



**HAL**  
open science

# Effets de l'exercice physique sur le tissu osseux et sa vascularisation : comparaison entre différentes modalités de course

Rkia Wazzani

## ► To cite this version:

Rkia Wazzani. Effets de l'exercice physique sur le tissu osseux et sa vascularisation : comparaison entre différentes modalités de course. Santé. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0092 . tel-04125448

**HAL Id: tel-04125448**

**<https://theses.hal.science/tel-04125448v1>**

Submitted on 12 Jun 2023

**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.



# Thèse de Doctorat

*Mention Biologie-Santé  
Spécialité STAPS, Réadaptation, Sport Santé*

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

**De l'Université de Picardie Jules Verne**

Par

**Rkia Wazzani**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Effets de l'exercice physique sur le tissu osseux et sa vascularisation : comparaison entre différentes modalités de course*

Soutenue le 08 décembre 2022 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M <sup>me</sup> Annabelle Cesaro, MCU HDR, Université d'Orléans	Rapporteur
M. Rawad Elhage, PU, Université de Balamand	Rapporteur
M <sup>me</sup> Véronique Bach, PU, Université Picardie Jules Verne	Présidente
M. Hugues Portier, HDR, Université d'Orléans	Examineur
M. Stéphane Pallu, HDR, Université d'Orléans	Examineur
M <sup>me</sup> Christelle Jaffré, PU, Université Picardie Jules Verne	Directrice de thèse
M. Saïd Ahmaïdi, PU, Université Picardie Jules Verne	Co-directeur de thèse

## Remerciements

Mes premiers remerciements vont au **Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MERSI)**, pour avoir financé cette thèse. Et **l'école doctorale Sciences techniques santé de l'université de Picardie Jules Verne**, pour l'acceptation de la réalisation de ce projet, pour l'accompagnement scientifique durant cette expérience doctorale, avec des formations de qualité à diverses dimensions, et aussi pour l'accompagnement psychologique et la facilité de réalisation des démarches depuis la première inscription jusqu'à la demande de soutenance. Je remercie donc le directeur de l'école doctorale Monsieur El Hajjaji et bien sûr toutes les secrétaires, qui étaient toujours à l'écoute, pour leur bienveillance et pour toutes les orientations.

J'adresse mes remerciements les plus dévoués à **mes directeurs de thèse la Pr Christelle Jaffré et le Pr Said Ahmaïdi**. Merci infiniment chère directrice Christelle pour tout !! il n'arrive qu'une seule fois dans la vie qu'une professeure d'université vienne nous proposer un sujet de thèse et une participation au concours de l'école doctorale, je te remercie donc pour la confiance en moi dès nos premiers contacts, pour tous tes efforts pour la réalisation et la réussite de ce projet, pour tous les conseils, les encouragements et le soutien dans mes moments difficiles, merci pour ton accompagnement scientifique dans le cadre professionnel mais aussi pour ton accompagnement humain et psychologique durant ces trois ans, surtout durant la période du confinement et d'avoir toujours compris mes conditions personnelles. Les mots ne peuvent vraiment pas exprimer mes sentiments de reconnaissance envers toi Chère Christelle. Merci ! Je remercie de la même façon Mon directeur de thèse M. Said d'avoir également accepté de diriger ce travail, merci également pour la confiance en moi dès le premier jour. Je vous remercie aussi en tant que directeur du laboratoire APERE, pour toutes les facilités que vous avez mis en place pour moi et mes collègues doctorants, votre méthodologie en tant que directeur m'a toujours inspiré car elle nous a vraiment permis d'avancer avec plus de poussées que de freins et de faire progresser nos indépendances et nos autogestions des projets. Merci !

**Je ne pourrai jamais assez vous remercier M Hugues Portier et M Stéphane Pallu**. Vous étiez les premiers à faire confiance à la petite fille, toute perdue, que j'étais durant les années du master. Faire votre connaissance fait partie des choses que j'ai gagnées durant ces années. M. Hugues, je n'oublierai jamais que tu étais le premier à me lancer dans

ce monde de recherche, merci infiniment pour l'accompagnement, les conseils, l'encadrement psychologique surtout, merci pour ta phrase « oui mais y'a pas de raison, tu vas y arriver » à mes moments perplexes, merci aussi pour ta collaboration, ton temps et pour tous les moments de formation en statistiques et en utilisations des logiciels. Merci ! M Stéphane, je n'oublierai jamais tes efforts afin de me trouver un financement et me lancer dans un projet de thèse, merci infiniment aussi pour ton temps et ta collaboration, merci pour tes efforts pour aiguïser mon esprit critique et faire ressortir mon côté chercheuse scientifique. Merci !

J'adresse mes remerciements les plus dévouées également à **Mme Céline Bourzac** pour sa collaboration. Je te remercie Céline pour tes efforts, pour ton temps, pour la formation en microscanner et surtout pour tes corrections d'anglais pour les articles. Merci !

**Mes remerciements les plus respectueux se dirigent aux membres du jury** M Rawad El Hage, Mme Annabelle Cesaro et Mme Véronique Bach. Merci pour chacun d'entre vous d'avoir accepté de faire part du jury de ma thèse, cela représente un énorme honneur pour moi. Merci pour le temps que vous m'avez accordé pour participer à ce jury. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.

Je tiens à remercier **l'ensemble des membres du laboratoire APERE**, le laboratoire qui m'a accueilli, il y a maintenant trois ans, pour cette expérience doctorale. Merci à mes collègues Maryne, Bilel et Aurélien pour votre bienveillance et l'accueil chaleureux que vous m'avez accordé dès le premier jour, merci également pour vos conseils, vos orientations et pour le partage d'information, merci aussi pour tous les moments d'amitié et de fraternité que nous avons partagé ensemble dans le laboratoire.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance et toutes mes pensées de gratitude à toute **l'équipe du Laboratoire B3OA** pour la collaboration dans ce projet, tout d'abord à M. Hervé Petite, directeur du laboratoire de m'avoir permis d'effectuer toute la partie expérimentale au sein de votre équipe, de m'avoir considéré comme une de vos thésards et merci pour toutes les facilités mises en place dans vos locaux et auprès de vos matériels du laboratoire. Sans votre collaboration cette thèse ne verrait pas de lumière aujourd'hui. Merci ! J'adresse également mes sentiments de reconnaissance les plus profonds à l'ensemble des membres du B3OA surtout à Hanane, Esther, Manon, Lionel et Nathanaël pour leur accompagnement et pour leur accueil bienveillant et leur disponibilité, et à mes copines doctorantes dans ce laboratoire Mathilde, Rebecca et Morgane pour leur gentillesse, leur amitié et pour tous les moments partagés avec beaucoup de joie et d'amour. Je remercie

également et avec beaucoup de reconnaissance l'ensemble des stagiaires qui ont participé à des différentes parties de ce projet, merci à Sara, Caroline, Xavier et Louis et je vous souhaite un avenir glorieux !

Pour finir **je voudrais rendre le plus profond hommage à mes parents, ma chère mère Fatima et mon cher père M'bark**, je vous adresse mon témoignage de respect, d'admiration, de reconnaissance. Un immense merci à mon père pour tous les sacrifices pour notre famille, pour tous les moments difficiles que tu as vécus juste pour que nous puissions vivre dans des meilleures conditions. Merci pour le soutien, l'encouragement et pour l'expression d'amour à tout moment et merci surtout pour la fierté que tu as vis-à-vis de moi. Sache mon cher père que c'est un honneur pour moi, à jamais, de porter votre nom ! Quant à toi ma belle et chère maman je ne pourrai jamais exprimer mes sentiments de gratitude envers toi. Grâce à toi ma chère mère, à tes sacrifices, à ta belle éducation, à tes prières qui m'accompagnent au quotidien, grâce aussi à toutes les valeurs que tu m'avais apprises ; la patience, le courage, le respect, la persévérance ; je suis là aujourd'hui et je réussis un grand projet dans ma vie. Merci pour ton immense amour, pour ton attention à toujours me soulager à distance et pour le soutien à ce que mes rêves deviennent possibles. Je suis très fière d'être ta fille !

**Je remercie chaleureusement également l'ensemble des membres de ma famille** qui ont été des facteurs importants de cet accomplissement et dans tout mon parcours. Tout d'abord, je remercie mes chères sœurs Naima et Hasna pour leur amour, leur soutien et leur encouragement inconditionnés. Merci aussi pour tous les moments que vous m'avez accordés afin que je me sente entourée et pas seule. Merci à ma belle âme-sœur Noura, ma cousine ma source d'optimisme et mon petit rayon de soleil, merci pour ton amour et soutien ! Un grand merci également à mes frères Abdallah et Abderrahim, à mon cher oncle Brahim et ma chère tante Najat, à toutes mes cousines Aicha, Bouchra, Samira, et Fatima, à mes chères amies Samira, Hafida et Chaimae. Chacun parmi vous à participer à cette réussite, par le soutien inconditionnel, par la croyance en moi, par l'amour et par vos encouragements avec peut-être des mots simples de vos parts, mais qui valaient beaucoup pour moi !

*Et comme disait John Kennedy « L'art de la réussite consiste à savoir s'entourer des meilleurs », aujourd'hui ma plus grande réussite se résume dans le fait que je suis entourée des meilleurs, dans ma vie professionnelle assez bien que personnelle. Il est rare de rencontrer des personnes aussi dévouées. Vous laisserez tous une trace gracieuse dans ma vie à jamais !*



## Résumé

L'exercice physique se caractérise par ses effets bénéfiques sur l'organisme humain. Au niveau osseux, il se traduit par une action ostéogénique permettant d'améliorer la qualité du tissu osseux. Elle se détermine entre autres par la vascularisation et l'angiogenèse. Le réseau vasculaire assure au tissu osseux les apports en oxygène et en nutriments dont les cellules osseuses ont besoin pour leur bon fonctionnement. L'effet de l'exercice physique sur ces différents paramètres dépend de l'intensité, de la fréquence et du type de l'exercice. L'exercice physique en continu n'a que peu d'effet sur le tissu osseux. L'exercice de type intermittent a des effets bénéfiques en termes d'ostéogénèse dans des modalités chez les rats Wistar. Cependant aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressée à l'effet de l'exercice combiné sur la qualité de tissu osseux et sa vascularisation. Notre objectif est d'analyser les effets de ces différentes modalités d'exercice continu, intermittent et le combiné sur les paramètres architecturaux et micro-architecturaux du tissu osseux, tout en tenant compte des différents mécanismes de mécano-transduction et de vascularisation. Cette étude montre que l'entraînement combiné tend à favoriser l'angiogenèse du fémur distal. Ce phénomène est associé à un effet ostéogénique au niveau de l'os trabéculaire fémoral. La course intermittente, antérieurement connu dans la littérature par son effet ostéogénique, tend à avoir un léger effet angiogénique. La course continue à intensité modérée semble ne pas affecter l'ensemble des paramètres au niveau de l'os fémoral.

**Mots clés :** Entraînement, Tissu osseux, Angiogenèse, Ostéogénèse, Modalités d'entraînement, Vascularisation, Remodelage osseux

## Abstract

Physical exercise is characterized by its beneficial effects on the human body. At the bone level, it results in an osteogenic action that improves the quality of the bone tissue. This is determined by vascularization and angiogenesis, among other things. The vascular network provides the bone tissue with the oxygen and nutrients that the bone cells need for their proper functioning. The effect of exercise on these different parameters depends on the intensity, frequency and type of exercise. Continuous exercise has little effect on bone tissue. Intermittent exercise has beneficial effects in terms of osteogenesis in Wistar rats. However, no study, to our knowledge, has investigated the effect of combined exercise on bone tissue quality and vascularization. Our objective is to analyze the effects of these different modalities of continuous, intermittent and combined exercise on the architectural and micro-architectural parameters of bone tissue, while taking into account the different mechanisms of mechano-transduction and vascularization. This study shows that combined training tends to promote angiogenesis of the distal femur. This phenomenon is associated with an osteogenic effect on the femoral trabecular bone. Intermittent running, previously known in the literature for its osteogenic effect, tends to have a slight angiogenic effect. Continuous running at moderate intensity does not seem to affect all the parameters in the femoral bone.

**Key words:** Training, Bone tissue, Angiogenesis, Osteogenesis, Training modalities, Vascularization, Bone remodeling



# Sommaire

Remerciements .....	2
Résumé .....	6
Abstract .....	7
Sommaire .....	8
Liste des abréviations .....	10
Liste des figures .....	13
Introduction générale.....	15
Partie I .....	18
Revue de littérature .....	18
Chapitre I : Tissu osseux .....	19
1. Généralités sur le tissu osseux .....	19
2. Structure micro-architecturale du tissu osseux .....	24
2.1. Os cortical .....	24
2.2. Os trabéculaire.....	27
3. Composition du tissu osseux .....	30
3.1. La matrice extracellulaire .....	30
3.2. Les cellules osseuses .....	31
4. Propriétés et fonctions du tissu osseux .....	41
4.1. Propriétés du tissu osseux .....	41
4.2. Fonctions du tissu osseux .....	41
5. Remodelage osseux .....	42
6. La qualité du tissu osseux .....	46
Chapitre II : Tissu osseux et vascularisation .....	48
1. Approvisionnement vasculaire osseux .....	48
2. Couplage angiogenèse-ostéogenèse .....	50
3. Vascularisation et réparation osseuse .....	52
Chapitre III : Activité physique, qualité osseuse et vascularisation osseuse .....	54
1. Généralités sur l'activité physique .....	54
2. Effet de l'exercice physique sur le tissu osseux .....	54
2.1. Effet des différentes modalités .....	54
2.2. Effet de l'exercice sur tapis roulant.....	56
3. Effet de l'exercice physique sur la vascularisation .....	65

3.1	Les effets hors tissu osseux .....	65
3.2	Effet de l'exercice physique sur la vascularisation osseuse .....	66
	Problématique, hypothèses et objectifs .....	74
Partie II	.....	75
Matériels et méthodes	.....	75
1.	Animaux .....	76
2.	Protocole d'entraînement physique des animaux de l'étude .....	76
2.1.	Acclimatation .....	76
2.2.	Mesure de la vitesse maximale aérobie (VMA).....	76
2.3.	Protocole d'entraînement physique.....	77
3.	Mesure des paramètres corporels et des paramètres sanguinsdes animaux.....	78
4.	Analyse ex-vivo du tissu osseux.....	79
4.1.	Micro-CT.....	79
4.2.	Histologie .....	80
4.3.	PCR quantitative en temps réel .....	87
5.	Statistiques.....	91
Partie III	.....	92
Résultats	.....	92
Etude I	.....	94
Etude II	.....	122
Etude III	.....	146
Partie IV	.....	164
Discussion générale	.....	164
Discussion et limites	.....	165
Conclusion et perspectives	.....	173
Références	.....	174
Production scientifique	.....	191
Annexe 1	.....	192
Annexe 2	.....	205

## Liste des abréviations

ATP	L'adénosine triphosphate
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALP	Les phosphatases alcalines
ANGPT1	Gène de l'angiopoïétine 1
AP	Diamètre antéro-postérieur
ARNm	L'acide ribonucléique messager
BGLAP	Gène de l'ostéocalcine
BMP	Protéine osseuse morphogénétique
BV/TV	Fraction volumique d'os trabéculaire
CE	Cellules endothéliales
Cf	Concentration finale
Ci	Concentration initiale
CPE	Cellules progénitrices endothéliales
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
Dll4	Gène de la protéine Delta-like 4
DMO	Densité minérale osseuse
DO	Densité optique
EC	Exercice modéré continu
COM	Exercice combiné
EI	Exercice intermittent
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Emcn	Gène de la protéine endomécine

eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
FGF	Facteurs de croissance des fibroblastes
HE	Hématoxyline-éosine
HIF	Facteur inductible d'hypoxie-1
IGF-1	Facteur de croissance 1
IHC	Immunohistochimie
IMC	Indice de masse corporelle
LM	Diamètre latéro-médial
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MEPE	Gène de la phosphoglycoprotéine extracellulaire matricielle
MMP	Les métalloprotéases matricielles
NF- $\kappa$ B	Facteur de transcription nucléaire Kappa B
NTX	Télopeptide N-terminal du collagène de type I
OPG	Ostéoprotégérine
Osx	Facteur de transcription Ostérix
PDGFB	Gène du facteur de croissance dérivé des plaquettes B
PDPN	Gène de protéine de la podoplanine
Pecam1	Molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires 1
PFA	Paraformaldéhyde
PGE-2	La prostaglandine E <sub>2</sub>
PTH	La parathormone
RANK	Récepteur activateur du NF- $\kappa$ B
RANKL	Ligand du récepteur activateur du NF- $\kappa$ B
ROI	La région d'intérêt

