comment l'amélioration de la qualité osseuse favorise la guérison osseuse ?

A l'échelle de l'os, nous avons montré dans notre étude que la course continue favorisait la microarchitecture, probablement par un remodelage osseux plus important, en particulier à la jonction cortico-trabéculaire. Or, c'est aussi dans cette région que le pontage osseux se fait dans un premier temps dans la phase de réparation de la cicatrisation osseuse (Hoerth *et al.* 2014). De plus, une activité ostéoclastique est nécessaire au début du processus de cicatrisation osseuse afin de résorber les fragments osseux nécrotiques avant que la phase de formation osseuse ne débute. Nous supposons donc que sur un os conditionné par l'entraînement continu, si une fracture devait survenir, la phase de résorption de l'os nécrotique serait accélérée permettant la mise en place de la phase de formation de manière plus précoce. La phase de pontage serait alors également accélérée. C'est d'ailleurs ce que laisse présager notre étude sur la guérison du défaut osseux, puisqu'un comblement au niveau de l'endoste était visible au μ CT dans le groupe CC et pas dans le groupe SED. La course intermittente, en améliorant la viabilité des ostéocytes dans le cortex et en diminuant nettement l'apoptose ostéocytaire, pourrait améliorer la phase de production osseuse et de remodelage, puisque par exemple, la différenciation et l'activation des ostéoblastes (pour la production de collagène de type I, par exemple) sont contrôlées par des facteurs autocrines et paracrines produits par les ostéocytes (Sims and Gooi 2008, Galli *et al.* 2010, Tu *et al.* 2012).

3.2. Perspectives et application chez l'Homme

Notre étude a été réalisée sur des rats encore en croissance, d'environ 200 g en début d'étude. Le rat est un animal qui grandit pendant toute la durée de sa vie, et plus particulièrement jusqu'à 10 mois. Les rats de notre étude constituent ainsi un bon modèle pour étudier les effets de l'exercice sur l'os et la réparation osseuse chez de jeunes adultes, lors du pic de masse osseuse (Sampson 2002). Ces données pourraient donc servir de support au raffinement des programmes d'entraînement pour les militaires ou les athlètes par exemple, particulièrement sujets aux fractures des membres inférieurs (Court-Brown *et al.* 2008, Waterman *et al.* 2016). Chez la Souris, il a cependant été démontré que la réponse du tissu osseux aux stimuli mécaniques décroissait chez les souris adultes et les souris âgées, par rapport aux jeunes souris (Razi *et al.* 2015). Parce que nous souhaitons apprécier les effets de l'exercice uniquement, nous avons choisi des rats jeunes mâles afin de nous affranchir de certaines interactions physiologiques, comme l'âge (et les risques de sarcopénie et ostéopénie) et le genre (hormones et les risques d'ostéoporose, la réponse des mâles à la course continue modérée étant plus prononcée que celle des femelles (Vicente *et al.* 2013)). Ainsi ce travail pourrait être prolongé par une nouvelle étude impliquant des rats plus âgés et des rates ovariectomisées, afin d'être plus directement transposables à une population âgée et/ou ostéoporotique, particulièrement sujette aux fractures (plus de 40 % des femmes et plus de 20 % des hommes atteints d'ostéoporose souffriront d'une fracture au cours de leur vie (Lane *et al.* 2006)). Il est en effet important de déterminer très spécifiquement les effets de l'exercice sur les différents paramètres de la qualité osseuse dans différentes populations afin de proposer un plan d'exercice préventif personnalisé.

Enfin, ce travail présente les bases théoriques de l'utilisation prophylactique de protocoles de course afin d'accélérer la réparation osseuse dans le cadre de chirurgie orthopédique, comme par exemple la prothèse de genou (Moyer *et al.* 2017).

3.3. Intégration aux thématiques du laboratoire B3OA

Un des axes de recherche au laboratoire B3OA est l'élaboration de bioingénieries innovantes pour la réparation osseuse, comme par exemple l'utilisation de biomatériaux de corailensemencé par des CSM dans la réparation de défauts osseux de taille critique dans un modèle grand animal (Decambon *et al.* 2017). Si cette technique était prometteuse, la non-union des segments osseux se produisait malgré tout dans près de la moitié des cas. Des stratégies ont donc été développées au laboratoire afin de stimuler les CSM par des facteurs biochimiques (comme les BMP-2) afin de favoriser la production osseuse (Decambon *et al.* 2017, Decambon *et al.* 2019). Là encore, seulement la moitié des défauts osseux guérissait, démontrant la nécessité de raffiner la technique avant son application en clinique. En parallèle, les travaux de recherche du B3OA investiguent des techniques permettant de développer un environnement favorable à la survie de CSM (Deschepper *et al.* 2013, Moya *et al.* 2017).

Ainsi, l'étude des effets de l'exercice sur les propriétés des CSM (et notamment prolifération, viabilité, différenciation ostéogénique et sécrétome comme initialement envisagé) s'inscrit parfaitement dans cette optique de stimulation et de conditionnement des CSM avant transplantation. Ainsi, pourrait être envisagée chez des personnes ne pouvant pratiquer une activité physique la transplantation des cytokines pro formation osseuse produites par les CSM issues d'individus pouvant la pratiquer.

Notre étude était limitée à l'évaluation de la guérison osseuse dans un défaut de taille non critique, afin d'évaluer les effets de l'exercice spécifiquement, et de s'affranchir des effets de la greffe nécessaire dans le traitement des défauts osseux de taille critique. Cette étude pourrait donc être répétée dans un premier temps dans un modèle de défaut osseux de taille critique afin d'évaluer les effets de l'exercice sur les capacités endogènes de guérison, avant l'éventuelle implantation de CSM.

Un autre axe de recherche est l'évaluation et la recherche de stratégies visant à compenser l'impact du diabète sur la réparation osseuse. La répétition de ce projet, en prenant comme sujets des rats diabétiques, permettrait d'évaluer des protocoles de course comme possible stratégie.

En conclusion, nos études ont montré que la course intermittente et la course continue avaient des effets variables et pouvant être opposés en fonction de la région osseuse considérée : la course continue aurait des effets bénéfiques sur l'os trabéculaire mais négatifs sur l'os cortical, alors que la course intermittente aurait des effets bénéfiques sur le cortex mais négatifs sur l'os trabéculaire. Les effets de la course intermittente dépendraient de l'os considéré. A intensité moyenne identique, les effets de la course intermittente se manifestent sur une plus courte durée de contraintes. De plus, en améliorant certains paramètres de la qualité osseuse, la pratique préventive de la course continue semble également favoriser la guérison osseuse.

Ainsi la qualité de la course plutôt que la quantité semble à privilégier afin d'améliorer la qualité osseuse et la combinaison des deux types de course pourrait être un bon compromis afin d'améliorer l'os dans sa globalité.

Toutefois, si la course intermittente favorise la guérison osseuse, au moins au même titre que la course continue (mais avec des contraintes de plus courte durée), reste à déterminer.

Bibliographie

Aguirre, J.I., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C. and Bellido, T. (2006) Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **21**, 605–615.

Ajubi, N.E., Klein-Nulend, J., Alblas, M.J., Burger, E.H. and Nijweide, P.J. (1999) Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE₂ production by cultured osteocytes. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **276**, E171–E178.

Aleksyniene, R. and Hvid, I. (2004) Parathyroid hormone--possible future drug for orthopedic surgery. *Med. Kaunas Lith.* **40**, 842–849.

Alele, J.D., Kamen, D.L., Hunt, K.J. and Ramsey-Goldman, R. (2011) Bone geometry profiles in women with and without SLE. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 2719–2726.

Alexandre, C. and Vico, L. (2011) Pathophysiology of bone loss in disuse osteoporosis. *Joint Bone Spine* **78**, 572–576.

Allen, M.R. and Burr, D.B. (2005) Human femoral neck has less cellular periosteum, and more mineralized periosteum, than femoral diaphyseal bone. *Bone* **36**, 311–316.

Allen, M.R., Hock, J.M. and Burr, D.B. (2004) Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* **35**, 1003–1012.

Anderson, H., Clarke (2005) The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci.* **10**, 822.

Anderson, J.J., Milin, L. and Crackel, W.C. (1971) Effect of exercise on mineral and organic bone turnover in swine. *J. Appl. Physiol.* **30**, 810–813.

Anderson, J.J.B. (2000) Exercise, Dietary Calcium, and Bone Gain in Girls and Young Adult Women. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1437–1439.

Angelis, K.D., Rodrigues, B., Zanesco, A., Oliveira, E.M. de, Evangelista, F. de S., Coelho Junior, H.J., et al. (2017) The importance of animal studies in Exercise Science. *Mot. Rev. Educ. Física* **23**.

Arahão, G.S., Shimano, A.C. and Picado, C.H.F. (2006) Effects of physical activity on the mechanical properties of osteopenic female rats' femurs and tibiae. *Acta Ortopédica Bras.* **14**, 242–245.

Arvidson, K., Abdallah, B.M., Applegate, L.A., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., et al. (2011) Bone regeneration and stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 718–746.

- Aubin, J. and Turksen, K. (1996) Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc. Res. Tech.* **128**–140.
- Bakker, A., Klein-Nulend, J. and Burger, E. (2004) Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1163–1168.
- Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M.T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G.F. and Bonucci, E. (1997) Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: Sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos. Int.* **7**, 39–43.
- Banase, X., Sims, T.J. and Bailey, A.J. (2002) Mechanical Properties of Adult Vertebral Cancellous Bone: Correlation With Collagen Intermolecular Cross-Links. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1621–1628.
- Barak, M.M., Weiner, S. and Shahar, R. (2010) The Contribution of Trabecular Bone to the Stiffness and Strength of Rat Lumbar Vertebrae: *Spine* **35**, E1153–E1159.
- Barengolts, E.I., Lathon, P.V., Curry, D.J. and Kukreja, S.C. (1994) Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner.* **26**, 133–140.
- Becquart, P., Cruel, M., Hoc, T., Sudre, L., Pernelle, K., Bizios, R., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H. and Bensidhoum, M. (2016) Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress. *Eur. Cell. Mater.* **31**, 160–173.
- Behonick, D.J., Xing, Z., Lieu, S., Buckley, J.M., Lotz, J.C., Marcucio, R.S., Werb, Z., Miclau, T. and Colnot, C. (2007) Role of Matrix Metalloproteinase 13 in Both Endochondral and Intramembranous Ossification during Skeletal Regeneration. *PLoS ONE* **2**, e1150.
- Biga, L.M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D. and Runyeon, J. (2019) 6.4 Bone Formation and Development. In: *Anatomy & Physiology*, OpenStax/Oregon State University.
- Billat, V., Slawinski, J., Bocquet, V., Demarle, A., Lafitte, L., Chassaing, P. and Koralsztein, J.-P. (2000) Intermittent runs at the velocity associated with maximal oxygen uptake enables subjects to remain at maximal oxygen uptake for a longer time than intense but submaximal runs. *Eur. J. Appl. Physiol.* **81**, 188–196.
- Birkhold, A.I., Razi, H., Duda, G.N., Weinkamer, R., Checa, S. and Willie, B.M. (2016) The Periosteal Bone Surface is Less Mechano-Responsive than the Endocortical. *Sci. Rep.* **6**, 23480.
- Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Sexton, P.M., Rochet, N. and Carle, G.F. (2004) Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* **18**, 1505–1511.
- Blizotes, M., McLoughlin, S., Gunness, M., Fumagalli, F., Jones, S.R. and Caron, M.G. (2000) Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter gene. *Bone* **26**, 15–19.

- Boivin, G. and Meunier, P.J. (2002) Changes in Bone Remodeling Rate Influence the Degree of Mineralization of Bone. *Connect. Tissue Res.* **43**, 535–537.
- Boivin, G.Y., Chavassieux, P.M., Santora, A.C., Yates, J. and Meunier, P.J. (2000) Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* **27**, 687–694.
- Bonewald, L.F. (2007) Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1116**, 281–290.
- Bonewald, L.F. (2011) The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 229–238.
- Bonewald, L.F. and Johnson, M.L. (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* **42**, 606–615.
- Bonfield, W. (1971) Mechanisms of deformation and fracture in bone. *Composites* **2**, 173–175.
- Bonnet, N., Beaupied, H., Vico, L., Dolleans, E., Laroche, N., Courteix, D. and Benhamou, CL. (2007) Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **22**, 578–588.
- Bonucci, E. (2002) Crystal ghosts and biological mineralization: fancy spectres in an old castle, or neglected structures worthy of belief? *J. Bone Miner. Metab.* **20**, 249–265.
- Borah, B., Dufresne, T.E., Chmielewski, P.A., Gross, G.J., Prenger, M.C. and Phipps, R.J. (2002) Risedronate Preserves Trabecular Architecture and Increases Bone Strength in Vertebra of Ovariectomized Minipigs as Measured by Three-Dimensional Microcomputed Tomography. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1139–1147.
- Borferie, D., Cherruau, B. and Ekindjian, O. (1997) Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse intérêt de leur détermination dans l'ostéoporose postménopausique. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* **12**, 24–28.
- Boskey, A.L. (2003) Bone mineral crystal size. *Osteoporos. Int.* **14**, 16–21.
- Bostrom, M.P.G., Lane, J.M., Berberian, W.S., Missri, A.A.E., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S.B., Glaser, D. and Rosen, V.M. (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop. Res.* **13**, 357–367.
- Bouassida, A., Latiri, I., Bouassida, S., Zalleg, D., Zaouali, M., Feki, Y., Gharbi, N., Zbidi, A. and Tabka, Z. (2006) Parathyroid hormone and physical exercise: a brief review. *J. Sports Sci. Med.* **5**, 367–374.
- Boudenot, A., Maurel, D.B., Pallu, S., Ingrand, I., Boisseau, N., Jaffré, C. and Portier, H. (2015) Quick benefits of interval training versus continuous training on bone: a dual-energy X-ray absorptiometry comparative study. *Int. J. Exp. Pathol.* **96**, 370–377.
- Boudenot, A., Presle, N., Uzbekov, R., Toumi, H., Pallu, S. and Lespessailles, E. (2014) Effect of interval-training exercise on subchondral bone in a chemically-induced osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 1176–1185.

- Bourrin, S., Genty, C., Palle, S., Gharib, C. and Alexandre, C. (1994) Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **76**, 1999–2005.
- Bourrin, S., Palle, S., Pupier, R., Vico, L. and Alexandre, C. (1995) Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **10**, 1745–1752.
- Bourzac, C., Bensidhoum, M., Pallu, S. and Portier, H. (2019) Use of adult mesenchymal stromal cells in tissue repair: impact of physical exercise. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **317**, C642–C654.
- Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldborg, R.E., Jepsen, K.J. and Müller, R. (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 1468–1486.
- Boyd, S.K., Davison, P., Müller, R. and Gasser, J.A. (2006) Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone* **39**, 854–862.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. and Lacey, D.L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342.
- Bronner, F. (1992) Bone and calcium homeostasis. *Neurotoxicology* **13**, 775–782.
- Burghardt, A.J., Kazakia, G.J., Ramachandran, S., Link, T.M. and Majumdar, S. (2009) Age and Gender Related Differences in the Geometric Properties and Biomechanical Significance of Intra-Cortical Porosity in the Distal Radius and Tibia. *J. Bone Miner. Res.* 091105035637074–32.
- Burr, D.B. and Akkus, O. (2014) Bone Morphology and Organization. In: *Basic and Applied Bone Biology*, Elsevier. pp 3–25.
- Butterfield, T.A., Leonard, T.R. and Herzog, W. (2005) Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. *J. Appl. Physiol.* **99**, 1352–1358.
- Cabral-Santos, C., Gerosa-Neto, J., Inoue, D.S., Panissa, V.L.G., Gobbo, L.A., Zagatto, A.M., Campos, E.Z. and Lira, F.S. (2015) Similar Anti-Inflammatory Acute Responses from Moderate-Intensity Continuous and High-Intensity Intermittent Exercise. *J. Sports Sci. Med.* **14**, 849–856.
- Caliaperoumal, G., Souyet, M., Bensidhoum, M., Petite, H. and Anagnostou, F. (2018) Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats. *Bone* **112**, 161–172.
- Caplan, A.I. and Correa, D. (2011) PDGF in bone formation and regeneration: New insights into a novel mechanism involving MSCs: MSCs, PERICYTES, VASCULATURE AND PDGF. *J. Orthop. Res.* **29**, 1795–1803.

- Center, J.R., Nguyen, T.V., Schneider, D., Sambrook, P.N. and Eisman, J.A. (1999) Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *The Lancet* **353**, 878–882.
- Chambers, T.J. (2010) The birth of the osteoclast: The birth of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 19–26.
- Chappard, C. (2012) Méthodes d'évaluation de la microarchitecture de l'os trabéculaire humain. *médecine/sciences* **28**, 1111–5.
- Chen, X., Aoki, H. and Fukui, Y. (2004) Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Biomed. Mater. Eng.* **14**, 53–59.
- Chen, Y., Wang, S., Bu, S., Wang, Y., Duan, Y. and Yang, S. (2011) Treadmill training prevents bone loss by inhibition of PPAR γ expression but not promoting of Runx2 expression in ovariectomized rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**, 1759–1767.
- Chennaoui, M., Drogou, C. and Gomez-Merino, D. (2008) Effects of physical training on IL-1 β , IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat. *Eur. Cytokine Netw.* **19**, 8–14.
- Chennaoui, M., Drogou, C., Gomez-Merino, D., Grimaldi, B., Fillion, G. and Guezennec, C.Y. (2001) Endurance training effects on 5-HT_{1B} receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci. Lett.* **307**, 33–36.
- Chow, J.W.M., Wilson, A.J., Chambers, T.J. and Fox, S.W. (1998) Mechanical Loading Stimulates Bone Formation by Reactivation of Bone Lining Cells in 13-Week-Old Rats. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 1760–1767.
- Christakos, S. (2002) Chapter 32: Vitamin D Gene Regulation. In: *Principles of Bone Biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 573–586.
- Clarke, B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **3 Suppl 3**, S131-139.
- Clarke, B.L. and Khosla, S. (2010) Physiology of Bone Loss. *Radiol. Clin. North Am.* **48**, 483–495.
- Colaianni, G., Cuscito, C., Mongelli, T., Pignataro, P., Buccoliero, C., Liu, P., et al. (2015) The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12157–12162.
- Cole, J.H. and van der Meulen, M.C.H. (2011) Whole bone mechanics and bone quality. *Clin. Orthop.* **469**, 2139–2149.
- Collett, G.D.M. and Canfield, A.E. (2005) Angiogenesis and Pericytes in the Initiation of Ectopic Calcification. *Circ. Res.* **96**, 930–938.
- Colnot, C. (2009) Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 274–282.

- Colnot, C., Lu, C., Hu, D. and Helms, J.A. (2004) Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev. Biol.* **269**, 55–69.
- Cooper, D.M.L., Kawalilak, C.E., Harrison, K., Johnston, B.D. and Johnston, J.D. (2016) Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr. Osteoporos. Rep.* **14**, 187–198.
- Court-Brown, C.M., Wood, A.M. and Aitken, S. (2008) The epidemiology of acute sports-related fractures in adults. *Injury* **39**, 1365–1372.
- Courtland, H.-W., Elis, S., Wu, Y., Sun, H., Rosen, C.J., Jepsen, K.J. and Yakar, S. (2011) Serum IGF-1 Affects Skeletal Acquisition in a Temporal and Compartment-Specific Manner. *PLoS ONE* **6**, e14762.
- Cummings, S.R., Browner, W., Cummings, S.R., Black, D.M., Nevitt, M.C., Browner, W., Genant, H.K., Cauley, J., Ensrud, K., Scott, J. and Vogt, T.M. (1993) Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *The Lancet* **341**, 72–75.
- Currey, J.D. (1990) Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone. *J. Biomech.* **23**, 837–844.
- Dallas, S.L. and Bonewald, L.F. (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 437–443.
- Daly, R.M., Duckham, R.L. and Gianoudis, J. (2014) Evidence for an interaction between exercise and nutrition for improving bone and muscle health. *Curr. Osteoporos. Rep.* **12**, 219–226.
- Daniels, J. and Scardina, N. (1984) Interval Training and Performance: *Sports Med.* **1**, 327–334.
- Das, A. and Botchwey, E. (2011) Evaluation of Angiogenesis and Osteogenesis. *Tissue Eng. Part B Rev.* **17**, 403–414.
- Davicco, M.J., Horcajada-Molteni, M.N., Gaumet-Meunier, N., Lebecque, P., Coxam, V. and Barlet, J.P. (1999) Endurance training and bone metabolism in middle-aged rats. *Mech. Ageing Dev.* **109**, 83–96.
- Day, T.F. and Yang, Y. (2008) Wnt and Hedgehog Signaling Pathways in Bone Development: *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.* **90**, 19–24.
- Decambon, A., Devriendt, N., Larochette, N., Manassero, M., Bourguignon, M., El-Hafci, H., Petite, H., Viateau, V. and Logeart-Avramoglou, D. (2019) Effect of the Bone Morphogenetic Protein-2 Doses on the Osteogenic Potential of Human Multipotent Stromal Cells- Containing Tissue Engineered Constructs. *Tissue Eng. Part A* **25**, 642–651.
- Decambon, A., Manassero, M., Bensidhoum, M., Lecuelle, B., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H. and Viateau, V. (2017) A comparative study of tissue-engineered constructs from *Acropora* and *Porites* coral in a large animal bone defect model. *Bone Jt. Res.* **6**, 208–215.

- Deschepper, M., Manassero, M., Oudina, K., Paquet, J., Monfoulet, L.-E., Bensidhoum, M., Logeart-Avrarmoglou, D. and Petite, H. (2013) Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells upon Transplantation. *STEM CELLS* **31**, 526–535.
- Dodd, J.S., Raleigh, J.A. and Gross, T.S. (1999) Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **277**, C598–C602.
- Doyle, M.E. and Jan de Beur, S.M. (2008) The skeleton: Endocrine regulator of phosphate homeostasis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **6**, 134–141.
- Driessler, F. and Baldock, P.A. (2010) Hypothalamic regulation of bone. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 175–181.
- Duchamp de Lageneste, O., Julien, A., Abou-Khalil, R., Frangi, G., Carvalho, C., Cagnard, N., Cordier, C., Conway, S.J. and Colnot, C. (2018) Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat. Commun.* **9**, 773.
- Ducy, P. (2011) The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* **54**, 1291–1297.
- Ducy, P. and Karsenty, G. (2010) The two faces of serotonin in bone biology. *J. Cell Biol.* **191**, 7–13.
- Dunstan, C.R., Somers, N.M. and Evans, R.A. (1993) Osteocyte death and hip fracture. *Calcif. Tissue Int.* **53**, S113–S117.
- Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y. and Nagasawa, T. (2001) The Earliest Stages of B Cell Development Require a Chemokine Stromal Cell-Derived Factor/Pre-B Cell Growth-Stimulating Factor. *Immunity* **15**, 323–334.
- Ejersted, C., Andreassen, T.T., Oxlund, H., Jørgensen, P.H., Bak, B., Häggblad, J., Tørring, O. and Nilsson, M.H.L. (2009) Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 1097–1101.
- Elefteriou, F. (2005) Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2339–2349.
- Elefteriou, F. (2018) Impact of the Autonomic Nervous System on the Skeleton. *Physiol. Rev.* **98**, 1083–1112.
- Emerton, K.B., Hu, B., Woo, A.A., Sinofsky, A., Hernandez, C., Majeska, R.J., Jepsen, K.J. and Schaffler, M.B. (2010) Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone* **46**, 577–583.
- Fang, J., Gao, J., Gong, H., Zhang, T., Zhang, R. and Zhan, B. (2019) Multiscale experimental study on the effects of different weight-bearing levels during moderate treadmill exercise on bone quality in growing female rats. *Biomed. Eng. Online* **18**, 33.

- Fields, A.J., Eswaran, S.K., Jekir, M.G. and Keaveny, T.M. (2009) Role of Trabecular Microarchitecture in Whole-Vertebral Body Biomechanical Behavior. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1523–1530.
- Firth, E.C. (2006) The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. *J. Anat.* **208**, 513–526.
- Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C. and Meunier, P.J. (2004) The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* **34**, 783–789.
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J.A. and Duarte, J.A. (2014) Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med. Auckl. NZ* **44**, 37–53.
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Vaz, M., Fernandes, M.H., Ferreira, R., Amado, F., Mota, M.P. and Duarte, J.A. (2012) Changes in proximal femur bone properties following ovariectomy and their association with resistance to fracture. *J. Bone Miner. Metab.* **30**, 281–292.
- Fratzl, P., Gupta, H.S., Paschalis, E.P. and Roschger, P. (2004) Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* **14**, 2115–2123.
- Frost, H.M. (1987) Bone ‘mass’ and the ‘mechanostat’: A proposal. *Anat. Rec.* **219**, 1–9.
- Fuchs, R.K., Bauer, J.J. and Snow, C.M. (2001) Jumping Improves Hip and Lumbar Spine Bone Mass in Prepubescent Children: A Randomized Controlled Trial. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 148–156.
- Fulzele, K., Riddle, R.C., DiGirolamo, D.J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., Faugere, M.-C., Aja, S., Hussain, M.A., Brüning, J.C. and Clemens, T.L. (2010) Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell* **142**, 309–319.
- Funck-Brentano, T. and Cohen-Solal, M. (2010) Le vieillissement osseux : les nouveaux acteurs de communication intercellulaire. *Médecine Longévité* **2**, 200–204.
- Gaines Das, R. and North, D. (2007) Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab. Anim.* **41**, 312–320.
- Galli, C., Passeri, G. and Macaluso, G.M. (2010) Osteocytes and WNT: the Mechanical Control of Bone Formation. *J. Dent. Res.* **89**, 331–343.
- Galson, DL. and Goldring, SR. (2002) Chapter 34: Structure and molecular biology of calcitonin receptor. In: *Principles of bone biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 603–617.
- Gao, J., Fang, J., Gong, H. and Gao, B. (2017) Morphological and Microstructural Alterations of the Articular Cartilage and Bones during Treadmill Exercises with Different Additional Weight-Bearing Levels. *J. Healthc. Eng.* **2017**, 1–8.

- Gardinier, J.D., Mohamed, F. and Kohn, D.H. (2015) PTH Signaling During Exercise Contributes to Bone Adaptation. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 1053–1063.
- Gardinier, J.D., Rostami, N., Juliano, L. and Zhang, C. (2018) Bone adaptation in response to treadmill exercise in young and adult mice. *Bone Rep.* **8**, 29–37.
- Gentili, C. and Cancedda, R. (2009) Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1334–1348.
- Gerstenfeld, L.C., Cullinane, D.M., Barnes, G.L., Graves, D.T. and Einhorn, T.A. (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* **88**, 873–884.
- Ghiasi, M.S., Chen, J.E., Rodriguez, E.K., Vaziri, A. and Nazarian, A. (2019) Computational modeling of human bone fracture healing affected by different conditions of initial healing stage. *BMC Musculoskelet. Disord.* **20**, 562.
- Gimble, J.M., Zvonic, S., Floyd, Z.E., Kassem, M. and Nuttall, M.E. (2006) Playing with bone and fat. *J. Cell. Biochem.* **98**, 251–266.
- Glimcher, M.J. (1989) Mechanism of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat. Rec.* **224**, 139–153.
- Golub, E.E. (2009) Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1790**, 1592–1598.
- Gross, T.S., Poliachik, S.L., Ausk, B.J., Sanford, D.A., Becker, B.A. and Srinivasan, S. (2004) Why rest stimulates bone formation: a hypothesis based on complex adaptive phenomenon. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **32**, 9–13.
- Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T.A. and Väänänen, H.K. (2005) Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 1095–1101.
- Guerino, M.R., Luciano, E., Goncalves, M. and Leivas, T.P. (1999) Effects of chronic physical activity and of ultrasound treatment on bone consolidation. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **31**, 131–138.
- Guiraud, T., Juneau, M., Nigam, A., Gayda, M., Meyer, P., Mekary, S., Paillard, F. and Bosquet, L. (2010) Optimization of high intensity interval exercise in coronary heart disease. *Eur. J. Appl. Physiol.* **108**, 733–740.
- Hagihara, Y., Fukuda, S., Goto, S., Iida, H., Yamazaki, M. and Moriya, H. (2005) How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *J. Bone Miner. Metab.* **23**, 289–294.
- Hagihara, Y., Nakajima, A., Fukuda, S., Goto, S., Iida, H. and Yamazaki, M. (2009) Running exercise for short duration increases bone mineral density of loaded long bones in young growing rats. *Tohoku J. Exp. Med.* **219**, 139–143.

Hamann, N., Kohler, T., Müller, R., Brüggemann, G.-P. and Niehoff, A. (2012) The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif. Tissue Int.* **90**, 429–437.

Hamrick, M.W. (2012) The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle–bone crosstalk. *BoneKEy Rep.* **1**.

Hao, Y., Ma, Y., Wang, X., Jin, F. and Ge, S. (2012) Short-term muscle atrophy caused by botulinum toxin-A local injection impairs fracture healing in the rat femur: MUSCLE ATROPHY IMPAIRS FRACTURE HEALING. *J. Orthop. Res.* **30**, 574–580.

Haram, P.M., Kemi, O.J., Lee, S.J., Bendheim, M.O., Al-Share, Q.Y., Waldum, H.L., Gilligan, L.J., Koch, L.G., Britton, S.L., Najjar, S.M. and Wisloff, U. (2008) Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc. Res.* **81**, 723–732.

Harry, L.E., Sandison, A., Paleolog, E.M., Hansen, U., Pearse, M.F. and Nanchahal, J. (2008) Comparison of the healing of open tibial fractures covered with either muscle or fasciocutaneous tissue in a murine model. *J. Orthop. Res.* **26**, 1238–1244.

Heikkinen, E., Vihersaari, T. and Penttinen, R. (1974) Effect of Previous Exercise on Fracture Healing: A Biochemical Study with Mice. *Acta Orthop. Scand.* **45**, 481–489.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., et al. (2002) Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell* **109**, 625–637.

Henry, J.C., Cooper, S.R., Freeman, D.W. and Kropp, J.R. (2003) Effects of Exercise on Bone Metabolism in Yearling Horses¹Approved for publication by the director, Oklahoma Agriculture Experiment Station. *Prof. Anim. Sci.* **19**, 435–438.

Hildebrand, T. and Rüegsegger, P. (1997) Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **1**, 15–23.

Hing, K.A. (2004) Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Eng. Sci.* **362**, 2821–2850.

Hodge, J.M., Collier, F.M., Pavlos, N.J., Kirkland, M.A. and Nicholson, G.C. (2011) M-CSF Potently Augments RANKL-Induced Resorption Activation in Mature Human Osteoclasts. *PLoS ONE* **6**, e21462.

Hoerth, R.M., Seidt, B.M., Shah, M., Schwarz, C., Willie, B.M., Duda, G.N., Fratzl, P. and Wagermaier, W. (2014) Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* **10**, 4009–4019.

Hollinger, J.O. and Kleinschmidt, J.C. (1990) The Critical Size Defect as an Experimental Model To Test Bone Repair Materials: *J. Craniofac. Surg.* **1**, 60–68.

Holy, X. and Zérath, E. (2000) Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 1562–1569.