RT-qPCR	Technique de PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative
Runx2	Gène du facteur de transcription lié à Runt 2
SD	Ecart-type
SED	Sédentaire
SEM	Erreur standard de la moyenne
Sost	Gène de la sclérostine
Sparc	Gène de l'ostéonectine
Tb.N	Nombre de trabécules osseuses
Tb.Sp	Espace entre les trabécules osseuses
Tb.Th	Epaisseur trabéculaire
TBS	Tampon Tris et phosphate salin
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$
TNF- $\alpha$	Facteurs de nécrose tumorale $\alpha$
TRAP	Phosphatase acide tartrate-résistant
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire
Vf	Volume final
Vi	Volume initial
VMA	Vitesse maximale aérobie
VOI	Volume d'intérêt

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Les deux différents modes d'ossification osseuse. A) Ossification endochondrale. B) Ossification intramembraneuse.....	21
<b>Figure 2.</b> Niveaux hiérarchiques d'organisation de l'os.....	23
<b>Figure 3.</b> Compositions et organisation de l'os cortical chez l'Homme. ....	25
<b>Figure 4.</b> Image microscopique de l'os cortical du rat. ....	25
<b>Figure 5.</b> Image microscopique de l'os cortical humain montrant la présence d'une microfissure .....	27
<b>Figure 6.</b> Compositions et organisation de l'os trabéculaire chez l'Homme .....	28
<b>Figure 7.</b> Organisation hiérarchique de l'os trabéculaire .....	29
<b>Figure 8.</b> Les différents types de cellules osseuses et leurs niveaux de localisation dans le tissu osseux.....	31
<b>Figure 9.</b> Les différentes étapes de différenciation ostéoblastique et les différents facteurs intervenant à chaque étape .....	33
<b>Figure 10.</b> Réseau dendritique de l'ostéocyte .....	34
<b>Figure 11.</b> Microscopie électronique à balayage d'une coupe transversale d'un os long murin montrant l'ostéocyte et son réseau lacuno-canaliculaire.....	35
<b>Figure 12.</b> Processus de mécanotransduction ostéocytaire.....	37
<b>Figure 13.</b> Les différentes étapes de différenciation ostéoclastique et leurs différents facteurs. ....	39
<b>Figure 14.</b> Cytokines stimulatrices et inhibitrices de l'activité ostéoclastique .....	40
<b>Figure 15.</b> L'unité multicellulaire de base du remodelage osseux .....	43
<b>Figure 16.</b> Les différentes étapes du remodelage osseux .....	44
<b>Figure 17.</b> Cycle de remodelage osseux avec les différents facteurs locaux et systémiques intervenants dans chaque phase.....	46
<b>Figure 18.</b> Les paramètres multi-échelles déterminant la qualité du tissu osseux.....	47
<b>Figure 19.</b> Le réseau vasculaire des os longs .....	49
<b>Figure 20.</b> Les micro-vaisseaux de type H et de type L et leur localisation au niveau des os longs .....	50
<b>Figure 21.</b> Lacunes ostéocytaires au niveau d'une coupe transversale de la partie corticale du tibia du rat chez les groupes contrôle sédentaire (SED), de course continue (CR) et de course intermittente (IR).....	61

<b>Figure 22.</b> Activité des ostéoclastes dans la partie corticale du tibia du rat chez les groupes contrôle sédentaire (a, SED), de course continue (b, CR) et de course intermittente (c, IR)...	62
<b>Figure 23.</b> L'immunohistochimie de la sclérostine dans l'os cortical du tibia de souris contrôles et âgés de 13 et de 41 semaines. L'exercice pendant 5 semaines sur tapis roulant diminue l'expression de la sclérostine par les ostéocytes chez les jeunes souris, mais pas chez les souris adultes.....	64
<b>Figure 24.</b> Les mécanismes potentiels de l'exercice dans la promotion de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse .....	73
<b>Figure 25.</b> Les différents protocoles d'exercice physique effectués par les différents groupes expérimentaux de la présente étude.....	78
<b>Figure 26.</b> Méthode utilisée pour la mesure de l'épaisseur corticale fémorale sur les coupes transversales des fémurs droits des rats. Coloration histologique par HE .....	84
<b>Figure 27.</b> Méthode de quantification du marquage TRAP .....	85
<b>Figure 28.</b> Méthode utilisée pour la quantification de l'immuno-marquage de la caspase-3 clivée, du CD31 et du VEGFR2 sur les coupes longitudinales des fémurs gauches des rats ..	86
<b>Figure 29.</b> Les différentes étapes du protocole d'extraction de l'ARN.....	88
<b>Figure 30.</b> Les différentes étapes du protocole de synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN ....	89
<b>Figure 31.</b> Les différentes étapes du protocole de la PCR quantitative en temps réel .....	90
<b>Figure 32.</b> Résultats du nombre de vaisseaux marqués au VEGFR2 .....	123
<b>Figure 33.</b> Résultats du nombre de vaisseaux marqués au CD31 .....	124

## Introduction générale

L'activité physique est un sujet important en recherche scientifiques. Un niveau d'activité physique insuffisant est considéré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'un des principaux facteurs de risque de maladies non transmissibles et de décès dans le monde [1]. Dès lors, l'activité physique est considéré dans la littérature comme étant une approche ou une modalité non pharmacologique efficace contre de nombreuses pathologies [2]. Et les preuves soutenant l'importance de l'exercice physique régulier comme moyen préventif efficace pour réduire la mortalité prématurée et pour le traitement de certaines maladies chroniques sont multiples et évidentes aujourd'hui [3]. Il est ainsi proposé comme thérapie dans le traitement de plusieurs maladies psychiatriques, neurologiques, métaboliques, cardiovasculaires, pulmonaires, cancer [4] et dans les troubles musculo-squelettiques [5]. L'exercice physique se caractérise également par son effet anti-inflammatoire [6, 7].

Au niveau osseux, de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal ont démontré l'importance de l'activité physique, dans l'amélioration, la régulation et le maintien de l'intégrité du squelette chez des sujets sains ou pathologiques [8]. L'exercice constitue la stratégie la plus efficace pour améliorer la masse osseuse durant l'enfance et l'adolescence et pour la maintenir à l'âge adulte [9]. Ce rôle de maintien et de renforcement du squelette est encore plus important quand il s'agit d'une activité physique en charge (avec des contraintes mécaniques élevées), alors que le manque d'activité en charge ou de poids est délétère pour le squelette. Ainsi, la microgravité, la sédentarité ou l'immobilisation entraînent une diminution de la densité minérale osseuse chez l'homme et chez l'animal [8].

L'os n'est pas un tissu inerte mais un tissu dynamique et vivant : il se modèle et se remodèle en fonction des contraintes qui lui sont appliquées. Dans l'hypothèse du mécanostat osseux développée par Frost [10], la structure et la microstructure osseuses dépendent des stimulations mécaniques reçues par l'os. L'exercice physique est un exemple concret de contrainte appliqué à l'os. L'exercice physique est reconnu dans la littérature comme une charge mécanique appliquée de manière externe à l'os associé à une mise en jeu des muscles squelettiques. L'exercice physique provoque des contraintes mécaniques (impacts au sol, chocs, traction au niveau des insertions musculaires) qui affectent directement l'os [11] et provoque également l'activation d'agents biochimiques transportés par le sang (hormones, cytokines...), favorisant l'anabolisme osseux [12,13].



Chez l'Homme, l'exercice physique favorise la formation osseuse en cas d'ostéopénie [14]. L'exercice est également reconnu pour contribuer à la prévention et au traitement de l'ostéoporose [15]. D'une façon globale, l'exercice physique améliore généralement tous les paramètres intervenant sur la qualité osseuse [16]. Ces paramètres de qualité osseuse prédéfinis par Fonseca et *al.*, (2014) sont basés sur une approche multi-échelle dans la compréhension et l'analyse du tissu osseux : la géométrie osseuse générale, sa microarchitecture et les propriétés tissulaires basées sur la densité cellulaire, l'équilibre entre les activités cellulaires, le degré de minéralisation et la stabilité du collagène [17].

En tant que matériau vivant, l'os va évoluer non seulement d'un point de vue mécanique, mais aussi d'un point de vue biologique, puisque les organes et les os dépendent d'activités cellulaires. Pour répondre aux contraintes mécaniques et se renforcer, le tissu osseux, en tant que tissu dynamique, nécessite une combinaison d'éléments, dont l'angiogénèse, qui est essentielle dans le remodelage, la réparation et la régénération osseuse [16]. En effet, l'os est un tissu hautement vascularisé et l'angiogénèse joue un rôle important dans l'ostéogénèse [18]. Ainsi, les vaisseaux sanguins peuvent participer activement à la formation osseuse par la production de facteurs qui stimulent la prolifération et la différenciation des ostéoprogéniteurs dans la moelle osseuse et la libération de facteurs favorisant l'ostéogénèse [19–21].

Cependant, si les études sur le tissu osseux sont nombreuses [16], à ce jour, les données sur les effets de l'exercice sur les réponses angiogéniques-ostéogéniques sont très limitées. De plus, en parlant uniquement des effets ostéogéniques de l'exercice, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus concernant ces effets notamment dans le contexte sain. Cela peut se justifier par la grande diversité des protocoles d'exercice physique observés dans la littérature. Le changement des paramètres de l'exercice tels que la durée, la fréquence et l'intensité, d'un protocole à un autre, d'une étude à une autre, a créé dans la littérature un ensemble de modalités d'exercice différentes, avec des effets controversés sur le statut osseux.

Pour tenter de combler ce manque de connaissances, cette thèse vise donc à décrire les effets de différents protocoles d'exercice de course sur tapis roulant, continu, intermittent et combiné, sur la qualité du tissu osseux et sur la vascularisation osseuse. La première partie de ce document porte sur l'état de l'art qui présente un rappel sur le tissu osseux, sa composition et sa physiologie, la vascularisation du tissu osseux, une méta-analyse des effets de l'exercice

physique sur l'os et la vascularisation osseuse, et se termine par des hypothèses et les objectifs de ce travail. La deuxième partie présente le protocole expérimental utilisé lors l'étude afin de répondre aux objectifs fixés. Dans un troisième temps, les résultats obtenus sont exposés sous forme d'articles. La quatrième et la dernière partie de ce document présente une discussion générale conduisant à une conclusion générale, qui sera suivie par les perspectives à donner à ce travail.

# **Partie I**

## **Revue de littérature**

# Chapitre I : Tissu osseux

## 1. Généralités sur le tissu osseux

Le système musculo-squelettique est l'unité qui correspond à l'ensemble des muscles et os reliés entre eux par des articulations et qui assure le mouvement. Il comprend le système squelettique qui se compose chez l'Homme adulte d'environ 206 os [22], ce nombre est plus élevé chez les jeunes adultes et plus faible chez les personnes âgées [22].

Le tissu osseux est un tissu bien vivant et non un tissu inerte comme le montrait son imagerie. C'est l'un des organes les plus étendus et les plus omniprésents du corps humain, et dont l'altération est l'une des principales causes de la réduction de la qualité de vie [23].

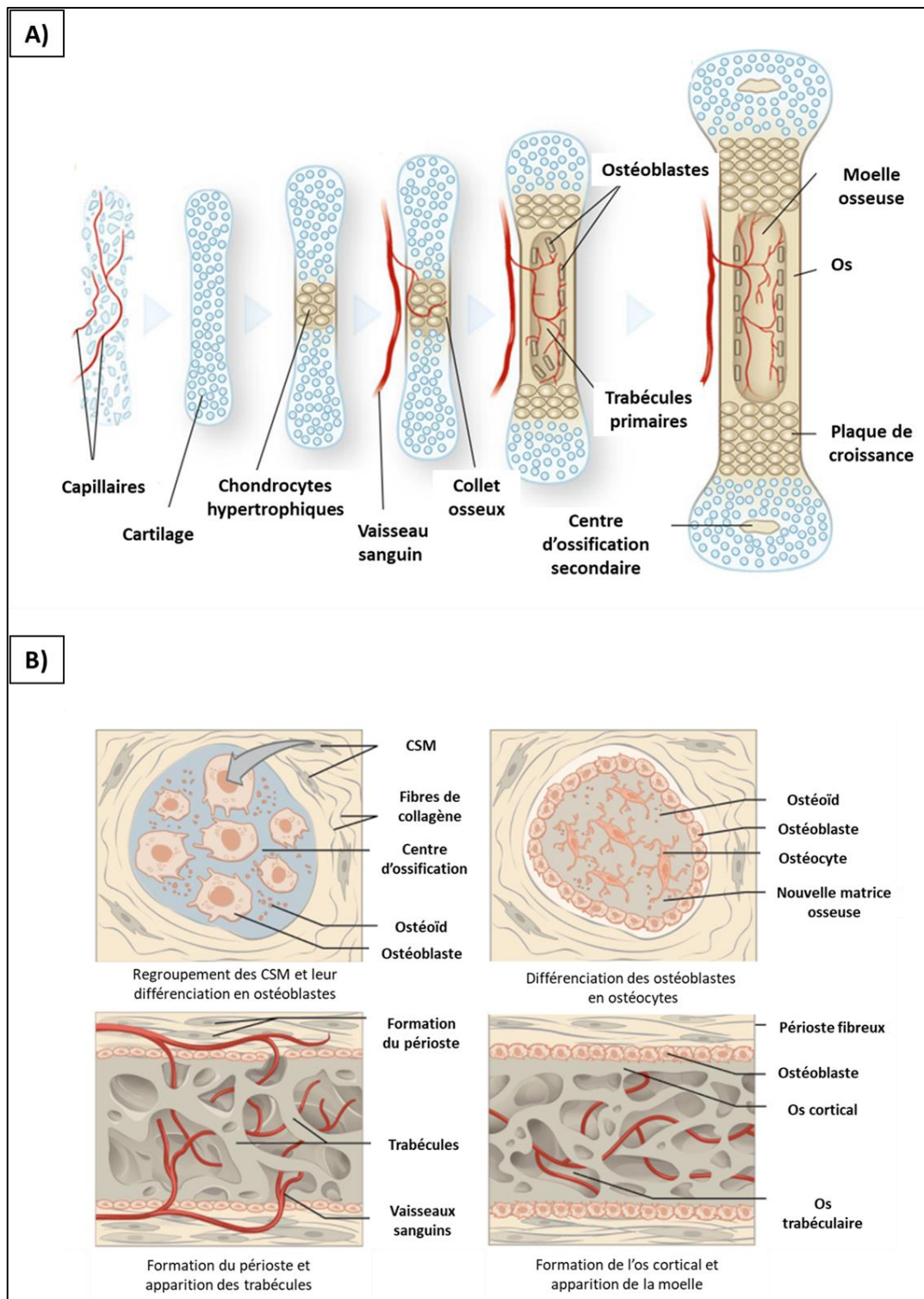
Le tissu osseux est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateux hautement spécialisé, résistant et léger. Il se caractérise par une hétérogénéité dans sa composition associant différents éléments et différentes cellules, le tout regroupé dans une matrice extracellulaire minéralisée/calciifiée. Ce tissu est vascularisé lui conférant la capacité de s'auto-renouveler, lui permettant de maintenir son rôle à la fois biologique et mécanique. Les propriétés de l'os et la notion de qualité osseuse sont grandement liées à la composition et la microarchitecture du tissu osseux.

Le tissu osseux assure en plus du mouvement d'autres fonctions : une fonction biomécanique pour défendre et protéger les organes et l'ensemble de l'appareil locomoteur [24], et une fonction biologique pour l'homéostasie du calcium et la production des cellules sanguines [25]. Son fonctionnement dépendant des facteurs chimiques et mécaniques lui permet de se remanier constamment tout au long de la vie de l'individu, à raison d'une fois tous les dix ans chez le jeune adulte [26]. Cette capacité constitue le remodelage osseux.

Grâce à ce processus du remodelage, l'os a la capacité de s'auto réparer et d'adapter sa masse, sa forme et ses propriétés intrinsèques en réponse à des modifications biomécaniques. Il est capable de supporter des charges et des contraintes mécaniques, comme celles liées à l'activité physique tout au long de la vie sans causer de fracture et sans être source de douleur en circonstance normale. Le tissu osseux se modèle et se remodèle en fonction des contraintes qui lui sont appliquées [27]. Le développement de la masse osseuse en l'absence de charges mécaniques est estimé à seulement de 30 % à 50 % de son potentiel [10].

En plus des contraintes mécaniques, il existe également des activités cellulaires diverses qui agissent sur ce remodelage osseux en conditions physiologiques et physiopathologiques [28].

Le tissu osseux est principalement issue de l'ostéogénèse, un processus impliquant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes ou en ostéoblastes qui forment des os sous le contrôle de divers facteurs de transcription [29,30]. En effet, durant l'initiation de la squelettogénèse, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues des lignées embryonnaires migrent vers les sites des futurs os en grandes quantités et y forment des condensations très denses qui définissent la forme et la taille des futurs os [31]. Ensuite, ces CSM se différencient soit en chondrocytes, donnant ainsi des modèles cartilagineux où le cartilage sera remplacé par de l'os, on parle de l'ossification endochondrale (ou formation osseuse endochondrale), responsable de la formation osseuse dans la majeure partie du squelette [30,32]. Ou bien, ces CSM se différencient en ostéoblastes pour former directement de l'os et on parle d'une ossification intramembraneuse (ou formation osseuse intramembraneuse) qui se produit généralement dans les os plats (figure 1) [32].