- Hou, J.C., Salem, G.J., Zernicke, R.F. and Barnard, R.J. (1990) Structural and mechanical adaptations of immature trabecular bone to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* **69**, 1309–1314.
- Huang, T.-H., Chang, F.-L., Lin, S.-C., Liu, S.-H., Hsieh, S.S. and Yang, R.-S. (2008) Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J. Bone Miner. Metab.* **26**, 350–357.
- Huang, T.H., Yang, R.S., Hsieh, S.S. and Liu, S.H. (2002) Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone* **30**, 293–299.
- Hulsart-Billström, G., Bergman, K., Andersson, B., Hilborn, J., Larsson, S. and Jonsson, K.B. (2015) A uni-cortical femoral defect model in the rat: evaluation using injectable hyaluronan hydrogel as a carrier for bone morphogenetic protein-2: Bone regeneration in a uni-cortical rat femoral defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 799–807.
- Hunt, T.K. (1984) Can repair processes be stimulated by modulators (cell growth factors, angiogenic factors, etc.) without adversely affecting normal processes? *J. Trauma* **24**, S39–49.
- Iijima, H., Aoyama, T., Ito, A., Yamaguchi, S., Nagai, M., Tajino, J., Zhang, X. and Kuroki, H. (2015) Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 1563–1574.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M. and Rauvala, H. (1998) Osteoblast Recruitment and Bone Formation Enhanced by Cell Matrix-associated Heparin-binding Growth-associated Molecule (HB-GAM). *J. Cell Biol.* **143**, 1113–1128.
- médicale (Inserm), I. national de la santé et de la recherche (2008) *Activité physique : Contextes et effets sur la santé*. Les éditions Inserm.
- Isales, C.M., Zaidi, M. and Blair, H.C. (2010) ACTH is a novel regulator of bone mass: ACTH and bone mass. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 110–116.
- Ishida, H., Bellows, C.G., Aubin, J.E. and Heersche, J.N.M. (1995) Tri-iodothyronine (T3) and dexamethasone interact to modulate osteoprogenitor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone* **16**, 545–549.
- Iwamoto, J., Shimamura, C., Takeda, T., Abe, H., Ichimura, S., Sato, Y. and Toyama, Y. (2004) Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J. Bone Miner. Metab.* **22**, 26–31.
- Iwamoto, J., Takeda, T. and Sato, Y. (2005) Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp. Anim.* **54**, 1–6.
- Iwamoto, J., Yeh, J.K. and Aloia, J.F. (1999) Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* **24**, 163–169.

Iwaniec, U.T. and Turner, R.T. (2013) Animal Models for Osteoporosis. In: *Osteoporosis*, Elsevier. pp 939–961.

Jähn, K., Lara-Castillo, N., Brotto, L., Mo, C.L., Johnson, M.L., Brotto, M. and Bonewald, L.F. (2012) Skeletal muscle secreted factors prevent glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis through activation of β -catenin. *Eur. Cell. Mater.* **24**, 197–209; discussion 209–210.

Järvinen, T.L.N., Kannus, P., Pajamäki, I., Vuohelainen, T., Tuukkanen, J., Järvinen, M. and Sievänen, H. (2003) Estrogen deposits extra mineral into bones of female rats in puberty, but simultaneously seems to suppress the responsiveness of female skeleton to mechanical loading. *Bone* **32**, 642–651.

Joo, Y.-I., Sone, T., Fukunaga, M., Lim, S.-G. and Onodera, S. (2003) Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* **33**, 485–493.

Kamel, M.A., Picconi, J.L., Lara-Castillo, N. and Johnson, M.L. (2010) Activation of β -catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE2: Implications for the study of mechanosensation in bone. *Bone* **47**, 872–881.

Karaplis, A.C. (2002) Chapter 3: Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: *Principles of bone biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 33–58.

Kasper, G., Dankert, N., Tuischer, J., Hoeft, M., Gaber, T., Glaeser, J.D., Zander, D., Tschirschmann, M., Thompson, M., Matziolis, G. and Duda, G.N. (2007) Mesenchymal Stem Cells Regulate Angiogenesis According to Their Mechanical Environment. *Stem Cells* **25**, 903–910.

Kawano, Y. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627–2634.

Keating, J.F., Simpson, A.H.R.W. and Robinson, C.M. (2005) The management of fractures with bone loss. *J. Bone Joint Surg. Br.* **87-B**, 142–150.

Khosla, S., Atkinson, E.J., Melton, L.J. and Riggs, B.L. (1997) Effects of Age and Estrogen Status on Serum Parathyroid Hormone Levels and Biochemical Markers of Bone Turnover in Women: A Population-Based Study¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1522–1527.

Klein-Nulend, J., Bacabac, R.G. and Mullender, M.G. (2005) Mechanobiology of bone tissue. *Pathol. Biol.* **53**, 576–580.

Kobayashi, Y., Maeda, K. and Takahashi, N. (2008) Roles of Wnt signaling in bone formation and resorption. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **44**, 76–82.

Kodama, H., Yamasaki, A., Abe, M., Niida, S., Hakeda, Y. and Kawashima, H. (1993) Transient recruitment of osteoclasts and expression of their function in osteopetrotic

(op/op) mice by a single injection of macrophage colony-stimulating factor. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 45–50.

Kogianni, G., Mann, V. and Noble, B.S. (2008) Apoptotic Bodies Convey Activity Capable of Initiating Osteoclastogenesis and Localized Bone Destruction. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 915–927.

Kohrt, W.M., Wherry, S.J., Wolfe, P., Sherk, V.D., Wellington, T., Swanson, C.M., Weaver, C.M. and Boxer, R.S. (2018) Maintenance of Serum Ionized Calcium During Exercise Attenuates Parathyroid Hormone and Bone Resorption Responses: calcium clamp during exercise. *J. Bone Miner. Res.* **33**, 1326–1334.

Koistinen, A.P., Halmesmäki, E.P., Iivarinen, J.T., Arokoski, J.P.A., Brama, P.A.J., Jurvelin, J.S., Helminen, H.J. and Isaksson, H. (2014) Short-term exercise-induced improvements in bone properties are for the most part not maintained during aging in hamsters. *Exp. Gerontol.* **51**, 46–53.

Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., et al. (2006) Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.* **12**, 657–664.

Kosmacheva, S.M., Volk, M.V., Yeustratenka, T.A., Severin, I.N. and Potapnev, M.P. (2008) In vitro growth of human umbilical blood mesenchymal stem cells and their differentiation into chondrocytes and osteoblasts. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145**, 141–145.

Kream, B.E. and Luckert, B.P. (2002) Chapter 41: Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. In: *Principles of bone biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 723–740.

Krings, A., Rahman, S., Huang, S., Lu, Y., Czernik, P.J. and Lecka-Czernik, B. (2012) Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* **50**, 546–552.

Kubek, D.J., Gattone, V.H. and Allen, M.R. (2009) Methodological assessment of acid-etching for visualizing the osteocyte lacunar-canalicular networks using scanning electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* NA-NA.

Kular, J., Tickner, J., Chim, S.M. and Xu, J. (2012) An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin. Biochem.* **45**, 863–873.

Kurata, K., Heino, T.J., Higaki, H. and Väänänen, H.K. (2006) Bone Marrow Cell Differentiation Induced by Mechanically Damaged Osteocytes in 3D Gel-Embedded Culture. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 616–625.

Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D. and Fortun, Y. (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 49–60.

Laib, A., Kumer, J.L., Majumdar, S. and Lane, N.E. (2001) The Temporal Changes of Trabecular Architecture in Ovariectomized Rats Assessed by MicroCT. *Osteoporos. Int.* **12**, 936–941.

- Lane, J.M., Serota, A.C. and Raphael, B. (2006) Osteoporosis: differences and similarities in male and female patients. *Orthop. Clin. North Am.* **37**, 601–609.
- Larriera, A.I., Palacio-Mancheno, P.E., Cardoso, L. and Fritton, S.P. (2011) Accurate quantification of cortical bone porosity using high-resolution micro-CT.
- Lavorato, V.N., Del Carlo, R.J., da Cunha, D.N.Q., Okano, B.S., Belfort, F.G., de Freitas, J.S., et al. (2016) Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **90**, 111–119.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., et al. (2007) Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* **130**, 456–469.
- Legrand, E., Chappard, D., Pascaretti, C., Duquenne, M., Krebs, S., Rohmer, V., Basle, M.-F. and Audran, M. (2000) Trabecular Bone Microarchitecture, Bone Mineral Density, and Vertebral Fractures in Male Osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 13–19.
- Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E., Lyritis, G.P. and Dontas, I.A. (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp. Med.* **58**, 424–430.
- Leppänen, O.V., Sievänen, H., Jokihäärä, J., Pajamäki, I., Kannus, P. and Järvinen, T.L.N. (2008) Pathogenesis of age-related osteoporosis: impaired mechano-responsiveness of bone is not the culprit. *PLoS One* **3**, e2540.
- Lerner, U.H. (2002) Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2**, 440–447.
- Li, H., Li, D., Ma, Z., Qian, Z., Kang, X., Jin, X., Li, F., Wang, X., Chen, Q., Sun, H. and Wu, S. (2018) Defective autophagy in osteoblasts induces endoplasmic reticulum stress and causes remarkable bone loss. *Autophagy* **14**, 1726–1741.
- Li, J., Kacena, M.A. and Stocum, D.L. (2019) Fracture Healing. In: *Basic and Applied Bone Biology*, Elsevier. pp 235–253.
- Li, K.C., Zernicke, R.F., Barnard, R.J. and Li, A.F. (1991) Differential response of rat limb bones to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.* **70**, 554–560.
- Liebschner, M.A.K. (2004) Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* **25**, 1697–1714.
- Liebschner, M.A.K. and Keller, T.S. (2005) Hydraulic Strengthening Affects the Stiffness and Strength of Cortical Bone. *Ann. Biomed. Eng.* **33**, 26–38.
- Lieu, S., Hansen, E., Dedini, R., Behonick, D., Werb, Z., Micalau, T., Marcucio, R. and Colnot, C. (2011) Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis. Model. Mech.* **4**, 203–211.
- Likibi, F., Assad, M., Coillard, C., Chabot, G. and Rivard, C.-H. (2005) [Bone integration and apposition of porous and non porous metallic orthopaedic biomaterials]. *Ann. Chir.* **130**, 235–241.

- Lindholm, C., Hirschberg, A.L., Carlström, K. and von Schoultz, B. (1993) Hormone Anabolic/Catabolic Balance in Female Endurance Athletes. *Gynecol. Obstet. Invest.* **36**, 176–180.
- Liu, C., Zhao, Y., Cheung, W.-Y., Gandhi, R., Wang, L. and You, L. (2010) Effects of cyclic hydraulic pressure on osteocytes. *Bone* **46**, 1449–1456.
- Liu, D., Jiang, L.-S. and Dai, L.-Y. (2007) Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides* **41**, 271–283.
- Liu, Z., Gao, J. and Gong, H. (2019) Effects of treadmill with different intensities on bone quality and muscle properties in adult rats. *Biomed. Eng. OnLine* **18**, 107.
- Lopez, M.J. (2019) Chapter 75: Bone biology and fracture healing. In: *Equine surgery*, 5th ed., Eds.: J.A. Auer, J.A. Stick, J.M. Kümmerle and T. Prange, Elsevier, Inc., Saint Louis, MO. pp 1255–1269.
- Lu, C., Saless, N., Hu, D., Wang, X., Xing, Z., Hou, H., Williams, B., Swartz, H.M., Colnot, C., Miclau, T. and Marcucio, R.S. (2011) Mechanical stability affects angiogenesis during early fracture healing. *J. Orthop. Trauma* **25**, 494–499.
- Ma, Y.L., Cain, R.L., Halladay, D.L., Yang, X., Zeng, Q., Miles, R.R., Chandrasekhar, S., Martin, T.J. and Onyia, J.E. (2001) Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. *Endocrinology* **142**, 4047–4054.
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G. and Kronenberg, H.M. (2010) Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev. Cell* **19**, 329–344.
- Malhan, D., Muelke, M., Rosch, S., Schaefer, A.B., Merboth, F., Weisweiler, D., Heiss, C., Arganda-Carreras, I. and El Khassawna, T. (2018) An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. *Front. Endocrinol.* **9**, 666.
- Marcus, R. (2002) Chapter 86: Mechanisms of Exercise Effects on Bone. In: *Principles of Bone Biology*, Elsevier. pp 1477–1488.
- Marie, P.J. (2012) Signaling Pathways Affecting Skeletal Health. *Curr. Osteoporos. Rep.* **10**, 190–198.
- Marks, S. and Hermey, D. (1996) Chapter 1: The structure and development of bone. In: *Principles of bone biology*, 1st ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 3–34.
- Marks, S. and Odgren, P. (2002) Chapter 1: Structure and Development of the Skeleton. In: *Principles of Bone Biology*, 2nd ed., Elsevier. pp 3–15.
- Marotti, G., Ferretti, M., Remaggi, F. and Palumbo, C. (1995) Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone* **16**, 125–128.

- Marques, E.A., Mota, J. and Carvalho, J. (2012) Exercise effects on bone mineral density in older adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Age Dordr. Neth.* **34**, 1493–1515.
- Marsell, R. and Einhorn, T.A. (2011) The biology of fracture healing. *Injury* **42**, 551–555.
- Martin, E. and Shapiro, J.R. (2007) Osteogenesis imperfecta: Epidemiology and pathophysiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* **5**, 91–97.
- Martin, R.B. and Ishida, J. (1989) The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *J. Biomech.* **22**, 419–426.
- Martin, T.J. and Ng, K.W. (1994) Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J. Cell. Biochem.* **56**, 357–366.
- Mashiba, T., Turner, C.H., Hirano, T., Forwood, M.R., Johnston, C.C. and Burr, D.B. (2001) Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* **28**, 524–531.
- Maurel, D.B., Boisseau, N., Pallu, S., Rochefort, G.Y., Benhamou, C.-L. and Jaffre, C. (2013) Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **80**, 492–498.
- Maurel, D.B., Jaffre, C., Rochefort, G.Y., Aveline, P.C., Boisseau, N., Uzbekov, R., Gosset, D., Pichon, C., Fazzalari, N.L., Pallu, S. and Benhamou, C.L. (2011) Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. *Bone* **49**, 543–552.
- McCance, R.A. (1957) THE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF BONE. Edited by Geoffrey H. Bourne. London: Academic Books Ltd. Pp. 875. \$20; 143s. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **42**, 148–148.
- Melton, L.J., Atkinson, E.J., O’Fallon, W.M., Wahner, H.W. and Riggs, B.L. (2009) Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 1227–1233.
- Mera, P., Ferron, M. and Mosialou, I. (2018) Regulation of Energy Metabolism by Bone-Derived Hormones. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a031666.
- van der Meulen, M.C.H., Yang, X., Morgan, T.G. and Bostrom, M.P.G. (2009) The Effects of Loading on Cancellous Bone in the Rabbit. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **467**, 2000–2006.
- Miller, J.P., Izon, D., DeMuth, W., Gerstein, R., Bhandoola, A. and Allman, D. (2002) The Earliest Step in B Lineage Differentiation from Common Lymphoid Progenitors Is Critically Dependent upon Interleukin 7. *J. Exp. Med.* **196**, 705–711.
- Misra, M. and Klibanski, A. (2011) The neuroendocrine basis of anorexia nervosa and its impact on bone metabolism. *Neuroendocrinology* **93**, 65–73.
- Morgan, E.F., Unnikrisnan, G.U. and Hussein, A.I. (2018) Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **20**, 119–143.

- Moriishi, T., Fukuyama, R., Ito, M., Miyazaki, T., Maeno, T., Kawai, Y., Komori, H. and Komori, T. (2012) Osteocyte Network; a Negative Regulatory System for Bone Mass Augmented by the Induction of Rankl in Osteoblasts and Sost in Osteocytes at Unloading. *PLoS ONE* **7**, e40143.
- Mosialou, I., Shikhel, S., Liu, J.-M., Maurizi, A., Luo, N., He, Z., et al. (2017) MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. *Nature* **543**, 385–390.
- Moya, A., Larochette, N., Paquet, J., Deschepper, M., Bensidhoum, M., Izzo, V., Kroemer, G., Petite, H. and Logeart-Avramoglou, D. (2017) Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia: Quiescence Preconditioning Enhances hMSC Survival. *STEM CELLS* **35**, 181–196.
- Moyer, R., Ikert, K., Long, K. and Marsh, J. (2017) The Value of Preoperative Exercise and Education for Patients Undergoing Total Hip and Knee Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JBJS Rev.* **5**, e2.
- Musumeci, G., Loreto, C., Leonardi, R., Castorina, S., Giunta, S., Carnazza, M.L., Trovato, F.M., Pichler, K. and Weinberg, A.M. (2013) The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* **31**, 274–284.
- Nabeshima, Y. (2008) The discovery of α -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3218–3230.
- Nakajima, D., Kim, C.S., Oh, T.W., Yang, C.Y., Naka, T., Igawa, S. and Ohta, F. (2001) Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.* **20**, 285–291.
- Nakamura, T., Turner, C.H., Yoshikawa, T., Slemenda, C.W., Peacock, M., Burr, D.B., Mizuno, Y., Orimo, H., Ouchi, Y. and Johnston, C.C. (2009) Do variations in hip geometry explain differences in hip fracture risk between japanese and white americans? *J. Bone Miner. Res.* **9**, 1071–1076.
- Nanes, M.S. (2003) Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* **321**, 1–15.
- Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z. and Watson, J.T. (2018) Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J. Orthop. Trauma* **32**, S7–S11.
- Nicks, K.M., Amin, S., Atkinson, E.J., Riggs, B.L., Melton, L.J. and Khosla, S. (2012) Relationship of age to bone microstructure independent of areal bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 637–644.
- Nicolella, D.P., Moravits, D.E., Gale, A.M., Bonewald, L.F. and Lankford, J. (2006) Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *J. Biomech.* **39**, 1735–1743.
- Nogueira, J.E., Branco, L.G.S. and Issa, J.P.M. (2016) Bone repair: Effects of physical exercise and LPS systemic exposition. *Injury* **47**, 1828–1834.

- Nollet, M., Santucci-Darmanin, S., Breuil, V., Al-Sahlanee, R., Cros, C., Topi, M., et al. (2014) Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy* **10**, 1965–1977.
- Notomi, T., Karasaki, I., Okazaki, Y., Okimoto, N., Kato, Y., Ohura, K., Noda, M., Nakamura, T. and Suzuki, M. (2014) Insulinogenic sucrose+amino acid mixture ingestion immediately after resistance exercise has an anabolic effect on bone compared with non-insulinogenic fructose+amino acid mixture in growing rats. *Bone* **65**, 42–48.
- Notomi, T., Okazaki, Y., Okimoto, N., Saitoh, S., Nakamura, T. and Suzuki, M. (2000) A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **83**, 469–474.
- Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A.H., Cicogna, A.C. and Novelli Filho, J.L.V.B. (2007) Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* **41**, 111–119.
- Nunamaker, D.M. (1998) Experimental Models of Fracture Repair: *Clin. Orthop.* **355S**, S56–S65.
- Nyman, J.S., Roy, A., Shen, X., Acuna, R.L., Tyler, J.H. and Wang, X. (2006) The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *J. Biomech.* **39**, 931–938.
- Obri, A., Khrimian, L., Karsenty, G. and Oury, F. (2018) Osteocalcin in the brain: from embryonic development to age-related decline in cognition. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 174–182.
- O’Brien, C.A., Jia, D., Plotkin, L.I., Bellido, T., Powers, C.C., Stewart, S.A., Manolagas, S.C. and Weinstein, R.S. (2004) Glucocorticoids Act Directly on Osteoblasts and Osteocytes to Induce Their Apoptosis and Reduce Bone Formation and Strength. *Endocrinology* **145**, 1835–1841.
- Odgren, P.R., Witwicka, H. and Reyes-Gutierrez, P. (2016) The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connect. Tissue Res.* **57**, 161–174.
- Oetgen, M.E., Merrell, G.A., Troiano, N.W., Horowitz, M.C. and Kacena, M.A. (2008) Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* **39**, 1119–1126.
- Olive, J., d’Anjou, M.-A., Alexander, K., Beauchamp, G. and Theoret, C.L. (2010) Correlation of signal attenuation–based quantitative magnetic resonance imaging with quantitative computed tomographic measurements of subchondral bone mineral density in metacarpophalangeal joints of horses. *Am. J. Vet. Res.* **71**, 412–420.
- Organisation mondiale de la Santé Stratégie mondiale pour l’alimentation, l’exercice physique et la santé. *Organ. Mondaile Santé* .
<https://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/fr/>. Accessed October 14, 2020
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D. and Werb, Z. (2003) How Proteases Regulate Bone Morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **995**, 109–116.

Ott, S.M. (2002) Chapter19: Histomorphometric analysis of bone remodeling. In: *Principles of bone biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 303–320.

Oury, F., Khrimian, L., Denny, C.A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., et al. (2013) Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell* **155**, 228–241.

Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P. and Karsenty, G. (2011) Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell* **144**, 796–809.

Oxlund, H., Barckman, M., Ørtoft, G. and Andreassen, T.T. (1995) Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* **17**, S365–S371.

Pagnotti, G.M., Styner, M., Uzer, G., Patel, V.S., Wright, L.E., Ness, K.K., Guise, T.A., Rubin, J. and Rubin, C.T. (2019) Combating osteoporosis and obesity with exercise: leveraging cell mechanosensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 339–355.

Pajamäki, I., Kannus, P., Vuohelainen, T., Sievänen, H., Tuukkanen, J., Järvinen, M. and Järvinen, T.L.N. (2003) The bone gain induced by exercise in puberty is not preserved through a virtually life-long deconditioning: a randomized controlled experimental study in male rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **18**, 544–552.

Palacio-Manchero, P.E., Larriera, A.I., Doty, S.B., Cardoso, L. and Fritton, S.P. (2014) 3D Assessment of Cortical Bone Porosity and Tissue Mineral Density Using High-Resolution μ CT: Effects of Resolution and Threshold Method. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 142–150.

Papapoulos, S.E. (2011) Targeting sclerostin as potential treatment of osteoporosis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, i119–i122.

Parfitt, A.M. (1987) Bone and plasma calcium homeostasis. *Bone* **8 Suppl 1**, S1-8.

Pazzaglia, U.E., Bonaspetti, G., Rodella, L.F., Ranchetti, F. and Azzola, F. (2007) Design, morphometry and development of the secondary osteonal system in the femoral shaft of the rabbit. *J. Anat.* **211**, 303–312.

Pearce, A., Richards, R., Milz, S., Schneider, E. and Pearce, S. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur. Cell. Mater.* **13**, 1–10.

Pedersen, B.K. (2011) Muscles and their myokines. *J. Exp. Biol.* **214**, 337–346.

Peng, Z., Tuukkanen, J. and Väänänen, H.K. (1994) Exercise can provide protection against bone loss and prevent the decrease in mechanical strength of femoral neck in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **9**, 1559–1564.

Phillips, A.M. (2005) Overview of the fracture healing cascade. *Injury* **36**, S5–S7.

Pneumaticos, S.G., Triantafyllopoulos, G.K., Basdra, E.K. and Papavassiliou, A.G. (2010) Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2561–2569.

- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Hérault, O., Charbord, P. and Domenech, J. (2007) The In Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities. *Stem Cells* **25**, 1737–1745.
- Poole, K.E.S., Van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W. and Reeve, J. (2005) Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* **19**, 1842–1844.
- Portier, H., Benaitreau, D. and Pallu, S. (2020) Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life* **10**, 217.
- Qin, Y.-X. and Hu, M. (2014) Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–12.
- Raggatt, L.J. and Partridge, N.C. (2010) Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.* **285**, 25103–25108.
- Rath Bonivtch, A., Bonewald, L.F. and Nicoletta, D.P. (2007) Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: A microstructural finite element analysis. *J. Biomech.* **40**, 2199–2206.
- Razi, H., Birkhold, A.I., Weinkamer, R., Duda, G.N., Willie, B.M. and Checa, S. (2015) Aging Leads to a Dysregulation in Mechanically Driven Bone Formation and Resorption: MECHANOREGULATION OF (RE)MODELING. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 1864–1873.
- Recker, R.R. and Barger-Lux, M.J. (2004) The elusive concept of bone quality. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2**, 97–100.
- Reginster, J.-Y. and Burlet, N. (2006) Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* **38**, S4-9.
- Reid, I.R. (2010) Fat and bone. *Arch. Biochem. Biophys.* **503**, 20–27.
- van der Rest, M. and Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **5**, 2814–2823.
- Rico, H., Aznar, L., Hernández, E.R., Seco, C., Sanchez-Atrio, A., Villa, L.F. and Gervas, J.J. (1999a) Effects of potassium bicarbonate supplementation on axial and peripheral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *Calcif. Tissue Int.* **65**, 242–245.
- Rico, H., Aznar, L., Hernández, E.R., Seco, C., Sanchez-Atrio, A., Villa, L.F. and Gervas, J.J. (1999b) Effects of potassium bicarbonate supplementation on axial and peripheral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *Calcif. Tissue Int.* **65**, 242–245.
- Rico, H., Gervas, J.J., Hernández, E.R., Seco, C., Villa, L.F., Revilla, M. and Sanchez-Atrio, A. (1999) Effects of alprazolam supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *Calcif. Tissue Int.* **65**, 139–142.

- Rizzoli, R., Fleisch, H. and Bonjour, J.-P. (1976) Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) on intestinal inorganic phosphate (Pi) absorption in rats with normal vitamin D supply. *Calcif. Tissue Res.* **22**, 561–562.
- Robling, A.G., Burr, D.B. and Turner, C.H. (2001) Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J. Exp. Biol.* **204**, 3389–3399.
- Robling, A.G. and Turner, C.H. (2009) Mechanical Signaling for Bone Modeling and Remodeling. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **19**, 319–338.
- Rochdi, A., Foucat, L. and Renou, J.P. (1999) Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. *Biopolymers* **50**, 690–696.
- Rochefort, G.Y., Pallu, S. and Benhamou, C.L. (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int.* **21**, 1457–1469.
- Rosen, C.J. and Yakar, S. (2002) Growth hormone, insulin-like growth factors, and IGF binding proteins. In: *Principles of Bone Biology*, Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 1441–1453.
- Rubin, C.T. and Lanyon, L.E. (1985) Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif. Tissue Int.* **37**, 411–417.
- Rubio-Martínez, L.M., Cruz, A., Inglis, D. and Hurtig, M.B. (2010) Analysis of the subchondral microarchitecture of the distopalmar aspect of the third metacarpal bone in racing Thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.* **71**, 1148–1153.
- Rueff-Barroso, C.R., Milagres, D., do Valle, J., Casimiro-Lopes, G., Nogueira-Neto, J.F., Zanier, J.F.C. and Porto, L.C. (2008) Bone healing in rats submitted to weight-bearing and non-weight-bearing exercises. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **14**, BR231-236.
- Russo, C.R., Lauretani, F., Seeman, E., Bartali, B., Bandinelli, S., Di Iorio, A., Guralnik, J. and Ferrucci, L. (2006) Structural adaptations to bone loss in aging men and women. *Bone* **38**, 112–118.
- Sampson, H.W. (2002) Alcohol and Other Factors Affecting Osteoporosis Risk in Women. **26**, 7.
- Sato, M., Asada, N., Kawano, Y., Wakahashi, K., Minagawa, K., Kawano, H., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T. and Katayama, Y. (2013) Osteocytes Regulate Primary Lymphoid Organs and Fat Metabolism. *Cell Metab.* **18**, 749–758.
- Schemitsch, E.H. (2017) Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J. Orthop. Trauma* **31**, S20–S22.
- Schmidt, A., Bierwirth, S., Weber, S., Platen, P., Schinkothe, T. and Bloch, W. (2009) Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells. *Br. J. Sports Med.* **43**, 195–198.

- Schoutens, A., Laurent, E. and Poortmans, J.R. (1989) Effects of Inactivity and Exercise on Bone: *Sports Med.* **7**, 71–81.
- Schultz, V.L., Boass, A., Garner, S.C. and Toverud, S.U. (1995) Several anesthetics, but not diethyl ether, cause marked elevation of serum parathyroid hormone concentration in rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **10**, 1298–1302.
- Seco, C., Revilla, M., Hernández, E.R., Gervás, J., González-Riola, J., Villa, L.F. and Rico, H. (1998) Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **13**, 508–512.
- Seeman, E. and Delmas, P.D. (2006) Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2250–2261.
- Sharkey, L., Hill, S., Weiss, D. and KJ, W. (2010) Structure of bone marrow. In: *Schalm's veterinary hematology*, 6th ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. pp 8–13.
- Sharma, D., Larriera, A.I., Palacio-Mancheno, P.E., Gatti, V., Fritton, J.C., Bromage, T.G., Cardoso, L., Doty, S.B. and Fritton, S.P. (2018) The effects of estrogen deficiency on cortical bone microporosity and mineralization. *Bone* **110**, 1–10.
- Sherk, V.D. and Rosen, C.J. (2019) Senescent and apoptotic osteocytes and aging: Exercise to the rescue? *Bone* **121**, 255–258.
- Shiga, K., Hara, H., Okano, G., Ito, M., Minami, A. and Tomita, F. (2003) Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *J. Nutr.* **133**, 4207–4211.
- Shipov, A., Zaslanski, P., Riesemeier, H. and Shahar, R. (2012) THE MICROSTRUCTURE OF RAT CORTICAL BONE: A SYNCHROTRON TOMOGRAPHY-BASED STUDY. *J. Biomech.* **45**, S546.
- Sibonga, J.D. (2013) Spaceflight-induced bone loss: is there an osteoporosis risk? *Curr. Osteoporos. Rep.* **11**, 92–98.
- Siller-Jackson, A.J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, L.F., Sprague, E. and Jiang, J.X. (2008) Adaptation of Connexin 43-Hemichannel Prostaglandin Release to Mechanical Loading. *J. Biol. Chem.* **283**, 26374–26382.
- Sims, N.A. and Gooi, J.H. (2008) Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 444–451.
- Sipos, W., Rauner, M., Skalicky, M., Viidik, A., Hofbauer, G., Schett, G., Redlich, K., Lang, S. and Pietschmann, P. (2008) Running has a negative effect on bone metabolism and proinflammatory status in male aged rats. *Exp. Gerontol.* **43**, 578–583.
- Siu, W.S., Qin, L., Cheung, W.H. and Leung, K.S. (2004) A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. *Bone* **35**, 21–26.

- Skerry, T. (2002) Neurotransmitters in bone. Introduction. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2**, 401–403.
- Skerry, T.M. (2006) One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **6**, 122–127.
- Skerry, T.M. (2008) The role of glutamate in the regulation of bone mass and architecture. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **8**, 166–173.
- Skerry, T.M. and Lanyon, L.E. (1995) Interruption of disuse by short duration walking exercise does not prevent bone loss in the sheep calcaneus. *Bone* **16**, 269–274.
- Søgaard, C.H., Danielsen, C.C., Thorling, E.B. and Mosekilde, L. (2009) Long-term exercise of young and adult female rats: Effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 409–416.
- Sommerfeldt, D. and Rubin, C.T. (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine J.* **10**, S86–S95.
- Song, J., Dong, F., Li, X., Xu, C., Cui, Z., Jiang, N., Jia, J. and Yu, B. (2014) Effect of Treadmill Exercise Timing on Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage by Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells: An Experimental Investigation in Rats. *PLoS ONE* **9**, e90858.
- Spira, E. and Farin, I. (1967) The Vascular Supply to the Epiphyseal Plate Under Normal and Pathological Conditions. *Acta Orthop. Scand.* **38**, 1–22.
- Stout, S. and Crowder, C. (2012) Bone remodeling, histomorphology, and histomorphometry. In: *Bone histology*, Boca Raton., Eds.: C. Crowder and S. Stout, CRC Press. pp 1–22.
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Ferrara, N., et al. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9656–9661.
- Swift, S.N., Baek, K., Swift, J.M. and Bloomfield, S.A. (2012) Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J. Nutr.* **142**, 1038–1045.
- Taes, Y., Lapauw, B., Griet, V., De Bacquer, D., Goemaere, S., Zmierzak, H. and Kaufman, J.-M. (2010) Prevalent fractures are related to cortical bone geometry in young healthy men at age of peak bone mass. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 1433–1440.
- Taichman, R.S. (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* **105**, 2631–2639.
- Takeda, S., Kobayashi, Y., Park, J.-H., Ezawa, I. and Omi, N. (2012) Effect of different intake levels of dietary protein and physical exercise on bone mineral density and bone strength in growing male rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **58**, 240–246.