**Figure 1.** Les deux différents modes d'ossification osseuse. A) Ossification endochondrale. Modifiée d'après [33]. B) Ossification intramembraneuse. Modifié d'après [34].

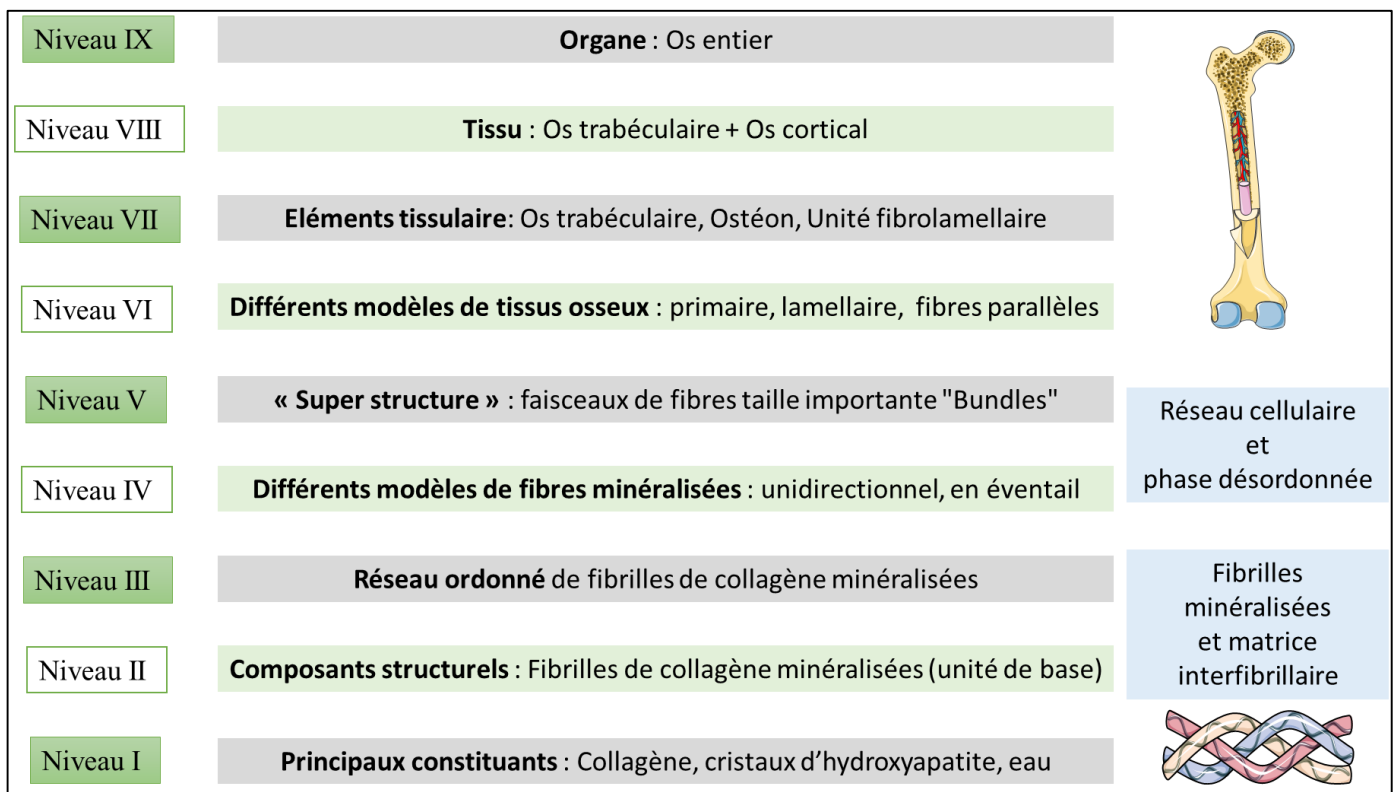
Comme précédemment mentionné, l'os est un tissu capable de s'auto-modeler, remodeler mais aussi de s'auto-réparer. La réparation osseuse comprend à la fois les processus de la formation osseuse et du développement osseux au cours de la vie fœtale et les mécanismes de base du remodelage osseux [35]. La réparation osseuse correspond à l'ensemble des processus permettant de cicatriser et de régénérer l'os après une fracture et de restaurer l'intégrité osseuse. Elle peut être induite par des stimuli externes (biomécaniques) et internes (biologiques) [36, 37]. On distingue deux modes ou deux processus de réparation osseuse différents, la guérison directe (primaire) et la guérison indirecte (secondaire) [38].

La guérison ou la cicatrisation primaire implique une différenciation directe des CSM en ostéoblastes qui forment l'os ultérieurement (ossification intramembraneuse). Alors que pendant la cicatrisation ou la guérison indirecte l'os est secondairement formé à travers un cartilage intermédiaire (ossification endochondrale) [38].

La guérison osseuse indirecte ou secondaire est la forme la plus courante de cicatrisation osseuse et ne nécessite pas de réduction anatomique et de recours à la chirurgie. Elle se déroule en plusieurs étapes consécutives [39] : immédiatement après le traumatisme, une réponse inflammatoire aiguë nécessaire à la progression de la cicatrisation se met en place. Ensuite, les CSM sont recrutées probablement à partir des tissus mous environnants et de la moelle osseuse. Ces CSM peuvent aussi être d'origine systémique circulant [40]. La génération et la formation d'un cal osseux cartilagineux se produit au site de fracture suivie immédiatement par la revascularisation et néo-angiogenèse du site. A posteriori, et pour que la cicatrisation osseuse progresse, le cal cartilagineux est minéralisé, résorbé et remplacé par un cal osseux dur. Finalement, dans une action terminale, le processus de remodelage osseux est mis en place pour remodeler le cal dur en une structure osseuse lamellaire, afin de lui redonner ses propriétés biomécaniques [35,39].

Pour la guérison dite primaire ou directe, elle ne se produit pas généralement dans le processus naturel de cicatrisation osseuse, car elle nécessite une réduction anatomique des extrémités de la fracture et une fixation stable empêchant ainsi le mouvement inter-fragmentaire [39]. Lorsque ces conditions sont remplies, la cicatrisation directe se produit par le remodelage direct d'un nouvel os lamellaire, et la formation des nouveaux canaux haversiens et des nouveaux vaisseaux sanguins qui revascularisent les fragments d'os [39,41]. La cicatrisation osseuse primaire dépend donc d'un apport sanguin adéquat fourni par cette restauration précoce de la microcirculation [41].

Avant la description détaillée de l'organisation et de la composition du tissu osseux chez l'Homme, il est primordial de le décrire selon les différents niveaux d'organisation. En 1998, Weiner et Wagner ont considéré l'os comme une famille de matériaux constitués de fibrilles de collagène minéralisées, avec un réseau de cellules et leurs processus cellulaires interconnectés. Le tout possède une structure très complexe qui peut être décrite en 7 niveaux hiérarchiques d'organisation [42]. Ce schéma a été mis à jour en 2014 par Reznikov et *al.*, pour donner au final un schéma structurel hiérarchique en 9 niveaux d'organisation, dans un cadre permettant de définir des questions fondamentales sur les relations structure-fonction dans l'os [43]. Le premier niveau d'organisation est formé principalement de collagène et d'eau. Les niveaux suivants sont liés au développement des fibres qui progressent en taille et en type, mais aussi à la minéralisation. Cette progression donne naissance aux deux tissus osseux distincts : l'os trabéculaire et l'os cortical, qui constituent l'os entier en tant qu'organe (figure 2) [43].



**Figure 2.** Niveaux hiérarchiques d'organisation de l'os. Modifié d'après [43].



## **2. Structure micro-architecturale du tissu osseux**

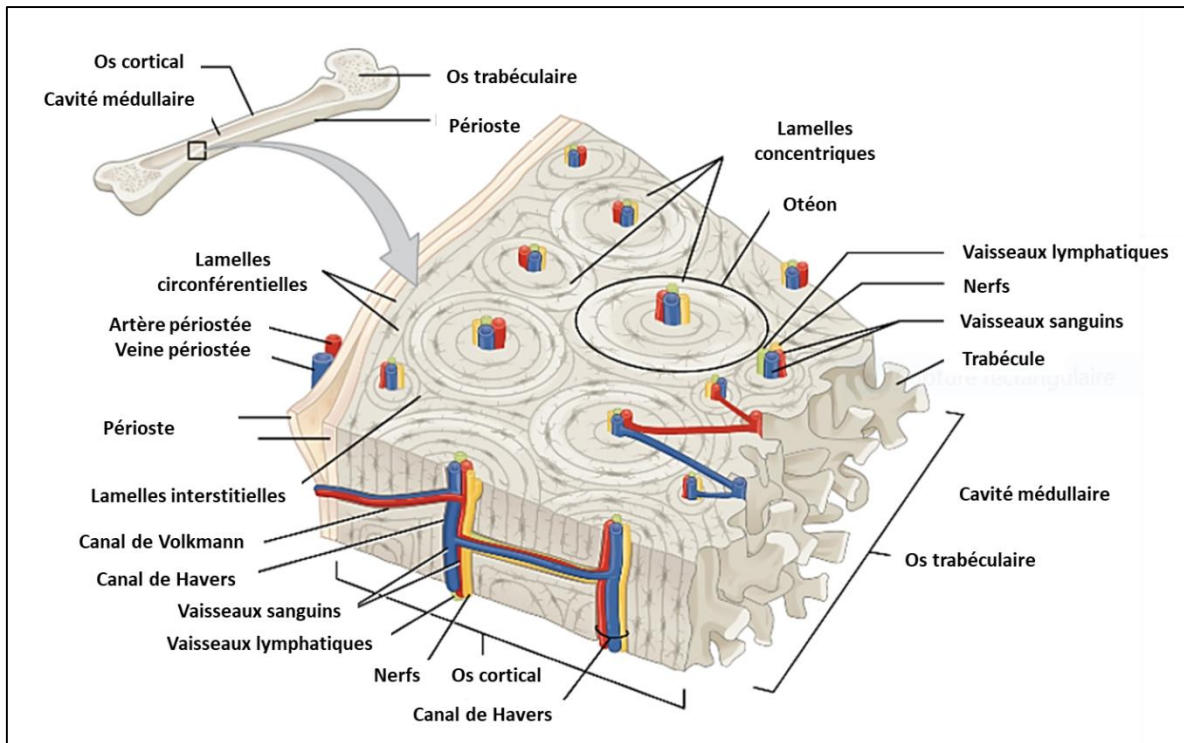
Il existe dans le corps humain trois types d'os : des os longs (comme le fémur, le tibia et l'humérus, etc.), des os courts (le tarse, le carpe) et des os plats (l'omoplate, le sternum). On peut cependant ajouter deux autres catégories à cette classification selon la forme d'os, ce sont les os sésamoïdes et les os irréguliers [44].

Les os longs sont les plus communément utilisés pour décrire la microarchitecture osseuse. Chez l'Homme adulte, ces os longs se composent de trois parties : les épiphyses proximales et distales en relation avec les articulations, et la partie diaphysaire qui fait référence à la partie centrale et principale des os longs [45]. Ces différentes parties sont constituées des deux types de tissu osseux : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux).

### **2.1. Os cortical**

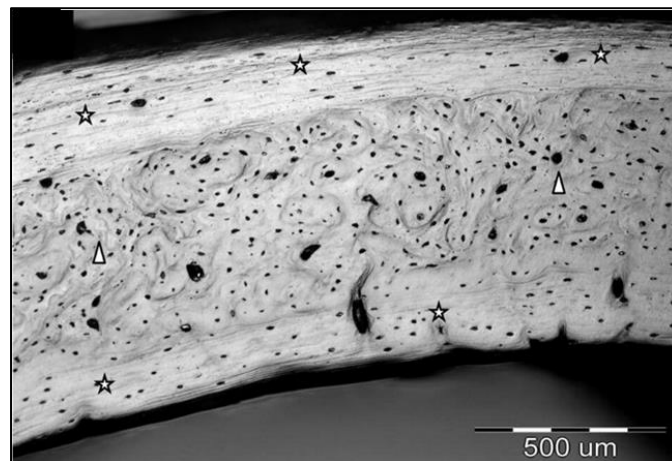
L'os cortical désigne la partie extérieure des os et représente environ 80% de la totalité du squelette [46]. La partie extérieure de l'os cortical est couverte d'une enveloppe appelé le périoste, à l'exception des zones d'attachement tendineuses et ligamentaires et les surfaces articulaires recouvertes du cartilage [47]. Le paroi de la cavité médullaire de l'os est recouverte d'une couche appelée l'endoste [47].

Chez l'Homme et chez la plupart des vertébrés, l'unité structurelle de l'os cortical est l'ostéon. L'ostéon a pour la première fois été observé sur un microscope optique ordinaire où il apparaissait comme étant composé d'unités cylindriques comportant plusieurs couches appelées lamelles, généralement coaxiales à l'axe du canal haversien (ou vasculaire) autour duquel elles se forment [48]. Ces lamelles constituées essentiellement de fibres de collagène contiennent les ostéocytes, les cellules osseuses les plus répandues, et qui résident dans des « espaces troués » appelés lacunes ostéocytaires [48,49]. Les ostéons sont transpercés par des canaux longitudinaux appelés canaux de Havers. Ces derniers sont reliés entre eux par d'autres canaux transversaux appelés canaux de Volkmann [50]. Ce système classique de canaux (Havers et Volkmann) est essentiellement pour l'apport vasculaire et nerveux [51]. De plus, les canaux de volkman permettant de relier horizontalement les ostéons, assurent la communication entre les ostéons [44].



**Figure 3.** Compositions et organisation de l'os cortical chez l'Homme. Modifié d'après [33].

Chez le rat, le modèle animal le plus utilisé dans la recherche, l'os cortical est très distinct et différent de l'os cortical humain principalement composé d'ostéons. En effet, L'os cortical chez le rat est généralement composé de deux différentes régions : une région comprenant des lamelles bien organisées présentes dans les zones périostes, et une région désorganisée située au centre du cortex. Entre ces deux régions, la matrice vient se disposer d'une manière aléatoire avec une présence d'ostéon très rare (Figure 4) [52].



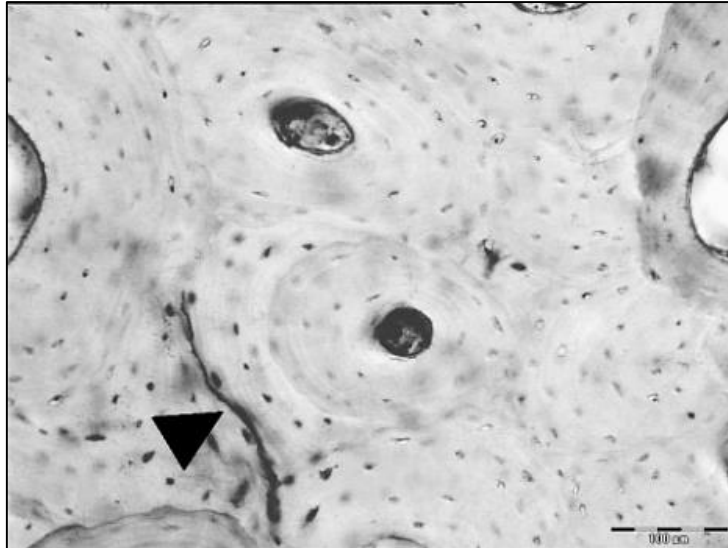
**Figure 4.** Image microscopique de l'os cortical du rat. D'après [52].

L'os cortical n'est pas vraiment un os compact et sa structure étant traversée par de nombreux canaux [46]. En plus des canaux de Volkmann et les canaux Haversiens (d'environ 10-50  $\mu\text{m}$  de diamètre), il existe à l'échelle petite le système lacunaire-canaliculaire. Il renferme le corps cellulaire des ostéocytes et leurs dendrites (de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) et permet la communication de cellule à cellule [53]. L'os cortical contient des cavités à différentes tailles. Cela s'échelonne des nano-cavités qui existent entre les fibres de collagène et les cristaux, à des micro-cavités comme les canaux vasculaire et les canalicules, jusqu'aux macro-cavités comme la cavité médullaire [54]. On parle de la porosité corticale, déterminant qualitativement de la microarchitecture corticale, intimement lié au remodelage osseux et dont le rôle dans la perte et la fragilité osseuse est de plus en plus reconnu [55].

Alors que les caractéristiques mécaniques du tissu osseux étaient pendant longtemps basées uniquement sur la masse et la qualité de l'os trabéculaire, il est aujourd'hui bien admis dans la littérature que l'os cortical joue un rôle primordial dans la détermination de la résistance et la solidité osseuse [56].