- Takyar, F.M., Tonna, S., Ho, P.W., Crimeen-Irwin, B., Baker, E.K., Martin, T.J. and Sims, N.A. (2013) EphrinB2/EphB4 inhibition in the osteoblast lineage modifies the anabolic response to parathyroid hormone. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 912–925.
- Talmage, R.V., Doppelt, S.H. and Fondren, F.B. (1977) An interpretation of acute changes in plasma ^{45}Ca following parathyroid hormone administration to thyroparathyroidectomized rats. *Calcif. Tissue Res.* **22**, 117–128.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. and Ikeda, K. (2007) Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metab.* **5**, 464–475.
- Tezuka, K., Takeshita, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., Kikuno, R. and Hashimoto-Gotoh, T. (1990) Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 246–251.
- Tezval, M., Biblis, M., Sehmisch, S., Schmelz, U., Kolios, L., Rack, T., Stuermer, K.M. and Stuermer, E.K. (2011) Improvement of femoral bone quality after low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the ovariectomized rat as an osteopenia model. *Calcif. Tissue Int.* **88**, 33–40.
- Tomljenović Borer, K. and Kuhns, L.R. (1977) Radiographic evidence for acceleration of skeletal growth in adult hamsters by exercise. *Growth* **41**, 1–13.
- Tortora, G.J. and Derrickson, B. (2017) *Manuel d'anatomie et de physiologie humaines*. De Boeck supérieur, Louvain-La-Neuve (Belgique).
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N. and Komori, T. (2001) Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 2017–2026.
- Tromp, A.M., Bravenboer, N., Tanck, E., Oostlander, A., Holzmann, P.J., Kostense, P.J., Roos, J.C., Burger, E.H., Huiskes, R. and Lips, P. (2006) Additional weight bearing during exercise and estrogen in the rat: the effect on bone mass, turnover, and structure. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 404–415.
- Trouvin, AP. and Goëb, V. (2010) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin. Interv. Aging* **345**.
- Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K. and Nabeshima, Y.-I. (2003) Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2393–2403.
- Tu, X., Rhee, Y., Condon, K.W., Bivi, N., Allen, M.R., Dwyer, D., Stolina, M., Turner, C.H., Robling, A.G., Plotkin, L.I. and Bellido, T. (2012) Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* **50**, 209–217.
- Turner, C.H. and Burr, D.B. (1993) Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* **14**, 595–608.

- Turner, R.T., Lotinun, S., Hefferan, T.E. and Morey-Holton, E. (2006) Disuse in adult male rats attenuates the bone anabolic response to a therapeutic dose of parathyroid hormone. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **101**, 881–886.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., et al. (1999) Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor. *Bone* **25**, 517–523.
- Umemura, Y., Ishiko, T., Yamauchi, T., Kurono, M. and Mashiko, S. (1997) Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **12**, 1480–1485.
- Umemura, Y., Sogo, N. and Honda, A. (2002) Effects of intervals between jumps or bouts on osteogenic response to loading. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **93**, 1345–1348.
- Utvåg, S.E., Iversen, K.B., Grundnes, O. and Reikerås, O. (2002) Poor muscle coverage delays fracture healing in rats. *Acta Orthop. Scand.* **73**, 471–474.
- Väänänen, H.K. and Zhao, H. (2002) Osteoclast function: Biology and mechanisms. In: *Principles of Bone Biology*, 2nd ed., Eds.: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, Academic Press, San Diego, CA. pp 109–126.
- Vashishth, D., Verborgt, O., Divine, G., Schaffler, M.B. and Fyhrie, D.P. (2000) Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone* **26**, 375–380.
- Vatsa, A., Mizuno, D., Smit, T.H., Schmidt, C.F., MacKintosh, F.C. and Klein-Nulend, J. (2006) Bio Imaging of Intracellular NO Production in Single Bone Cells After Mechanical Stimulation. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1722–1728.
- Verborgt, O., Gibson, G.J. and Schaffler, M.B. (2000) Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling After Fatigue In Vivo. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 60–67.
- Vicente, W.S., dos Reis, L.M., Gracioli, R.G., Gracioli, F.G., Dominguez, W.V., Wang, C.C., et al. (2013) Bone Plasticity in Response to Exercise Is Sex-Dependent in Rats. *PLoS ONE* **8**.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. and Delmas, P.D. (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* **17**, 319–336.
- Volpon, J.B., Silva, A.V., Falcai, M.J., Louzada, M.J.Q., Zamarioli, A., Kotake, B.G.D.S. and Issa, J.P.M. (2015) The osteogenic effects of swimming on bone mass, strength, and microarchitecture in rats with unloading-induced bone loss. *Microsc. Res. Tech.* **78**, 784–791.
- Wallace, J.M., Rajachar, R.M., Allen, M.R., Bloomfield, S.A., Robey, P.G., Young, M.F. and Kohn, D.H. (2007) Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. *Bone* **40**, 1120–1127.

- Wang, Q., Yang, M. and Wang, J. (2013) [Effects of treadmill exercise on mRNA expression levels of osteoprotegerin, RANKL and RUNX2 in bone tissues of ovariectomized]. *Zhongguo Gu Shang China J. Orthop. Traumatol.* **26**, 940–943.
- Wang, Y., Tang, Q., Zhu, L., Huang, R., Huang, L., Koleini, M. and Zou, D. (2016) Effects of Treatment of Treadmill Combined with Electro-Acupuncture on Tibia Bone Mass and Substance P Expression of Rabbits with Sciatic Nerve Injury. *PLOS ONE* **11**, e0164652.
- Warden, S.J., Galley, M.R., Hurd, A.L., Richard, J.S., George, L.A., Guildenbecher, E.A., Barker, R.G. and Fuchs, R.K. (2014) Cortical and Trabecular Bone Benefits of Mechanical Loading Are Maintained Long Term in Mice Independent of Ovariectomy. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 1131–1140.
- Warner, S.E., Shea, J.E., Miller, S.C. and Shaw, J.M. (2006) Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 395–403.
- Waterman, B.R., Gun, B., Bader, J.O., Orr, J.D. and Belmont, P.J. (2016) Epidemiology of Lower Extremity Stress Fractures in the United States Military. *Mil. Med.* **181**, 1308–1313.
- Weinstein, R.S., Wan, C., Liu, Q., Wang, Y., Almeida, M., O'Brien, C.A., Thostenson, J., Roberson, P.K., Boskey, A.L., Clemens, T.L. and Manolagas, S.C. (2010) Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell* **9**, 147–161.
- Whitfield, J.F. (2003) Primary cilium--is it an osteocyte's strain-sensing flowmeter? *J. Cell. Biochem.* **89**, 233–237.
- van der Wiel, H.E., Lips, P., Graafmans, W.C., Danielsen, C.C., Nauta, J., van Lingen, A. and Mosekilde, L. (1995) Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. *Bone* **16**, 73–80.
- Wilson, E.E., Awonusi, A., Morris, M.D., Kohn, D.H., Tecklenburg, M.M.J. and Beck, L.W. (2006) Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR. *Biophys. J.* **90**, 3722–3731.
- Wolff, J. (1986) *The Law of Bone Remodelling*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Wu, X., McKenna, M.A., Feng, X., Nagy, T.R. and McDonald, J.M. (2003) Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology* **144**, 5545–5555.
- Xie, L., Jacobson, J.M., Choi, E.S., Busa, B., Donahue, L.R., Miller, L.M., Rubin, C.T. and Judex, S. (2006) Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* **39**, 1059–1066.
- Xing, L., Xiu, Y. and Boyce, B.F. (2012) Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J. Orthop.* **3**, 212–222.

- Xu, X., Zhou, J., Yang, F., Wei, S. and Dai, H. (2016) Using Micro-Computed Tomography to Evaluate the Dynamics of Orthodontically Induced Root Resorption Repair in a Rat Model. *PLOS ONE* **11**, e0150135.
- Yamaguchi, S., Aoyama, T., Ito, A., Nagai, M., Iijima, H., Tajino, J., Zhang, X., Kiyan, W. and Kuroki, H. (2016) The Effect of Exercise on the Early Stages of Mesenchymal Stromal Cell-Induced Cartilage Repair in a Rat Osteochondral Defect Model. *PloS One* **11**, e0151580.
- Yamashita, J. and McCauley, L.K. (2019) Effects of Intermittent Administration of Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein on Fracture Healing: A Narrative Review of Animal and Human Studies. *JBMR Plus* **3**, e10250.
- Yao, Z., Lafage-Proust, M.-H., Plouët, J., Bloomfield, S., Alexandre, C. and Vico, L. (2004) Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **19**, 1471–1480.
- Yee, C.S., Schurman, C.A., White, C.R. and Alliston, T. (2019) Investigating Osteocytic Perilacunar/Canalicular Remodeling. *Curr. Osteoporos. Rep.* **17**, 157–168.
- Yeh, J.K., Aloia, J.F., Chen, M.M., Tierney, J.M. and Sprintz, S. (1993) Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **8**, 1117–1125.
- Yeh, J.K., Aloia, J.F., Tierney, J.M. and Sprintz, S. (1993) Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: determined by dual energy X-ray absorptiometry. *Calcif. Tissue Int.* **52**, 234–238.
- Yeni, Y.N., Brown, C.U. and Norman, T.L. (1998) Influence of bone composition and apparent density on fracture toughness of the human femur and tibia. *Bone* **22**, 79–84.
- Yerramshetty, J.S. and Akkus, O. (2008) The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone* **42**, 476–482.
- Yingling, V.R., Davies, S. and Silva, M.J. (2001) The effects of repetitive physiologic loading on bone turnover and mechanical properties in adult female and male rats. *Calcif. Tissue Int.* **68**, 235–239.
- Zebaze, R., Atkinson, E.J., Peng, Y., Bui, M., Ghasem-Zadeh, A., Khosla, S. and Seeman, E. (2019) Increased Cortical Porosity and Reduced Trabecular Density Are Not Necessarily Synonymous With Bone Loss and Microstructural Deterioration. *JBMR Plus* **3**, e10078.
- Zebaze, R.M., Ghasem-Zadeh, A., Bohte, A., Iuliano-Burns, S., Mirams, M., Price, R.I., Mackie, E.J. and Seeman, E. (2010) Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *The Lancet* **375**, 1729–1736.
- Zhang, Jie, He, F., Zhang, W., Zhang, M., Yang, H. and Luo, Z.-P. (2015) Mechanical force enhanced bony formation in defect implanted with calcium sulphate cement. *Bone Res.* **3**, 14048.

Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S. and Yang, W. (2014) Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–5.

Zhang, Y., Dong, X., Leung, P.-C. and Wong, M.-S. (2009) Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone* **44**, 46–52.

Zhang, Yi-Xian, Yuan, M.-Z., Cheng, L., Lin, L.-Z., Du, H.-W., Chen, R.-H. and Liu, N. (2015) Treadmill exercise enhances therapeutic potency of transplanted bone mesenchymal stem cells in cerebral ischemic rats via anti-apoptotic effects. *BMC Neurosci.* **16**.

Zhong, Q., Sridhar, S., Ruan, L., Ding, K., Xie, D., Insogna, K., Kang, B., Xu, J., Bollag, R. and Isaacs, C. (2005) Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells. *Bone* **36**, 820–831.

Zhu, J., Garrett, R., Jung, Y., Zhang, Y., Kim, N., Wang, J., Joe, G.J., Hexner, E., Choi, Y., Taichman, R.S. and Emerson, S.G. (2007) Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* **109**, 3706–3712.

VIN Micro-Hematocrit Capillary Tube Reader. <http://bookstore.vin.com/VIN9835>. Accessed June 2, 2017

Annexe 1 : article réparation osseuse

Article

Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using μ CT

Céline Bourzac ^{1,2}, Morad Bensidhoum ¹, Mathieu Manassero ^{1,2}, Christine Chappard ¹, Nicolas Michoux ³, Stéphane Pallu ^{1,4} and Hugues Portier ^{1,4,*}

¹ B3OA, UMR CNRS 7052, INSERM U1271, Université de Paris, 75010 Paris, France; c_bourzac@yahoo.fr (C.B.); morad.bensidhoum@paris7.jussieu.fr (M.B.); mathieu.manassero@vet-alfort.fr (M.M.); christine.chappard@inserm.fr (C.C.); stephane.pallu@univ-orleans.fr (S.P.)

² Département Elevage et Pathologie des Equidés et des Carnivores, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France

³ Département de Radiologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université Catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium; nicolas.michoux@uclouvain.be

⁴ Collegium Science & Technique, 2 Allée du Château, Université d'Orléans, 45100 Orléans, France

* Correspondence: hugues.portier@univ-orleans.fr; Tel.: +33-782-309-43

Received: 26 October 2020; Accepted: 19 November 2020; Published: 24 November 2020



Abstract: Although physical exercise has unquestionable benefits on bone health, its effects on bone healing have been poorly investigated. This study evaluated the effects of preemptive moderate continuous running on the healing of non-critical sized bone defects in rats by μ CT. We hypothesized that a preemptive running exercise would quicken bone healing. Twenty 5-week-old, male, Wistar rats were randomly allocated to one of the following groups ($n = 10$): sedentary control (SED) or continuous running (EX, 45 min/d, 5 d/week at moderate speed, for 8 consecutive weeks). A 2 mm diameter bone defect was then performed in the right tibia and femur. No exercise was performed during a 4 week-convalescence. Healing-tissue trabecular microarchitectural parameters were assessed once a week for 4 weeks using μ CT and plasma bone turnover markers measured at the end of the study protocol (time point T12). At T12, bone volume fraction (BV/TV; BV: bone volume, TV: tissue volume) of the healing tissue in tibiae and femurs from EX rats was higher compared to that in SED rats ($p = 0.001$). BV/TV in EX rats was also higher in tibiae than in femurs ($p < 0.01$). The bone mineral density of the healing tissue in femurs from EX rats was higher compared to that in femurs from SED rats ($p < 0.03$). N-terminal telopeptide of collagen type I in EX rats was decreased compared to SED rats ($p < 0.05$), while no differences were observed for alkaline phosphatase and parathyroid hormone. The study provides evidence that preemptive moderate continuous running improves the healing of non-critical sized bone defects in male Wistar rats.

Keywords: physical exercise; continuous running training; bone repair; non critical-size bone defect; rats

1. Introduction

Physical exercise (PE) has unquestionable beneficial effects on bone health [1–5]. Using rats as a model, the effects of different exercise modalities on bone biochemical characteristics and biomechanical properties have been previously investigated [6–8]. Among PE modalities, treadmill running is one

of the most common weight-bearing exercises in rats. On normal bone, literature reports provide the following evidence. Moderate continuous running (MCR) on a treadmill, (i) increased the bone mineral density (BMD) in the tibiae or femora as a result of increased trabecular volume, number or thickness of trabeculae, (ii) decreased trabecular separation [6,9–13] and (iii) increased cortical bone volume in the tibiae [11], compared to respective results obtained in sedentary controls. Treadmill MCR also increased calcium accumulation in the bone, stimulating bone formation and suppressing bone resorption in young female rats [14]. Of note, some prophylactic effects of MCR on bone health were reported. MCR thus prevented trabecular bone loss related to hormone suppression in ovariectomized female [11] or castrated male [15] rats. MCR also prevented decreased femoral BMD induced by age, most likely by limiting bone resorption [16]. Finally, treadmill exercise prevented deterioration of subchondral bone in a rat model of osteoarthritis [17].

The positive effects of PE have also been investigated on the repair of various tissues (including bone) in rats. In myocardial tissue treadmill running for 12 weeks (initiated 24 h after experimentally-induced infarction) showed positive effects on cardiac remodeling and function, resulting in an increased left ventricle free wall in systole or in an improved ejection fraction [18]. In cartilage, regular treadmill running improved Wakitani cartilage repair scores (in osteochondral defect in the femoral groove after 8 weeks) compared to sedentary rats [19]. In bone tissue, swimming (with a load of 5% body weight) improved osteotomy healing at the end of bone consolidation [20]. Compared to swimming, running exercise (intensity not given) starting 24 h after a non-critical-sized bone defect surgery, improved trabecular radio-opacity after 14 days of exercise [21]. In a model of bone defect treated with biodegradable cement, treadmill exercise for 30 consecutive days (starting 7 days postoperatively) improved bone repair in terms of, (i) defect filling (decreased residual defect areas and increased speed of repair) and (ii) repaired tissue strength compared to sedentary controls [22].

Although the benefits of PE on bone health have been widely documented [6,9–13,23,24], most of the studies investigating the effects of PE on bone repair have focused on PE a posteriori, i.e., after an injury was sustained. Two studies addressed the effects of previous exercise training on subsequent bone healing by evaluating the effects of moderate continuous running (MCR) on the healing of a manually-induced tibial fracture in mice [25] or non-critical-sized defect in the tibia in rats [26]. Increased rates of collagen synthesis and higher levels of calcium in the callus from mice subjected to exercise compared to sedentary mice [25], and increased bone formation rate, type I collagen and osteocalcin expression [26] suggested enhanced bone healing with prior exercise. These studies, however, were limited to the tibial bone and to chemical or immunohistochemical evaluation of the healing tissue. Moreover, the follow-up evaluation of the healing tissue was restricted to 1 or 2 time-points within 14 days maximum. Finally, BMD imaging assessment was performed in the whole tibia, not the defect only [26]. The effects of PE on the femur or on the systemic bone turnover markers and healing bone tissue imaging and longitudinal follow-up, were not investigated.

Thus, preemptive PE may have prophylactic effects on bone healing, but studies are limited both in the number of parameters assessed and in time of follow-up. To address this gap in knowledge, the aims of this study were: (i) to follow the evolution of the healing tissue microarchitecture using μ CT over a period of 4 weeks, (ii) assess the BMD in the healing tissue specifically and (iii) evaluate systemic bone turn over markers after 8 weeks of preemptive MCR exercise in male Wistar rats. It was hypothesized that previous MCR exercise improves the healing of non-critical-sized bone defects compared to sedentary lifestyle, both in the tibia and femur.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Twenty 5-week-old, male, Wistar rats, weighing 201 ± 10 g, were purchased from Elevage Janvier (Le Genet-St-Isle, France), acclimated for 1 week to the new facilities and for 1 week to the treadmill. Rats were then randomly assigned to one of the 2 following groups ($n = 10$ each): sedentary control

(SED) or moderate continuous running exercise (EX). The rats were housed all along the experiment in controlled facilities (4 per standard cage, under a 12 h light/dark cycle, kept at a constant temperature of 21 ± 2 °C). A commercial standard diet (Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided ad libitum to all animals. Besides from free movement in their cages, all the rats had no access to any other activity such as wheel running. Moreover, during the recovery period, no rats showed signs of discomfort or lameness of the operated limb.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lariboisiere/Villemin (Paris, France) and from the French Ministry of Agriculture (Paris, France; APAFIS # 9505), and was carried out in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (Directive 2010/63/EU).

2.2. Experimental Design

The study was divided in two phases (Figure 1). The first phase involved treadmill running exercise for 8 consecutive weeks (from time-point T1 to T8). The second phase involved a non-critical sized bone-defect surgery, followed by 4 weeks of follow-up (from time-point T9 to T12). Femur and tibia were chosen because they are load-bearing bones that may be mechanically impacted by treadmill training program.

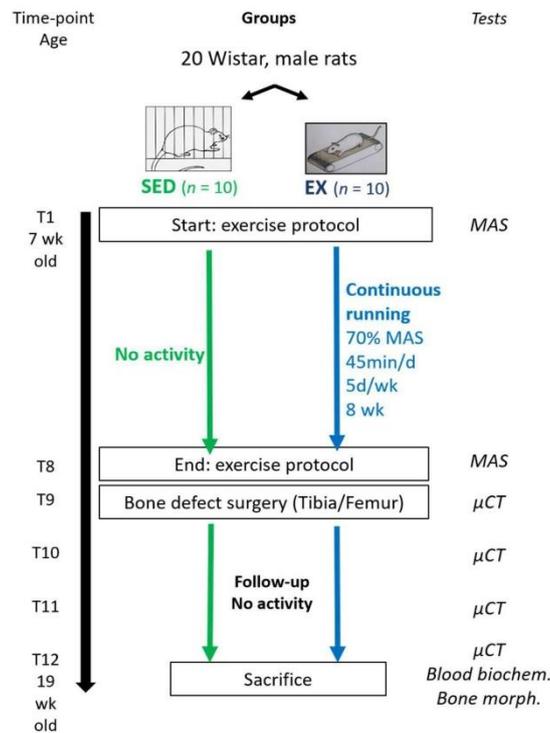


Figure 1. Study design SED: sedentary control, EX: moderate continuous treadmill running exercise, MAS: maximal aerobic speed, μ CT: micro-computed tomography, biochem.: biochemistry analysis, morph.: morphometry.

At the end of the follow-up period (T12), all rats were sacrificed by cardiac puncture and exsanguination, after induction of general anesthesia with 5% isoflurane in air. Blood was collected on heparinized tubes, immediately cooled, centrifuged at $700\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min and plasma stored frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assays were performed.

2.3. Body Parameters, Food and Water Follow-Up

Quantities of ingested chow and water were recorded weekly during the training period. Body weights were recorded at 5 (upon arrival, time-point T0), 15 (T8) and 19 (T12) weeks of age, body lengths (nose to anus) at T0 and T12, and body mass index (BMI) calculated as body weight (g)/length² (cm²) at T0 and T12 [27].

2.4. Exercise Training Protocols

Prior to the beginning of the exercise protocols, the rats were placed on a motor-driven treadmill [28] for adaptation for 4 days. On the 5th day, the maximal aerobic speed (MAS) was determined for each rat, using a progressive running test (adapted from Krzesiak et al., 2019 [29]), starting with warming at 10° inclination and a speed of 13 m/min for 5 min, then increments of 4 m/min every 2 min until 17 min were reached, then increments of 4 m/min every 1 min 30 s. The test was conducted until fatigue occurs. Fatigue was defined as when the rats could no longer keep pace with the treadmill speed, despite 2 consecutive stimulations with air-compressed sprays. The test was then stopped and the last fully sustained increment speed defined as the MAS for the rat. Since speed could not be adapted within each treadmill lane, groups had to be formed for training and the MAS for each group corresponded to the lowest MAS within the group. At the beginning of the exercise protocol (time-point T1), the rats were 7 weeks old.

The EX group performed MCR activity on the treadmill, 0° inclination, 45 min per day, 5 days per week, for 8 consecutive weeks, starting with a 5 min warming session at the speed of 12 m/min followed by 40 min corresponding to 70% of MAS (i.e., 15 m/min). Exercise stimulation was provided, when needed, with air-compressed sprays. Electric shocks were not used at any stage. The SED group did not perform any daily physical activity beyond normal movements in their cages. A MAS test was conducted at the end of the exercise protocol (T8) to validate exercise conditioning [30].

2.5. Non-Critical Sized Bone Defect Surgery

2.5.1. Anesthesia

Prior to surgery, the rats were anesthetized in an induction box with 5% isoflurane (Forene[®]) in oxygen, then transferred to a mask for anesthesia maintenance with 3% isoflurane in oxygen. A stable body temperature was maintained using a heating device (maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). The rats were then premedicated with a single dose of enrofloxacin (10 mg/kg, subcutaneously (SC), Baytril[®] 5%) for antimicrobial prophylaxis, and buprenorphine (0.2 mg/kg, SC, Buprecare[®] 0.3 mg/mL) for analgesia. The right hind limb was clipped, aseptically prepared and draped.

2.5.2. Surgical Procedure

A parapatellar approach was performed on the lateral aspect of the limb, with skin incision centered over the femoro-patellar joint. The fascia lata was incised and muscles were retracted caudally. A cylindrical defect was created using a 2 mm drill bit and a ultraviolet-sterilized, surgery-dedicated drill (Dremel[®] 4300, Robert Bosch France, Saint-Ouen, France), in the distal femoral metaphysis, at the level of the lateral collateral ligament insertion, between the lateral collateral ligament and the insertion of the extensor digitorum longus muscle, and in the proximal tibial metaphysis, at the level of the collateral ligament insertion, between the lateral collateral ligament and the patellar tendon. Irrigation with saline was provided throughout the drilling procedure to avoid thermal necrosis. The drilled holes were then rinsed to discard any bone fragments (Figure 2). The fascia lata, subcutaneous tissue

and skin were closed in 3 plans using an absorbable monofilament (Biosyn® 5-0). The wound was irrigated with lidocaine (Lurocaïne®, 20 mg/mL) between each plan to provide additional analgesia. Buprenorphine (0.1 mg/kg, SC) was provided 12 h after surgery.

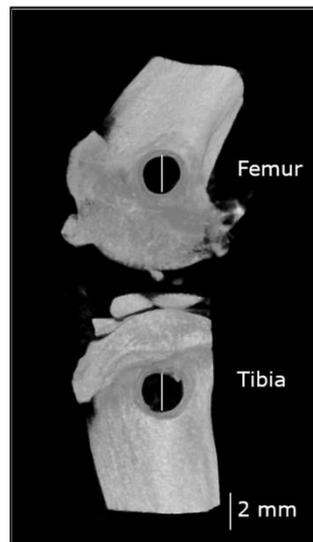


Figure 2. Non critical-sized bone defects in the tibia and the femur immediately after surgery. These microcomputed tomography (μ CT) images display the 2 mm bone defects in the distal metaphysis of the femur and the proximal metaphysis of the tibia. This figure is a composite image of reconstructions obtained from the femur and the tibia, separately.

All rats recovered successfully from surgery. They did not display any discomfort or lameness in their operated limb from the day after surgery to the day they were euthanized. The day after surgery, however, 1 rat of the SED group presented with wound dehiscence. The wound was debrided and sutured close without any further complications.

2.6. Postoperative Microcomputed Tomography (μ CT) and Computation

Anesthesia was induced and maintained as described above. The right distal femur and proximal tibia were imaged during the same procedure using a high-resolution μ CT (Skyscan 1176, Bruker, Belgium) once a week following surgery, for 4 weeks (time-points T9, T10, T11 and T12). These time-points were chosen on the basis that a 2 mm \times 6 mm cortical defect in rat femurs filled within 40 days [31].

2.6.1. μ CT Settings

The μ CT images were obtained at the following setting: source voltage 50 kV, source current 475 μ A, matrix 1000 \times 668, exposure time 40 ms, rotation step 0.7-degree, frame averaging 5, filter aluminum 0.5 mm thick and pixel size 35.6 μ m.

2.6.2. μ CT Reconstruction and Data Computation

Images were reconstructed (separating the femur from the tibia) using NRecon software, 16 bits (v1.7.0.4, Skyscan). For the quantitative analysis of bone formation within the femoral and tibial bone defects, all μ CT reconstructions were oriented using DataViewer software (v1.5.2.4, Skyscan,

Aartselaar, Belgium), so that the bone defect appeared as a circle on each consecutive slice. For bone volume computation, images were converted to 8 bits and a cylindrical volume of interest (VOI; diameter 2.3 mm, so that the size was close to, but not including the rim of the drilled hole), centered over the bone defect was defined within the cancellous bone, as previously described for the cortical bone [32,33]. The length of the cylinder represented the centrally located 75% of the total length of the defect at each time point. This methodology was used to evaluate the exact same region at each time point, accounting for the radial bone growth and differences in defect length, due to variations in bone defect location with respect to the physis. The bone volume fraction (BV/TV, a measure of part of cancellous space filled with trabeculae [34]; BV: bone volume, TV: tissue volume), specific bone surface (BS/BV; BS: bone surface), structure model index (SMI) and trabecular pattern factor (Tb.Pf) were computed from these VOI within bone-specific threshold (40–160 gray values) at each time point (T9 to T12). Bone mineral density (BMD) was computed from these VOI at T12 only, using hydroxyapatite phantoms for calibration, with CTAn software (v1.16.4.1, Skyscan, Aartselaar, Belgium) [35].

2.7. Blood Analyses

Total alkaline phosphatase (ALP), a marker of bone formation, was assayed using a standard laboratory analyzer (Selectra xl, Elitech) and enzymatic kinetic kit (ALP (DEA) SL, Elitech), in the same run for all the samples, following the manufacturers' instructions. The limit of detection was equal to 6 U/L.

Cross linked N-Telopeptide of type I collagen (NTx), a marker of bone resorption, and intact parathyroid hormone (PTH), a key regulator of the phospho-calcic metabolism, were measured using established rat enzyme linked immunosorbent assay kits (Antibodies-online GmbH, Aachen, Germany [36], and Immutopics, Inc., San Clemente, CA, USA [37], respectively), following the manufacturers' instructions. The intra-/interassay coefficients of variation and limit of detection for NTx were <12% and 2.47 ng/mL respectively. The intra-/interassay coefficients of variation and limit of detection for PTH were <8.9% and 3 pg/mL respectively.

2.8. Data Analysis and Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using a commercially available software (StatView, Version 5.0.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Descriptive statistics were reported as means \pm standard deviation of the mean (SD) or median (with 25th and 75th percentiles) according to the normality of the data distribution (Shapiro–Wilk test). Differences between EX and SED groups in terms of body characteristics, MAS, blood analysis and BMD were then assessed using a Mann–Whitney U test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Evolution over time of parameters BV/TV, BS/BV, SMI and Tb.Pf was first studied using boxplots. Then, a four-way ANOVA was performed for each parameter of interest to assess potential differences in measurements between groups, bones and time-points (fixed effects) and between animal (random effects). The function ANOVAN (Matlab software v.R2017a; The MathWorks Inc. Natick, MA, USA) was used for the analysis. The significance level for these tests was $p < 0.025$ (Bonferroni correction). When the analysis of variance demonstrated statistically significant differences between groups means, a pairwise comparison between these groups was performed using the function MULTCOMPARE (Matlab). This function allowed comparing the marginal means from the factors group, bone and time points in averaging out the effects from the factor animal [38]. Due to the multiple comparisons that were performed, a Tukey–Kramer correction was applied to this test.

3. Results

3.1. Body Parameters, Food and Water Consumption

Results are summarized in Table 1. At the beginning of the protocol, body mass indexes were not statistically different between SED and EX groups. Body mass indexes and weight gains were

not statistically different between SED and EX rats throughout the study time. Food and water consumptions were not different between SED and EX rats (food: 25.1 ± 4.1 and 27.6 ± 2.9 g, for SED and EX rats respectively; water: 31.4 ± 3.1 and 37.6 ± 11.3 mL respectively).

Table 1. Body characteristics at 5 (T0), 15 (T8) and 19 (T12) weeks of age, and maximum aerobic speed (at 7 weeks of age, T1) in sedentary (SED) male Wistar rats and rats subjected to moderate continuous running exercise (EX).

		SED	EX	<i>p</i> Values
Weight (g)	T0	195 ± 9	207 ± 8	<i>p</i> = 0.001
	T8	469 ± 41	495 ± 43	<i>p</i> = 0.14
	T12	521 ± 50	557 ± 29	<i>p</i> = 0.08
Length (cm)	T0	19.4 ± 0.6	20.6 ± 0.7	<i>p</i> = 0.001
	T12	27.0 ± 1.0	27.5 ± 0.9	<i>p</i> = 0.35
BMI (g/cm ²)	T0	0.52 ± 0.04	0.49 ± 0.05	<i>p</i> = 0.1
	T12	0.71 ± 0.05	0.74 ± 0.04	<i>p</i> = 0.5
MAS (m/min)	T1	23.4 ± 11.3	29.2 ± 7.9	<i>p</i> = 0.11

Groups were considered comparable at T0 based on these characteristics.

3.2. Exercise Training

At T1, the MAS was not significantly different between EX and SED rats (Table 1). At T8, the MAS was higher in EX rats compared to that in SED rats (MAS^{EX}: 37.3 ± 7.4 m/min, MAS^{SED}: 18.3 ± 5.4 m/min, *p* < 0.01). The MAS improved (*p* < 0.05) by 8.1 m/min in the EX rats between T1 and T8, validating exercise conditioning.

3.3. Microcomputed Tomography Bone Formation and Bone Mineral Density Assessment

Representative images of bone defect healing over time are given in Figure 3A. Between T9 and T12, BV/TV increased in both SED and EX rats and for both tibias and femurs (Table 2, BV/TV^{SED}: *p* < 0.0001 for tibias and *p* = 0.006 for femurs; BV/TV^{EX}: *p* < 0.0001 for tibias and *p* < 0.0001 for femurs). In the tibias, BV/TV in EX rats were higher (*p* = 0.0012) at T10, T11 and T12, than respective results obtained in SED rats. In the femurs, BV/TV in EX rats was higher (*p* < 0.0001) than respective results obtained in SED rats, at T12 only (Figure 3C). In SED rats, a significant increase in BV/TV was observed only between T9 and T12, regardless of the bone.

In contrast, significant increases in BV/TV in EX rats were observed between each time-point for the tibias (*p* < 0.0001), while no significant difference was observed at intermediate time-points for the femurs. Overall, no difference in BV/TV between tibias and femurs was observed in SED rats, regardless of the time-points. In contrast in EX rats, BV/TV was higher in tibias at late time-points (T11 and T12), than respective results obtained in femurs (*p* = 0.01; Figure 3B).

A significant (*p* < 0.0001) time–bone interaction was observed for Tb.Pf, suggesting that the effect of time on Tb.Pf depended on the bone in which it was measured (Table 2). BS/BV (*p* < 0.0001) and SMI (*p* < 0.001) only depended on time. No significant difference with respect to group (SED vs. EX), bone (tibia vs. femur) and animals were observed (Table 2).