La présence des cavités de différente taille (porosité corticale) réduit la rigidité, la force et la résistance de l'os cortical [54]. Un déséquilibre du processus de remodelage cortical se produit, associé d'une porosité et d'un amincissement du cortex [54,56]. Avec l'âge et le vieillissement, les processus de consolidation et du remodelage osseux s'inverse, une trabécularisation du cortex s'installe, et en conséquence les pores corticaux s'agrandissent engendrant une porosité corticale de plus en plus grande avec une perte de résistance osseuse importante [57]. Des études récentes portent sur l'évaluation et la mesure des différents paramètres de l'os cortical, et démontrent qu'il s'agit bien d'un déterminant efficace de la force osseuse. Son analyse participe à la prédiction et d'identification du risque de fracture [58–60].

En plus de la porosité, l'os cortical est sensible aux microfissures. Il s'agit de courtes fissures, d'une longueur de 30 à 100  $\mu\text{m}$  résultant d'une rupture des liaisons intermoléculaires [61]. Ces microfissures s'accumulent sous l'effet d'une charge mécanique prolongée amenant à une fatigue osseuse et se sont souvent associées à une détérioration de la force et la rigidité osseuse [61].

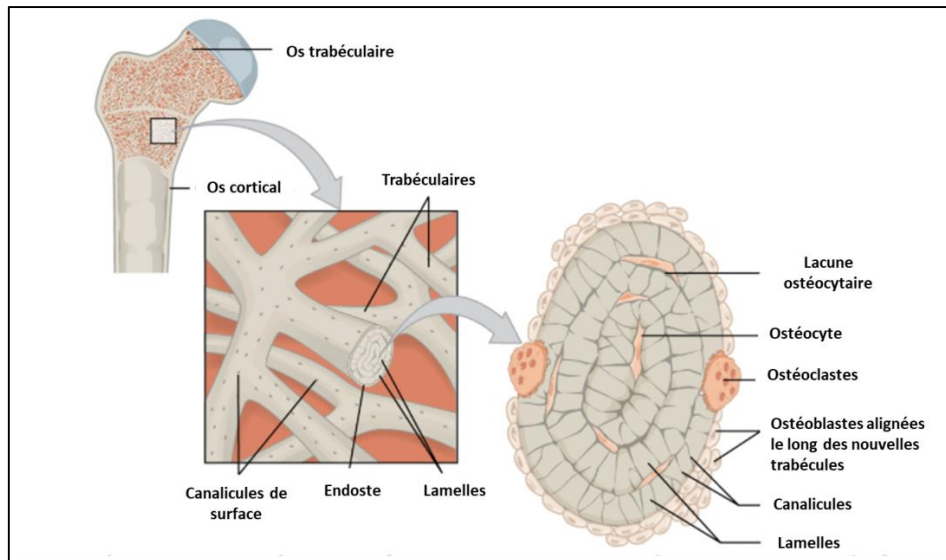


**Figure 5.** Image microscopique de l'os cortical humain montrant la présence d'une microfissure (flèche noir). D'après [61].

Nous pouvons conclure que l'os cortical est un paramètre déterminant de la fragilité osseuse et joue un rôle important dans la restauration et le maintien de la solidité des os. Les propriétés de l'os cortical proviennent principalement de sa composition : les minéraux et les protéines (fibres de collagène). En effet, le constituant minéral résiste très efficacement aux forces de compression, alors que les fibres de collagène assurent la résistance à la force de traction [61]. Il est néanmoins important de noter que ces propriétés de l'os cortical dépendent directement de la qualité de ses composantes et leurs disposition spatiale [61,62].

## **2.2. Os trabéculaire**

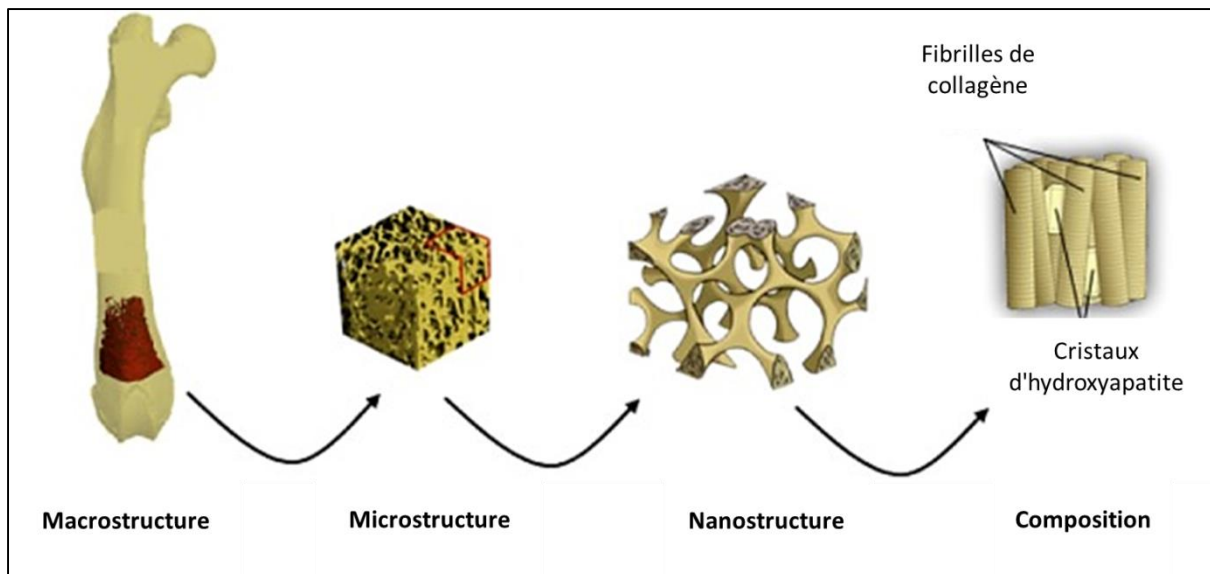
L'os trabéculaire désigne le tissu osseux couvrant les cavités internes des extrémités (épiphyses et métaphyses) des os longs, et l'intérieur des os plats. Il représente les 20% restant du squelette [44,46]. Il est cependant plus actif et réagit plus rapidement au changement de charge et de contraintes, ce qui le rend beaucoup plus dynamique avec un rôle majeur dans le métabolisme osseux [44]. Alors que l'os cortical a une porosité faible (de 5% à 15%), celle de l'os trabéculaire varie entre 40 à 95% [63]. Il est ainsi considéré comme étant un matériau hautement poreux. En raison de cette porosité importante par rapport à celle de l'os cortical, les propriétés mécaniques de cet os sont spécifiquement fondées sur sa porosité. Ainsi, la qualité osseuse à ce niveau anatomique est principalement basée sur la disposition micro-architecturale du réseau trabéculaire et les caractéristiques tissulaires des trabécules (volume, épaisseur... etc.) [63].



**Figure 6.** Compositions et organisation de l'os trabéculaire chez l'Homme. Modifié d'après [33].

La forme ostéonale présente au niveau de l'os cortical est remplacée par une forme appelée « paquets » au niveau de l'os trabéculaire avec une forme semi-lunaire d'une épaisseur de 35 mm en moyenne [64]. L'unité structurale de celle-ci est la trabécule. Les trabécules s'associent les unes aux autres pour donner la forme géométrique de l'os trabéculaire. Il est composé, d'un point de vue tridimensionnel, de plaques et de poutres d'une épaisseur moyenne de 50 à 400 mm en moyenne chez l'Homme [64]. L'espace poreux entre les trabécules est remplis par la moelle osseuse rouge constituée principalement des cellules hématopoïétiques, et la moelle jaune principalement composée des cellules non hématopoïétiques (les CSM donnant entre autres les ostéoblastes) [65].

A l'échelle microstructurale, l'architecture trabéculaire permet d'optimiser le transfert de charge. Dans le squelette appendiculaire, l'os trabéculaire transfère les charges mécaniques de la surface articulaire à l'os cortical [66]. Les os sont tous soumis à diverses forces mécaniques, notamment des forces de compression, de traction, de flexion, de cisaillement et de torsion. La résistance de l'os trabéculaire est beaucoup plus élevée en compression qu'en tension et beaucoup plus faible en cisaillement [67]. En cas de traumatismes mineurs, une augmentation du liquide interstitiel se produit sans aucune lésion des éléments cellulaires. Cependant en cas des traumatismes plus grave et des contraintes plus importantes, les dommages tissulaires peuvent aller de petites microfissures à des micro-fractures et des hémorragies intenses [65].



**Figure 7.** Organisation hiérarchique de l'os trabéculaire. Modifié d'après [66].

Il est important de noter que la résistance de l'os trabéculaire aux différentes forces mécaniques précédemment citées et auxquelles il est soumis, diminue avec la diminution de la densité minérale osseuse (DMO) [67]. La mesure de densité minérale osseuse (DMO) par technique d'absorptiométrie biphotonique à rayon X a été pendant longtemps l'atout du diagnostic de l'ostéoporose [68]. Il est cependant bien établi dans la littérature d'aujourd'hui que cette mesure présente des limites pour le diagnostic de l'ostéoporose et l'ostéopénie. Elle est de plus en plus considérée comme un outil subjectif plutôt qu'objectif, avec des variabilités inter-observateurs importantes, voire un manque de sensibilité pour les tissus de mauvaise qualité [69]. En conséquence, un nouvel outil analytique basé sur l'analyse de nouvelles mesures de texture en niveaux de gris sur des images d'absorptiométrie à rayons X a été récemment développé [70]. Il s'agit du score d'os trabéculaire (TBS pour Trabecular Bone Score), qui n'est pas une mesure directe de la microarchitecture osseuse, mais une mesure liée aux caractéristiques tridimensionnelles de l'os trabéculaire telles que le nombre des trabécules, la séparation trabéculaire et la densité de connectivité [70]. Un TBS élevé semble représenter une microarchitecture forte et résistante aux fractures, tandis qu'un TBS faible reflète une microarchitecture faible et sujette aux fractures [70]. De ce fait, il est admis dans la littérature que le TBS est un outil efficace pour la prédiction des fractures indépendamment de la DMO [71]. Cela prouve la corrélation de la microarchitecture osseuse trabéculaire à la résistance osseuse indépendamment de la DMO.

### **3. Composition du tissu osseux**

Tous les organes sont composés d'un mélange de cellules et de composants non cellulaires. Le tissu osseux est chimiquement constitué d'une matrice minéralisée dite matrice extracellulaire composée du collagène et des protéines non collagéniques, et de cellules osseuses qui synthétisent et qui contrôlent ce tissu [72]. La qualité et les propriétés tissulaires de ce tissu hautement spécialisé sont donc basées sur les caractéristiques de ses composantes : la densité cellulaire, l'intégrité des fibres de collagène de la matrice extracellulaire, etc.

#### **3.1. La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire, le composant non cellulaire du tissu osseux, est une matrice minéralisée principalement constituée des protéines de collagène et d'une petite quantité de protéines non collagéniques. Ces derniers sont généralement dissimulés dans la matrice et sont libérés lorsque l'os est résorbé [73].

Considérée pendant longtemps comme un composant inerte et inactif ne participant qu'à la préservation de la morphologie osseuse, son rôle majeur est apparu lors de ces dernières années [74]. En plus de son rôle important dans l'adhésion et le mouvement des cellules [75], la matrice extracellulaire régule également un ensemble de processus cellulaires notamment la croissance, la migration, la différenciation, la survie, la communication cellule-cellule et l'homéostasie [76]. Et ce, car la matrice extracellulaire présente plusieurs sites de liaison pour de nombreux facteurs de croissance agissant sur les cellules et contrôlant la morphogenèse osseuse globale [77]. La transmission des signaux mécaniques aux cellules et ainsi l'activation de plusieurs voies de signalisation sont aussi assurés par la matrice extracellulaire [78].

La matrice extracellulaire osseuse est composée de diverses protéines qui donnent naissance à diverses structures et propriétés osseuses [74]. Il s'agit principalement du collagène de type 1, les protéoglycanes, les facteurs de croissance, les protéines d'adhérence, les métalloprotéines matricielles... etc [74].

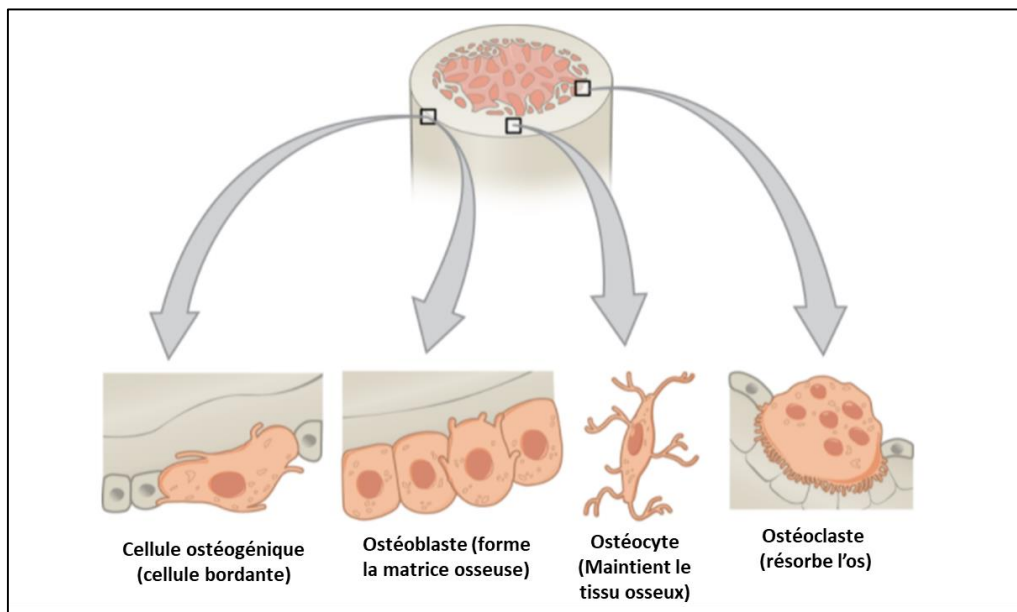
La matrice osseuse est souvent répartie, d'un point de vue composition, en deux phases ou fraction : une phase dite organique qui représente 30% du tissu osseux et qui est constituée à 95% de collagène de type 1, et une phase inorganique ou dite minérale qui représente 70% du tissu osseux, composée principalement de phosphate de calcium [79].

La phase organique de la matrice osseuse (collagène de type 1) est extrêmement dense et fortement réticulée jouant un rôle important dans la solidité des os. Cependant, la phase minérale avec sa composante élastique assure la résistance cruciale de l'os contre les chocs, les déformations et les fractures [80].

### 3.2. Les cellules osseuses

Il est aujourd'hui admis dans la littérature que le tissu osseux est un tissu vivant et dynamique, contrairement à la fausse idée largement répandue, admettant l'os comme un organe inerte. L'activité dynamique du tissu osseux, basée sur son auto-renouvellement constant, est principalement assurée par sa diversité cellulaire. En effet, le tissu osseux est composé de différents types de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes (ou cellules de revêtement osseux) et les ostéoclastes.

La lignée ostéoblastique (les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes) dérive des CSM qui donnent également naissance aux chondrocytes, aux adipocytes, aux myocytes et aux fibroblastes [81]. Alors que les ostéoclastes proviennent des monocytes issus eux-mêmes des cellules souches hématopoïétiques (CSH) [82]. L'activité de cette unité cellulaire osseuse hétérogène est régulée par plusieurs éléments : les forces mécaniques, les facteurs de croissances, les cytokines, les facteurs locaux et les hormones systémiques comme l'hormone parathyroïdienne (PTH) et les œstrogènes [83].



**Figure 8.** Les différents types de cellules osseuses et leurs niveaux de localisation dans le tissu osseux. D'après [33].



### a. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules osseuses situées le long de la surface osseuse ayant une forme cuboïde, elles représentent 4 à 6% du nombre total des cellules osseuses et dont la fonction majeure est la formation osseuse [84]. Les ostéoblastes proviennent de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Pendant le processus de différenciation des CSM en ostéoblastes, ces derniers passent par quatre stades différents de maturation : Les pré-ostéoblastes, l'ostéoblaste, l'ostéocyte et la cellule osseuse mature [85]. Toutes ces cellules ressemblent histologiquement aux ostéoblastes (elles se colorent toutes positivement à la phosphatase alcaline). Par contre, les ostéoblastes matures uniquement possèdent la capacité de formation du tissu osseux minéralisé [85].