At T12, the femoral BMD in EX rats was higher (*p* = 0.03) than respective results in SED rats. No significant difference in tibial BMD was observed between EX and SED rats (Table 2).

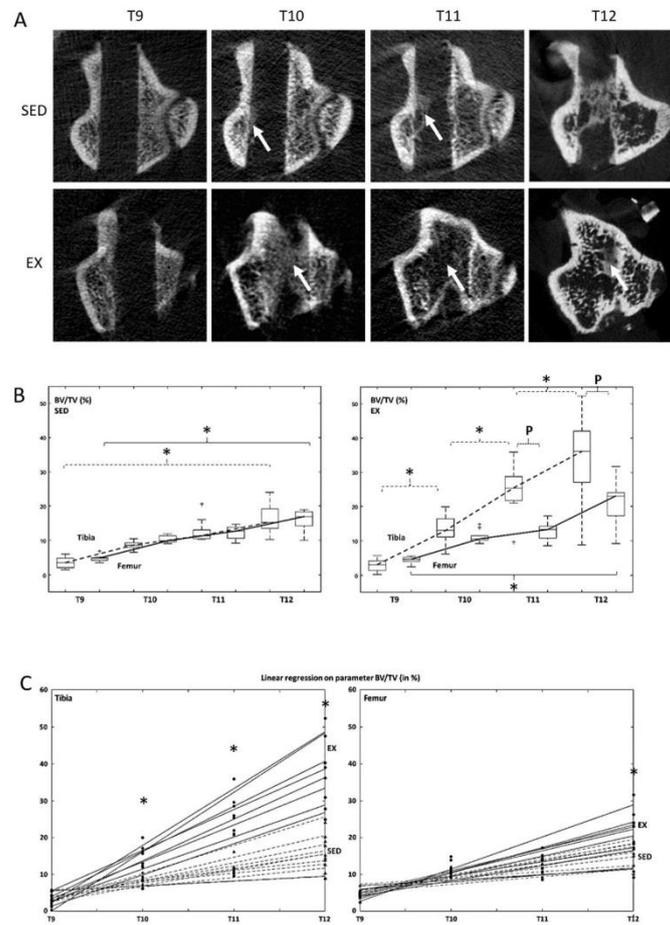


Figure 3. The healing of a non-critical sized bone defect in the tibia and the femur of sedentary (SED) and running (EX) male Wistar rats was followed for 4 weeks. **(A)** Representative images of progressive bone healing in the tibia of SED and EX rats over time (transverse views through the central portion of the defect). White arrows indicate healing tissue. The defect is almost completely filled-in in EX rats at the 4 week follow up. **(B)** Evolution of parameter BV/TV (in %) in tibia and femur rats over time is displayed as a boxplot for both SED and EX rats. On each box, the central mark indicates the median, and the bottom and top edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles. The whiskers extend to the most extreme data points not considered outliers (+). Similar kinetics are observed in SED rats, regardless of the bone, while a steeper slope in the tibia compared to that of the femur is observed in EX rats. Four-way ANOVA, $n = 9$ in each group. * indicates a statistically ($p < 0.05$) significant difference between time-points and P indicates a statistically significant difference between bones. **(C)** Evolution of parameter BV/TV (in %) in SED and EX rats over time is displayed as a boxplot for both tibia and femur. Kinetics show a steeper slope in the tibia from EX rats compared to respective results from SED rats and similar slopes in the femur, regardless of the group. Four-way ANOVA, $n = 9$ in each group. * indicates statistically significant differences between SED and Ex rats.

Table 2. Healing tissue microarchitecture and mineral density (BMD) in sedentary male Wistar rats (SED) and rats subjected to 8 weeks of moderate continuous running exercise (EX) at 1 (T9), 2 (T10), 3 (T11) and 4 (T12) weeks following non critical-sized bone defect surgery in tibias and femurs.

	Bones	Groups	Time-Points			
			T9	T10	T11	T12
BV/TV (%)	Tibia	SED	3.4 ± 1.5	8.6 ± 1.1	12.7 ± 3.3	16.3 ± 4.0 [¶]
		EX	2.9 ± 1.6	13.4 ± 4.1 [‡]	24.8 ± 6.8 [‡]	34.2 ± 12.3 ^{‡¶}
	Femur	SED	4.8 ± 0.9	10.4 ± 1.0	12.2 ± 1.8	15.9 ± 2.9 [¶]
		EX	4.4 ± 0.9	11.1 ± 1.8	13.0 ± 2.4	22.0 ± 5.6 [¶]
BS/BV (1/mm)	Tibia	SED	57.6 ± 11.4	47.6 ± 9.3 [‡]	34.5 ± 6.1 [‡]	21.7 ± 3.4 ^{‡¶}
		EX	70.6 ± 26.6	43.6 ± 3.9 [‡]	31.9 ± 8.7 [‡]	16.4 ± 5.0 ^{‡¶}
	Femur	SED	58.9 ± 10.7	43.0 ± 8.3 [‡]	39.1 ± 6.8	22.8 ± 3.8 ^{‡¶}
		EX	58.0 ± 7.4	44.3 ± 3.5 [‡]	40.8 ± 5.2	20.3 ± 3.6 ^{‡¶}
SMI	Tibia	SED	2.78 ± 0.47	2.38 ± 0.18 [‡]	2.28 ± 0.24	2.01 ± 0.28 ^{‡¶}
		EX	2.83 ± 0.15	2.40 ± 0.37 [‡]	2.35 ± 0.56	1.97 ± 0.63 ^{‡¶}
	Femur	SED	2.42 ± 0.21	2.43 ± 0.27	2.31 ± 0.19	2.06 ± 0.68 ^{‡¶}
		EX	2.54 ± 0.14	2.41 ± 0.27	2.57 ± 0.17	1.76 ± 0.36 ^{‡¶}
Tb.Pf (1/mm)	Tibia	SED	23.09 ± 9.02	12.75 ± 3.20 [‡]	9.56 ± 2.30	5.66 ± 1.48 [¶]
		EX	25.16 ± 6.75	12.02 ± 4.89	5.33 ± 5.50	3.59 ± 2.04 [¶]
	Femur	SED	17.71 ± 5.55	12.46 ± 3.57 [‡]	10.19 ± 3.37 [‡]	4.57 ± 1.82 [¶]
		EX	19.03 ± 3.03	12.26 ± 3.66 [‡]	12.44 ± 1.74 [‡]	2.98 ± 1.89 [¶]
BMD (mg HA/cm ³)	Tibia	SED				125.4 ± 28.
		EX				108.1 ± 11.6
	Femur	SED				107.8 ± 5.1
		EX				114.0 ± 9.2 *

Four way ANOVA (BV/TV, BS/BV, SMI and Tb.Pf) and Mann–Whitney (BMD) U tests * indicates statistically ($p < 0.05$) significant differences compared to SED group, [¶] indicates statistically significant differences between T12 and T9 and [‡] indicates statistically significant differences compared to the immediately previous time-point. $n = 9$ in each group. HA: hydroxyapatite.

3.4. Blood Analysis Parameters

At T12, plasmatic NTx was lower ($p < 0.05$) in EX rats compared to respective results obtained in SED rats. Although not statistically significant, plasmatic PTH was higher in EX rats. Plasmatic ALP was not statistically different between SED and EX rats (Table 3).

Table 3. Plasmatic parameters in sedentary rats (SED) and rats subjected to 8 weeks of moderate continuous running exercise (EX), 4 weeks following bone defect surgery (T12).

Parameters	SED	EX
ALP (IU/L)	256 ± 113	244 ± 31
NTx (ng/mL)	52 ± 6	44 ± 6 *
PTH (pg/mL)	94 ± 86	200 ± 158

Mann–Whitney (BMD) U tests * indicates statistically ($p < 0.05$) significant differences compared to the SED group. $n = 10$ in each group.

4. Discussion

In this study, we investigated whether exercise in the form of treadmill MCR prior to a bone injury can be a preemptive method that increases bone healing in a non-critical bone defect rat model. Our goals were to determine the effects of preemptive treadmill MCR on (i) healing bone tissue

microarchitecture and mineral density in the femur and the tibia and (ii) on systemic bone turn over markers.

4.1. Preemptive MCR Improves Bone Healing Tissue Microarchitecture and Mineral Density

Our results demonstrated that bone healing in both the tibiae and femora was significantly improved in running rats compared to sedentary rats. Specifically, BV/TV in the tibia and femur from running rats was higher at the end of the study than respective results obtained from sedentary rats. Moreover, the kinetics of the healing process in the tibia from running rats followed a rather linear progression and were improved at all time-points, compared to sedentary rats. Finally, the BMD of the femoral healing tissue was also improved in running rats compared to sedentary rats. These two results provide evidence that the beneficial effects of MCR on bone healing persist for several weeks, since differences between SED and EX rats increased with time. This is consistent with the previously reported results that the beneficial effects of tibia loading for 3 days per week, for 4 weeks on bone volume fraction in mice persisted 8 weeks after loading cessation [39].

In contrast, preemptive exercise had no effect on BS/BV, SMI and Tb.Pf. These parameters, however, decreased over time, as observed with bone maturation in longitudinal bone repair studies [40,41]. BS/BV is measured based on triangulation of the surface, SMI and Tb.Pf correspond to the surface/volume ratio before and after dilation. In a theoretical point of view, BS/BV, which represents the relative surface to volume, is higher in the case of a dense network of thin structures. This can be observed in newly formed bone such as callus struts compared to mature bone where trabeculae are thicker and clearly designed. SMI close to zero corresponds to ideal plates, 3 to ideal rods and 4 to ideal spheres [42]. Therefore, SMI can provide information about new bone maturity. As previously reported following tooth extraction, the newly-formed bone is more rod-like, as opposed to mature bone, which is more plate-like [41]. Tb.Pf reflects the proportion of concave–convex structures and is an indirect measurement of connectivity with a high proportion of concave structures in the case of highly connected structures. On the contrary, abundant convex structures represent a disconnected trabecular bone network. Lower Tb.Pf indicates a highly connected state of bone structure. To the best of our knowledge, this is the first longitudinal study evaluating the effects of prophylactic exercise on bone healing in young, male, Wistar rats.

4.2. Effects of Preemptive MCR on Bone Healing Depend on the Bone Studied

Our results demonstrated that, in the running rats, the kinetics of the healing process in the tibia was steeper, with BV/TV remaining higher at late time-points, than respective results obtained in the femur. In contrast, in the sedentary rats, no such difference was observed. Moreover, the kinetics of the healing process were rather linear in the tibia, while they plateaued between T10 and T11 before increasing again between T11 and T12 in the femur. MCR improved the BMD in the femoral but not the tibial healing tissue. This is in contrast with a previous study, in which the BMD in the tibia was increased following a treadmill running exercise [26]. The BMD, however, was measured in the whole tibia and rather reflects the previously reported effects of exercise on trabecular parameters in the entire bone [6,9–13], than in the healing tissue specifically. Tentative explanations include, but are not limited to, differences in stress intensity or distribution sustained by the femur and the tibia due to the relative orientation of these bones when contacting the ground, differences in bone geometry [11], attenuation of the mechanical stimulus in the femur by menisci or differences in response to running exercise among skeletal sites [12]. Regarding the BMD results, one possible explanation would be that the amount of mineralized tissue within the healing tissue is similar between the tibia and the femur but the distribution of this tissue within the total volume of healing tissue changes as a smaller volume of healing tissue was obtained in the femur [43]. We are not aware of previous studies comparing the healing process within these two bones, and these findings may have interesting implications, such as proper model selection to study bone healing for instance.

In order to explain the effects of MCR on bone healing, we analyzed bone turnover markers in the serum of EX and SED rats. No difference in total ALP, an early marker of osteogenesis, was observed between running and sedentary rats. These results were consistent with previous reports, in which treating osteotomized bone [20] or bone defects [21] with swimming or running exercises did not elicit an increase in ALP. A first hypothesis to that observation is that exercise intensity was not sufficient or too high to increase ALP activity. Data from a recent study [44] using a similar protocol (treadmill running at 16 m/min, 45 min/d and 5 d/week, for 4 consecutive weeks) did not show an increase in serum ALP, whereas running at 12 m/min did. These experiments, however, were conducted in rats with intact bones, limiting the conclusions to healing bones. A second hypothesis is that the size of the bone defect was not sufficient to increase plasma levels of ALP, especially 4 weeks after cessation of the physical activity [21]. In that case, investigating variations in temporal ALP gene expression in the bone tissue during the healing process may provide further information [45].

MCR resulted in a 16% decrease in NTx, compared to sedentary rats. This finding suggests that MCR may favor bone healing and increase BMD by reducing bone resorption, as previously described in healthy bone [46]. This is in contrast with the previous results that MCR (for 4 consecutive weeks) did not induce an increase in osteoprotegerin and tartrate-resistant acid phosphatase in the healing tissue of a non-critical-sized defect [26]. This discrepancy may be explained by the fact that 4 weeks of training were not enough to elicit an effect on bone resorption, while 8 weeks were [46].

PTH is an indirect marker of increased bone remodeling. It has been reported in the literature that PTH regulated bone adaptation to exercise and that running exercise would increase plasma PTH levels [47–49]. It has also been demonstrated that the administration of PTH promoted fracture healing [50]. In our study, however, plasma PTH levels in running rats were not significantly different from these in sedentary rats. These results were consistent with a previous study evaluating the effects of exercise on bone remodeling-related hormones, although that study was performed on ovariectomized rats [51]. In [47–49], PTH was evaluated at the end of the exercise protocols. Of note in our study, although not statistically significant, PTH levels in running rats were higher than in sedentary rats. Therefore, the effects of running exercise on PTH levels may not have been detectable anymore at the end of a 4 week-convalescence period.

4.3. Putative Explanations Pertaining to the Positive Effects of MCR on Bone Healing

Bone healing is a highly orchestrated physiological process, proceeding with a variety of primordial cells, intracellular and extracellular signaling (such as hormones and growth factors for instance [52]), and an osteoconductive matrix, in a defined spatial and temporal sequence [53]. It is now well-established that bone responds to loads [54] and that strains, induced by loading the bone, generate signals, to which cells (osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, etc.) may detect or respond [55,56]. PE also has indirect effects on the bone, through bone–muscle interactions: PE induces an increase in muscle mass, which in turn, induces increased strains at the osteotendinous junction. These strains generate an osteogenic stimulus [11], activating the periosteum and enhancing callus formation [57]. Additionally, the effects of PE on mesenchymal stem cells has been reviewed; although little data is available, PE in the form of MCR may enhance bone marrow-derived mesenchymal stromal cell proliferation and osteogenic capacities [58]. Pertaining to bone matrix, literature data is consistent with an increase in collagen type I, the most abundant protein in the bone matrix, with no changes in collagen type III, associated with MCR, pleading for a better bone collagen network organization induced by exercise [26]. Taken together, these results contribute, at least partially, to the positive effects of MCR on bone healing. Noteworthy in our study, food and water consumption and body weight variations were similar between groups. Therefore, these parameters may not explain the differences in healing kinetics observed between sedentary and running rats.

4.4. Limitations

We acknowledge that this study presents several limitations. First, it was conducted on still growing male rats in order to observe the effects of PE only, and avoid many physiological interactions (e.g., age: sarcopenia and osteopenia, sex: hormones and possibly osteoporosis). Studies in mice, however, demonstrated that bone responses to mechanical stimuli decrease in adult and aged animals, compared to young ones [59]. Therefore, these results may not be applicable to adult rats or humans. Since bone response to exercise was shown to be sex-dependent [60], conclusions may not be directly drawn for the female population either. Second, moderate continuous running exercise was chosen because it is commonly used and better than low or high intensity running, to increase bone mass in humans and animals [61–63]. Further work may include investigations of the effects of different types of running (i.e., continuous vs. intermittent) and different intensities (i.e., low, moderate and high) and different types of exercises (i.e., weight-bearing vs. non weight-bearing, for instance) on bone repair. Finally, the study did not intend to investigate the mechanisms and signaling transduction pathways of bone tissue responses during bone repair associated with MCR. The study aimed at analyzing positive or negative effects of MCR on bone healing. Therefore, the effects of MCR on bone vascularization, calcium intake and to (immuno-) histological and chemical analyses of the healing tissue should be further investigated to explain the observed differences in bone repair between running and sedentary rats [26].

4.5. Perspectives in Humans

To the best of our knowledge, the prophylactic effects of running exercise on lower limb bone repair have not been investigated in humans. In fact, studies in humans have mainly focused on rehabilitation after a fracture was sustained and rather investigate resistance exercises, progressive weight-bearing or whole-body vibration. By using still growing rats in our study, these may be a pertinent model to investigate bone repair in young adults, at the bone mass peak [64]. Data retrieved from studies investigated the effects of preemptive exercise on bone healing may provide valuable information to adapt training protocols in servicemen and athletes for instance, populations at increased risks of lower limb fractures [65,66] and shorten the period of convalescence. Further investigation may involve older rats or ovariectomized rats, and different running modalities, to allow inference in the elderly population, at high risk of fracture injuries too [67], and plan personalized preventive exercise strategies.

5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrated the positive effects of a preemptive 8 week-program of moderate continuous running on the healing of non-critical-sized defects in a rat model. Differences in healing kinetics in response to a running exercise were observed in tibia and femur. Further work should aim at investigating various types of exercises and intensities to determine the most osteogenic program. This study, however, presents the theoretical basis that MCR may be considered as a preemptive protocol to quicken bone healing in the event of bone injury, including programmed bone surgery such as knee prosthesis.

Author Contributions: C.B.: Conceptualization, methodology, investigation, writing—original draft, visualization, funding acquisition, M.M.: Methodology, writing—review and editing, C.C.: Validation, resources, writing—review and editing; M.B.: Conceptualization, methodology, resources, writing—review and editing; N.M.: Formal analysis, visualization, S.P.: Conceptualization, writing—review and editing H.P.: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing—review and editing, funding acquisition, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by “ENVA Appel à projet 2018”.

Acknowledgments: We thank Esther Potier, Delphine Logeart-Avramoglou, Marine Vermot des Roches, Hanane El-Hafci, Benedicte Lagofun and Philippe Germain for technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cheung, A.M.; Giangregorio, L. Mechanical stimuli and bone health: What is the evidence? *Curr. Opin. Rheumatol.* **2012**, *24*, 561–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maïmoun, L.; Sultan, C. Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism* **2011**, *60*, 373–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Troy, K.; Mancuso, M.; Butler, T.; Johnson, J. Exercise Early and Often: Effects of Physical Activity and Exercise on Women’s Bone Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hong, A.R.; Kim, S.W. Effects of Resistance Exercise on Bone Health. *Endocrinol. Metab.* **2018**, *33*, 435. [[CrossRef](#)]
- Boudenot, A.; Achiou, Z.; Portier, H. Does running strengthen bone? *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2015**, *40*, 1309–1312. [[CrossRef](#)]
- Huang, T.H.; Lin, S.C.; Chang, F.L.; Hsieh, S.S.; Liu, S.H.; Yang, R.S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *95*, 300–307. [[CrossRef](#)]
- Honda, A.; Sogo, N.; Nagasawa, S.; Shimizu, T.; Umemura, Y. High-impact exercise strengthens bone in ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *95*, 1032–1037. [[CrossRef](#)]
- Notomi, T.; Okimoto, N.; Okazaki, Y.; Tanaka, Y.; Nakamura, T.; Suzuki, M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 166–174. [[CrossRef](#)]
- Bourrin, S.; Palle, S.; Pupier, R.; Vico, L.; Alexandre, C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 1745–1752. [[CrossRef](#)]
- Joo, Y.-I.; Sone, T.; Fukunaga, M.; Lim, S.-G.; Onodera, S. Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* **2003**, *33*, 485–493. [[CrossRef](#)]
- Iwamoto, J.; Takeda, T.; Sato, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp. Anim.* **2005**, *54*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Iwamoto, J.; Yeh, J.K.; Aloia, J.F. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* **1999**, *24*, 163–169. [[CrossRef](#)]
- Hagihara, Y.; Nakajima, A.; Fukuda, S.; Goto, S.; Iida, H.; Yamazaki, M. Running exercise for short duration increases bone mineral density of loaded long bones in young growing rats. *Tohoku J. Exp. Med.* **2009**, *219*, 139–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Iwamoto, J.; Shimamura, C.; Takeda, T.; Abe, H.; Ichimura, S.; Sato, Y.; Toyama, Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J. Bone Miner. Metab.* **2004**, *22*, 26–31. [[CrossRef](#)]
- Horcajada-Molteni, M.N.; Davicco, M.J.; Collignon, H.; Lebecque, P.; Coxam, V.; Barlet, J.P. Does endurance running before orchidectomy prevent osteopenia in rats? *Eur. J. Appl. Physiol.* **1999**, *80*, 344–352. [[CrossRef](#)]
- Davicco, M.J.; Horcajada-Molteni, M.N.; Gaumet-Meunier, N.; Lebecque, P.; Coxam, V.; Barlet, J.P. Endurance training and bone metabolism in middle-aged rats. *Mech. Ageing Dev.* **1999**, *109*, 83–96. [[CrossRef](#)]
- Iijima, H.; Aoyama, T.; Ito, A.; Yamaguchi, S.; Nagai, M.; Tajino, J.; Zhang, X.; Kuroki, H. Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1563–1574. [[CrossRef](#)]
- Lavorato, V.N.; Del Carlo, R.J.; da Cunha, D.N.Q.; Okano, B.S.; Belfort, F.G.; de Freitas, J.S.; de Fatima Alves da Mota, G.; Quintão-Júnior, J.F.; Silame-Gomes, L.H.L.; Drummond, F.R.; et al. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *90*, 111–119. [[CrossRef](#)]
- Yamaguchi, S.; Aoyama, T.; Ito, A.; Nagai, M.; Iijima, H.; Tajino, J.; Zhang, X.; Kiyan, W.; Kuroki, H. The Effect of Exercise on the Early Stages of Mesenchymal Stromal Cell-Induced Cartilage Repair in a Rat Osteochondral Defect Model. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151580. [[CrossRef](#)]
- Guerino, M.R.; Luciano, E.; Goncalves, M.; Leivas, T.P. Effects of chronic physical activity and of ultrasound treatment on bone consolidation. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **1999**, *31*, 131–138.
- Rueff-Barroso, C.R.; Milagres, D.; do Valle, J.; Casimiro-Lopes, G.; Nogueira-Neto, J.F.; Zanier, J.F.C.; Porto, L.C. Bone healing in rats submitted to weight-bearing and non-weight-bearing exercises. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2008**, *14*, BR231–BR236.

22. Zhang, J.; He, F.; Zhang, W.; Zhang, M.; Yang, H.; Luo, Z.-P. Mechanical force enhanced bony formation in defect implanted with calcium sulphate cement. *Bone Res.* **2015**, *3*, 14048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Maurel, D.B.; Boisseau, N.; Pallu, S.; Rochefort, G.Y.; Benhamou, C.-L.; Jaffre, C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **2013**, *80*, 492–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bonnet, N.; Beaupied, H.; Vico, L.; Dolleans, E.; Laroche, N.; Courteix, D.; Benhamou, C.L. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2007**, *22*, 578–588. [[CrossRef](#)]
25. Heikkinen, E.; Viheraari, T.; Penttinen, R. Effect of Previous Exercise on Fracture Healing: A Biochemical Study with Mice. *Acta Orthop. Scand.* **1974**, *45*, 481–489. [[CrossRef](#)]
26. Nogueira, J.E.; Branco, L.G.S.; Issa, J.P.M. Bone repair: Effects of physical exercise and LPS systemic exposition. *Injury* **2016**, *47*, 1828–1834. [[CrossRef](#)]
27. Novelli, E.L.B.; Diniz, Y.S.; Galhardi, C.M.; Ebaid, G.M.X.; Rodrigues, H.G.; Mani, F.; Fernandes, A.A.H.; Cicogna, A.C.; Novelli Filho, J.L.V.B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* **2007**, *41*, 111–119. [[CrossRef](#)]
28. Chennaoui, M.; Drogou, C.; Gomez-Merino, D.; Grimaldi, B.; Fillion, G.; Guezennec, C.Y. Endurance training effects on 5-HT1B receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci. Lett.* **2001**, *307*, 33–36. [[CrossRef](#)]
29. Krzesiak, A.; Cognard, C.; Seville, S.; Carré, G.; Bosquet, L.; Delpech, N. High-intensity intermittent training is as effective as moderate continuous training, and not deleterious, in cardiomyocyte remodeling of hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *126*, 903–915. [[CrossRef](#)]
30. Pica, A.J.; Brooks, G.A. Effects of training and age on VO₂max in laboratory rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1982**, *14*, 249–252. [[CrossRef](#)]
31. Hulsart-Billström, G.; Bergman, K.; Andersson, B.; Hilborn, J.; Larsson, S.; Jonsson, K.B. A uni-cortical femoral defect model in the rat: Evaluation using injectable hyaluronan hydrogel as a carrier for bone morphogenetic protein-2: Bone regeneration in a uni-cortical rat femoral defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9*, 799–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Matsumoto, T.; Goto, D.; Sato, S. Subtraction micro-computed tomography of angiogenesis and osteogenesis during bone repair using synchrotron radiation with a novel contrast agent. *Lab. Investig.* **2013**, *93*, 1054–1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Matsumoto, T.; Goto, D. Effect of low-intensity whole-body vibration on bone defect repair and associated vascularization in mice. *Med. Biol. Eng. Comput* **2017**, *55*, 2257–2266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Parfitt, A.M.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *2*, 595–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldberg, R.E.; Jepsen, K.J.; Müller, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 1468–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhang, Y.; Dong, X.; Leung, P.-C.; Wong, M.-S. Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone* **2009**, *44*, 46–52. [[CrossRef](#)]
37. Schultz, V.L.; Boass, A.; Garner, S.C.; Toverud, S.U. Several anesthetics, but not diethyl ether, cause marked elevation of serum parathyroid hormone concentration in rats. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **1995**, *10*, 1298–1302. [[CrossRef](#)]
38. Milliken, G.A.; Johnson, D.E. *Analysis of Messy Data. Volume 1: Designed Experiments*; Chapman & Hall/CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1992.
39. Warden, S.J.; Galley, M.R.; Hurd, A.L.; Richard, J.S.; George, L.A.; Guildenbecher, E.A.; Barker, R.G.; Fuchs, R.K. Cortical and Trabecular Bone Benefits of Mechanical Loading Are Maintained Long Term in Mice Independent of Ovariectomy. *J. Bone Miner. Res.* **2014**, *29*, 1131–1140. [[CrossRef](#)]
40. Hestehave Pedersen, R.; Rasmussen, M.; Overgaard, S.; Ding, M. Effects of P-15 Peptide Coated Hydroxyapatite on Tibial Defect Repair In Vivo in Normal and Osteoporotic Rats. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 253858. [[CrossRef](#)]
41. Xu, X.; Zhou, J.; Yang, F.; Wei, S.; Dai, H. Using Micro-Computed Tomography to Evaluate the Dynamics of Orthodontically Induced Root Resorption Repair in a Rat Model. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150135. [[CrossRef](#)]

42. Hildebrand, T.; Rügsegger, P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **1997**, *1*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. O'Neill, K.R.; Stutz, C.M.; Mignemi, N.A.; Burns, M.C.; Murry, M.R.; Nyman, J.S.; Schoenecker, J.G. Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone* **2012**, *50*, 1357–1367. [[CrossRef](#)]
44. Liu, Z.; Gao, J.; Gong, H. Effects of treadmill with different intensities on bone quality and muscle properties in adult rats. *Biomed. Eng. Online* **2019**, *18*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Song, S.J.; Hutmacher, D.; Nurcombe, V.; Cool, S.M. Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing. *Gene* **2006**, *379*, 92–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hagihara, Y.; Fukuda, S.; Goto, S.; Iida, H.; Yamazaki, M.; Moriya, H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *J. Bone Miner. Metab.* **2005**, *23*, 289–294. [[CrossRef](#)]
47. Kohrt, W.M.; Wherry, S.J.; Wolfe, P.; Sherk, V.D.; Wellington, T.; Swanson, C.M.; Weaver, C.M.; Boxer, R.S. Maintenance of Serum Ionized Calcium During Exercise Attenuates Parathyroid Hormone and Bone Resorption Responses: Calcium clamp during exercise. *J. Bone Miner. Res.* **2018**, *33*, 1326–1334. [[CrossRef](#)]
48. Gardinier, J.D.; Mohamed, F.; Kohn, D.H. PTH Signaling during Exercise Contributes to Bone Adaptation. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 1053–1063. [[CrossRef](#)]
49. Bouassida, A.; Latiri, I.; Bouassida, S.; Zalleg, D.; Zaouali, M.; Feki, Y.; Gharbi, N.; Zbidi, A.; Tabka, Z. Parathyroid hormone and physical exercise: A brief review. *J. Sports Sci. Med.* **2006**, *5*, 367–374.
50. Yamashita, J.; McCauley, L.K. Effects of Intermittent Administration of Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein on Fracture Healing: A Narrative Review of Animal and Human Studies. *JBMR Plus* **2019**, *3*, e10250. [[CrossRef](#)]
51. Li, L.; Chen, X.; Lv, S.; Dong, M.; Zhang, L.; Tu, J.; Yang, J.; Zhang, L.; Song, Y.; Xu, L.; et al. Influence of exercise on bone remodeling-related hormones and cytokines in ovariectomized rats: A model of postmenopausal osteoporosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112845. [[CrossRef](#)]
52. Henderson, S.A.; Graham, H.K.; Mollan, R.A.B.; Riddoch, C.; Sheridan, B.; Johnston, H. Calcium homeostasis and exercise. *Int. Orthop.* **1989**, *13*, 69–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Einhorn, T.A. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin. Orthop.* **1998**, *355S*, S7–S21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1986; ISBN 978-3-642-71031-5.
55. Marotti, G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2000**, *1*, 133–136. [[PubMed](#)]
56. Skerry, T. Neurotransmitters in bone. Introduction. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2002**, *2*, 401–403. [[PubMed](#)]
57. Abou-Khalil, R.; Yang, F.; Lieu, S.; Julien, A.; Perry, J.; Pereira, C.; Relaix, F.; Miclau, T.; Marcucio, R.; Colnot, C. Role of Muscle Stem Cells during Skeletal Regeneration: Muscle Stem Cells in Bone Repair. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1501–1511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bourzac, C.; Bensedhoum, M.; Pallu, S.; Portier, H. Use of adult mesenchymal stromal cells in tissue repair: Impact of physical exercise. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2019**, *317*, C642–C654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Razi, H.; Birkhold, A.I.; Weinkamer, R.; Duda, G.N.; Willie, B.M.; Checa, S. Aging Leads to a Dysregulation in Mechanically Driven Bone Formation and Resorption: Mechanoregulation of (Re)Modeling. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 1864–1873. [[CrossRef](#)]
60. Vicente, W.S.; dos Reis, L.M.; Gracioli, R.G.; Gracioli, F.G.; Dominguez, W.V.; Wang, C.C.; Fonseca, T.L.; Velosa, A.P.; Roschel, H.; Teodoro, W.R.; et al. Bone Plasticity in Response to Exercise Is Sex-Dependent in Rats. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64725. [[CrossRef](#)]
61. Yuan, Y.; Chen, X.; Zhang, L.; Wu, J.; Guo, J.; Zou, D.; Chen, B.; Sun, Z.; Shen, C.; Zou, J. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2016**, *122*, 122–130. [[CrossRef](#)]
62. Warner, S.E.; Shea, J.E.; Miller, S.C.; Shaw, J.M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif. Tissue Int.* **2006**, *79*, 395–403. [[CrossRef](#)]
63. Liu, S.; Li, Z.; Xu, S.; Xu, L.; Yang, M.; Ni, G. Intensity-dependent effect of treadmill running on differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 7746–7756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sampson, H.W. Alcohol and Other Factors Affecting Osteoporosis Risk in Women. *Alcohol Res. Health* **2002**, *26*, 292. [[PubMed](#)]

65. Court-Brown, C.M.; Wood, A.M.; Aitken, S. The epidemiology of acute sports-related fractures in adults. *Injury* **2008**, *39*, 1365–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Waterman, B.R.; Gun, B.; Bader, J.O.; Orr, J.D.; Belmont, P.J. Epidemiology of Lower Extremity Stress Fractures in the United States Military. *Mil. Med.* **2016**, *181*, 1308–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lane, J.M.; Serota, A.C.; Raphael, B. Osteoporosis: Differences and similarities in male and female patients. *Orthop. Clin. N. Am.* **2006**, *37*, 601–609. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 2 : article remodelage osseux

A new comprehensive approach for bone remodeling under medium and high mechanical load based on cellular activity

Daniel George ^{1*}, **Rachele Allena** ², **Céline Bourzac** ³, **Stéphane Pallu** ^{3,4}, **Morad Bensidhoum** ³,
Hugues Portier ^{3,4}, and **Yves Rémond** ¹

¹ *University of Strasbourg, CNRS, ICUBE, 67000 Strasbourg, France.*

² *Arts et Métiers ParisTech, LBM/Institut de Biomécanique Humaine Georges Charpak, 75013 Paris, France*

³ *University of Paris, CNRS, INSERM, B30A, 75010 Paris, France*

⁴ *University of Orléans, COST, 45100 Orléans, France*

** Corresponding author : Daniel George – george@unistra.fr*

° Shared co-first authorship

Keywords : bone remodeling ; cellular activity ; high medium mechanical load ; osteoblasts ; osteoclasts

ABSTRACT

Most of the last century has proposed bone remodeling models based on the observation that bone density is dependent on the intensity of the applied mechanical loads. Most of these cortical or trabecular bone remodeling models are related to the osteocyte mechanosensitivity and they have all a direct correlation between the bone mineral density and the mechanical strain energy. However, experiments on human athletes show that high intensity sport activity tends not to increase bone mineral density, but it rather has a negative impact. Therefore, it appears that the optimum bone mineral density would develop for “medium” intensity activity (or medium mechanical loads) and not for the highest one.