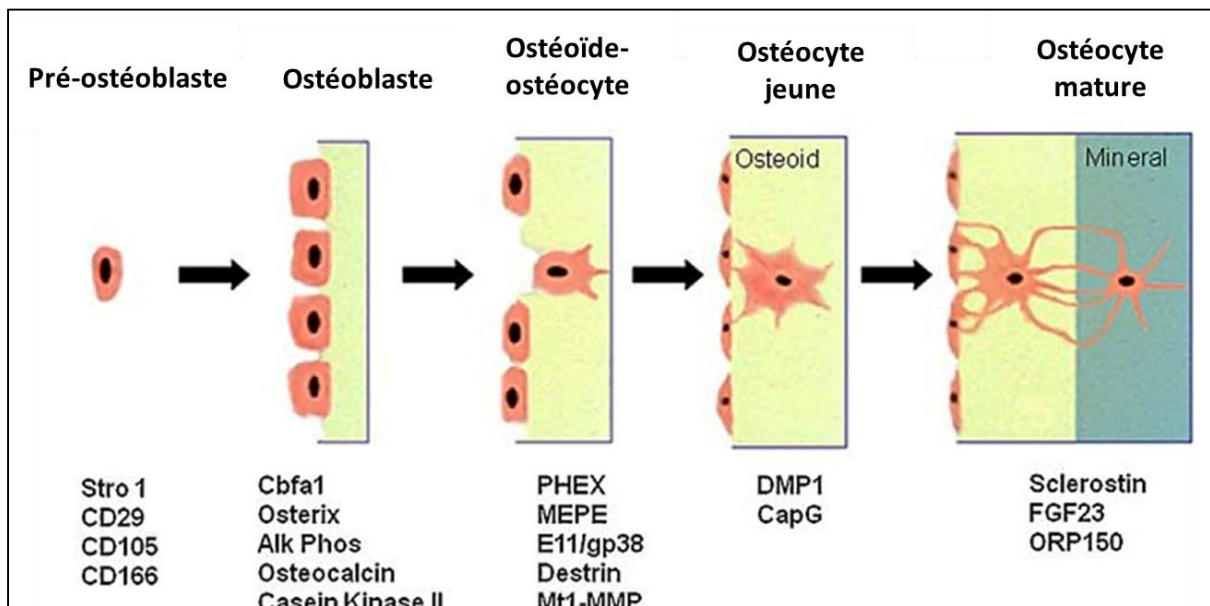
La différenciation des CSM en ostéoblastes se fait sous l'action des stimuli appropriés (hormones, facteurs de transcription, facteurs de croissance, etc.) [85]. Ce processus de différenciation est donc stimulé par plusieurs facteurs à différents stades, et il implique une coordination spatio-temporelle de l'interaction entre ces différents facteurs endocrines, paracrines et autocrines [83]. Parmi ces différents facteurs, citons les plus importants : la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, le Runx2 et Ostérix (Osx).

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans la différenciation des ostéoblastes au stade pré-ostéoblastiques et joue un rôle important dans la régulation de la formation osseuse [83,85]. Le Runx2, quant à lui, est le gène maître de la différenciation ostéoblastiques. En effet, le Runx2 est exprimé dans les CSM, il est ensuite régulé positivement dans les pré-ostéoblastes, en atteignant un niveau maximal dans les ostéoblastes immatures, et puis il se régule négativement dans les ostéoblastes matures [86]. Ostérix est aussi un facteur crucial de différenciation ostéoblastiques. Associé au Runx2, Ostérix dirige les pré-ostéoblastes vers des ostéoblastes immatures produisant les protéines de la matrice osseuse, tout en bloquant leur potentiel à se différencier en chondrocytes [87].

En résumé, les CSM se différencient sous l'action du Runx2, Ostérix et  $\beta$ -caténine en pré-ostéoblastes et puis en ostéoblastes immatures qui produisent les protéines de la matrice osseuse et qui expriment en grandes quantité l'ostéopontine. Ces ostéoblastes immatures se différencient à leur tour en ostéoblastes matures qui expriment des niveaux élevés d'ostéocalcine et qui sont intégrés dans la matrice osseuse afin de devenir des ostéocytes [87].

## b. Les ostéocytes

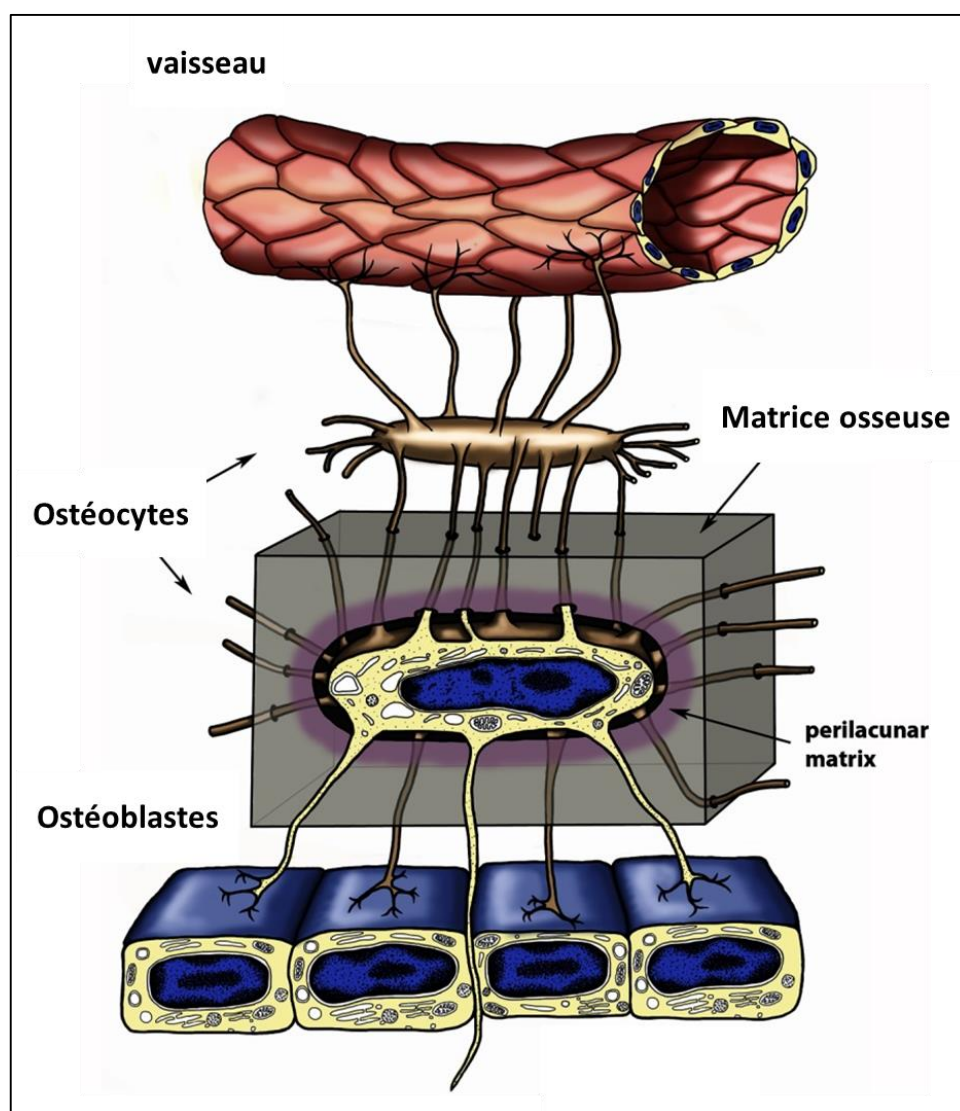
Les ostéocytes sont des anciens ostéoblastes enfermés dans la matrice osseuse qu'ils synthétisent eux-mêmes, c'est à dire, ce sont des cellules en phase terminal de différenciation avec une activité de formation osseuse beaucoup plus faible [83]. En effet, les cellules ostéoblastiques, en fin de vie, ont trois destins distincts [88] : certains s'enferment dans la matrice pour devenir des ostéocytes (environ 10 à 30% chez l'Homme) [89], d'autres se transforment en cellules bordantes (cellules de revêtement osseux), et une proportion de ces ostéoblaste meurent par apoptose, la mort cellulaire programmée (environ 65% chez l'Homme)[89]. Cependant, les mécanismes responsables de ces devenus de l'ostéoblaste restent inconnus. Le processus ostéocytaire (différenciation des ostéoblastes en ostéocytes) contient quatre stades différents : l'ostéoïde-ostéocyte, le pré-ostéocyte, l'ostéocyte jeune et l'ostéocyte mature [89].



**Figure 9.** Les différentes étapes de différenciation ostéoblastique et les différents facteurs intervenant à chaque étape. Modifié d'après [90].

Les ostéocytes sont les cellules osseuse les plus abondantes chez les mammifères, ils constituent de 90 à 95% de toutes les cellules du squelette adulte (20 000 à 80 000 cellules par  $\text{mm}^3$ ), tandis que les ostéoblastes en composent moins de 5% et les ostéoclastes moins de 1% [13,89]. Chez l'Homme, les ostéocytes ont une durée de vie importante, estimée à des décennies [89]. En comparaison, les ostéoblastes ne vivent que quelques semaines et les ostéoclastes que quelques jours [89].

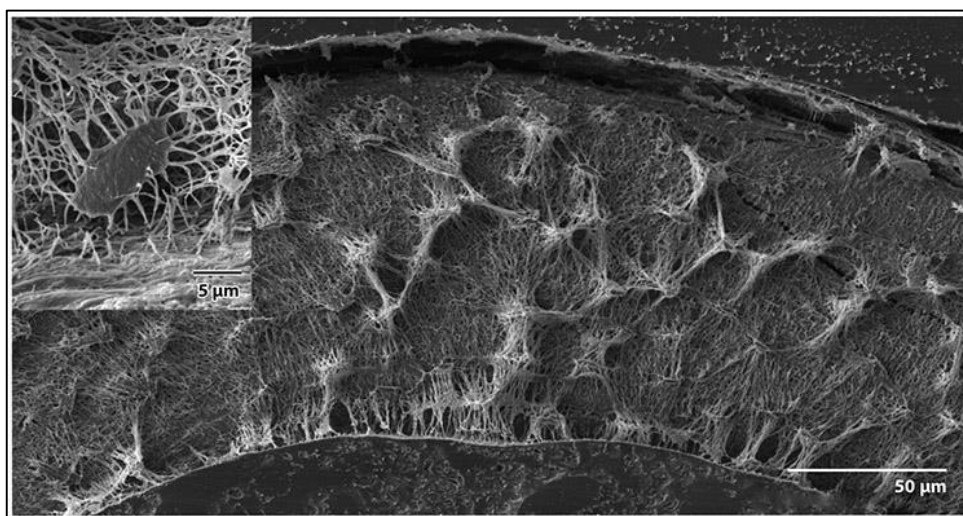
Les ostéocytes résident dans des lacunes de la matrice osseuse minéralisée. Ils ont une forme d'étoile et une morphologie ressemblant à celle des neurones, avec des extensions cytoplasmiques appelés dendrites (allant de 40 à 100 par cellule). Ils occupent les canalicules pour former le réseau lacuno-canaliculaire [91]. Ce processus dendritique assure principalement la communication entre les ostéocytes, et entre les ostéocytes et les cellules de la surface osseuse, la moelle osseuse et le système vasculaire (figure 10) [91]. De plus, ce réseau lacuno-canaliculaire sert également à fournir l'ostéocyte en de l'oxygène et en nutriments nécessaires pour sa viabilité, et ce via le fluide canaliculaire ou le fluide osseux qui le traverse [91].



**Figure 10.** Réseau dendritique de l'ostéocyte. Modifié d'après [91].

Jusqu'à la dernière décennie, le rôle de l'ostéocyte était quasiment ignoré dans la littérature et il était largement considéré comme une cellule passive du tissu osseux [90]. Depuis, il a été démontré que cette cellule a plusieurs fonctions dont la plus importante est le maintien de l'homéostasie osseuse et la régulation du métabolisme squelettique en réponse à la charge mécanique [92]. Désormais, l'ostéocyte est donc considéré comme le chef d'orchestre du remodelage osseux du fait qu'il régule à la fois l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes [90]. Cette cellule interagit non seulement sur les cellules à la surface de l'os, mais elle est également source de plusieurs facteurs solubles pour cible des organes distants (notamment les reins et les muscles) [90]. Ces éléments révèlent l'importance de cette cellule ignorée pendant longtemps et l'importance de sa viabilité et son bon fonctionnement pour l'homéostasie des os et des autres organes.

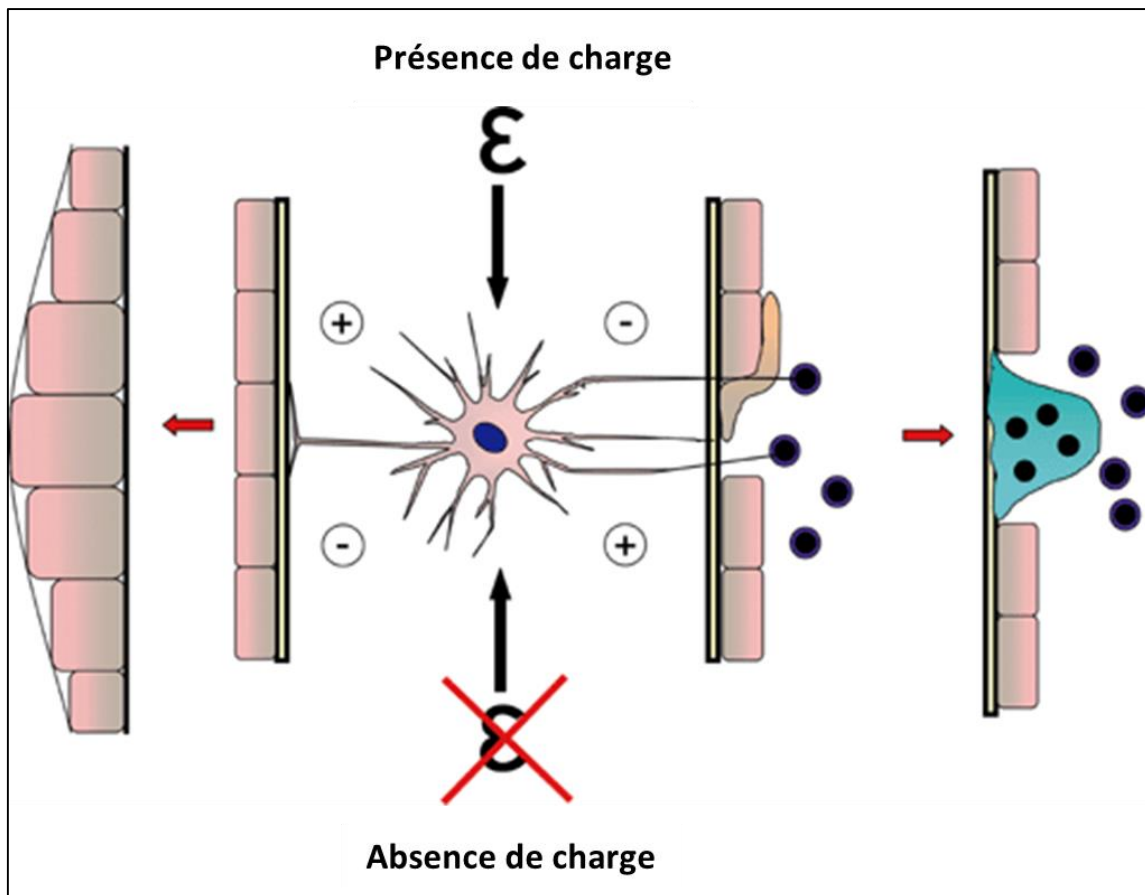
Les différents aspects fonctionnels de l'ostéocyte ont fait l'objet d'une revue récente dans la littérature. En effet, selon les auteurs, les ostéocytes peuvent remplir des fonctions primaires directes et indirectes [93]. Leurs fonctions primaires directes portent sur leur capacité à remodeler (éliminer et remplacer) leur matrice péri-lacunaire et péri-canaliculaire, et leur capacité sensorielle (mécanodétection) faisant d'elles des cellules osseuses mécanosensibles [93]. Les fonctions indirectes des ostéocytes se basent sur leur capacité à réguler l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes et également leur capacité à communiquer avec des organes distants et à les réguler. Cette fonction se fait par l'intermédiaire de l'ostéocalcine, un facteur osseux synthétisé par l'ostéocyte et dont l'effet sur des organes distants (notamment le muscle et les reins) a été prouvé [93].



**Figure 11.** Microscopie électronique à balayage d'une coupe transversale d'un os long murin montrant l'ostéocyte et son réseau lacuno-canaliculaire. D'après [93].

Il est actuellement admis que la viabilité des ostéocytes repose sur leur sensibilité aux contraintes mécaniques. En effet, il a été démontré que les microdamages et le déficit ostéocytaire se produisent toujours dans les mêmes régions osseuses, donnant ainsi une information sur une relation de cause à effet entre ces deux phénomènes [94]. De plus, il a aussi été démontré, *in vitro*, que les contraintes de cisaillement appliquées aux ostéocytes par la circulation d'un fluide ont pu les maintenir en vie tout en exprimant des gènes anti-apoptotiques [95]. Cela explique donc, *in vivo*, l'importance de contraintes engendrées par l'écoulement du fluide osseux canaliculaire (ou le liquide interstitiel) pour la viabilité ostéocytaire [13].

La capacité des ostéocytes à détecter et à répondre aux stimulus mécaniques dépend de plusieurs facteurs notamment leurs corps cellulaires et leurs processus dendritiques [12]. Une fois qu'ils ont perçu les signaux de charge et des contraintes mécaniques, les ostéocytes donnent des réponses sous forme de signaux biochimiques destinés aux cellules de la surface afin de réguler leur fonctionnement. Nous parlons de la communication cellulaire ou de la mécanotransduction ostéocytaire (Figure 12) [12]. Les signaux biochimiques envoyés par les ostéocytes sont des signaux anabolisant osseux : l'oxyde nitrique (NO), les prostaglandines, la voie Wnt/béta-caténine et d'autres petites molécules comme l'ATP [96–99].