In this work, we propose a new continuum approach based on bone cell activity being either positive or negative as a function of the intensity of the applied mechanical load. At standard earth gravity without exercise, bone homeostasis is observed with cell activity being at equilibrium. When “medium loads” such as “low intensity” or “optimized” sport activity are applied, cells are activated and an increase of bone density occurs. On the contrary, “high intensity loads” such as overtraining leads to bone density decrease or bone degradation. Our results are in agreement with the literature and enable to foresee applications such as optimal sport training for best physical conditions.

1. Introduction

The last hundred years or so have seen many bone remodeling models being developed under the hypothesis that the mechanical energy is the main driving parameter of this complex phenomenon. According to the first law of bone remodeling defined by Wolff and reprinted many

times [Wolff 2012], bone mineral density is directly dependent on the intensity of the applied mechanical loads. Many strain related models for bone remodeling have followed since. To name a few, see for example [Carter 1984], [Frost 1987] and its “mechanostat” proposal, [Cowin 1986], [Beaupré et al. 1990], [Turner 1998], or more lately [Lekszycki 2002] where the highly heterogeneous bone microstructure is seen as an optimum structural response to given external mechanical boundary conditions. Many theoretical frameworks of bone remodeling were proposed for cortical [Pivonka 2008] and trabecular [Ruimerman et al. 2005] bone accounting for different bone cells at the origin of this remodeling [Pivonka and Kamarova 2010], [Klein-Nulend et al. 2013]. More recently, further theoretical models were proposed [Madeo et al. 2011], [Lekszycki and Dell’Isola 2012], [Madeo et al. 2012], [Scala et al. 2012], some of them taking also into account the complex viscous mechanical behavior of the bone [Andreaus et al. 2014], [Giorgio et al. 2016], [Giorgio et al. 2017].

Nowadays, it is generally accepted that without considering the specific effects of the bone cells, whatever the theoretical model, the prediction of bone remodeling remains at best phenomenologically driven. Although at the continuous level (scale of the bone) the continuum mechanics is “manageable”, the integration of continuum biology is highly risky since, for the time being, there are no experimental measurements available in the literature able to link the local cells phenomena to the bone continuum. The full understanding of the bone mechanobiology is still unknown, but some literature exists on its basic principles (see for example [Burr and Allen 2013]). It is therefore possible to start developing more precise mechanobiological models, but at the local scale (scale of the cells) and try understanding what are the main biological parameters driving this evolution [Lemaire et al. 2011]. Nonetheless, bridging the local and the global scales through multiscale or homogenization models remains a challenging task [Lemaire et al. 2006], [Lemaire et al. 2010], [Lemaire et al. 2015]. Multiscale theories on biological materials have been developed lately (see e.g. [Rémond et al. 2016], [George et al. 2017], [Spingarn et al. 2017]), but the uncertainties remain on the multiscale models themselves [Sansalone et al. 2015], the scale growth response [Louna et al. 2017] or even the influence of the microstructure on the overall behavior [Sheidaei et al. 2019].

The obvious next step in bone remodeling is to try integrating more biological actions that are at the origin of the bone tissues evolution such as the capillary growth [Bednarczyk and Lekszycki 2016], the nutrients supply [Lu and Lekszycki 2016], or the cells migration [Allena and Maini 2014], [Schmitt et al. 2015], [Frame et al. 2017], [Frame et al. 2018]. However, the homogenization of such local effects at more macroscopic scales [George et al. 2018a, 2018b, 2018c] is complex to transpose and interpret. This is even without accounting for thermodynamically consistent models [Martin et al. 2017] or the influence of the bone microstructure distribution over its macroscopic behavior [Bagherian et al. 2019].

At this stage, it is clear that bone mechanobiology is a highly complex phenomenon and, even with the big progresses made in the past fifty years, we still know very little to properly describe the bone remodeling scenario. In this work, we want to address the bone remodeling phenomenon at a macroscopic scale based on the direct relationship between the mechanical

strain and the bone cell responses (see e.g. [Ehrlich and Lanion 2002]). Our approach is evidently dependent on the activation of osteoblasts for the bone creation and of the osteoclasts for the bone resorption triggered by specific signals that are transmitted by the osteocytes, as proposed in [Ignatius et al. 2005], [Andreas et al. 2014] and [Rocheffort et al. 2010]. In agreement with the experimental literature [Herman et al. 2010] and [Hao et al. 2017], we find that bone mineral density does not continually increase with the developed mechanical strain, contrarily to the proposed “mechanostat” model by Frost [Frost 1987], and that reverse effects can be observed.

2. Model development

2.1. Model construction

We propose a strain energy density (SED) based approach accounting for external mechanical loads driving the cell activity and leading to a macroscopic bone mineral density change at the continuous scale.

It has been observed that practicing a regular physical activity is healthy not only for the heart, but also to reinforce bone structure and stiffness. However, it was also acknowledged that over-training could lead to worst health condition than moderate training scenario, [Forwood and Parker 1989], [Grimston et al. 1991], [Herman et al. 2010] and [Hao et al. 2017]. Thus, for “medium” mechanical loads (i.e. intermittent sport activity under a certain threshold), the bone mineral density increases, whereas for “high” mechanical loads (i.e. critical above the given threshold), the bone mineral density decreases.

We want to keep a simplified approach in order to be able to identify the model’s parameters and to validate it. Our main assumption is that the cell activity is directly proportional to the intensity of the mechanical load, but with a predefined scenario. We define such a cell activity as the quantity of bone formation/resorption (or bone mineral density change) as a function of time and mechanical energy. Hence, for a given mechanical energy level, the cell activity will change the bone mineral density in a given time. The cell activity increases with the mechanical load up to a certain value that is proportional to the amount of available space within the structure (related to the porosity and defined on Figure 1 by the maximum osteoblasts activity per unit volume). The cell activity cannot exceed this value and a maximum cellular density exists. The maximum cellular activity (of osteoblast or osteoclasts) is dependent on the cell density at a given location and at a given time. It is assumed that this activity linearly increases (with the mechanical load) up to the maximum value (defined by the porosity). Finally, as we are working at the continuous macroscopic scale, we define a continuous representative volume element (RVE) that is large enough so that both osteoblasts and osteoclasts can be active within it at the same time (as a function of the given bone microstructure distribution and the given mechanical strain field) depending on the signals transmitted by the osteocytes. It is therefore assumed that the total bone mineral density change is the sum of the positive (through osteoblasts) and the negative (through osteoclasts) effects within this given RVE. Therefore, bone mineral density is directly proportional to the cell activity and defined by the corresponding units (i.e. the cellular activity is given in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$ of fabricated (or degraded) bone per cell density).

A schematic of the cell activities as a function of the intensity of the developed mechanical energy W within the structure is presented in Figure 1. The homeostasis condition (W_0) corresponds to the equilibrium state where it is acknowledged that bone remodeling and cellular activity are non-zero, but they are not integrated within the model. The modeled variations (i.e. bone density change) are dependent on cell activity differences away from the equilibrium state.

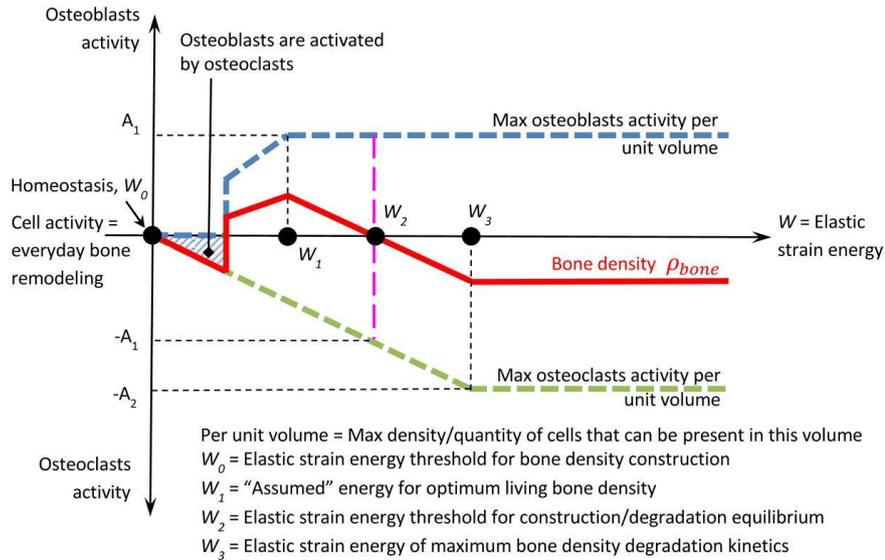


Figure 1 : Schematic of the mechano-regulatory model of cellular activity as a function of the developed mechanical energy W within the structure (blue dashed line: osteoblasts activity A_{ob} , green dashed line: osteoclasts activity A_{oc} , red line: bone density ρ_{bone} obtained by the combined blue and green cellular activities).

The osteoblasts activity is shown as positive whereas the osteoclasts activity is shown as negative. Both activities increase linearly up to a maximum level as the mechanical energy increases. Two conditions are required here :

1. for a bone density increase for "medium low" mechanical energy ($W_0 < W < W_2$), the osteoblasts activity must be higher than the osteoclasts one;
2. for a bone density decrease with "higher" mechanical energy ($W > W_2$), the osteoclasts activity must be higher than the osteoblasts one.

On the graph in Figure 1, the initial osteoblasts activity is triggered by osteoclasts (osteoblasts will start being active only after osteoclasts have "cleaned up" the bone surface so bone remodeling can initiate). At W_0 , we are at homeostasis state where neither bone formation nor resorption occurs at a constant living load condition. Only continuous bone remodeling of living is present. This means that Figure 1 is correct at a given time t and corresponds to an equilibrium

state once bone formation or degradation has finished. In the current work, this condition corresponds to the start of the analysis (initial zero condition). From W_0 to W_1 , both osteoblasts and osteoclasts activity increase at the same time leading to an increase of the bone mineral density since the sum of both cell activities is positive. When reaching the maximum osteoblasts activity, i.e. $W \geq W_1$, the bone mineral density increase is impacted by the osteoclasts activity taking over the osteoblasts one. Above a given energy threshold, from W_2 to W_3 , the bone mineral density decreases as the combined cells effect is negative. For a mechanical energy between W_0 and W_2 , we have a bone density increase, while for a mechanical energy above W_2 , we have a bone density decrease. W_2 corresponds to the energy threshold not to overtake to keep a good bone health. The following equations interpret the scheme in [Figure 1](#) :

$$\begin{aligned}
 &\text{if } W_0 < W < W_1 \text{ then } A_{ob} = k_1 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{and} \quad A_{oc} = -k_2 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \\
 &\text{if } W_1 < W < W_2 \text{ then } A_{ob} = A_1 + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{and} \quad A_{oc} = -k_2 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \\
 &\text{if } W_2 < W < W_3 \text{ then } A_{ob} = A_1 + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{and} \quad A_{oc} = -k_2 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \\
 &\text{if } W > W_3 \text{ then } A_{ob} = A_1 + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{and} \quad A_{oc} = -A_2 + \rho_{bone}^{ini}
 \end{aligned} \tag{1}$$

where k_1 and k_2 are the coefficients of osteoblasts and osteoclasts activity increase, A_1 and A_2 are their corresponding maximum values and ρ_{bone}^{ini} is the initial bone density, constant over time, in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$. Thus, we obtain a model with only four parameters (k_1, k_2, A_1, A_2) defined as follows:

$$\begin{aligned}
 A_{ob} &= k_1 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{for } W < W_1 \quad ; \quad A_{oc} = -k_2 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{for } W < W_3 \\
 A_{ob}^{max} &= A_1 + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{for } W > W_1 \quad ; \quad A_{oc}^{max} = -A_2 + \rho_{bone}^{ini} \quad \text{for } W > W_3
 \end{aligned} \tag{2}$$

The units of these four parameters are given in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$ for A_1 and A_2 , and in $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$ for k_1 and k_2 . Such parameters can be quantified experimentally by histochemistry through the measurement of the different cell density activities as a function of the applied mechanical load at any given time and point of the structure. For instance, osteocytes viability and osteoclasts activity can be determined through the ratio between empty (i.e. without cell) and full (i.e. with cell) lacunae. More specifically, osteocytes viability can be determined by cell apoptosis through cleaved-CASPASE 3 activation [[Lavrik et al. 2005](#)], [[Nicholson et al. 1995](#)], and [[Maurel et al. 2014](#)], and osteoclasts activity through the measure of the resorption area surrounding the cells (TRAP activity) [[Kodoma et al. 1993](#)].

Once the cell activity defined and quantified as a function of the mechanical energy W , we can describe it as a function of time for different levels of mechanical loads (as presented in [Figure 2](#)).

Four different cases scenarios are considered:

1. when forces correspond to everyday life conditions, we are at equilibrium state ($W_{homeostasis}$) where the bone density is in the homeostasis condition. In this case, the "average" osteoblastic and osteoclastic cells activity is compensated (normal remodeling) and bone mineral density remains constant over time;

2. when forces increase ($W_{intermediate}$), corresponding to a “sport training” like activity at a moderate level, osteoblastic cells become predominant and the sum of these effects is positive leading to an increase in the bone mineral density;
3. if the “exercise” level increases (over training like) leading to an increase of the averaged developed mechanical energy, the energy level reaches a threshold ($W_{max}=W_2$) corresponding to the maximum energy under which bone density evolution remains at best positive or null. Here again, and similarly to the homeostasis case, but not for the same reason, the combined effect of osteoblasts and osteoclasts provide equilibrium. However, contrary to the homeostasis case, this equilibrium is unstable, depending on the biology that is patient dependent;
4. finally, when the average mechanical energy goes beyond the threshold ($W=W_2$), bone density decreases due to an over expression of the osteoclastic cells reacting to a sollicitation that needs to be biologically quantified.

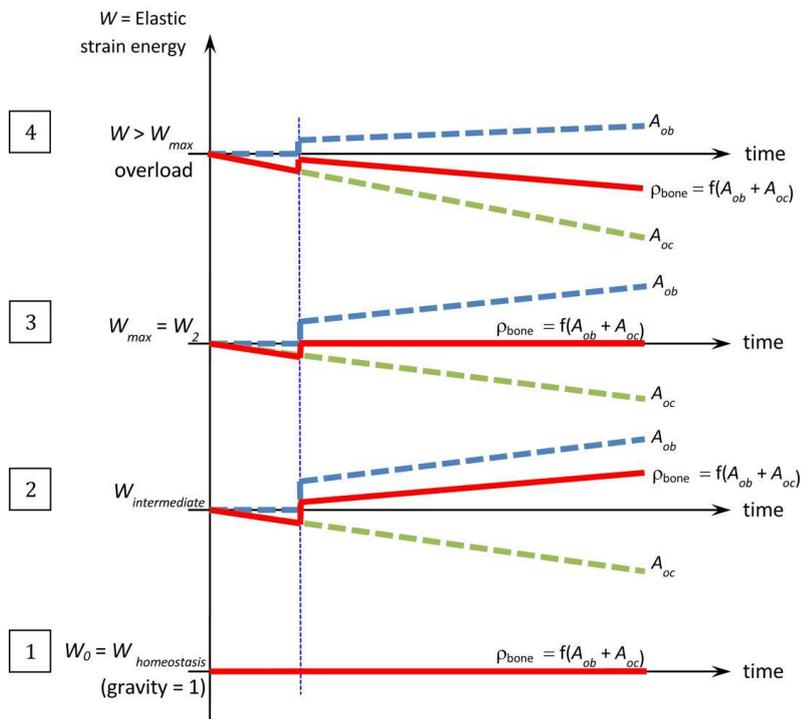


Figure 2 : Schematic of the mechano-regulatory model or cellular activity as a function of time t for different levels of applied mechanical load (energy) within the structure (blue dashed line: osteoblasts activity A_{ob} , green dashed line: osteoclasts activity A_{oc} , red line: bone density ρ_{bone}).

In essence, an average person's life is the result of the combined effect of all these different cases (being dependent on both the mechanical energy level and time) and bone mineral density evolves accordingly in space and time.

An interpretation of the schematic bone mineral density evolution in time of Figure 2 is given by the four following energy intervals :

$$\begin{aligned}
 &\text{if } W_0 < W < W_1 \text{ then } \frac{\partial \rho_{bone}}{\partial t} > 0 \text{ and } \rho_{bone} > 0 \\
 &\text{if } W_1 < W < W_2 \text{ then } \frac{\partial \rho_{bone}}{\partial t} < 0 \text{ and } \rho_{bone} > 0 \\
 &\text{if } W_2 < W < W_3 \text{ then } \frac{\partial \rho_{bone}}{\partial t} < 0 \text{ and } \rho_{bone} < 0 \\
 &\text{if } W > W_3 \text{ then } \frac{\partial \rho_{bone}}{\partial t} < 0 \text{ and } \rho_{bone} < 0
 \end{aligned} \tag{3}$$

where ρ_{bone} is the bone density.

When combining the two schemes of Figure 1 and Figure 2 on the same graph, we obtain the corresponding Figure 3 where the bone mineral density is a function of time t and the elastic strain energy W (when we suppose that the mechanical behavior of bone is linear elastic).

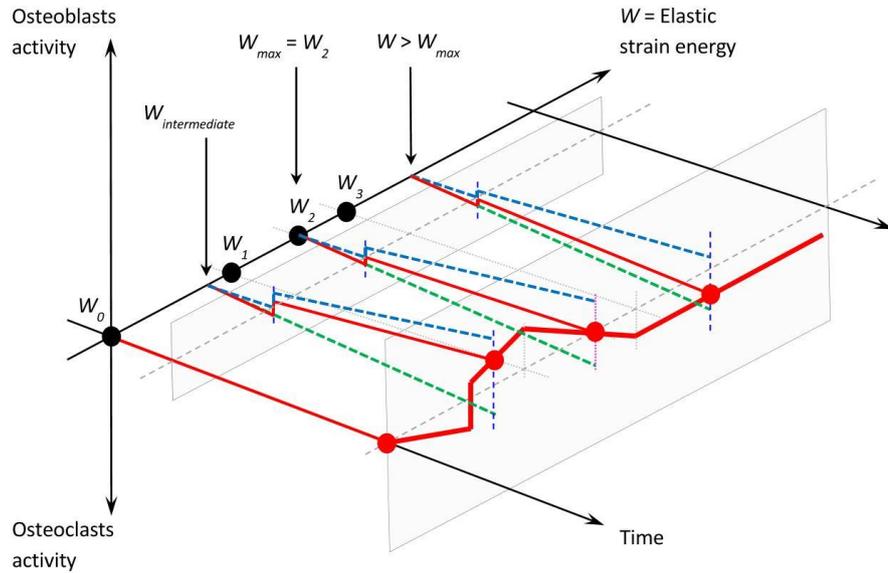
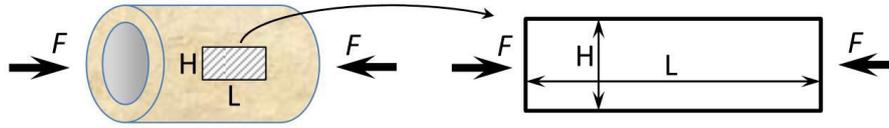


Figure 3 : Global schematic of the mechano-regulatory model or cell activity as a function of time and energy (blue dashed line: osteoblasts activity A_{ob} , green dashed line: osteoclasts activity A_{oc} , red line: bone density ρ_{bone}).

As the cell activity is defined as an amount of fabricated (or degraded) bone as a function of its density, the amount of mechanical energy developed, and the time, the variation of bone mineral density can be computed directly. There remain only to calculate the corresponding Young's modulus (as a function of the bone density), that is given by the relation $E = E_0 \cdot \rho_{bone}^2$ [Rho et al. 1995], that is classically accepted in the literature, where E_0 is the cortical bone Young's modulus.

2.2. Model application

A numerical application of the above proposed model is made on a simplified geometry accounting for simple load conditions. We consider a femur diaphysis loaded under compression (i.e. body weight) as presented on Figure 4(a). Since we assume a constant distribution of the stresses through the thickness of the femur diaphysis, we propose to study a simplified 2D rectangular beam of length $L=50\text{mm}$ and height $H=20\text{mm}$ (Figure 4(b)).



(a) Femur diaphysis under simple tension (b) Rectangular beam under simple tension

Figure 4 : Geometry for the numerical application – (a) real geometry of a femoral diaphysis, and (b) simplified geometry.

Of course, it is acknowledged that the exact quantification of the model parameters will depend on the given geometry and structure of the exact experimental model to represent. In this case, we will quantify them only for validation purposes. The other materials parameters are defined by the Young modulus of the cortical bone $E_0 = 20.3 \text{ GPa}$ and Poisson ratio $\nu = 0.3$ [Bernard et al. 2013]. The applied mechanical load is equivalent to a human body weight $F = 400 \text{ N}$ on one leg and an initial normalized bone density $\rho_{bone}^{ini} = 0.5$ is taken for validation purpose. We suppose a close system with no external input.

The model parameters were identified without *a priori* knowledge of the corresponding biological quantifications of the *in vivo* conditions and serve here only for validation purposes. The homeostatic energy $W_0 = 1\text{E-}5 \text{ mJ}$ was determined based on an average femur cross section area and its corresponding bone density and body weight load conditions. The other two energies $W_1 = 1.456\text{E-}5 \text{ mJ}$ and $W_3 = 3\text{E-}5 \text{ mJ}$ were defined based on identification of the four parameters of the model by $k_1 = 1\text{E}5 \text{ kg} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$, $k_2 = 0.7\text{E}5 \text{ kg} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$, $A_1 = 1.456 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$, and $A_2 = 2 \text{ kg} \cdot \text{mJ}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$, where $k_1 > k_2$, and $A_2 > A_1$. The intermediate energy W_2 is the linear interpolation between W_1 and W_3 . The model was implemented within the Software COMSOL Multiphysics® and the results are presented in the following section.

3. Results and discussion

3.1. Validation

The model was submitted to a constant force $F = 400$ N, corresponding to the body weight, for an arbitrary length of time, leading to a constant energy distribution throughout the structure and hence a bone density evolution as defined by Figure 3. A first numerical validation of the model was made by testing three simplified cases: (i) osteoblasts and osteoclasts have the same activity (i.e. the models parameters are equal and opposite ; $k_1 = -k_2$ and $A_1 = -A_2$), (ii) only osteoblasts are active (i.e. $k_2 = A_2 = 0$), and (iii) only osteoclasts are active (i.e. $k_1 = A_1 = 0$). The results are presented in Figure 5.

As expected, an equal intensity of osteoblasts and osteoclasts activity (Figure 5(a)) leads to a constant bone density as a function of time. This is similar to homeostasis conditions when homogenized to long periods of time (everyday life activity). On Figure 5(b), when only osteoblasts are considered (i.e. $k_2 = A_2 = 0$), there is no osteoclasts activity, therefore, if the energy level is high enough to trigger osteoblasts, bone density increases and since the bone stiffness increases correspondingly, then the developed mechanical energy (for a constant applied force) decreases, and so the osteoblasts activity. Finally, when only osteoclasts are considered (i.e. $k_1 = A_1 = 0$, Figure 5(c)), there is no osteoblasts activity, bone density decreases and so its stiffness, hence the developed mechanical energy increases (for a constant applied force), and also the osteoclasts activity.

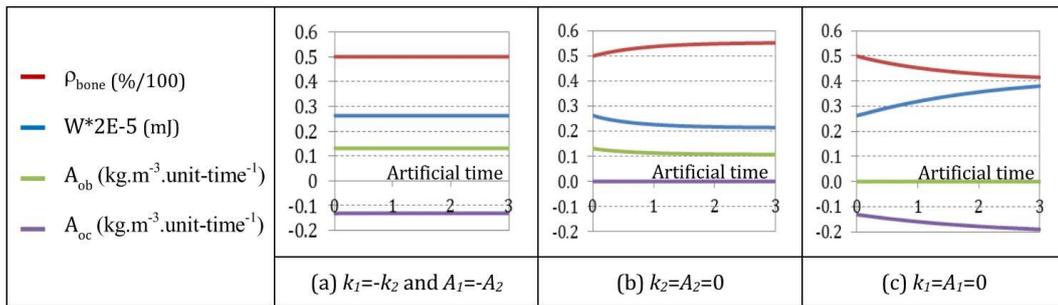


Figure 5: Evolution of the model parameters, bone density, and mechanical energy as a function of time for the three simplified cases.

3.2. Results and sensibility study for different load cases

Different intensities of F were applied from 360 N to 480 N. The results are presented in Figure 6 to Figure 8. For constant load cases below 478 N, we observe a convergence towards an increase of bone density (Figure 7) and a corresponding decrease of mechanical energy (Figure 6). For load cases above 478 N, the opposite occurs with a decrease of bone density and an increase of energy. Here, the energy threshold W_2 shows up around 478.1 N with the given values of the model parameters.

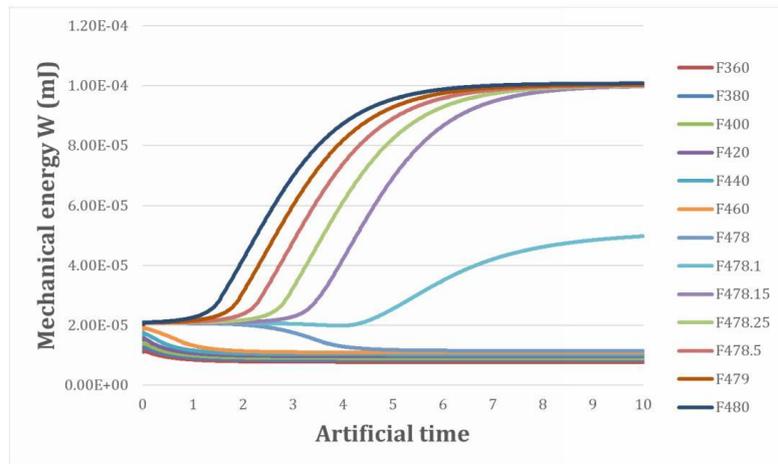


Figure 6 : Mechanical energy W variation as function of time for different values of the applied force F .

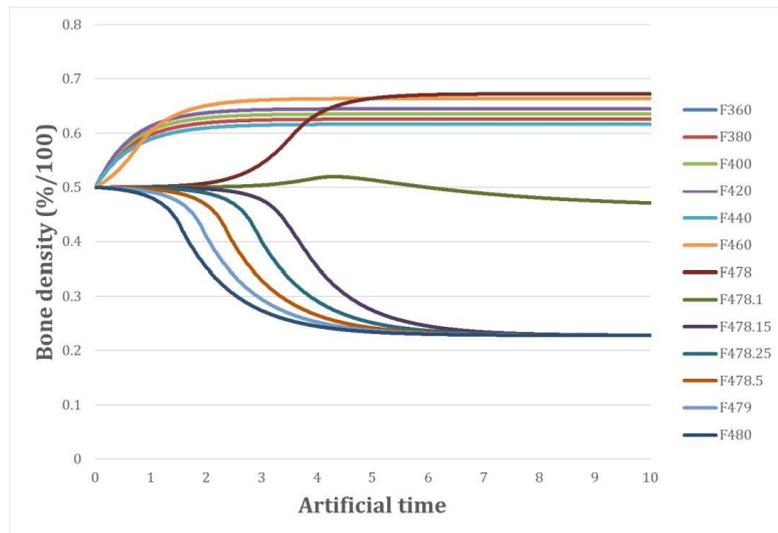


Figure 7 : Bone mineral density ρ_{bone} variation as function of time for different values of the applied force F

The threshold (i.e. the switch from positive to negative bone density) is very sensitive to the intensity of the applied force and it is located within a very thin force range around 478 N, deregulating the system very quickly. It is not possible at this stage to know if this is a limitation of the proposed model (due to the simplified assumptions made or the lack of more detailed information on the existing couplings at the mechanobiological level) or if this is really occurring

in reality. Such an aspect needs to be investigated further experimentally at a later stage. For the case of the control force (400 N), the mechanical energy W and the bone density ρ_{bone} reach final values of $9.019E-6$ mJ and 0.64.

Cell activities are presented in Figure 8. For the control case, their final values are equal to $9.019E-1$ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$ and $-6.313E-1$ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$ respectively for A_{ob} and A_{oc} . Thus, we can conclude that for this specific case, a fast stabilization is observed to reach the mechanobiological equilibrium. Since we observed a fast switch in the variables trends around 478 N, we decided to perform more simulations around this threshold in order to highlight such a transition.

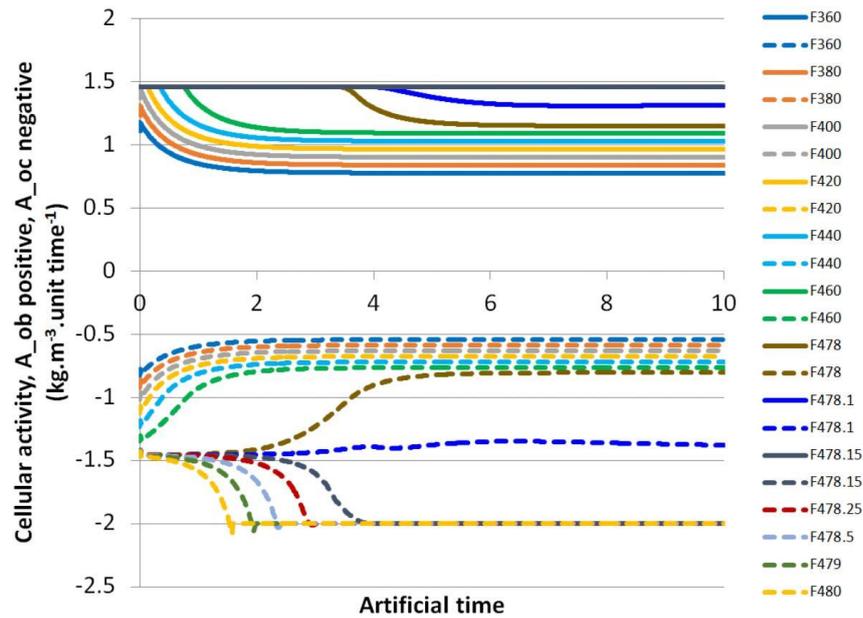


Figure 8 : Osteoblasts activity A_{ob} and osteoclasts activity A_{oc} variations as function of time for different values of the applied force F . Osteoblasts activity is shown positive in continuous lines up to a force of 478.15 N above which it remains maximum at $1.46 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$. Osteoclasts activity is shown negative in dashed lines up to a force of 480 N showing the transient behavior through 478 N towards bone degradation.