**Figure 12.** *Processus de mécanotransduction ostéocytaire. En présence d'une charge normale, l'ostéocyte envoie des signaux aux cellules de revêtement osseux qui peuvent se différencier en ostéoblaste. En absence de charge, l'ostéocyte envoie des signaux activant les ostéoclastes et la résorption osseuse. Modifié d'après [12].*

Avec le vieillissement, une réduction de la taille et du nombre des ostéocytes et leurs lacunes a été rapportée [100]. Cela entraîne une modification de la mécanotransduction, des réponses réduites suite charges mécaniques, et en conséquence une altération du maintien de la masse et l'architecture osseuse [100]. La viabilité et la densité ostéocytaire jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité osseuses. Le blocage de leur apoptose peut améliorer la perte osseuse liée au vieillissement ou à la corticothérapie [90]. Néanmoins, l'apoptose des ostéocytes est importante pour la réparation des dommages et le remplacement normal du squelette. Ces fonctions sont assurées par l'activité de résorption ostéoclastique. En effet, après l'apoptose des ostéocytes, les cellules de la surface osseuse perçoivent un message d'activation des ostéoclastes et donc de activité de résorption osseuse [101].

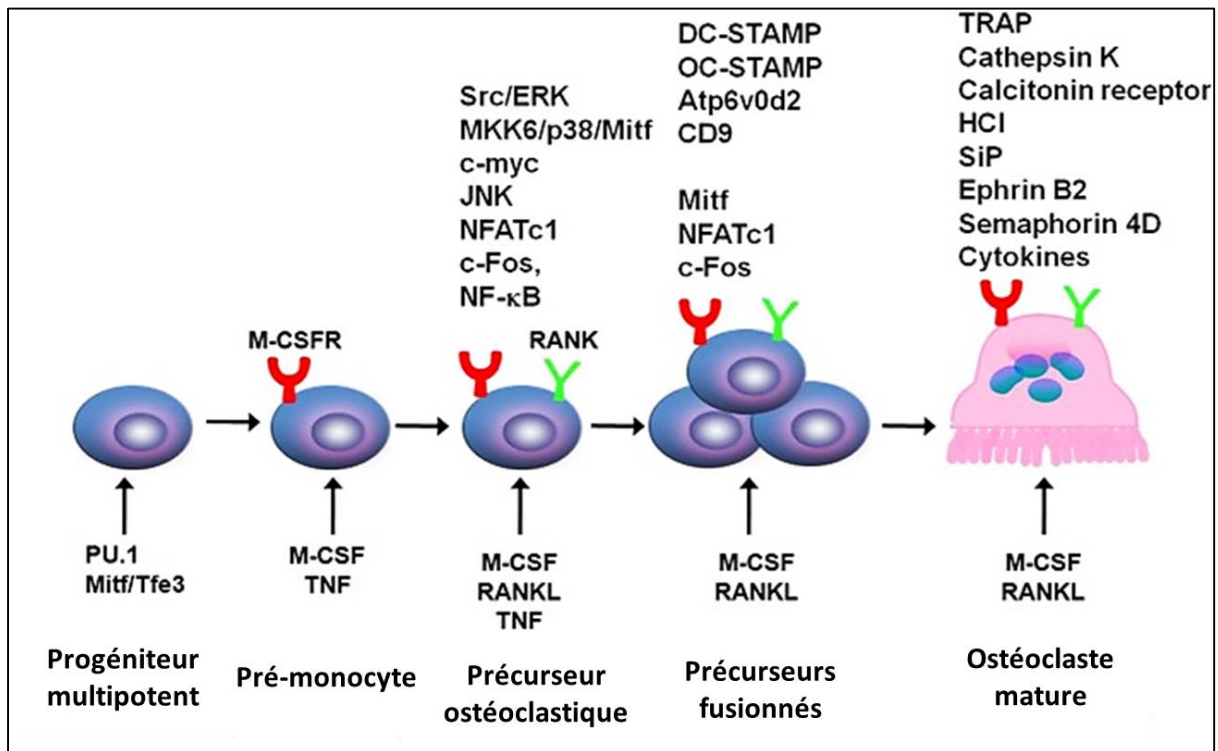
### c. Les ostéoclastes

L'ostéoclaste est la seule cellule participant à la résorption osseuse. C'est une cellule géante hautement spécialisée dont la fonction principale est le contrôle de l'homéostasie du calcium [102]. Longtemps les ostéoclastes ont été considérés comme issus d'une différenciation ostéoblastique et ce n'est qu'à partir des années soixante-dix qu'il est devenu clair que les ostéoclastes n'étaient des cellules osseuses, mais plutôt des cellules circulantes [82]. Les ostéoclastes sont donc des cellules multi-nucléaires d'origine hématopoïétique, dérivées des cellules de la lignée des monocytes/macrophages issues de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques [82]. Ils sont principalement formés par fusion de cellules précurseurs mononucléaires circulants qui se différencient au niveau ou à proximité de la surface osseuse [103]. Le nombre de noyaux dans un ostéoclaste varie selon les situations physiologiques et pathologiques et selon également les espèces. Ce nombre est généralement estimé à entre 20 et 100 noyaux par cellule [104]. Il est admis que plus le nombre de noyaux dans les ostéoclastes est élevé, plus importante sera l'activité de résorption [105]. Cependant, les mécanismes régulant le nombre de noyaux dans les ostéoclastes restent inconnus [104].

Dans les conditions normales et physiologiques, les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes de la formation osseuse. Le déséquilibre de cette homéostasie osseuse engendre des maladies du métabolisme osseux comme l'ostéoporose [106]. Plusieurs cytokines et de nombreux facteurs agissent sur ces activités cellulaires. De plus, la communication directe de type cellule-cellule entre les ostéoblastes et les ostéoclastes, est bien évidente, et rentre en jeu pour la régulation de leurs activités [107]. Ainsi, les ostéoblastes agissent sur la régulation de la formation des ostéoclastes et vice versa [108]. Le contact ou bien la communication entre ces deux cellules est généralement assurée par des petites jonctions lacunaires mais surtout par un ensemble de facteurs sécrétés par les ostéoblastes et qui initient l'ostéoclastogenèse [108].

L'ostéoclastogenèse (la différenciation des ostéoclastes) est donc principalement assurée par les ostéoblastes, et ce via deux mécanismes majeurs [108,109]. Premièrement, les ostéoblastes produisent le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) essentiel à la différenciation des ostéoclastes. Dans un second temps, les ostéoblastes sécrètent le ligand du récepteur activateur du NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire kappa B) (RANKL), qui interagit avec son récepteur RANK exprimé par les précurseurs des ostéoclastes, qui se différencient en ostéoclaste mature en présence du M-CSF [108,109]. RANKL n'est pas

uniquement exprimé par les ostéoblastes mais aussi par de nombreux types cellulaires, notamment les chondrocytes hypertrophiques essentiellement lors du processus de l'ossification endochondrale [110].

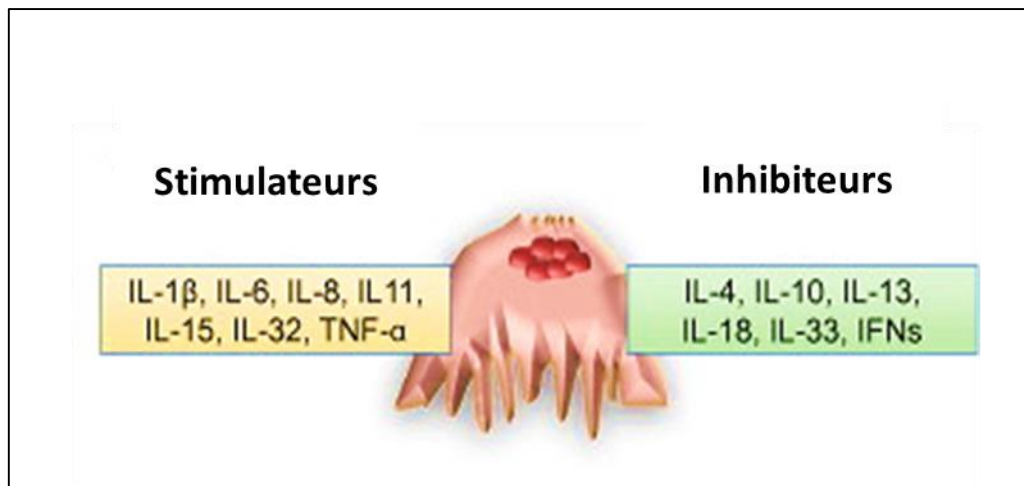


**Figure 13.** Les différentes étapes de différenciation ostéoclastique et leurs différents facteurs. Modifié d'après [110].

L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur leurre du RANKL principalement libéré par les ostéoblastes [111]. Cette protéine a pour but principale d'empêcher la résorption ostéoclastique en inhibant l'interaction entre le récepteur ostéoclastique RANK et son ligand (RANKL). L'OPG est un puissant inhibiteur de l'ostéoclastogenèse, en conséquence, il joue un rôle important dans l'amélioration et le maintien de la masse osseuse. En plus de l'OPG, d'autres cytokines inhibent l'activité des ostéoclastes, et d'autres la favorisent (Figure 14) [112].

Le système RANKL/RANK/OPG est le régulateur clé de la perte de masse osseuse vu qu'il représente la voie cruciale de l'induction, de l'activation, de la différenciation et de la survie des cellules résorbatrices de l'os : les ostéoclastes [109,113].





**Figure 14.** Cytokines stimulatrices et inhibitrices de l'activité ostéoclastique. Modifié d'après [112].

#### d. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes ou également appelées cellules de revêtement osseux sont des cellules aplaties ayant des noyaux plats ou légèrement ovoïdes et qui recouvrent les surfaces osseuses inactives, c'est à dire qui ne subissent pas de remodelage [114]. Ces cellules sont des cellules descendantes des ostéoblastes, comme précédemment mentionné, la transformation des ostéoblastes en cellules bordantes est l'un des destins des ostéoblastes ayant achevés leur fonction de formation osseuse [88,115]. En revanche, les cellules bordantes gardent la capacité à se différencier en cellules ostéogéniques et peuvent toujours représenter une véritable source de précurseurs des ostéoblastes [114]. Il est suggéré que les cellules bordantes participent à l'initiation du processus du remodelage. En effet, il a été proposé que le signal responsable d'initier la résorption osseuse, et par conséquent le cycle du remodelage, dépend de ces cellules de surface osseuse, qui reçoivent l'instruction initiale par les ostéocytes [116]. Il semble également que ces cellules de revêtement osseux sont importantes pour le maintien du fluide interstitiel dans les compartiments osseux, jouant ainsi un rôle important non-négligeable dans l'homéostasie minérale osseuse [88,114].

## **4. Propriétés et fonctions du tissu osseux**

### **4.1. Propriétés du tissu osseux**

Comme précédemment mentionné, le tissu osseux est biologiquement formé d'une partie organique (des fibres de collagène principalement) et d'une partie minérale. Les propriétés de l'os qui assurent sa fonction mécanique y compris l'élasticité et la rigidité dépendent soit de la phase organique de l'os soit de la phase minérale : les fibrilles de collagène assurent la résistance à la force de traction et de torsion, le contenu minéral assure l'élasticité contre les forces de compression [61,117]. Les propriétés mécaniques de l'os se mesurent et s'évaluent par différents tests expérimentaux qui fournissent des données quantitatives et qualitatives sur la force et la résistance osseuse. Ces différents tests comprennent des tests de torsion, flexion, traction et de compression. Ceux-ci doivent impérativement être choisis selon la source de l'os (humain ou animal) et selon sa nature (corticale ou trabéculaire). Ils peuvent ainsi être combinés avec les données sur la DMO et les données de géométrie osseuse afin de fournir une information complète sur l'état osseux [118].

### **4.2. Fonctions du tissu osseux**

Le système squelettique humain assure trois fonctions principales : une fonction mécanique, l'hématopoïèse et une fonction métabolique [44] :

- Pour la fonction mécanique, l'os représente un cadre mécanique et un point d'attache et d'insertion pour les autres tissus mous (muscle, tendons et ligaments), ce qui permet en conséquence la locomotion et le mouvement. De plus, le squelette représente également une barrière de protection mécanique contre les traumatismes pour les organes vitaux de l'organisme humain (cerveau, poumons, cœur etc.).
- Pour la fonction hématopoïétique, la moelle osseuse couvrant les parties trabéculaires des os est considérée la seule source des cellules hématopoïétiques (globules rouges, globules blancs et les plaquettes sanguines).
- Pour la fonction métabolique, le squelette humain représente une véritable réserve de plusieurs minéraux comme le calcium, le phosphore et le fer.

En plus de ces fonctions de bases du système osseux, des fonctions endocriniennes osseuses peuvent affecter d'autres organes distants [119]. Par exemple, il a été démontré que l'ostéocalcine d'origine ostéoblastique est transportée par la circulation sanguine et agit sur

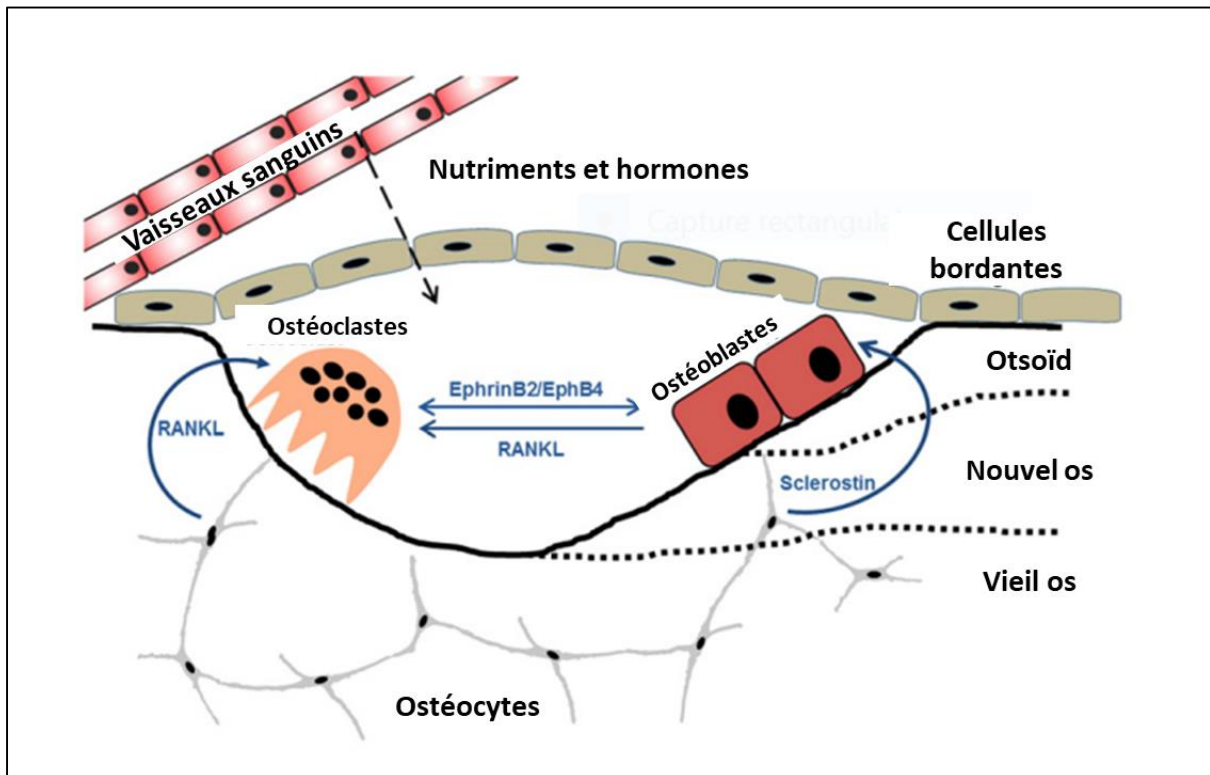
d'autres organes notamment le pancréas (où elle améliore la sécrétion et la sensibilité de l'insuline), le tissu adipeux, les testicules (où elle peut augmenter la fertilité) et le système nerveux (où elle améliore les capacités d'apprentissage et de mémoire) [84,120–122]. L'ostéocyte, la cellule osseuse dominante, possède également une fonction endocrinienne dans la littérature. Il est suggéré que cette cellule est capable de réguler le métabolisme des phosphates en agissant entre autres les glandes parathyroïdes et les reins [123,124].