Similarly to the developed mechanical energy and bone mineral density variations, when the applied mechanical force increases above 478 N, osteoblasts activity reaches its maximum value, and we observe an inversion of the osteoclasts activity (decreasing to increasing). As the osteoblasts activity is at its maximum of $1.46 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$, when increasing the applied force, the osteoclasts activity will pass from “ineffective” (below the osteoblasts activity of $-1.5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$) to “effective” as it reaches a final value of $-2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{unit time}^{-1}$. Once the new

equilibrium reached, where both osteoblasts and osteoclasts activities have reached their maximum value, a fast bone degradation is observed (Figure 7). A return to normal physical conditions depends upon a decrease of the applied mechanical force and a new stabilization of the system under study.

The proposed model only relies on few parameters: ρ_{bone}^{ini} , A_1 , A_2 , k_1 , k_2 , W_0 , W_1 , and W_3 . A sensibility study was performed in order to evaluate their influence on the overall results. We let vary one parameter at a time in the range $\pm 10\%$ and we recorded the obtained results for the energy W , the osteoblasts (A_{ob}) and osteoclasts (A_{oc}) activities and the bone density ρ_{bone} . The obtained results show that ρ_{bone}^{ini} , A_1 , A_2 , W_0 , W_1 and W_3 , within the 10% range variation, have little effect. The initial bone mineral density value has no effect since we apply a constant force on the structure, so whatever the initial state equilibrium, it will lead to the same final results with a different kinematic evolution. Since most of the evolution occurs during the osteoblasts (A_{ob}) and osteoclasts (A_{oc}) activities through k_1 and k_2 parameters, the other parameters do not impact either the obtained results in this study.

However, it appeared that k_1 and k_2 have a higher impact on the final results as reported in Table 1. As k_1 decreases, ρ_{bone} decreases too (-11.8%), whereas as k_2 decreases, ρ_{bone} increases (+15.68%). For W and A_{ob} , inverse trends can be noticed when varying k_1 and k_2 . For k_1 , W and A_{ob} fluctuate between +11.76% and -8.67% and between -5.42% and +4.64%, respectively. For k_2 , W and A_{ob} fluctuate between -6.31% and +7.82% and between +3.32% and -3.68%, respectively. Finally, A_{oc} varies between +0.61% and +0.47% for k_1 and between +6.31% and +7.82% for k_2 .

k_1 (kg.m⁻¹.m⁻³.unit time⁻¹)	9E4 (-10%)	9.5E4 (-5%)	10E4 (Control)	10.5E4 (+5%)	11E4 (+10%)
W (mJ)	+11.76%	+5.39%	9.019E-6	-4.63%	-8.67%
ρ_{bone} (x100%)	-5.42%	-2.58%	0.6352	+2.41%	+4.64%
A_{ob} (kg.m⁻³.unit time⁻¹)	+0.61%	+0.12%	0.9019	+0.13%	+0.47%
A_{oc} (kg.m⁻³.unit time⁻¹)	-11.80%	-5.39%	-0.6313	+4.63%	+8.66%
k_2 (kg.m⁻¹.m⁻³.unit time⁻¹)	6.3E4 (-10%)	6.65E4 (-5%)	7E4 (Control)	7.35E4 (+5%)	7.7E4 (+10%)
W (mJ)	-6.31%	-3.32%	9.019E-6	+3.68%	+7.82%
ρ_{bone} (x100%)	+3.32%	+1.7%	0.6352	-1.78%	-3.68%
A_{ob} (kg.m⁻³.unit time⁻¹)	-6.31%	-3.32%	0.9019	+3.68%	+7.82%
A_{oc} (kg.m⁻³.unit time⁻¹)	+15.68%	+8.14%	-0.6313	-8.87%	-18.60%

Table 1 : Results of the sensibility study performed for k_1 and k_2 .

Most of the bone mineral density variation occurs within the k_1 and k_2 phases. Hence, modifying only one parameter (k_1 or k_2) at a time has a direct impact on the final results. This effect would

be compensated if both parameters would change oppositely in the same proportions which would lead to the same final results.

After identification and validation of the mechanobiological phenomena at play in this model (developed mechanical energy, osteoblasts and osteoclasts activities, and bone mineral density variations) as a function of time for given intensities of mechanical forces, the results were plotted not as a function of time, but as a function of the intensity of mechanical energy for all the simulations. The results are presented on Figure 9.

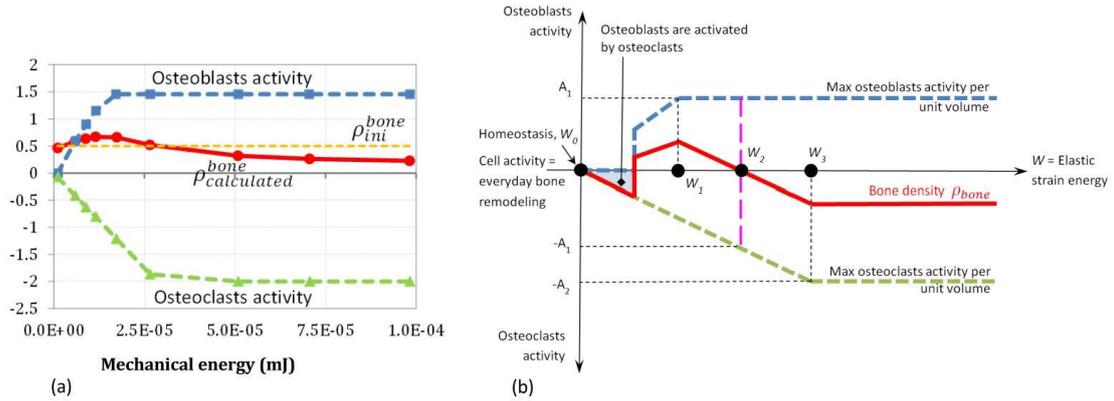


Figure 9 : Comparison between (a) numerical results and (b) initial model hypotheses.

Figure 9(a) shows the results obtained with the newly proposed mechano-regulatory model. These results should be compared with Figure 9(b) that is a recall of Figure 1 showing the theoretical hypotheses defined initially. Observation is made that a very strong correlation is obtained between the proposed model and the obtained numerical results. We have an initial increase of the osteoblasts and osteoclasts activities up to their maximum values that remain constant afterwards. The only difference is that in the numerical model, the initial osteoblasts activity being triggered by the osteoclasts was not included which explains why it is not visible on Figure 9(a), but starts directly increasing at the origin. We also observe that the bone mineral density evolution follows the sum of both cell activities (function of the applied mechanical force) being positive initially for lower mechanical energy and negative later on for higher energy from an original normalized bone density of 0.5. The maximum osteoblasts activity is reached first (energy level W_1) followed by the maximum of the osteoclasts activity (energy level W_3). We note that the equilibrium between osteoblasts and osteoclasts activity does not correspond to the bone mineral density variation equals to zero (i.e. return to the initial bone density of 0.5) as there appears to be a time delay of the structure response to the mechanical load. The passage of the bone mineral density from positive to negative variation occurs later. Thereafter, there is a continuing decrease of the bone mineral density with stabilization later on, dependent on the intensity of the applied force.

3.3. Application to variable load conditions

The numerical results were validated on constant load and showed good correlation with the proposed model hypotheses. Hence, to extract bone density variations in a more “real application” like environment, variable mechanical forces were considered. A constant force is applied on the model until equilibrium is reached (constant bone density that occurs in normal living conditions after several weeks). Then the intensity of the applied force is changed to reach a new equilibrium. This is done for two intensities of the mechanical force, one below and one above the overload degradation threshold. Results are presented in Figure 10.

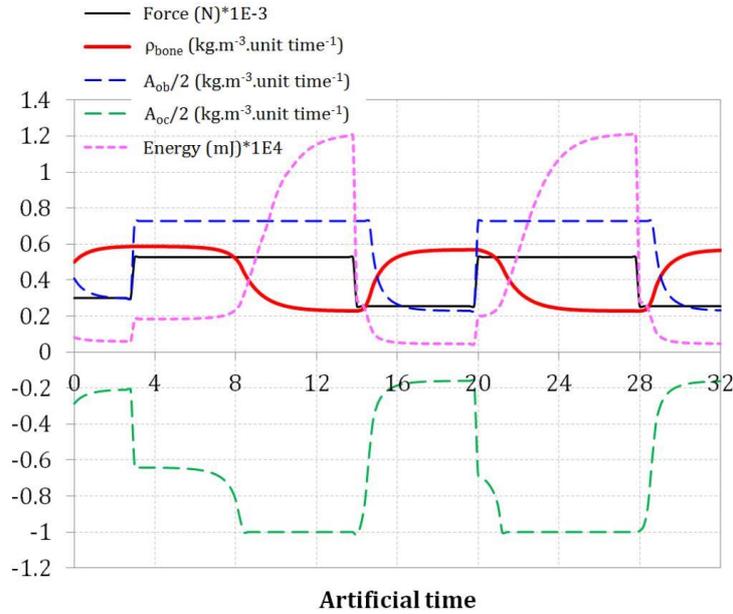


Figure 10 : Bone mineral density, cell activity, and energy variations when applying a variable force below and above the degradation threshold (overload threshold).

At initial mechanical load (300N), bone density quickly reaches equilibrium (≈ 0.55) with decreasing cellular activity. Next, the force is increased above the threshold (520N). The cell activity is changed to reach its maximum with immediate response from osteoblasts and delayed response from osteoclasts. This is dependent on the evolution of the elastic strain energy within the model that takes time to develop as a function of the bone density that is present at a given point of the structure and at a given time. Once the energy has developed above the threshold, bone density starts to decrease to reach a new equilibrium that is lower than the previous one. When cycling this effect by applying in turn these two mechanical forces, we observe the corresponding bone density variations and new equilibrium being formed. Decreasing the overloading force will lead to a re-increase of the bone density coming back to its “normal”

healthy working conditions. However, it is anticipated that keeping an overload condition onto the bone will probably lead to a complete degradation of the structure. This was not modeled here as it certainly requires accounting for extra mechanobiological actions that were not integrated within this simplified mecano-regulatory model.

4. Conclusion

A new comprehensive approach based on cell activity to describe bone remodeling is proposed to assess the possible bone degradation kinetics when under high intensity mechanical loads. Despite the complexity of the mechanobiological process, only four experimentally measurable parameters are required to tune this model for specific cases. These are the variations of the bone density kinetics with the intensity of the applied mechanical loads up to their maximum value, and the two maximum values for osteoblasts and osteoclasts activities. The results show the respective contributions of each process on the bone mineral density evolution and are in agreement with the experimental data provided in the literature. In fact, the model is able to depict both the harmful and the favorable effects of high and medium mechanical loads, respectively. With this approach, when measuring experimentally the four model parameters for different load scenario (force intensity, test specimen, ageing, diseased, etc...), potential differences are expected between the cases and possible foreseen applications for optimization process for sport activities.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CNRS for its financial support through the DEFI CNRS Mécanobiologie to carry out the work.

References

- [Wolff 2012] J. Wolff, "The Law of Bone Remodelling", *Springer Science* (2012), 126 pages.
- [Carter 1984] D.R. Carter, "Mechanical loading histories and cortical bone remodeling", *Cal. Tissue Int.* **36** (1984), S19-S24.
- [Frost 1987] H.M. Frost, "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal", *The Anat. Rec.* **219** (1987), 1-9.
- [Cowin 1986] S.C. Cowin, "Wolff's law of trabecular architecture at remodeling equilibrium", *J. Biomed. Eng.* **108**:1 (1986), 83-88.
- [Beaupré et al. 1990] G.S. Beaupré, T.E. Orr, and D.R. Carter, "An approach for time-dependent bone modeling and remodeling—Application: A preliminary remodeling simulation", *J. Orth. Res.* **8**:5 (1990), 662-670.
- [Turner 1998] C.H. Turner, "Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli", *Bone* **23**:5 (1998), 399-407.

- [Lekszycki 2002] T. Lekszycki, "Modeling of bone adaptation based on an optimal response hypothesis", *Meccanica* **37** (2002), 343-354.
- [Pivonka et al. 2008] P. Pivonka, J. Zimak, D.W. Smith, B.S. Gardiner, C.R. Dunstan, and N.A. Sims, "Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study", *Bone* **43:2** (2008), 249-263.
- [Ruimerman et al. 2005] R. Ruimerman, R. P. Hilbers, B. van Rietbergen, and R. Huiskes, "A theoretical framework for strain-related trabecular bone maintenance and adaptation", *J. Biomech.* **38** (2005), 931-941.
- [Pivonka and Kamarova 2010] P. Pivonka, and S.V. Komarova, "Mathematical modeling in bone biology: From intracellular signaling to tissue mechanics", *Bone* **47:2** (2010), 181-189.
- [Klein-Nulend et al. 2013] J. Klein-Nulend, A.D. Baker, R.G. Bacabac, A. Vatsa, and S. Weinbaum, "Mechanosensation and transduction in osteocytes", *Bone* **54** (2013), 182-190.
- [Madeo et al. 2011] A. Madeo, T. Lekszycki, and F. Dell'Isola, "A continuum model for the bio-mechanical interactions between living tissue and bio-resorbable graft after bone reconstructive surgery", *Comptes Rendus Mécanique* **339** (2011), 625-640.
- [Lekszycki and Dell'Isola 2012] T. Lekszycki T, and F. Dell'Isola, "A mixture model with evolving mass densities for describing synthesis and resorption phenomena in bones reconstructed with bio-resorbable materials", *ZAMM* **92** (2012), 426-444.
- [Madeo et al. 2012] A. Madeo, D. George, T. Lekszycki, M. Nierenberger, and Y. Rémond, "A second gradient continuum model accounting for some effects of microstructure on reconstructed bone remodeling", *Comptes Rendus Mécanique* **340** (2012), 575-589.
- [Scala et al. 2016] I. Scala, C. Spingarn, Y. Rémond, A. Madeo, and D. George, "Mechanically-driven bone remodeling simulation : application to LIPUS treated rat calvarial defects", *Math. Mech. Sol.* **22** (2016), 1976-1988.
- [Andreas et al. 2014] U. Andreas, I. Giorgio, and T. Lekszycki, "A 2-D continuum model of a mixture of bone tissue and bio-resorbable material for simulating mass density redistribution under load slowly variable in time", *ZAMM* **94** (2014), 978-1000.
- [Giorgio et al. 2016] I. Giorgio, U. Andreas, D. Scerrato, and F. Dell'Isola, "A visco-poroelastic model of functional adaptation in bones reconstructed with bio-resorbable materials", *Biomech Model Mechanobiol.* **15** (2016), 1325-1343.
- [Giorgio et al. 2017], I. Giorgio, U. Andreas, F. Dell'Isola, and T. Lekszycki, "Viscous second gradient porous materials for bones reconstructed with bio-resorbable grafts", *Ext. Mech. Let.* **13** (2017), 141-147.
- [Burr and Allen 2013] D.B. Burr, and M.R. Allen, "Basic and applied bone biology", *Academic Press* (2013), 390 pages, 85-86.
- [Lemaire et al. 2011] T. Lemaire, E. Capiez-Lernout, J. Kaiser, S. Naili, and V. Sansalone, "What is the importance of multiphysical phenomena in bone remodelling signals expression? A multiscale perspective", *J Mech Behav Biomed Mater.* **4** (2011), 909-920.
- [Lemaire et al. 2006] T. Lemaire, S. Naili, and A. Rémond, "Multiscale analysis of the coupled effects governing the movement of interstitial fluid in cortical bone", *Biomech. Mod. Mech.* **5:1** (2006), 39-52.

- [Lemaire et al. 2010] T. Lemaire, S. Naili, and V. Sansalone, "Multiphysical modelling of fluid transport through osteo-articular media", *An. Ac. Bras. Ciências* **82**:1 (2010), 127-144.
- [Lemaire et al. 2015] T. Lemaire, J. Kaiser, S. Naili, and V. Sansalone, "Three-scale multiphysics modeling of transport phenomena within cortical bone", *Math. Prob. Eng.* (2015), 398970.
- [Rémond et al. 2016] Y. Rémond, S. Ahzi, M. Baniassadi, and H. Garmestani, "Applied RVE Reconstruction and Homogenization of Heterogeneous Materials", *Ed. Wiley-ISTE* (2016), ISBN: 978-1-84821-901-4.
- [George et al. 2017] D. George, C. Spingarn, C. Dissaux, M. Nierenberger, R.A. Rahman, and Y. Rémond, "Examples of multiscale and multiphysics numerical modeling of biological tissues", *Bio-Med. Mat. Eng.* **28**:S1 (2017), S15-S27.
- [Spingarn et al. 2017] C. Spingarn, D. Wagner, Y. Rémond, and D. George, "Multiphysics of bone remodeling: a 2D mesoscale activation", *Bio-Med. Mat. Eng.* **28**:S1 (2017), S153-S158.
- [Sansalone et al. 2015] V. Sansalone, D. Gagliardi, C. Descelier, G. Haiat, and S. Naili, "On the uncertainty propagation in multiscale modeling of cortical bone elasticity", *Comp. Meth. Biom. Biomed. Eng.* **18** (2015), 2054-2055.
- [Louna et al. 2017] Z. Louna, I. Goda, J.F. Ganghoffer, and S. Benhadid, "Formulation of an effective growth response of trabecular bone based on micromechanical analyses at the trabecular level", *Arch. Appl. Mech.* **87** (2017), 457-477.
- [Sheidaei et al. 2019] A. Sheidaei, M. Kazempour, A. Hasanabadi, F. Nosouhi, M. Pithioux, M. Baniassadi, Y. Rémond, and D. George, "Influence of bone microstructure distribution on developed mechanical energy for bone remodeling using a statistical reconstruction method", *Math. Mech. Sol.* **24**:10 (2019), 3027-3041.
- [Bednarczyk and Lekszycki 2016] E. Bednarczyk, and T. Lekszycki, "A novel mathematical model for growth of capillaries and nutrient supply with application to prediction of osteophyte onset", *ZAMP* **67** (2016), 94.
- [Lu and Lekszycki 2016] Y. Lu, and T. Lekszycki, "A novel coupled system of non-local integro-differential equations modelling Young's modulus evolution, nutrients' supply and consumption during bone fracture healing", *ZAMP* **67** (2016), 111.
- [Allena and Maini 2014] R. Allena, and P.K. Maini, "Reaction-diffusion finite element model of lateral line primordium migration to explore cell leadership", *B. Math. Biol.* **76**:12 (2014), 3028-3050.
- [Schmitt et al. 2015] M. Schmitt, R. Allena, T. Schouman, S. Frasca, J.M. Collombet, X. Holy, and P. Rouch, "Diffusion model to describe osteogenesis within a porous titanium scaffold", *Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **19**:2 (2015), 171-179.
- [Frame et al. 2017] J. Frame, P.Y. Rohan, L. Corté, and R. Allena, "A mechano-biological model of multi-tissue evolution in bone", *Cont. Mech. Thermo.* **31**:1 (2017), 1-31.
- [Frame et al. 2018] J. Frame, P.Y. Rohan, L. Corté, and R. Allena, "Optimal bone structure is dependent on the interplay between mechanics and cellular activities", *Mech. Res. Com.* **92** (2018), 43-48.
- [George et al. 2018a] D. George, R. Allena, and Y. Rémond, "Cell nutrients and motility for mechanobiological bone remodeling in the context of orthodontic periodontal ligament deformation", *J. Cell. Immunotherapy* **4** (2018), 26-29.

- [George et al. 2018b] D. George, R. Allena, and Yves Rémond, "A multiphysics stimulus for continuum mechanics bone remodeling", *Math. Mech. Compl. Syst.* **6** (2018), 307-319.
- [George et al. 2018c] D. George, R. Allena, and Y. Rémond, "Integrating molecular and cellular kinetics into a coupled continuum mechanobiological stimulus for bone reconstruction", *Cont. Mech. Thermodyn.* **31**:3 (2019), 725-740.
- [Martin et al. 2017] M. Martin, T. Lemaire, G. Haiat, P. Pivonka, and V. Sansalone, "A thermodynamically consistent model of bone rotary remodeling: a 2D study", *Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **20**:S1 (2017), 127-128.
- [Bagherian et al. 2019] A. Bagherian, M. Baghani, D. George, Y. Rémond, C. Chappard, S. Patlazhan, and M. Baniassadi, "A novel numerical model for the prediction of patient-dependent bone density loss in microgravity based on micro-CT images", *Continuum Mech. Thermodyn.* (in press), DOI: 10.1007/s00161-019-00798-8.
- [Ehrlich and Lanyon 2002] P.J. Ehrlich, and L.E. Lanyon, "Mechanical strain and bone cell function : a review", *Osteop. Int.* **13** (2002), 688-700.
- [Ignatius et al. 2005] A. Ignatius, H. Blessig, A. Liedert, C. Schmidt, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, B. Friemert, and L. Clase, "Tissue engineering of bone : effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices", *Biomaterials* **26** (2005), 311-318.
- [Andreas et al. 2014] U. Andreas, M. Colloca, and D. Iacoviello, "Optimal bone density distributions: numerical analysis of the osteocyte spatial influence in bone remodeling", *Comp. Meth. Prog. Biom.* **113**:1 (2014), 80-91.
- [Rocheffort et al. 2010] G.Y. Rocheffort, S.Pallu, C.L. Benhamou, "Osteocyte : the unrecognized side of bone tissue", *Osteoporos Int.* **21**:9 (2010), 1457-1469.
- [Herman et al. 2010] B.C. Herman, L. Cardoso, R.J. Majeska, K.J. Jepsen, M.B. Schaffler, "Activation of bone remodeling after fatigue : differential response to linear microcracks and diffuse damage", *NIH Pub. Access*, **47** :4 (2010), 766-772.
- [Hao et al. 2017] L. Hao, L. Rui-Xin, Z. Bin, H. Bao-Hui, L. Ying-Jie, Z. Xi-Zheng, "Effects of athletic fatigue damage and the associated bone targeted remodeling in the rat ulan", *BioMed. Eng. Online* **16** (2017), 99.
- [Forwood and Parker 1989] M.R. Forwood, A.W. Parker, "Microdamage in response to repetitive torsional loading in the rat tibia", *Calcif Tissue Int* **45** (1989), 47-53.
- [Grimston et al. 1991] S.K. Grimston, J.R. Engsborg, R. Kloiber, "Bone mass, external loads, and stress fracture in female runners", *Int J Sports Blomech* **7** (1991), 293-302.
- [Maurel et al. 2014] D.B. Maurel, D. Benaitreau, C. Jaffré, H. Toumi, H. Portier, R. Uzbekov, C. Pichon, C.L. Benhamou, E. Lespessailles, S. Pallu, "Effect of the alcohol consumption on osteocyte cell processes: a molecular imaging study", *J Cell Mol Med* **18**:8 (2014), 1680-1693.
- [Lavrik et al. 2005] I.N. Lavrik, A. Golks, P.H. Krammer, "Caspases: pharmacological manipulation of cell death", *J. Clin. Invest* **115** (2005), 2665-2672.
- [Nicholson et al. 1995] D.W. Nicholson, A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P.R. Griffin, M. Labelle, Y.A. Lazebnik, N.A. Munday, S.M. Raju, M.E. Smulson, T.T. Yamin, V.L. Yu, D.K. Miller, "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis", *Nature* **376** (1995), 37-43.

[Kodoma et al. 1993] H. Kodoma, A. Yamasaki, M. Abe, S. Niida, Y. Hakeda, H. Kawashima, "Transient Recruitment of Osteoclasts and Expression of Their Function in Osteopetrotic (op/op) Mice by a Single Injection of Macrophage Colony-Stimulating Factor", *J. Bone Min. Res.* **8**:1 (1993), 45-50.

[Rho et al. 1995] J.Y. Rho, M.C. Ho Ba Tho, R.B. Ashman, "Relations of mechanical properties to density and CT numbers in human bone", *Med. Eng. Phys.* **17**:5 (1995), 347-355.

[Bernard et al. 2013] S. Bernard, Q. Grimal, P. Laugier, "Accurate measurement of cortical bone elasticity tensor with resonant ultrasound spectroscopy", *J. Mech. Beh. Bio. Mat.* **18** (2013), 12-19.

Annexe 3 : revue exercice et cellules souches

REVIEW

Use of adult mesenchymal stromal cells in tissue repair: impact of physical exercise

© Celine Bourzac,^{1,2} Morad Bensidhoum,¹ Stephane Pallu,^{1,3} and © Hugues Portier^{1,3}

¹Université de Paris, CNRS, INSERM, Laboratoire de Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Osteoarticulaires (B3OA), Paris, France; ²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Laboratoire de Biologie, Bioingénierie et Bioimagerie Osteoarticulaires (B3OA), Maisons-Alfort, France; and ³Université d'Orléans, Le Collegium sciences et techniques (COST), Orléans, France

Submitted 27 December 2018; accepted in final form 17 June 2019

Bourzac C, Bensidhoum M, Pallu S, Portier H. Use of adult mesenchymal stromal cells in tissue repair: impact of physical exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 317: C642–C654, 2019. First published June 26, 2019; doi:10.1152/ajpcell.00530.2018.—Physical exercise (PE) has unquestionable beneficial effects on health, which likely extend into several organ-to-cell physiological processes. At the cell scale, endogenous mesenchymal stromal cells (MSCs) contribute to tissue repair, although their repair capacities may be insufficient in paucicellular or severely damaged tissues. For this reason, MSC transplantation holds great promise for tissue repair. With the goals of understanding if PE has beneficial effects on MSC biology and if PE potentiates their role in tissue repair, we reviewed literature reports regarding the effects of PE on MSC properties (specifically, proliferation, differentiation, and homing) and of a combination of PE and MSC transplantation on tissue repair (specifically neural, cartilage, and muscular tissues). Contradictory results have been reported; interpretation is complicated because various and different species, cell sources, and experimental protocols, specifically exercise programs, have been used. On the basis of these data, the effects of exercise on MSC proliferation and differentiation depend on exercise characteristics (type, intensity, duration, etc.) and on the characteristics of the tissue from which the MSCs were collected. For the in vitro studies, the level of strain (and other details of the mechanical stimulus), the time elapsed between the end of exposure to strain and MSC collection, the age of the donors, as well as the passage number at which the MSCs are evaluated also play a role. The combination of PE and MSC engraftment improves neural, cartilage, and muscular tissue recovery, but it is not clear whether the effects of MSCs and exercise are additive or synergistic.

differentiation; mesenchymal stromal cells; physical exercise; proliferation; repair

INTRODUCTION

There is evidence that regular physical exercise (PE) has unquestionable beneficial effects on health: for instance, regular aerobic fitness exercise reduces by 33% the risk of developing cardiovascular diseases (54); exercise-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells, involved in vascular repair and angiogenesis, may explain this positive effect (43). There is also evidence that these benefits depend on the PE nature: for instance, brisk walking has superior effects to slower pace to reduce cardiovascular-related mortality (47).

Focusing on the cell scale, literature provided evidence that PE promotes hematopoietic stromal cell and progenitor cell (HSPC) mobilization through adaptations in the medullary-niche architecture and increases in skeletal-muscle cytokine

production (3, 10). In addition, the HSPC numbers in peripheral blood transiently increase following heavy exercise (10). In training of runners, HSPC numbers increase in both the bone marrow (BM) and extramedullary organs but decrease following heavy exercise (10).

Mesenchymal stromal cells (MSCs) behave as plastic-adherent, self-renewing cells with colony-forming capability that can differentiate into various cell types including osteocytes, chondrocytes, and adipocytes in vitro (39). MSCs are identified by the expression of a subset of cell markers (such as CD73, CD90, and CD 105⁺) and by the absence of hematopoietic markers (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, or CD19 and HLA-DR) (14). MSCs, which form a reservoir of progenitors for the replacement of damaged or aging cells (8), have been isolated from various tissues (20, 50). Although direct replacement of lost or damaged cells by MSC differentiation has been observed for bone (16), cartilage (13), and liver (49), in vivo, MSCs have now been demonstrated to synthesize and release paracrine factors, highlighting their primary role as a stromal

Address for reprint requests and other correspondence: H. Portier, Univ. d'Orléans, COST, 10 Ave. de Verdun, COST, F-45100 Orléans, France (e-mail: hugues.portier@univ-orleans.fr).

support for tissue regeneration (42). Such replacement capacities, however, may either be at a very low rate (7) or sometimes overcome, for instance, in paucicellular (32) and severely damaged tissues (56). In such cases, MSC transplantation holds substantial promise for tissue repair (2, 6, 12, 31, 34), specifically for the treatment of cardiovascular (34), neurodegenerative (2), and osteo-articular lesions (6, 12, 31). We, therefore, hypothesized that PE may improve endogenous- and transplanted-MS C properties.

One investigator (C. Bourzac) searched PubMed, using the following strategy: (mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells) and (exercise or physical exercise) and (transplantation or implantation) and (tissue repair or tissue healing) with English and French language restriction. Inclusion criteria were thorough description of the exercise protocols, data on MSC properties, and concomitant (<48 h between MSC transplantation and start of the exercise) use of MSC and exercise for tissue repair. In vivo studies pertaining to low-magnitude vibrations, believed to mimic high-impact exercises (18, 44), were also included. In vitro studies (stretching...), hematopoietic stem cells studies or limb unloading studies were excluded. The present review outlines the effects of PE on MSC properties (specifically, proliferation, differentiation, and homing), as well as the combined effects of PE and MSC transplantation in the repair of neural, cartilage, and muscular tissues in humans and rodents.

EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ON MESENCHYMAL STROMAL CELL PROPERTIES

Details regarding exercise regimes and MSC characterization are provided in Table 1.

Physical Exercise Affects Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Apoptosis

In some diseases, for instance osteoporosis, the number of MSCs is insufficient for bone regeneration (19). PE is recommended in osteoporotic people to improve bone health. Is PE altering MSC proliferation and apoptosis? The effects of various exercise regimes on MSC proliferation and apoptosis were investigated in rodent models and human athletes (Table 1 and Fig. 1).

In rodents, most reports pertaining to MSC proliferation have been focusing on the effects of moderate continuous treadmill exercise (CTE) on BM-MS C, and results from these studies are conflicting. For instance, when compared with results obtained from sedentary controls, a higher [21 ± 2 vs. 16 ± 2 , $P < 0.05$ (33)] or a similar [$P > 0.05$ (3)] number of colony-forming units (CFU)-f was obtained with BM-MS Cs collected from femurs or tibiae of mice submitted to moderate CTE for several weeks. Parameters in these studies that may have contributed to the observed discrepancies include duration of the exercise protocols [5 (33) vs. 10 (3) wk; see Table 1 for further details], age at the time of BM-MS C collection [10 (33) vs. 15 (3) wk], and cell culture duration before CFU-f count [21 (33) vs. 14 (3) days]. When considering an acute single bout exercise, the proliferation of BM-MS Cs collected from 4-wk-old C57B1/6 mice (assessed by the number of 5-bromo-2-deoxyuridine-positive MSC) submitted to CTE was increased ($P = 0.01$) in runners, compared with respective results in sedentary controls (15). Similarly, an acute single

bout of downhill running (eccentric exercise) resulted in increased numbers (2.2-fold, $P < 0.001$) of muscle-derived (m) MSC in skeletal muscles collected from wild-type mice (age, sex not reported) compared with respective results obtained from sedentary mice (51). The appearance of these mMSC in skeletal muscles was shown to be regulated by α_7 -integrin (51).

Regarding tendon tissue, population-doubling time of patellar tendon-derived stem cells (TSC) collected from 20-wk-old Sprague-Dawley rats (sex not reported) exposed to moderate CTE was 35% shorter ($P < 0.05$) compared with respective results from sedentary controls (60). Moreover, the colony numbers of TSC and the number of TSC per colony, were higher ($P < 0.05$) in the exercising, compared with sedentary rats (60). Similarly, the numbers of TSC collected from the patella of aging (9- and 24-mo-old) mice submitted to moderate CTE (50 min/day, 5 days/wk for 3 wk; speed not reported) were higher ($P < 0.05$) compared with controls (59).

In the studies above, the CFU-f numbers may have been affected by cell passage and tissue origin. Supporting evidence was provided by the results that the CFU-f numbers were higher ($P < 0.05$) for passage 3 but not passage 6 MSCs when collected from bone marrow (from 13- to 14-wk-old male Wistar rats exposed to moderate CTE) compared with sedentary controls. In contrast, the CFU-f numbers were higher ($P < 0.05$) for either passage 3 or passage 6 MSC when collected from adipose tissue (AT) (28). Within a given tissue, for instance bone marrow, MSC proliferation may also be affected by the specific site of cell collection. Supporting evidence was provided by the results that BM-MS C numbers collected from the humerus of 6-wk-old, female Hsd:ICR mice were similar ($P = 0.39$) between mice submitted to moderate CTE and sedentary controls, whereas in the femur CTE lowered ($P = 0.044$) the number of BM-MS Cs (52). Since the baseline density in BM-MS Cs was similar ($P = 0.61$) between the two bones in the control group, the lowered number in the running group was interpreted as MSC having been signaled away from their progenitor state in the femur (52).

Voluntary-climbing exercise (VCE) on a 100 cm mesh-wire tower (66–73 m/day for 12–13 min/day for 4 wk) did not affect the CFU-f numbers for BM-MS Cs collected from the femurs of 8-wk-old mice at 2 and 4 wk of the experiment (35). Unfortunately, these results are based on a single study. In contrast, low-magnitude high-frequency vibrations (LMHFV; provided by a vertically oscillating platform at 90 Hz, 0.2 g, 15 min/day, 5 days/wk for 6 wk) applied to 7-wk-old male mice, increased, although not significantly ($P = 0.23$), MSC numbers in bone marrow compared with respective results obtained from control mice with no vibrations (30).

In humans, the effects of a single bout of intense exercise (46) or contraction resistance training (17) were evaluated on MSC proliferation. Five athletes (age and sex not reported) were submitted to a single bout of cycling ergometer exercise (warm-up for 12 min followed by exhausting exercise), and sera were collected before warm-up, immediately after exhaustion, and 1 h after exercise, and used as supplement in in vitro culture of human BM-MS Cs (donor age and sex not reported) (46). The percentages of proliferative, passage 3-BM-MS Cs were similar whether these cells were cultured with serum collected before warm-up (7%), at exhaustion (5%), and 1 h after exercise (9%) (46). In contrast, the numbers of mMSC,

Table 1. Effects of physical exercise on mesenchymal stromal cell properties

Properties/Exercise	Exercise Regime	Effects	Method of Assessment	MSC Origin	MSC Characterization	Species	Ref.
Proliferation							
MCR	14 m/min (1st wk) to 24 m/min (10th days/wk), 10 wk	= CFU-f (29% as many as in sedentary controls but $P > 0.05$)	CFU count	BM (tibia, femur)	Adherence to plastic, Sca-1 ⁺ , c-kit ⁺	Mice	(3)
MCR	14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↑ CFU-f (21 ± 2 vs. $1.8 \pm 2 \times 10^6$ Cells in sedentary controls, $P < 0.05$)	CFU count	BM (tibia, femur)	Mononucleated, Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺ cells	Mice	(32)
MCR	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ CFU-f of 3rd passage BM and AT-MSC vs. sedentary controls	CFU count	BM (femur) AT (inguinal fat pad)	CD11b ⁻ CD45 ⁻ CD79 ⁺ CD90 ⁺	Rats	(27)
MCR	13 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↑ CFU-f of 6th passage AT-MSC vs. sedentary controls	CFU count + morphology	Tendon (patellar)	Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(58)
MCR	12 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 1 wk	↑ CFU (and size of colonies) of TSC	Flow cytometry	BM (humerus, femur)	Oct-4, Nanog, Nucleostemin	Mice	(50)
MCR	14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk	= MSC numbers in humerus (vs. sedentary controls, $P = 0.39$)	Flow cytometry	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ , c-Kit ⁺ , CD44 ⁺ , CD90.2 ⁺ , CD105 ⁺	Mice	(32)
MCR	Single bout, warming 8 m/min, 2 m/min, increase every 10 min until 16 m/min, 16 m/min 30 min, 18 m/min 20 min, 0% slope	↑ MSC numbers in femur (vs. sedentary controls, $P = 0.044$)	Flow cytometry	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺	Mice	(32)
MCR	13 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↑ MSC numbers ($4 \pm 2 \times 10^6$ vs. 16 ± 2 in sedentary controls, $P < 0.05$) after 21 days in culture	Immunocytochemistry	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺	Mice	(32)
MCR	50 min/day, 5 days/wk, 3 wk, speed not reported	↑ PDGFRα ⁺ MSC numbers ($68.43 \pm 4.43\%$ vs. $57.02 \pm 8.00\%$ in sedentary controls, $P = 0.01$)	BrdU incorporation	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ , c-Kit ⁺ , Lin ⁻ , CD45 ⁻ , PDGFRα ⁺	Mice	(15)
LMHFV	15 min/day, 5 day/wk, 90 Hz, 0.2 g peak acceleration	↓ PDT of TSC by 35% vs. sedentary controls ($P < 0.05$)	Cell count	Tendon (patellar)	Oct-4, Nanog, Nucleostemin	Rats	(58)
DRE	17 m/min, 30 min, -20° slope, acute single bout	↓ PDT of TSC vs. sedentary controls ($P < 0.05$)	Cell count and morphology	Tendon (patellar)	Oct-4, NS, Sca-1, SSEA-1	Rats	(57)
CRT	Knee flexions, 33 min/day, 3 days/wk, 12 wk (75–85° range of motion, 2–3 s tempo, eccentric loading = 120% of concentric loading)	↑ MSC numbers by 46.1% (vs. sedentary controls, $P = 0.022$)	Flow cytometry	BM (femur, tibia)	Sca-1 ⁺ , Pref-1 ⁺	Mice	(29)
CRT		↑ Muscle-derived MSC	Flow cytometry	Muscle (gastrocnemius, soleus)	Sca-1 ⁺ CD45 ⁻	Mice	(51)
CRT		↑ MSC numbers vs. before training ($P < 0.01$)	Immunohistochemistry Ki-67	Muscle (vastus lateralis)	Mononucleated, PDGFRα ⁺ CD90 ⁺	Humans	(17)

Continued

Table 1.—Continued

Properties/Exercise	Exercise Regime	Effects	Method of Assessment	MSC Origin	MSC Characterization	Species	Ref.
MCR	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo 19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↓ MSC apoptosis (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = MSC apoptosis	Caspase-3 expression RT-PCR	BM (femur, tibia)	Adherence to plastic	Rats	(21)
VCE	66–73 m/day for 12–13 min/day, 4 wk	= CFU-f vs. sedentary controls	CFU count	BM (femur) AT (inguinal fat pad) BM (tibia)	CD11b ⁺ CD45 ⁺ CD79 ⁺ CD90 ⁺ , osteocyte and adipocyte differentiation Adherence to plastic	Rats	(27)
Differentiation Osteogenic ICR	95% maximum oxygen uptake, 28 m/min, 50 min/day, 6 days/wk for 5 wk, 5° slope 85% maximum oxygen uptake, 18 m/min, 50 min/day, 6 days/wk for 5 wk, 5° slope 14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk	= ALP-positive CFU-f vs. sedentary controls ↑ ALP-positive CFU-f vs. sedentary controls ($P < 0.05$)	ALP staining + cell count	BM (femur)	Adherence to plastic	Mice	(59)
MCR	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo, 0° slope 19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ ALP activity (19 ± 1 vs. $16 \mu\text{U/mL} \pm 1$ in sedentary controls, $P < 0.05$) ↑ ALP activity in osteopenic rats (vs. sedentary osteopenic controls, $P < 0.05$) at 7 but not 14 and 21 days of culture ↑ ALP activity in 3rd and 6th passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Colorimetric assay	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁺ CD45 ⁺ CD31 ⁺ CD51 ⁺	Mice	(32)
	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo	↑ ALP activity in osteopenic rats (vs. sedentary osteopenic controls, $P < 0.05$) at 7, 14, 21 days of culture	Colorimetric assay	BM (femur)	CD45 ⁺ CD54 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺	Rats	(36)
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ ALP activity in 3rd and 6th passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	pNPP	BM (femur) AT (inguinal fat pad)	CD11b ⁺ CD45 ⁺ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)
	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo	↑ ALP expression in adult rats (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = ALP expression (vs. young rats, $P > 0.05$) at 7, 14, 21 days of culture ↑ ALP-mRNA expression with 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = ALP-mRNA expression with 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) ↑ OCL expression in adult rats (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = OCL expression (vs. young rats, $P > 0.05$), at 21 days of culture = Sialoprotein expression in adult rats (vs. sedentary controls, $P > 0.05$) = Col I expression in adult rat (vs. young rats, $P > 0.05$)	qRT-PCR	BM (femur, tibia)	Adherence to plastic	Rats	(21)
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ ALP-mRNA expression with 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = ALP-mRNA expression with 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	RT-PCR	BM (femur) AT (inguinal fat pad)	CD11b ⁺ CD45 ⁺ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)
	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo	↑ OCL expression in adult rats (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = OCL expression (vs. young rats, $P > 0.05$), at 21 days of culture = Sialoprotein expression in adult rats (vs. sedentary controls, $P > 0.05$) = Col I expression in adult rat (vs. young rats, $P > 0.05$)	qRT-PCR	BM (femur, tibia)	Adherence to plastic	Rats	(21)

Continued

Table 1.—Continued

Properties/Exercise	Exercise Regime	Effects	Method of Assessment	MSC Origin	MSC Characterization	Species	Ref.	
Differentiation Osteogenic MCR	14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↑ OCL level (170 ± 1 vs. 130 ng/mL ± 1 in sedentary controls, $P < 0.05$) ↑ OPN level (48 ± 2 vs. 32 ng/mL ± 2 in sedentary controls, $P < 0.05$)	ELISA	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺	Mice	(32)	
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ OCL mRNA expression for 3rd passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = OCL mRNA expression for 6th passage BM-MSCs ($P > 0.05$) ↑ Col I mRNA expression for 3rd passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$), = Col I mRNA expression for 6th passage AT-MSC ($P > 0.05$) = OCL mRNA expression for 3rd and 6th passage AT-MSC (vs. sedentary controls, $P > 0.05$) = Col I mRNA expression for 3rd and 6th passage AT-MSC (vs. sedentary controls, $P > 0.05$) = % of absorbed alizarin red dye (81 ± 9 vs. 56 ± 3 in sedentary controls, $P < 0.05$)	RT-PCR	BM (femur) AT (inguinal fat pad)	CD11b ⁻ CD45 ⁻ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)	
	14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk 19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↑ %Absorbed alizarin red dye for 3rd passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed alizarin red dye for 6th passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed alizarin red dye for 3rd and 6th passage AT-MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) ↑ Numbers of mineralized nodules (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Alizarin red staining + DO	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺	Mice	(32)	
	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo 15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo, 0° slope	↑ %Absorbed alizarin red dye for 3rd passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed alizarin red dye for 6th passage BM-MSCs (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed alizarin red dye for 3rd and 6th passage AT-MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) ↑ Numbers of mineralized nodules (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Alizarin red staining + DO	BM (femur) AT (inguinal fat pad)	CD11b ⁻ CD45 ⁻ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)	
	15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 3 mo	↑ Numbers of mineralized nodules in osteopenic rats (8.85 ± 0.9 , 8.27 ± 0.7 , 6.47 ± 0.3 vs. 0.51 ± 0.1 , 0.70 ± 0.1 , 0.02 ± 0.03 in sedentary osteopenic controls, at 7, 14, and 21 days respectively, $P < 0.05$, but $<$ that in nonosteopenic rats, $P < 0.05$) = Numbers of mineralized nodules for 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Silver stain + count	BM (femur, tibia)	Adherence to plastic	Rats	(21)	
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↓ %Absorbed Oil red O dye (17 ± 3 vs. 46 ± 3 in sedentary controls, $P < 0.05$)	Silver stain + count	BM (femur)	CD45 CD54 CD73 CD90	Rats	(36)	
	14 m/min (1st wk) to 28 m/min (5th wk), 45 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↓ %Absorbed Oil red O dye for 3rd passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed Oil red O dye for 6th passage MSC (vs. sedentary controls) ↓ %Absorbed Oil red O dye 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Alizarin red staining + DO	AT	CD11b ⁻ CD45 ⁻ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)	
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↓ %Absorbed Oil red O dye (17 ± 3 vs. 46 ± 3 in sedentary controls, $P < 0.05$)	Oil red O staining + DO	BM (tibia, femur)	Sca-1 ⁺ Lin ⁻ CD45 ⁻ CD31 ⁻ CD51 ⁺	Mice	(32)	
	Adipogenic MCR	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↓ %Absorbed Oil red O dye for 3rd passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$) = %Absorbed Oil red O dye for 6th passage MSC (vs. sedentary controls) ↓ %Absorbed Oil red O dye 3rd and 6th passage MSC (vs. sedentary controls, $P < 0.05$)	Oil red O staining + DO	BM AT	CD11b ⁻ CD45 ⁻ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)

Continued

Table 1.—Continued

Properties/Exercise	Exercise Regime	Effects	Method of Assessment	MSC Origin	MSC Characterization	Species	Ref.
	19.3 m/min, 5° slope, 60 min/day, 8 wk	↓ PPAR-γ2 mRNA for 3rd passage MSC (vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) ↓ C/EBP-α mRNA for 6th passage MSC (vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05)	RT-PCR	BM, AT	CD11b [−] CD45 ⁺ CD79 ⁺ CD90 ⁺ Differentiation in osteocyte and adipocyte	Rats	(27)
Tenogenic MCR	13 m/min, 30 min/day, 5 days/wk, 5 wk	↑ Col I (5-fold, vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) ↑ Col III (3-fold, vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) ↑ Tenomodulin (2-fold, vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) ↓ >50% PPAR-γ2, Runx2 and Col II (vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05)	RT-PCR	Tendon (patellar)	Oct-4, Nanog, Nucleostemin	Rats	(58)
Osteogenic LCR	65% maximum oxygen uptake; 8 m/min, 50 min/day, 6 days/wk for 5 wk, 5° slope 66–73 m/day for 12–13 min/day, 4 wk	= ALP-positive CFU-f vs. sedentary controls ↑ ALP-positive CFU-f (vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) at 2 wk ↑ Size of mineralized nodules (vs. sedentary controls, <i>P</i> < 0.05) at 2 wk	ALP staining + count	BM (femur)	Adherence to plastic	Mice	(59)
VCE (light)	Exercise to exhaustion (max 8 min)	= Proliferation rate of 3rd passage MSC cultured with serum collected before warm-up (7%) vs. immediately after exhaustion (5%) vs. 1 h after exhaustion (9%) = Apoptosis for 3rd passage MSC before warm up, immediately after exhaustion and 1 h after exhaustion ↑ Migration of 3rd passage MSC by 120% (immediately after exhaustive exercise, vs. before exercise, <i>P</i> < 0.05)	ALP staining + count Alizarin red staining area immunohistochemistry KI-67 Immunohistochemistry activated caspase-3	BM (tibia) BM (femur)	Adherence to plastic Gradient density, adherence to plastic	Mice Humans	(34) (45)
Cycling ergometer (intensive)	Warming 8 m/min, increasing 2 m/m every 10 min until 16 m/min, 16 min for 30 min, then 18 m/min 20 min, 0% slope	↑ Migration of 3rd passage MSC by 132% (1 h after exhaustive exercise, vs. before exercise, <i>P</i> < 0.05) Secretion of G-CSF, SCF, IL-2, IL-17, STNFR1, IL-3, IL-5, and IFN-γ was decreased	Boyden chamber	BM (femur)	Gradient density, adherence to plastic	Humans	(45)
CTE			Cytokine assay	BM (femur, tibia)	Lin [−] , CD45 [−]	Mice	(15)

ALP, alkaline phosphatase; AT, adipose tissue; BM, bone marrow; BrdU, 5-bromo-2-deoxyuridine; CFU, colony-forming unit; Col I, type I collagen; Col II, type II collagen; Col III, type III collagen; CRT, contraction resistance training; DRE, downhill running exercise; Fabp4, fatty acid binding protein 4 adipocyte; HU, hind limb unloading; ICR, intensive continuous running; LCR, low-intensity continuous running; MCR, moderate continuous running; MSC, mesenchymal stem cells; OCL, osteoclast; OPN, osteopontin; Osx, Osterix; PDT, population doubling time; pNPP, *p*-nitrophenyl phosphate assay; PPAR-γ2, peroxisome proliferator-activated receptor γ2 (a master transcription factor during adipogenesis); TSC, tendon stem cells; VCE, voluntary climbing exercise.

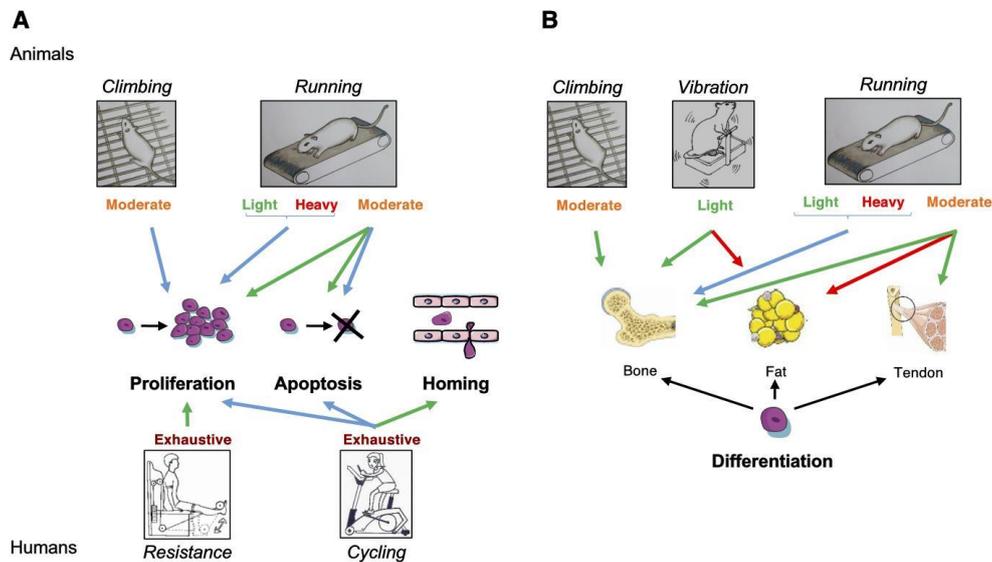


Fig. 1. Effects of physical exercise on mesenchymal stromal cell (MSC) properties. The effects of physical exercise on MSC proliferation, apoptosis, and homing (A) and differentiation (osteogenic, adipogenic and tenogenic) (B) capacities are presented. Green arrows indicate a positive effect (increased capacity), red arrows indicate a negative effect (decreased capacity), and blue arrows indicate an absence of effect (similar capacity) of physical exercise on MSC properties.

collected from the vastus lateralis of young (mean age: 23.4 yr) men were increased ($P < 0.01$) following concentric (one leg) or eccentric (the contralateral leg) contraction resistance training, compared with results obtained before exercise initiation (17).

Considering MSC apoptosis, the results reported in the literature are inconclusive. In one in vivo study, moderate CTE (15 m/min, 30 min/day, 5 days/wk for 3 mo) increased ($P < 0.05$) cleaved caspase-3 expression in passage 4 BM-MSCs from 6-mo-old, female, Wistar rats compared with sedentary rats (22). The percentage of BM-MSCs per field in both groups, however, was similar, suggesting that PE is associated with both a higher rate of apoptosis and an increased rate of cell proliferation (22). In another study, moderate CTE (19.3 m/min, on a 5° incline, 60 min/day for 8 wk) did not affect apoptosis of BM-MSCs from 13- to 14-wk-old, male Wistar rats (28). Similar results were obtained in vitro: the number of apoptotic human BM-MSCs was similar after the BM-MSCs were cultured with athletes' sera obtained either immediately after exhaustive exercise or 1 h later (46).

In summary, literature reports provided evidence that the effects of exercise on MSC proliferation and apoptosis depend on exercise characteristics, specifically type (such as treadmill running, climbing, vibration, etc.), intensity (low, moderate, intense, etc.), duration of exposure to exercise conditions (acute single bout or chronic), age of the subjects, and origin of the tissue from which the MSC were collected. The time elapsed between the end of exposure to exercise and MSC collection, as well as the passage number at which the MSC are evaluated, may play a role.

Physical Exercise Affects the Differentiation Capacity of Mesenchymal Stromal Cells

Little literature data is available to determine which specific cell-lineage differentiation may be driven by PE (Table 1).

Considering running exercise, moderate CTE may increase the osteogenic potential of BM-MSCs. Supporting evidence was provided by the results that alkaline phosphatase (ALP)-positive CFU-f was increased ($P < 0.01$) for BM-MSCs obtained from 2-mo-old, male mice subjected to CTE, compared with respective results obtained from sedentary mice (61). Similarly, ALP activity for BM-MSCs obtained from 5-wk-old mice was enhanced ($P < 0.05$) when these mice were subjected to moderate CTE; the adipogenic potential of BM-MSCs, collected from exercising mice, was however decreased ($P < 0.05$) (33). Moreover, moderate CTE decreases osteogenic differentiation associated with age or osteoporosis. Supporting evidence is provided by the results that the osteocalcin (at 21 days of cell culture) and ALP (at 7, 14, and 21 days of culture) expressions for BM-MSCs obtained from 6-mo-old, female Wistar rats, participating in a moderate CTE, were comparable to those obtained from 1-mo-old, sedentary rats at the same culture time points (22). Additionally, moderate CTE [using the same exercise protocol (22)] resulted in increased ($P < 0.05$) ALP activity in BM-MSCs collected from 5-mo-old, osteopenic, female, Wistar rats, only after 7 days of cell culture, compared with results obtained from sedentary control rats (37). Increased capacity to produce mineralized nodules was also observed with BM-MSCs collected from these osteopenic (after 7, 14, and 21 days of cell culture in osteogenic

medium) (37) or 6-mo-old (22) rats subjected to moderate CTE compared with their respective sedentary controls. The number of mineralized nodules remained, however, lower ($P < 0.05$) than that obtained with BM-MSCs collected from nonosteopenic (37) or 1-mo-old (22) rats not exposed to exercise. Evidence that nitric oxide-synthase inhibition decreased ALP activity in nonosteopenic and in active osteopenic (but not in sedentary) rats (37) led to the conclusion that moderate CTE enhanced the osteogenic capacities of BM-MSCs through the nitric oxide-mediated pathway.

In contrast, high- or low-intensity CTE resulted in similar osteogenic capacities (as assessed by the numbers of ALP-positive CFU-f) between runners and control mice (61). LMHFV (applied at 0.2 g, which is lower than earth's gravitational field) is low-intensity exercise, even relative to normal weight bearing. In 7-wk-old, male, C57BL/6J mice, LMHFV (applied at 0.2 g, 90 Hz, 15 min/day, 5 days/wk, for 6 wk) resulted in increased BM-MSCs osteogenic capacities (showed by upregulated transcription of Runx2) compared with control mice not subjected to vibration (30). Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ was also observed in mice subjected to LMHFV. It was therefore suggested that these changes in osteogenesis and adipogenesis obtained with LMHFV were not related to exercise-induced increased metabolic activity (considering the low loading and low signal magnitude) (45). It was also demonstrated that MSC differentiation was driven to musculoskeletal lineage, away from an adipocytic fate (45).

Similar to moderate CTE, VCE (exercise of moderate intensity) enhanced ($P < 0.05$) the osteogenic potential following 2 wk of the exercise program in 7- to 8-wk-old, male mice. The results, however, were not different after 4 wk of the exercise program (35).

In the case of TSC, exposure to moderate CTE resulted in increased ($P < 0.05$) expression of the tenocyte genes compared with sedentary controls (60). Exposure to CTE also resulted in decreased, by $>50\%$ ($P < 0.05$), non-tenocyte-related gene expression, compared with results from sedentary controls (60).

Along with MSC proliferation, MSC differentiation capacities may have been affected by cell passage and tissue origin. In a study that compared mRNA-levels from bone marrow- and AT-derived MSC collected from rats submitted to moderate CTE (28), higher ($P < 0.05$) ALP-mRNA expression was observed in passage 3 and passage 6 BM-MSCs, compared with respective results in MSC obtained from sedentary controls. Upregulation of osteocalcin and type I collagen mRNA expression was observed only for passage 3 BM-MSCs (28). ALP staining of for passage 3 and passage 6 cells and mineral content of passage 3 cells were increased only for the BM-MSCs under osteogenic culture conditions after exercise training. The results (mRNA levels, ALP staining, and mineral content) obtained with AT-MSC from exercising rats were, however, similar to those obtained with either for passage 3 and passage 6 AT-MSC from sedentary rats (28). Exposure to exercise resulted in lower ($P < 0.05$) adipogenic capacity only for passage 3 BM-MSCs and for passage 3 and passage 6 AT-MSC, compared with sedentary controls (28).

In summary, literature reports provided evidence that similar exercise programs result in different patterns of gene expression depending on the tissue from which the MSC were

harvested. In addition, various populations of MSC exhibit different patterns of gene expression depending on the type of exercise to which the animals tested are exposed.

Physical Exercise Affects Mesenchymal Stromal Cell Homing

MSC homing is the migration and arrest of MSC within the vasculature of a tissue followed by transmigration across the endothelium (24) and engraftment in the target tissue. MSC homing to injured tissues depends on the systemic and local inflammatory state (40). Does PE affect MSC homing (Table 1)?

The effects of PE on MSC migration capacities were evaluated using sera collected from five athletes (age and sex not reported) submitted to exhaustive exercise on an ergometer as a chemoattractant in a Boyden chamber (46). Sera were collected before warm-up, immediately after exhaustive exercise, and 1 h later. After 8 h of incubation, migration of passage 3-human BM-MSCs was increased by 120% ($P = 0.021$) and 132% ($P = 0.015$) using sera collected immediately after exhaustive exercise and 1 h later, respectively, compared with results obtained with sera collected before exercise (46). The observed migratory function of BM-MSCs could be in response to chemical compounds in the serum following PE rather than to a direct effect of the physical stimulus on the cells. Supporting evidence is provided by a markedly ($P < 0.05$) increased concentration of interleukin-6 (known to promote increased motility of MSC) in the serum after exhaustive exercise (46).

Physical Exercise Affects Mesenchymal Stromal Cell Secretome

MSCs have been demonstrated to synthesize and release paracrine factors, providing support for tissue repair (42). Literature pertaining to the effects of exercise on MSC secretome is limited to one study. Following an acute single bout of CTE, secretion of G-CSF, SCF, IL-2, IL-17, STNFR1, IL-3, and thrombopoietin from BM-MSCs collected from 4-wk-old C57B1/6 mice was increased compared with respective results in sedentary controls. Conversely, secretion of IL-5 and IFN- γ was decreased (15). Some of these factors are involved in HSPC proliferation and mobilization into peripheral circulation.

MSCs are considered ideal therapeutic targets for regenerative medicine. Considering the effects of PE on MSC properties, PE could be used as an adjuvant for MSC transplantation for tissue repair.

EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE COMBINED WITH MESENCHYMAL STROMAL CELL TRANSPLANTATION ON NEURAL, CARTILAGE, AND MUSCULAR TISSUE REPAIR

MSC therapy has gained great interest in neurological, osteo-articular, and cardiovascular diseases. Since PE is recommended for the prevention and management of such conditions, literature reports have mainly focused on the combined effects of PE and MSC for neural, cartilage, and muscular tissue repair (Table 2 and Fig. 2).

Table 2. Detailed effects of the combination of exercise and mesenchymal stem cells on tissue repair

Tissue/Type of exercise	MSC Origin	Model of Injury	MSC Route of Administration	Effects	Ref.
Neural Swimming	Heterologous BM	Sciatic nerve transection	At injury site	= Sciatic function index, vertical locomotor activity, ankle angle, compound-muscle action potential characteristics 4 wk after sciatic nerve transection (vs. swimming alone, water 30°C, $P > 0.05$) ↑ Sciatic function index, vertical locomotor activity, ankle angle, compound-muscle action potential characteristics 4 wk after sciatic nerve transection (vs. BM-MSCs alone, $P < 0.05$)	(53)
	Heterologous BM	Sciatic nerve crushing	At injury site	↑ Sciatic function index, vertical locomotor activity, ankle angle, compound-muscle action potential peak amplitudes, and onset latencies 4 wk after sciatic nerve crushing (vs. either BM-MSCs alone or swimming alone, water 0°C, $P < 0.05$) = Vertical locomotor activity and ankle angle (vs. BM-MSCs alone, $P < 0.05$)	(57)
MCR	Heterologous BM	Cerebral ischemia	Intravenous	↓ Neurological severity score (5.33 ± 0.82) vs. BM-MSCs alone (7.33 ± 0.82) or exercise alone (7.50 ± 1.37), $P < 0.01$	(62)
Cartilage MCR	Heterologous BM	Osteochondral defect	At injury site	↓ Total Wakitani score (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P < 0.05$) at 4 wk postinjury = Total Wakitani score (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P > 0.05$) at 2 wk postinjury = Total Wakitani score (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P > 0.05$) at 8 wk postinjury ↑ % area Col II (vs. exercise alone, $P < 0.05$) at 4 wk postinjury = % area Col II (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P < 0.05$) at 4 wk postinjury	(55)
Muscle MCR	Heterologous BM	Myocardial infarction	Intravenous	= Myocardial infarction extension (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P > 0.05$) = LVID-D, LVID-S, LVFW-D, IVS-D, IVS-S, ejection fraction, fractional shortening (vs. exercise alone, BM-MSCs alone, $P > 0.05$) ↓ Time to peak extension (vs. BM-MSCs alone, $P < 0.05$)	(26)
Downhill running	Heterologous		At site	↑ DiI-negative fibers (indirect new fiber synthesis) in close proximity to DiI-positive MSC (vs. no exercise, $P < 0.05$)	(51, 63)

BM, bone marrow; Col II, type II collagen; LVID-D, left ventricular internal dimension in diastole; LVID-S, left ventricular internal dimension in systole; LVFW-D, left ventricular free wall dimension in diastole; IVS-D, thickness of the interventricular septum in diastole; IVS-S, thickness of the interventricular septum in systole; MCR, moderate continuous running; MSCs, mesenchymal stromal cells.

Effects of Physical Exercise and MSC Transplantation on Neural Tissue Repair

Exercise training (walking on a 20°-upslope treadmill for 1 h/day, 5 days/wk, for 2 wk) elicited enhanced axon regeneration but not functional recovery following peripheral nerve injury in female Lewis rats (age not reported) (11). The synergistic effects of exercise and BM-MSCs transplantation were evaluated in adult, male, Sprague-Dawley rats (age not reported) for their recovery from sciatic nerve injury (53, 57). The combination of 30 min of swimming in 30°C water (every day for 7 days, starting 12 h after nerve transection) and heterologous BM-MSCs transplantation (at the time of surgery) at the injury site improved nerve functional recovery 4 wk postinjury compared with BM-MSCs alone but not compared with swimming alone (53). The same protocol (swimming and BM-MSCs), except for an average water temperature of 16.5°C, was applied to a crush model of sciatic nerve injury in rats (57). Compared with animals exposed to either BM-

MSCs alone or swimming alone, the sciatic function index, vertical locomotor activity, ankle angle, compound-muscle action potential peak amplitudes, and onset latencies were improved ($P < 0.05$) in the animals exposed to combined swimming and BM-MSC transplantation 4 wk after injury. The vertical locomotor activity and ankle angle, however, were not different when the animals were exposed to either combined swimming and BM-MSC transplantation or BM-MSC transplantation alone 10 days after injury (57). The differences observed in functional recovery between the two aforementioned studies may be explained by the two different models of injury used, and thus the severity of the lesion was induced. Alternatively, cold-induced decrease in inflammation may have played a role.