## **5. Remodelage osseux**

Étant donné que le tissu osseux est un organe vivant et actif, il subit un remodelage constant tout au long de la vie. Le remodelage osseux se définit comme étant un renouvellement du tissu osseux minéralisé via l'élimination de l'ancien tissu par les ostéoclastes (résorption osseuse) et la fabrication d'un nouveau par les ostéoblastes (formation osseuse). Les ostéocytes jouent un rôle important dans la régulation de ce processus en augmentant la sécrétion et la libération des facteurs ostéoblastogéniques et ostéoclastogéniques [125]. L'interaction entre les différents types cellulaires est indispensable pour harmoniser les différentes étapes du remodelage osseux. En effet, dans un équilibre homéostatique, le couplage entre les deux activités cellulaires de résorption et de formation régule le processus du remodelage osseux. Celui-ci a pour but le maintien et la restauration de l'intégrité osseuse tout en assurant les fonctions des tissus osseux, comme le soutien du corps et le stockage des minéraux, et en compensant les défauts tels que les microfissures [125,126]. Ce processus physiologique permet également au tissu osseux d'adapter sa structure par rapport à l'environnement et les modifications mécaniques, diminuant ainsi le risque de fracture [127].

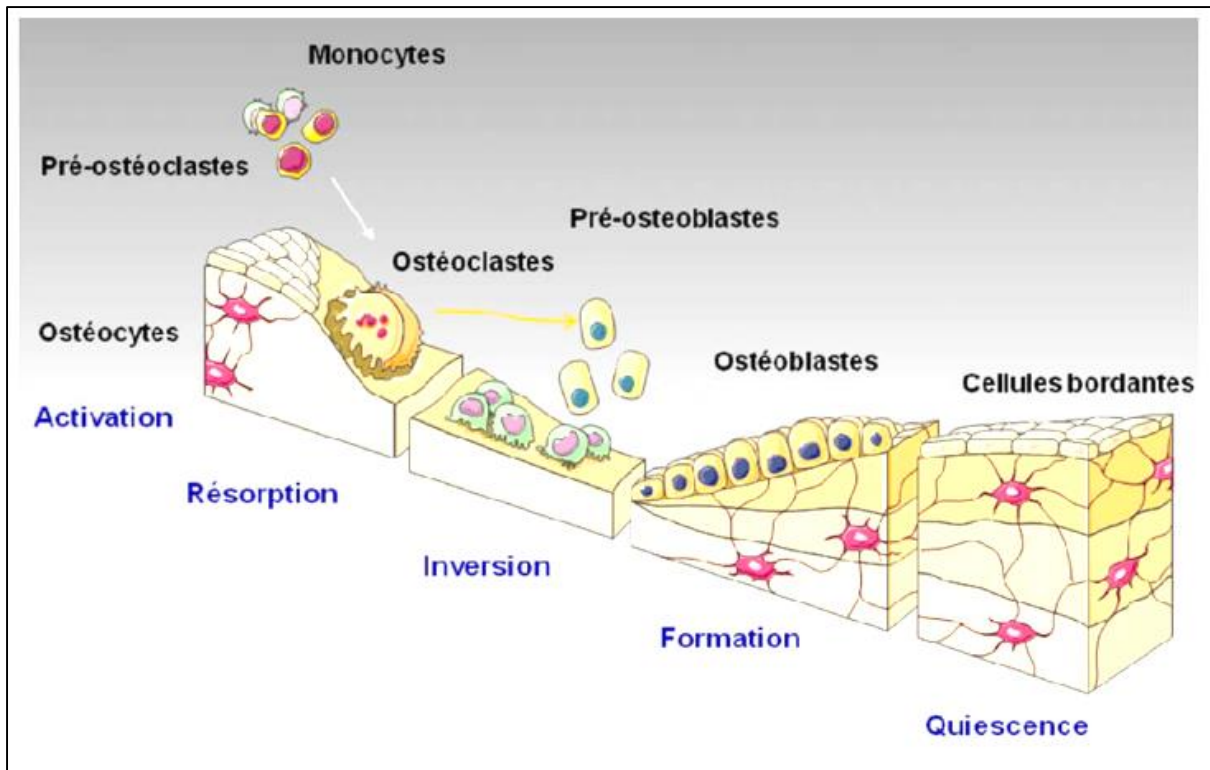
Sur le plan anatomique, le processus du remodelage osseux se déroule au sein d'une composante dite unité multicellulaire de base. Cette unité élémentaire développée par Frost en 1990 [128] est composée des ostéoclastes qui résorbant l'os, des ostéoblastes remplaçant l'os, des ostéocytes imprégnés dans la matrice osseuse, des cellules bordantes et d'un apport sanguin capillaire irriguant le site anatomique (Figure 15) [85]. L'unité multicellulaire de base possède une durée de vie beaucoup plus longue que celle des ostéoclastes et des ostéoblastes qu'elle contient, ce qui nécessite un réapprovisionnement constant de ces cellules pour la continuité de son fonctionnement [129]. La structure de cette unité varie en fonction du site où elle se trouve : au niveau de l'os trabéculaire, elle se situe à la surface formant une lacune

résorbée et ensuite comblée. Alors que dans l'os cortical, elle forme un cône dans le cortex au niveau de l'os endommagé et à éliminer [129].



**Figure 15.** L'unité multicellulaire de base du remodelage osseux. Modifié d'après [85].

Le remodelage osseux se déroule en plusieurs séquences consécutives lors d'un seul cycle, qui se répètent sur plusieurs cycles pour assurer la continuité du processus dans le temps [130]. Ce phénomène physiologique commence par une phase d'activation, et se déroule en quatre différentes phases : la résorption, l'inversion, la formation et la quiescence (Figure 16) [130], et ce sur une durée d'environ de 200 jours [131].



**Figure 16.** Les différentes étapes du remodelage osseux. D'après [130].

### ○ Phase d'activation

Le remodelage osseux commence par une phase d'activation ou également appelée phase d'initiation. Les précurseurs ostéoclastiques sont recrutés et se différencient ensuite en ostéoclastes matures responsables d'une résorption initiale. Cette première étape est extrêmement importante dans le processus du remodelage du fait d'elle garantir qu'elle n'aura lieu que lorsque cela s'avère nécessaire (lors d'un dommage osseux par exemple) [129,130]. La différenciation des ostéoclastes est principalement assurée par le système RANKL/RANK/OPG médié par les ostéoblastes en présence du M-CSF [132]. De plus, d'autres facteurs et hormones systémiques favorisant l'activation du remodelage et la résorption osseuse : des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ), la PTH et les prostaglandines [133]. Cette première phase se termine par la différenciation complète des ostéoclastes, l'acteur majeur de la deuxième phase du remodelage.

### ○ Phase de résorption

Un fois que les ostéoclastes sont différenciés et qui deviennent matures, ils adhèrent à la surface osseuse en exprimant des enzymes de lyse qui dégradent la matrice osseuse (la

phosphatase acide tartrate-résistante par exemple) [134]. La phase de résorption se termine par la mort des ostéoclastes par apoptose garantissant qu'aucun excès de résorption ne se produit [129].

- **Phase d'inversion**

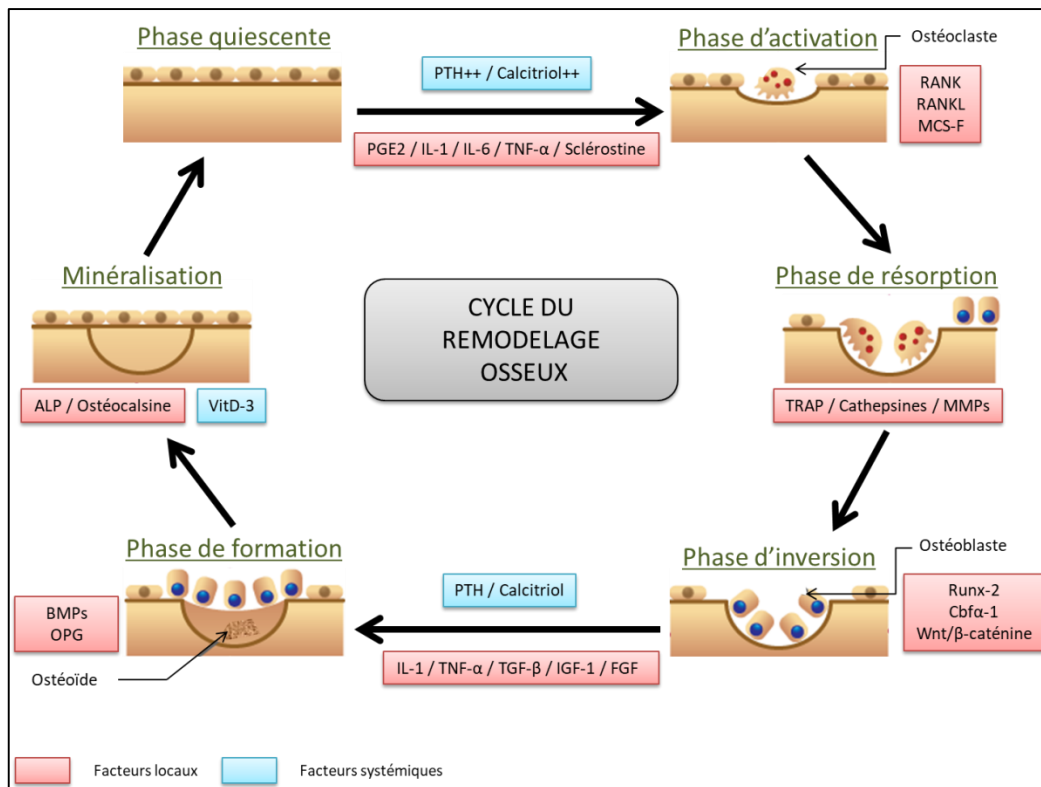
Comme son nom l'indique, la phase d'inversion consiste à un renversement des activités cellulaires. L'activité de résorption ostéoclastique est donc remplacée par l'activité de formation ostéoblastique. Cette phase qui dure environ quatre à cinq semaines reste encore mal comprise [129]. Cette phase assure le couplage des activités de résorption et de formation [135]. A la fin de celle-ci, les précurseurs ostéoblastiques sont recrutés. Ces précurseurs se différencient ensuite en ostéoblastes matures, responsables de la formation osseuse, sous l'action de plusieurs mécanismes notamment la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [130] et de plusieurs facteurs locaux et systémiques (Runx2, TGF- $\beta$ , IGF-1, FGF etc.) [133].

- **Phase de formation**

La phase de formation osseuse dure en moyenne trois à quatre mois, représentant ainsi la phase la plus longue du cycle de remodelage. C'est une phase très importante lors du processus du remodelage osseux car elle représente le moment où les ostéoblastes vont synthétiser la matrice afin de combler les lacunes de résorption. Dans un premier temps, ces cellules formatrices synthétisent et sécrètent la matrice riche en collagène de type 1, ensuite elles assurent la minéralisation de la nouvelle matrice formée [130]. En plus des facteurs ostéoblastogénèses, d'autres facteurs d'ordre systémiques participent à la régulation des activités cellulaires lors de cette étape (BMP, IGF-1, FGF-2, vitamine D, Runx2, TGF- $\beta$  etc.) [133].

- **Phase de quiescence**

La dernière phase du processus du remodelage osseux est la phase de quiescence ou dite de résiliation. Une fois la formation de la nouvelle matrice par les ostéoblastes est terminée, celles-ci meurent par apoptose, ou se transforment en cellules bordante, ou bien se différencient en ostéocytes enfermées dans la matrice néoformée [133]. Les ostéocytes prennent action et sécrètent des antagonistes de l'ostéogénèse (la sclérostine en particulier) finalisant ainsi la formation osseuse et le cycle du remodelage [90,133].



**Figure 17.** Cycle de remodelage osseux avec les différents facteurs locaux et systémiques intervenants dans chaque phase.

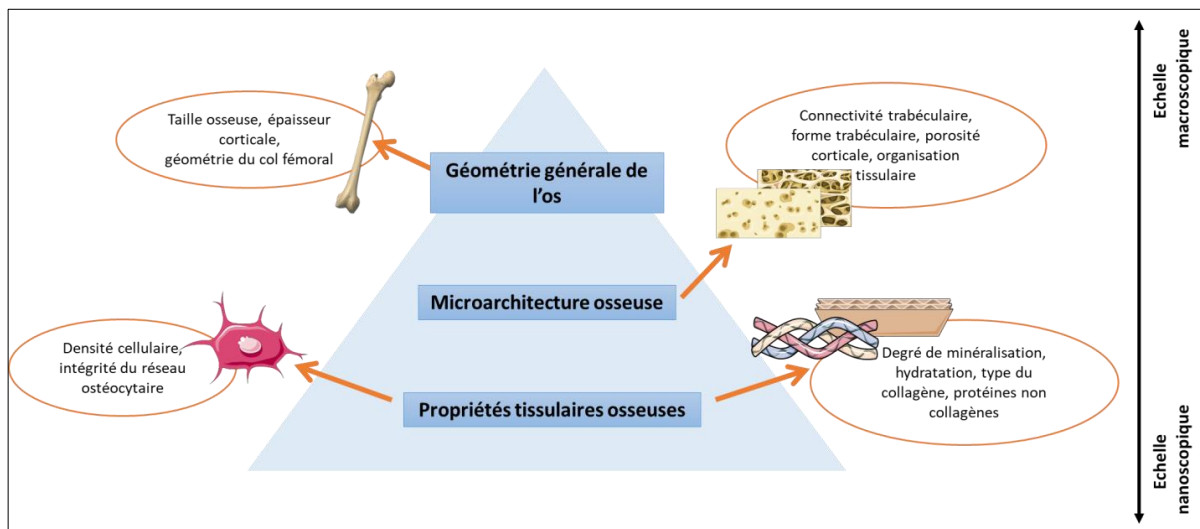
Le tissu osseux subit, en plus du remodelage, un autre processus : le modelage. La modélisation (ou modelage osseux) est le processus permettant aux os de modifier leur forme générale en réponse à des facteurs physiologiques et aux contraintes mécaniques, dans le but d'ajuster progressivement le squelette aux forces qui lui sont imposées et de prévenir le risque de fracture [64]. Contrairement au remodelage osseux, la résorption et la formation osseuses ne sont pas étroitement couplées lors du modelage du squelette [136]. De plus, ce processus du modelage est beaucoup moins fréquent que le remodelage chez un individu adulte. Cependant, il peut être augmenté ou accéléré lors de certaines anomalies comme l'hypoparathyroïdie et les maladies rénales [136,137].

## 6. La qualité du tissu osseux

La résistance du tissu osseux se définit par la quantité maximale des charges mécaniques tolérées par le l'os avant la survenue d'une défaillance structurelle. Il s'agit généralement des microfissures et des déformations qui se développent lorsque la capacité à supporter les charges mécaniques atteint une limite critique [138]. Pendant longtemps, la DMO était le seul

paramètre permettant d'évaluer la résistance osseuse et les maladies qui lui sont relatives (comme l'ostéoporose) et de prédire le risque de fracture. Cependant, des fractures de fragilité osseuse survenaient même chez des populations présentant des valeurs normales de DMO [139]. A partir de ces observations, il s'est avéré nécessaire d'analyser d'autres paramètres : la résistance, la force et la qualité osseuse. En 2014, Fonseca et *al.*, ont présenté une nouvelle conception sur les différents paramètres à prendre en ligne de compte dans l'évaluation de la qualité du tissu osseux [17]. Selon ces auteurs, la qualité osseuse est déterminée non seulement par les valeurs de la DMO, mais aussi par un ensemble de paramètres osseux à différentes échelles (macroscopique, microscopique et nanoscopique) qui influence les propriétés mécaniques de l'os et sa qualité globale [17].

A l'échelle macroscopique, il s'agit de la morphologie et la géométrie de l'os entier comprenant la taille des os et l'épaisseur corticale. Sur le plan micro-architectural, la qualité du tissu osseuse est spécialement basée sur la forme des trabécules, leur connectivité, leur organisation tissulaire et sur la porosité corticale. Finalement, au niveau nanoscopique, les propriétés tissulaires sont liées entre autres la densité cellulaire, le degré de minéralisation et l'orientation des fibres de collagène [17].