In a model of cerebral ischemic injuries in adult, male, Sprague-Dawley rats (age not reported), moderate CTE (12 m/min, 30 min/day for 14 days, starting 48 h after injury) associated with intravenous administration of BM-MSCs 24 h

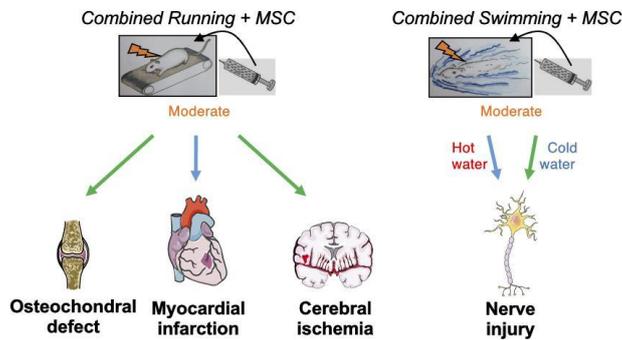


Fig. 2. The effects of a combination of physical exercise and mesenchymal stromal cell (MSC) transplantation on tissue repair. The effects of a combination of physical exercise and MSC transplantation on cartilage repair and on the functional recovery of cardiac, cerebral, and neural injuries are presented. Green arrows indicate a positive effect of this combination on tissue repair, and blue arrows indicate the absence of effect.

after injury resulted in greater improvement in neurological function compared with results obtained from animals exposed to either BM-MSCs alone ($P < 0.01$) or exercise alone ($P < 0.01$) (62). The neurological function improvement was attributed to inhibition of apoptosis in the implanted BM-MSCs induced by exercise and thus to subsequent better engraftment of these cells (44).

In summary, the literature reports provided evidence that combination of exercise and BM-MSC engraftment improves neurological tissue recovery compared with either exercise or BM-MSC transplantation alone. These effects may depend on exercise characteristics, specifically type (such as treadmill running, swimming), exercise conditions, but also injury characteristics (such as transection, crush, ischemia...). It is not clear from these studies, however, whether the effects of MSC and exercise are additive or synergistic.

Effects of Physical Exercise and MSC Transplantation on Cartilage Tissue Repair

When injured, the hyaline cartilage in a joint is replaced by a fibrocartilage with inferior mechanical properties. Cartilage repair of femoral osteochondral defects was compared following injection of either heterologous, passage 3-BM-MSCs, or phosphate-buffered saline solution into the femoro-tibial joint of 8-wk-old, male, Wistar rats, associated or not with moderate CTE (12 m/min, 30 min/day, 5 days/wk starting 48 h after injection, and 4 wk after osteochondral defect creation) for periods of 2, 4, or 8 wk (55). Two weeks postinjury, the results were similar for the rats that had been exposed to both BM-MSCs and exercise and for those that had received only BM-MSCs. Four weeks after injection, there was improvement ($P < 0.05$) in cartilage repair in the rat group that had received both BM-MSCs and exercise compared with the results obtained from the rats that had been exposed only to exercise, only to BM-MSCs, or to sham group. At 4 wk postinjury, the percentage area of type II collagen (differentiation biomarker) was higher ($P < 0.05$) in the rat group that had received both BM-MSCs and exercise compared with the animals exposed only to exercise and to the animals not exposed to either exercise or BM-MSCs. At 8 wk, although not significant, improvement in cartilage repair was, however, lower in the rat group that received both BM-MSCs and exercise, compared with animals exposed to either only exercise or only BM-

MSCs (55). This result suggests that long exposition to moderate exercise may be detrimental to the tissue repaired by the combination of BM-MSC injection and exercise. This study did not determine whether the beneficial effect of the experimental conditions on cartilage repair was a time-dependent, additive, or synergistic effect (55). The effects of the time elapsed between osteochondral defect creation and exercise initiation was not evaluated.

Effects of Physical Exercise and MSC Transplantation on Cardiac Tissue Repair

Therapeutic strategies following myocardial infarction include, but are not limited to, MSC therapy and aerobic exercise to prevent adverse cardiac remodeling and ventricular dysfunction. However, little is known about the combined effects of MSC transplantation and exercise. The effects of moderate CTE (60% of the maximal running speed, 60 min/day, 5 days/wk, for 12 wk, starting 24 h after injury) associated with immediate BM-MSC therapy on recovery from myocardial infarction were evaluated in 40-day-old male Wistar rats. Although exposure to either BM-MSC therapy or exercise separately had beneficial effects on the infarcted heart remodeling and function, the combination of the two treatments had no synergistic effects (26). Explanations regarding these results are currently unknown, and further investigation is warranted.

DISCUSSION

Taken together, the results reported in the literature provide evidence that the effects of exercise on MSC functions depend on exercise characteristics, specifically type (treadmill running, climbing, etc.), intensity (moderate, intense, etc.), duration of exposure, etc. Specifically, moderate exercise increases BM-MSC proliferation and osteogenic differentiation (3, 33, 61). In contrast, either high- or low-intensity running exercises have either none or detrimental effects on the proliferation and osteogenic differentiation of BM-MSCs (3, 55). The type of exercise may also play a role in MSC proliferation and differentiation since VCE did not result in any changes in MSC proliferation but resulted in increased osteogenic and adipogenic differentiation cell capacities. Moreover, LMHFV, a low-intensity exercise that generates mechanical signals in bone tissue several orders of magnitude below strains generated during strenuous exercise, resulted in increased BM-MSC

osteogenic differentiation (30, 52). It is difficult to determine whether the aforementioned differences are actually due to the various types of exercise tested or to intrinsic differences in exercise intensity (35).

Furthermore, literature reports provided evidence that the tissue characteristics (specifically, origin) from which MSC are collected affect MSC proliferation and differentiation after exposure to exercise (28). This outcome is not surprising since differences in the cell proliferation and differentiation capacities of various MSC niches in several species in the absence of exercise stimulation have been reported (1, 21, 23, 25, 27, 29, 41, 58).

In addition, the effects of exercise on MSC proliferation and differentiation may be affected by the age of the donors or the passage number of MSCs. Supporting evidence was provided by the results that the CFU-f numbers were higher ($P < 0.05$) when passage 3 BM-MSCs (from 13- to 14-wk-old male Wistar rats) exposed to moderate CTE were used compared with cells from sedentary controls but not when passage 6-BM-MSCs were used (28). This result highlights the importance of MSC passage number since the cell differentiation process is affected as this number increases.

An important limitation in most of the studies reported in this review is that the effects of exercise on MSC properties, specifically, proliferation and differentiation, were evaluated by *in vitro* tests, sometimes after a period of cell culture (Table 1). Differences between groups in MSC properties *in vivo* may have been attenuated by several weeks of cell culture *in vitro* in a similar culture medium. In contrast, some differences may have been enhanced by optimal culture conditions, in which MSC interactions with their environment were not replicated. Whether the data *in vitro* reflect events *in vivo* is therefore difficult to confirm. Direct evidence of the effects of exercise (through LMHFV application) on MSC adipogenic differentiation *in vivo*, however, was provided by tracking MSC and their differentiated states using green fluorescent protein in irradiated mice (45). The effects of LMHFV on MSC differentiation *in vivo* were also indirectly demonstrated by analyzing pertinent gene expression directly on "fresh bone marrow" (i.e., without any cell culture) (30).

Another limitation pertains to the various methods of MSC isolation and identification used in the reported studies (Tables 1 and 2). These methods usually included adherence to plastic dish and multilineage differentiation or automatic cell sorting based on specific surface markers. These surface markers, however, varied widely between studies and so did methods to assess differentiation potential. Consequently, the MSC populations evaluated were probably not equivalent, which likely contributed to some of the discrepancies between studies. Unfortunately, exclusive, specific surface markers or features that categorically identify MSC have not been reported, yet MSC surface markers and differential potential depend on, for instance, species from which they were isolated (38).

Regarding the effects of combinations of exercise and MSC transplantation on tissue repair, literature reports provided evidence of, at least, additive effects on neural tissue functional recovery and cartilage repair (55, 57, 62). Treadmill running may be more effective for neural functional recovery than swimming, although the small number of reported studies prevents from drawing definitive conclusions. In contrast, the

beneficial effect of the combination of exercise and MSC transplantation on structural and functional cardiac remodeling in infarcted rats is not definitively resolved yet (26). Differences in methodological procedures (such as exercise protocols, time elapsed between injury exercise initiation or BM-MS transplantation, MSC dose...), however, make comparisons between studies difficult. Moreover, young animals, i.e., with inherent better regeneration capacities, were used in most of the studies. Results must, therefore, be interpreted with caution.

Tissue repair improvement observed with a combination of MSC transplantation and physical exercise may be explained in different ways. First, moderate PE induces the systemic release of growth factors (such as vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor...) and cytokines that may improve the environment for MSC survival at the site of injury. PE may also induce local inflammation, which in turn activates both transplanted and resident MSC to exert paracrine, neurotrophic, or immunomodulatory effects, improving tissue healing. In such a model, the extent of inflammation would parallel the extent of exercise-induced tissue damage. This hypothesis is, however, unlikely in the studies reported here, since MSC were implanted in an already acutely inflamed environment (24–48 h after injury induction) (26, 53, 55, 57, 62). Moreover, literature rather provides evidence that PE promotes an anti-inflammatory environment (4), and it was demonstrated, at least in muscles, that inflammation was not the primary regulator of MSC accumulation (51). Second, PE may directly stimulate transplanted MSC to differentiate into resident cell population (such as osteocytes, chondrocytes, tenocytes...). Although a possibility, supporting evidence is lacking since MSC were not labeled and actual engraftment and differentiation not confirmed in all but one (45) studies reported in this review. Third, MSC themselves may directly sense mechanical signals [such as the osteocyte in bone (9)] and adapt their paracrine or immunomodulatory effects to alter tissue healing. Supporting evidence was provided *in vitro* by the results that MSC submitted to high-strain magnitude or low-intensity vibration loading regime incorporating refractory periods exhibited decreased adipogenesis compared with controls without refractory periods (48). Finally, PE may deter MSC from engaging undesirable differentiation into adipocytes or fibrotic cells in the tissue repair process. Supporting evidence was provided by the results that LMHFV deterred MSC away from adipogenesis (through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ) toward osteogenesis (45). These hypotheses are not mutually exclusive and a combination of different mechanisms is likely.

Overall, the results of the literature are difficult to interpret and compare because of major differences in the experimental protocols used. For instance, the various exercise regimes performed were not fully described (regarding intensity, maximum oxygen uptake, exercise duration, etc.) and the species, sex and age of the experimental subjects were different. The population and the differentiation stage of MSC were not always defined, and cells of various passages were used. Nonetheless, there is strong evidence that MSC respond to mechanical strain (5) and thus probably modulate tissue repair.

CONCLUSIONS

Moderate, continuous, running exercise has beneficial effects on MSC proliferation and differentiation, specifically, improved osteogenic and tenogenic properties. The effects of a combination of exercise and MSC transplantation, however, remain inconclusive; cellular and molecular changes induced by physical activity are not completely elucidated but have great research interest (36).

Future studies should aim at comparing the effects of various types of exercise on MSC properties using standardized protocols and include detailed information regarding all aspects of the exercise regime applied.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rena Bizios for help in English language revision.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.B. prepared figures; C.B. drafted manuscript; M.B., S.P., and H.P. edited and revised manuscript; C.B., M.B., S.P., and H.P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Aliborzi G, Vahdati A, Mehrabani D, Hosseini SE, Tamadon A. Isolation, characterization and growth kinetic comparison of bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells of guinea pig. *Int J Stem Cells* 9: 115–123, 2016. doi:10.15283/ijsc.2016.9.1.115.
- Antonic A, Sena ES, Lees JS, Wills TE, Skeers P, Batchelor PE, Macleod MR, Howells DW. Stem cell transplantation in traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PLoS Biol* 11: e1001738, 2013. doi:10.1371/journal.pbio.1001738.
- Baker JM, De Lisio M, Parise G. Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis. *FASEB J* 25: 4348–4357, 2011. doi:10.1096/fj.11-189043.
- Batista ML Jr, Rosa JC, Lopes RD, Lira FS, Martins E Jr, Yamashita AS, Brum PC, Lancha AH Jr, Lopes AC, Seelaender M. Exercise training changes IL-10/TNF- α ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine* 49: 102–108, 2010. doi:10.1016/j.cyt.2009.10.007.
- Bequart P, Cruel M, Hoc T, Sudre L, Pernelle K, Bizios R, Logeart-Avramoglou D, Petite H, Bensidhoum M. Human mesenchymal stem cell responses to hydrostatic pressure and shear stress. *Eur Cell Mater* 31: 160–173, 2016. doi:10.22203/eCM.v031a11.
- Berebichez-Fridman R, Gómez-García R, Granados-Montiel J, Berebichez-Fastlicht E, Olivos-Meza A, Granados J, Velasquillo C, Ibarra C. The Holy Grail of orthopedic surgery: mesenchymal stem cells—their current uses and potential applications. *Stem Cells Int* 2017: 1–14, 2017. doi:10.1155/2017/2638305.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupcic J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98–102, 2009. doi:10.1126/science.1164680.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105: 829–841, 2001. doi:10.1016/S0092-8674(01)00409-3.
- Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42: 606–615, 2008. doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.
- Boppard MD, De Lisio M, Witkowski S. *Exercise and stem cells*. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, edited by Bouchard B. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, vol. 135, chapt. 18, p. 423–456, 2015.
- Cannoy J, Crowley S, Jarratt A, Werts KL, Osborne K, Park S, English AW. Upslope treadmill exercise enhances motor axon regeneration but not functional recovery following peripheral nerve injury. *J Neurophysiol* 116: 1408–1417, 2016. doi:10.1152/jn.00129.2016.
- De Bari C, Roelofs AJ. Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol* 40: 74–80, 2018. doi:10.1016/j.coph.2018.03.009.
- Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci* 13: 4517–4528, 2008. doi:10.2741/3020.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317, 2006. doi:10.1080/14653240600855905.
- Emmons R, Niemi GM, Owolabi O, De Lisio M. Acute exercise mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells and alters the mesenchymal stromal cell secretome. *J Appl Physiol* (1985) 120: 624–632, 2016. doi:10.1152/jappphysiol.00925.2015.
- Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, Bak M, Kauppinen S, Kassem M. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 6139–6144, 2011. doi:10.1073/pnas.1016758108.
- Farup J, De Lisio M, Rahbek SK, Bjerre J, Vendelbo MH, Boppard MD, Vissing K. Pericyte response to contraction mode-specific resistance exercise training in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 119: 1053–1063, 2015. doi:10.1152/jappphysiol.01108.2014.
- Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 21: 1464–1474, 2006. doi:10.1359/jbmr.060612.
- Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Exp Gerontol* 41: 1080–1093, 2006. doi:10.1016/j.exger.2006.09.008.
- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9: 12, 2011. doi:10.1186/1478-811X-9-12.
- Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, Sarvari A, Borjani S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotechnol* 5: 104–117, 2013.
- Hell RC, Ocarino NM, Boeloni JN, Silva JF, Goes AM, Santos RL, Serakides R. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Acta Physiol (Oxf)* 205: 292–301, 2012. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02397.x.
- Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 14: 17986–18001, 2013. doi:10.3390/ijms140917986.
- Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4: 206–216, 2009. doi:10.1016/j.stem.2009.02.001.
- Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 333: 207–215, 2008. doi:10.1007/s00441-008-0633-5.
- Lavorato VN, Del Carlo RJ, da Cunha DNQ, Okano BS, Belfort FG, de Freitas JS, da Mota GF, Quintão-Júnior JF, Silame-Gomes LHL, Drummond FR, Carneiro-Júnior MA, de Oliveira EM, Monteiro BS, Primola-Gomes TN, Natali AJ. Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: Effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 90: 111–119, 2016. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.12.012.
- Li CY, Wu XY, Tong JB, Yang XX, Zhao JL, Zheng QF, Zhao GB, Ma ZJ. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 6: 55, 2015. doi:10.1186/s13287-015-0066-5.
- Liu SY, He YB, Deng SY, Zhu WT, Xu SY, Ni GX. Exercise affects biological characteristics of mesenchymal stromal cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Int Orthop* 41: 1199–1209, 2017. doi:10.1007/s00264-017-3441-2.
- Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells* 7: 135–142, 2014. doi:10.15283/ijsc.2014.7.2.135.

30. Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, Gilsanz V, Pessin JE, Judex S, Rubin CT. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. *J Bone Miner Res* 24: 50–61, 2009. doi:10.1359/jbmr.080817.
31. Manassero M, Viateau V, Deschepper M, Oudina K, Logeart-Avrampoglou D, Petite H, Bensidhoum M. Bone regeneration in sheep using *acropora* coral, a natural resorbable scaffold, and autologous mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 19: 1554–1563, 2013. doi:10.1089/ten.tea.2012.0008.
32. Manning CN, Schwartz AG, Liu W, Xie J, Havlioglu N, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Xia Y, Gelberman RH, Thomopoulos S. Controlled delivery of mesenchymal stem cells and growth factors using a nanofiber scaffold for tendon repair. *Acta Biomater* 9: 6905–6914, 2013. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.008.
33. Marędział M, Śmieszek A, Chrząstek K, Basinska K, Marycz K. Physical activity increases the total number of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, enhances their osteogenic potential, and inhibits their adipogenic properties. *Stem Cells Int* 2015: 1–11, 2015. doi:10.1155/2015/379093.
34. Miao C, Lei M, Hu W, Han S, Wang Q. A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther* 8: 242, 2017. doi:10.1186/s13287-017-0697-9.
35. Mori T, Okimoto N, Sakai A, Okazaki Y, Nakura N, Notomi T, Nakamura T. Climbing exercise increases bone mass and trabecular bone turnover through transient regulation of marrow osteogenic and osteoclastogenic potentials in mice. *J Bone Miner Res* 18: 2002–2009, 2003. doi:10.1359/jbmr.2003.18.11.2002.
36. National Institutes of Health. *NIH Awards Aim to Understand Molecular Changes During Physical Activity* (Online). 2016. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-awards-aim-understand-molecular-changes-during-physical-activity>.
37. Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide* 19: 320–325, 2008. doi:10.1016/j.niox.2008.08.004.
38. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103: 1662–1668, 2004. doi:10.1182/blood-2003-09-3070.
39. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147, 1999. doi:10.1126/science.284.5411.143.
40. Ponte AL, Marais E, Gally N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, Charbord P, Domenech J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737–1745, 2007. doi:10.1634/stemcells.2007-0054.
41. Radtke CL, Nino-Fong R, Esparza Gonzalez BP, Stryhn H, McDuffee LA. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 74: 790–800, 2013. doi:10.2460/ajvr.74.5.790.
42. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 10: 244–258, 2012. doi:10.1016/j.stem.2012.02.005.
43. Ribeiro F, Ribeiro IP, Alves AJ, do Céu Monteiro M, Oliveira NL, Oliveira J, Amado F, Remião F, Duarte JA. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a systematic review. *Am J Phys Med Rehabil* 92: 1020–1030, 2013. doi:10.1097/PHM.0b013e31829b4c4f.
44. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 412: 603–604, 2001. doi:10.1038/35088122.
45. Rubin CT, Capilla E, Luu YK, Busa B, Crawford H, Nolan DJ, Mittal V, Rosen CJ, Pessin JE, Judex S. Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17879–17884, 2007. doi:10.1073/pnas.0708467104.
46. Schmidt A, Bierwirth S, Weber S, Platen P, Schinköthe T, Bloch W. Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells. *Br J Sports Med* 43: 195–198, 2009. doi:10.1136/bjism.2007.043208.
47. Schnorr P, Scharling H, Jensen JS. Intensity versus duration of walking, impact on mortality: the Copenhagen City Heart Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14: 72–78, 2007. doi:10.1097/HJR.0b013e3280144470.
48. Sen B, Xie Z, Case N, Styner M, Rubin CT, Rubin J. Mechanical signal influence on mesenchymal stem cell fate is enhanced by incorporation of refractory periods into the loading regimen. *J Biomech* 44: 593–599, 2011. doi:10.1016/j.jbiomech.2010.11.022.
49. Sgotta M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, König S, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 313: 2875–2886, 2007. doi:10.1016/j.yexcr.2007.05.020.
50. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204–2213, 2006. doi:10.1242/jcs.02932.
51. Valero MC, Huntsman HD, Liu J, Zou K, Boppard MD. Eccentric exercise facilitates mesenchymal stem cell appearance in skeletal muscle. *PLoS One* 7: e29760, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0029760.
52. Wallace IJ, Pagnotti GM, Rubin-Sigler J, Naeher M, Copes LE, Judex S, Rubin CT, Demes B. Focal enhancement of the skeleton to exercise correlates with responsiveness of bone marrow mesenchymal stem cells rather than peak external forces. *J Exp Biol* 218: 3002–3009, 2015. doi:10.1242/jeb.118729.
53. Wang J, Yang CC, Chen SC, Hsieh YL. No synergistic effect of mesenchymal stem cells and exercise on functional recovery following sciatic nerve transection. *Funct Neurol* 25: 33–43, 2010.
54. Warburton DE, Charlesworth S, Ivey A, Nettlefold L, Bredin SS. A systematic review of the evidence for Canada's Physical Activity Guidelines for Adults. *Int J Behav Nutr Phys Act* 7: 39, 2010. doi:10.1186/1479-5868-7-39.
55. Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Kiyan W, Kuroki H. The effect of exercise on the early stages of mesenchymal stromal cell-induced cartilage repair in a rat osteochondral defect model. *PLoS One* 11: e0151580, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0151580.
56. Yang C, Jiang J, Yang X, Wang H, Du J. Stem/progenitor cells in endogenous repairing responses: new toolbox for the treatment of acute lung injury. *J Transl Med* 14: 47, 2016. doi:10.1186/s12967-016-0804-1.
57. Yang CC, Wang J, Chen SC, Jan YM, Hsieh YL. Enhanced functional recovery from sciatic nerve crush injury through a combined treatment of cold-water swimming and mesenchymal stem cell transplantation. *Neurol Res* 37: 816–826, 2015. doi:10.1179/1743132815Y.0000000060.
58. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327: 449–462, 2007. doi:10.1007/s00441-006-0308-z.
59. Zhang J, Wang JH. Moderate exercise mitigates the detrimental effects of aging on tendon stem cells. *PLoS One* 10: e0130454, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0130454.
60. Zhang J, Yuan T, Wang JH. Moderate treadmill running exercise prior to tendon injury enhances wound healing in aging rats. *Oncotarget* 7: 8498–8512, 2016. doi:10.18632/oncotarget.7381.
61. Zhang L, Chen X, Wu J, Yuan Y, Guo J, Biswas S, Li B, Zou J. The effects of different intensities of exercise and active vitamin D on mouse bone mass and bone strength. *J Bone Miner Metab* 35: 265–277, 2017. doi:10.1007/s00774-016-0764-9.
62. Zhang YX, Yuan MZ, Cheng L, Lin LZ, Du HW, Chen RH, Liu N. Treadmill exercise enhances therapeutic potency of transplanted bone mesenchymal stem cells in cerebral ischemic rats via anti-apoptotic effects. *BMC Neurosci* 16: 56, 2015. doi:10.1186/s12868-015-0196-9.
63. Zou K, Huntsman HD, Carmen Valero M, Adams J, Skelton J, De Lisio M, Jensen T, Boppard MD. Mesenchymal stem cells augment the adaptive response to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 47: 315–325, 2015. doi:10.1249/MSS.0000000000000405.

Annexe 4 : poster ECTS 2020



Poster ND-P10
ECTS congress, 2020



Effects of exercise on bone histological parameters *Continuous vs. intermittent running in Wistar rats*

Bourzac C.¹, Pallu S.^{1,2}, Wazzani R.^{1,3}, Bensidhoum M.¹, Portier H.^{1,2}

¹B2OA UMR CNRS 7052 INSERM 1271, Université de Paris, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, F-75010 Paris, France
²COST, Université d'Orléans, F-45100 Orléans, France
³APERÉ, Université Jules Verne-Picardie, Faculté des Sciences et du Sport, F-80000, Amiens, France

Background

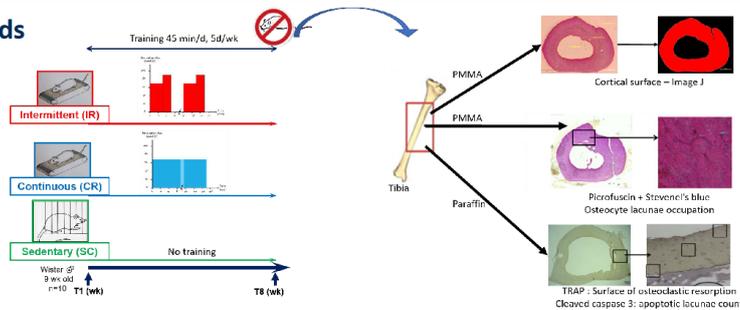
Effects of physical exercise on bone quality has been recently reviewed¹. While many studies focus on continuous running, recent studies investigated intermittent running.

There is, however, no consensus on their respective effects on bone histological parameters.

This study aims to investigate the effects of running exercise on bone histological parameters.

We hypothesized that intermittent running would improve the quality of cortical bone.

Methods



Results

Continuous running decreases the mean cortical surface

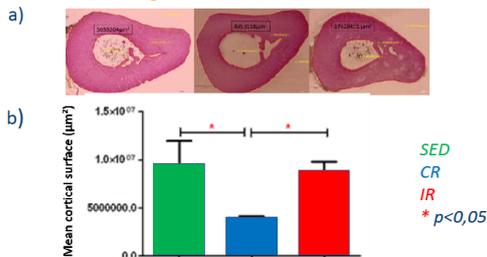


Figure 1: a) Representative images, and b) measurements of the cortical surface in the tibial diaphysis from SC, CR, and IR groups.

Continuous running increases cortical bone resorption

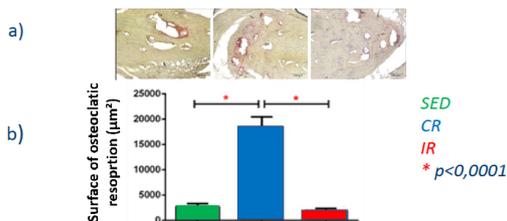


Figure 2: a) Representative images, and b) measurements of the surface of osteoclastic resorption (TRAP staining) in the tibial diaphysis from SC, CR, and IR groups.

In IR rats, resorption was mainly localized to the peripheral cortex.

Intermittent running improves osteocyte viability

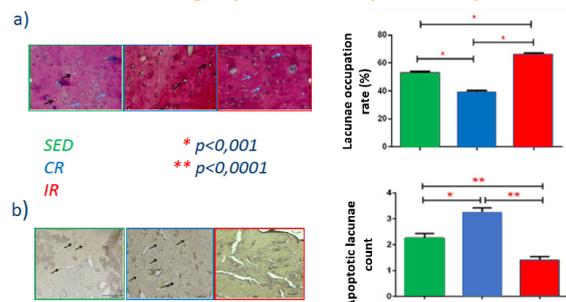


Figure 3: Representative images, (left) and count (right) of a) the occupation rate of osteocyte lacunae, and b) the apoptotic lacunae (cleaved caspase 3) in the tibial diaphysis from SC, CR, and IR groups (a) black arrow = empty lacuna and blue arrow = lacuna with osteocyte; b) black arrow = apoptotic lacunae).

Apoptotic lacunae were mainly localized on the endosteal side of the bone, while lacunae with a viable osteocyte were mainly on the periosteal side.

Conclusion

Intermittent running enhances cortical bone formation and limits its resorption, while continuous running drives the cortical bone towards resorption.

The **rest period** in intermittent running limits osteocyte desensitization², thus favoring the anabolic response to exercise.

This work was supported by « DEFI CNRS Mécanobiologie » and ENVA « Appel à projet 2018 »

1. Portier et al., Life, 2020
2. Robling and Turner, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 2009

Annexe 5 : poster ECTS 2019

B20A



Running-exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in Rats

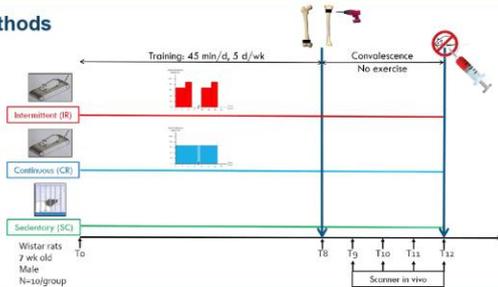
Bourzac C¹, Bensidhoum M¹, Manassero M¹, Pallu S^{1,2}, Portier H^{1,2}.

¹B20A UMR 7052, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, CNRS, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, F-75010 Paris, France
²COST, Université d'Orléans, F-45100 Orléans, France

Background

The occurrence of bone fractures represents major health and economic challenges: it reduces life expectancy by 6 years in elderlies, shortens athletes' career and costs billions of euros to health insurance. Physical exercise has been advocated to improve bone metabolism and remodeling and, specifically, running to enhance the healing of non critical size defects in mice [1]. There is, however, no consensus on the nature of the exercise the most favorable to bone repair. The present study aims at investigating the most osteogenic exercise-conditioning program to improve non-critical size bone defect repair. We hypothesized that high-intensity-interval running will improve the healing of non-critical size bone defects.

Methods



With microscanner (μCT) in vivo

- Bone volume in healing tissue

With plasma

- Alkaline Phosphatase (bone anabolism) : enzymatic kinetic assay
- NTx (bone catabolism) : ELISA assay

Statistics

- Kruskal-Wallis test
- Mann-Whitney test
- Significance set at p< 0.05

Protocols were approved by the local Animal Ethical Committee

Results (1)

Running exercise conditioning, especially high intensity interval running, improves bone healing in the tibia

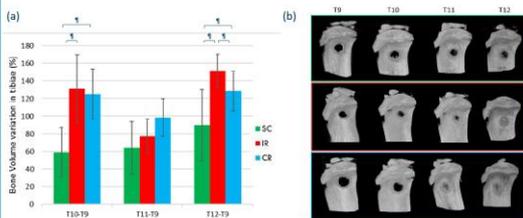


Figure 1: (a) Bone volume variation in a non-critical size bone defect in tibiae over time. A bone volume variation of 100% means that the bone volume has doubled. The bone volume variation is calculated relative to T₉ (just after the defect is made). (b) Representative μCT images of the healing of non-critical size bone defects in tibiae, at T₁₀, T₁₁ and T₁₂ weeks. ¶ p<0,05

Running exercise conditioning does not improve bone healing in the femur

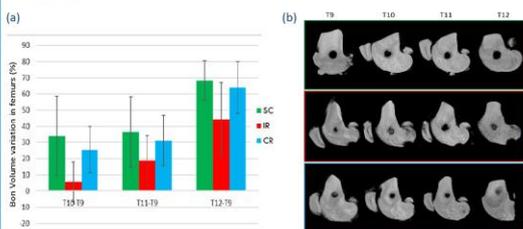


Figure 2: (a) Bone volume variation in a non-critical size bone defect in femurs over time. The bone volume variation is calculated relative to T₉ (just after the defect is made). (b) Representative μCT images of the healing of non-critical size bone defects in femurs, at T₁₀, T₁₁ and T₁₂ weeks.

Results (2)

Running exercise conditioning improved bone healing to a greater extent in the tibia than in the femur

	T10-T9		T11-T9		T12-T9	
	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia
SC	33,9 (±24,5)	59,0 (±28,3)	36,3 (±21,8)	64,0 (±29,9)	68,3 (±12,1)	89,6 (±40,4)
IR	5,6 (±12,2) ¶	131, (±38,3)	18,9 (±15,2)	77,3 (±19,6)	44,2 (±22,9) ¶	151,6 (±18,4)
CR	25,6 (±14,3)	124,9 (±28,5)	31,2 (±15,5)	98,5 (±21,1)	63,9 (±16,1) ¶	128,5 (±22,7)

Table 1: Comparison of volume variation in a non-critical size bone defect between tibiae and femurs at T₁₀, T₁₁ and T₁₂ weeks. ¶ p<0,05 (femurs vs tibiae)

Continuous running exercise conditioning decreases bone resorption

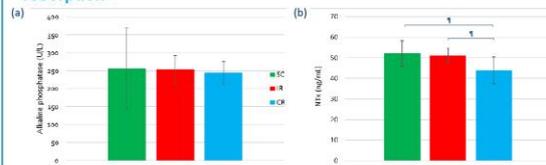


Figure 3: (a) Alkaline phosphatase and (b) NTx concentration in rat sera. ¶ p<0,05.

Conclusion

The present study demonstrated that continuous and high intensity interval running exercise conditioning improves the healing of non-critical size bone defects in the tibia, in Wistar rats. The tibia appears as a better model than the femur to evaluate bone repair. Differences in bone microarchitecture and in bone loading during ground impact may explain the discrepancies observed between the two bones.

References

[1] Heikkinen et al., 1974, Acta orthopaedica Scandinavica

This work was supported by « Mecanobio » and ENVA « Appel à projet 2018 »