**Figure 18.** Les paramètres multi-échelles déterminant la qualité du tissu osseux. Modifié d'après [17].



## Chapitre II : Tissu osseux et vascularisation

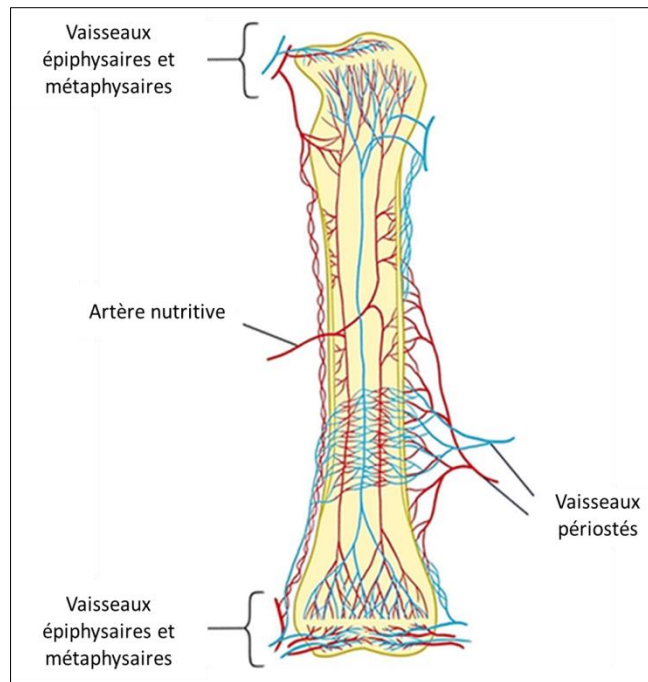
### 1. Approvisionnement vasculaire osseux

L'os est un tissu très vascularisé pour fournir l'oxygène ( $O_2$ ), les cellules immunitaires et les nutriments nécessaires, et pour éliminer le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) et les déchets métaboliques de ce tissu actif [140]. Les reçoivent entre 10 à 15% du débit cardiaque au repos [141], ce pourcentage est donc susceptible d'être augmenté à l'effort. Le rôle majeur de cet apport vasculaire est le transport des nutriments et d' $O_2$ . En absence de cet apport, le transport se fait par diffusion sur des courtes distances. Ce mécanisme caractérise généralement les tissus à faible activité métabolique, comme le cartilage à titre d'exemple [142]. En plus des fonctions de base du système vasculaire au niveau osseux, le réseau vasculaire osseux assure d'autres fonctions importantes qui vont du développement osseux au remodelage et à la réparation osseuse [142]. De plus, les cellules endothéliales qui couvrent la couche la plus interne des parois vasculaires possèdent des capacités importantes de signalisation, contrôlant ainsi la croissance, la structuration, le développement et la régénération osseuse [143].

On distingue le processus de vasculogénèse ou la vascularisation simple qui fait référence à la formation initiale des vaisseaux sanguins lors de la vie embryonnaire, et le processus d'angiogénèse qui représente la formation des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants [142,143].

Selon une revue récente portant sur la vascularisation osseuse, la présence d'un réseau vasculaire a été démontré la première fois au 17<sup>ème</sup> siècle, pour ensuite être décrit plus en détail lors du 20<sup>ème</sup> siècle [144]. C'est donc à cette époque qu'a été mis en évidence le sens centrifuge de l'écoulement du sang dans le cortex osseux des os longs [145].

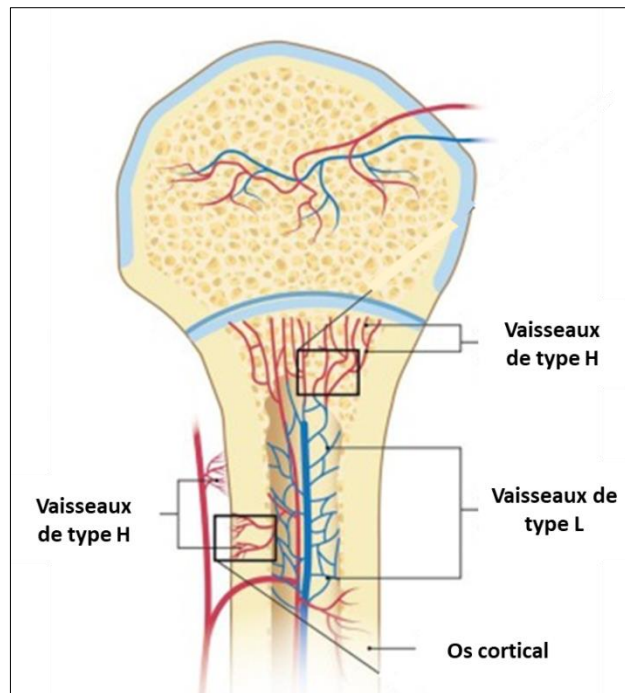
Au niveau macroscopique, les os longs sont irrigués par un apport sanguin de plusieurs sources, principalement l'artère nutritive centrale, les artères métaphyso-épiphysaires et les artères périostées. Le retour sanguin est effectué par une grande veine centrale [143,144,146].



**Figure 19.** Le réseau vasculaire des os longs. Modifié d'après [144].

Au niveau microscopique, les vaisseaux sanguins des os longs logent les canaux de Havers et de Volkmann au niveau de l'os cortical, et traversent les trabécules de l'os trabéculaire [147]. Généralement, après avoir pénétré dans l'os, les artères se ramifient en artérioles et finalement en capillaires. On distingue entre les capillaires de type H et les capillaires de type L, qui sont connectés entre eux et qui drainent le sang des veines plus petites vers la grande veine centrale [148].

Les microvaisseaux de type H sont localisés dans les régions métaphysaires des os longs, ils expriment des niveaux élevés de marqueurs de vaisseaux sanguins: l'endomucine (Emcn) et le CD31 (ou Pecam1) [21,148,149], et ont la capacité d'induire la formation osseuse [150]. Les vaisseaux de type L possèdent une expression très faible de ces marqueurs. Ils se diffèrent des vaisseaux de type H également par leurs localisation située au niveau de la diaphyse et la cavité médullaire des os longs [21,148,149].



**Figure 20.** Les micro-vaisseaux de type H et de type L et leur localisation au niveau des os longs. Modifié d'après [150].

## 2. Couplage angiogénèse-ostéogénèse

La formation osseuse (ostéogénèse) et la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) sont deux processus qui se produisent simultanément. Elles suivent l'une des deux voies d'ossification osseuse (endochondrale et intramembraneuse) selon le site anatomique [143], on parle du couplage angiogénèse-ostéogénèse. L'angiogénèse est médiée par la production de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par les chondrocytes hypertrophiques et cellules mésenchymateuses en différenciation [151].

Le couplage angiogénèse-ostéogénèse est principalement basé sur les interactions entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales vasculaires et demeure indispensable pour la continuité du processus du remodelage, notamment dans le contexte de réparation osseuse [152].

De nombreux facteurs sont impliqués dans ce couplage angiogénèse-ostéogénèse, mais, à ce jour, seuls quelques-uns d'entre eux ont été étudiés. Les principaux facteurs analysés dans la littérature sont : le VEGF, le HIF-1, l'eNOS, les FGF, les BMP, les MMP et les ligands de Notch.

VEGF : les facteurs les plus étudiés sont les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires VEGF. Ils sont des régulateurs majeurs de l'angiogenèse et agissent dans la prolifération, la migration et l'activation des cellules endothéliales [153,154]. En raison du couplage angiogenèse-ostéogenèse, les VEGF influencent également le développement du squelette et la réparation osseuse postnatale. La sécrétion de VEGF est essentielle pour le couplage de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse. Le VEGF existe sous différents sous-types (VEGF-A, VEGF-B... etc). Le VEGF (en particulier le VEGF-A) agit comme une molécule chimiotactique, attirant les cellules endothéliales vers un tissu osseux et contrôlant directement la différenciation et les fonctions des ostéoblastes et des ostéoclastes, participant au remodelage osseux [155].

HIF-1 $\alpha$  : le facteur 1 inductible par l'hypoxie (HIF-1) améliore la réponse cellulaire à l'hypoxie due à une réduction des niveaux d'oxygène dans les tissus dans des conditions comme la pratique physique. Les HIF constituent un régulateur transcriptionnel, qui soutient la néo-angiogenèse [156] et régule l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [157]. HIF-1 $\alpha$  joue un rôle important dans le couplage de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse, en particulier dans la guérison et le développement du squelette [158].

eNOS : ce sont des facteurs activés par un déficit en oxygène. L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre qui régule la fonction des cellules osseuses. L'isoforme endothéliale de l'oxyde nitrique synthase (eNOS) est exprimée de manière constitutive dans l'os, et y améliore l'angiogenèse et l'apport sanguin facilitant ainsi l'ostéogenèse, au niveau des sites ostéoporotiques [159]. L'isoforme eNOS semble jouer un rôle clé dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et de la formation osseuse [160].

FGF : les facteurs de croissance des fibroblastes sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires dans divers organes, y compris les os. Concernant la vascularisation osseuse, le FGF-2 joue un rôle important dans la vascularisation osseuse, en particulier lors de la cicatrisation des défauts osseux et donc dans les processus de réparation osseuse [161].

BMP : les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) constituent la plus grande sous-division de la famille des ligands du facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Ils initient une cascade biologique qui implique plusieurs types de cellules et événements de signalisation dans la production de tissu osseux fonctionnel [162]. Par exemple, ils initient la

différenciation ostéoblastique [163]. La signalisation BMP est centrale dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins [164].

MMP : les métalloprotéines matricielles (MMP) interviennent dans divers processus physiologiques y compris la différenciation ostéoblastique/ostéocytaire, la formation osseuse, le recrutement et la migration des ostéoclastes, l'angiogenèse, et comme facteur de couplage dans le remodelage osseux dans des conditions physiologiques [165].

Notch : la voie de signalisation Notch contribue à réguler les interactions cellule-cellule. Dans le tissu osseux, l'activation de la signalisation Notch entraîne une amélioration de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse [20].

### **3. Vascularisation et réparation osseuse**

Peu d'études ont porté sur l'impact et l'importance de la vascularisation dans la réparation osseuse. Les fractures sont les lésions traumatiques osseuses les plus courantes chez l'homme [36]. La guérison des fractures osseuses est un processus complexe en plusieurs étapes. Il commence par la formation d'un hématome autour de la région fracturée de l'os et implique des cellules inflammatoires sécrétant des cytokines pour former un caillot fibrineux [35]. Au début du cal, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en chondrocytes, qui favorisent davantage la vascularisation et la formation osseuse par la sécrétion de plusieurs protéines (BMP, MMP-13, phosphatase alcaline, VEGF et facteur de croissance placentaire). La formation d'un réseau vasculaire est donc essentielle pour une bonne formation osseuse et une restauration osseuse fonctionnelle [144]. Les chondrocytes du cal libèrent également des facteurs anti-angiogéniques, qui limitent la croissance des vaisseaux sanguins [166].

Quand la circulation sanguine est altérée, la cicatrisation et la réparation osseuses peuvent être retardées [167]. En effet, il est admis que la présence de vaisseaux sanguins est indispensable pour une régénération osseuse réussie [168]. Le manque d'approvisionnement en sang induit une hypoxie locale, qui peut être entretenue par une inflammation ultérieure [169]. Cette hypoxie induite par un traumatisme amène les cellules endothéliales (CE) à réguler positivement les protéines morphogéniques osseuses (BMP) pour favoriser l'ostéogenèse [170,171]. La voie du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF)- $\alpha$ , activée dans l'hypoxie, est considérée comme un mécanisme clé pour coupler la croissance osseuse à l'angiogenèse via une expression accrue du VEGF, le principal facteur de croissance

vasculaire exprimé par les ostéoblastes hypoxiques [140]. Chez la souris, où HIF $\alpha$  est surexprimé, les os sont fortement vascularisés [172].

Le VEGF stimule la repousse des vaisseaux sanguins dans le site de la blessure, de sorte que les niveaux d'oxygène et de nutriments reviennent à des valeurs normales [140]. Le schéma général de cicatrisation osseuse consiste en un recrutement des ostéoclastes en phase hypoxique précoce, tandis que la revascularisation favorise progressivement la fonction ostéoblastique (prolifération, différenciation et formation osseuse). Les précurseurs ostéoblastiques pourraient également se déplacer dans les os fracturés en même temps que l'invasion des vaisseaux sanguins [35].

Comme pour le développement osseux embryonnaire, les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) sont également nécessaires à la réparation osseuse. Kigami et *al.*, (2013) ont montré que le FGF-2 augmentait l'angiogenèse dans les défauts osseux de taille critique du crâne de rat [35]. Il est également admis le rôle central joué par la voie de signalisation Notch dans la cicatrisation osseuse et la régulation du flux sanguin osseux [170,173].

# Chapitre III : Activité physique, qualité osseuse et vascularisation osseuse

## 1. Généralités sur l'activité physique

Comme pour le muscle squelettique, l'os nécessite une stimulation par l'activité physique pour assurer sa solidité et son renforcement. En effet, sa modélisation et son remodelage sont affectés par les contraintes mécaniques qu'il subit [177].

L'exercice physique est un exemple concret de contrainte appliqué à l'os. En effet l'exercice physique provoque des contraintes mécaniques affectant directement l'os et ce via l'impact au sol, la torsion et la traction des tendons [11]. Selon Wolff (1886), L'activité physique entraîne des modifications provoquant une résorption ou un anabolisme osseux, modifiant ainsi l'architecture interne et la morphologie externe de l'os [8,178].

Dans la littérature, on distingue généralement entre deux types fondamentaux d'activité physique : les exercices d'endurance (ou exercices aérobies, comme la marche, la montée des escaliers, la course... etc.), et les exercices de force et de résistance. Les exercices de résistance peuvent être effectués avec une charge (musculature) ou sans charge (natation) [179,180]. Il existe par ailleurs d'autres types d'exercice physique comme les exercices d'équilibre et d'étirement [181].

De ces différents types d'exercice physique sortent des modalités très variées en fonction de type, de la fréquence et de l'intensité de l'exercice effectué. Les effets de ces modalités sur le statut osseux et la vascularisation osseuse restent à l'heure actuelle mal connus. Aucun consensus concernant un protocole d'exercice physique ostéogénique n'est établi aujourd'hui. Les effets de différentes modalités d'exercice physique sur les différents paramètres de qualité et de vascularisation osseuses sont détaillés dans la suite de cette revue bibliographique.

## 2. Effet de l'exercice physique sur le tissu osseux

### 2.1. Effet des différentes modalités

Les effets des différents types et modalités d'exercice physique sur le patrimoine osseux sont variables dans la littérature. Une revue récente a synthétisé ces résultats, délétères et ostéogéniques, de différentes modalités d'exercice (course en roue libre, natation, exercice de

résistance, vibrations du corps entier) chez le rat sain [16]. Chez l'Homme (femmes ménopausées notamment), une revue publiée en 2014 fait le point sur les effets des exercices à impact et aérobies (natation), des exercices de résistance et les effets des vibrations du corps entier sur la fonction osseuse [182].

L'exercice par accès libre à une roue constitue une activité physique moins stressante que l'activité forcée selon des protocoles bien déterminés [183]. Il modifie positivement la DMO chez les rats sains par rapport aux témoins [183]. Ce type d'exercice améliore également les paramètres trabéculaires, l'épaisseur corticale [184], et le nombre des ostéocytes [185] par rapport aux rats sédentaires en bonne santé.

La natation, l'exercice aérobique sans impact, représente dans la littérature la modalité avec le plus des effets délétères sur la DMO et les paramètres trabéculaires chez le rat [16]. Néanmoins, avec des protocoles beaucoup plus longs et des durées de pratique plus prolongées, cet exercice peut entraîner une amélioration de la DMO chez le rat [186] et chez l'Homme [182]. Dès lors, la nage de longue durée peut faire partie d'un protocole d'amélioration de la DMO notamment chez les femmes ménopausées [182].

Quant aux exercices à fort impact ou bien de résistance (les sauts notamment), ils semblent être plus ostéogéniques que les exercices à impact modéré (la course) [187]. Ils améliorent la DMO, la microarchitecture trabéculaire et les propriétés biomécaniques de l'os (la résistance osseuse) [188,189]. Chez l'Homme, bien que les exercices d'impact et de résistance soient reconnus comme bénéfiques pour la stimulation du tissu osseux, des variables telles que la force musculaire, le type de contraction musculaire, la durée et l'intensité des exercices sont déterminants pour un effet positif sur le métabolisme osseux [182].

Les vibrations du corps entier ne présentent pas d'effets chez le rat [190], voire des effets délétères pour les paramètres trabéculaires et la résistance osseuse [191]. Cependant, chez l'Homme, ces vibrations mécaniques se sont avérées bénéfiques pour la microarchitecture osseuse et la densité osseuse et favorisent la résistance osseuse [182].

La course sur tapis roulant est la modalité la plus utilisée pour observer les effets de l'exercice physique sur le capital osseux chez le rat [16]. Elle permet en effet une meilleure modélisation au laboratoire, avec différents protocoles : intermittent, continu et combiné.



## **2.2. Effet de l'exercice sur tapis roulant**

L'exercice sur tapis roulant, le protocole d'exercice le plus utilisé, engendre des effets positifs sur l'os dans la plupart des études qui l'ont évalué (dans 67,7% des études analysées) [16]. Ce type de pratique physique se caractérise par la grande variété des protocoles qui peuvent être effectués, en modifiant les paramètres de durée, de fréquence et d'intensité [16]. Des poids supplémentaires et des inclinaisons du tapis peuvent aussi être mis en place dans le but de rendre l'exercice beaucoup plus résistant [16]. De ce fait, ce protocole d'exercice existe dans la littérature sous forme de différentes modalités avec des effets sur la qualité osseuse controversés.

La plupart des protocoles continus ont porté sur la course à intensité modérée [192–195]. Peu d'études se sont intéressées à la course dite intermittente ou par intervalles, où un temps de repos est inséré entre les périodes d'exercice [196–198]. Enfin, l'effet de course combinée (alternance entre le continu et l'intermittent) n'a jamais fait, à notre connaissance, l'objet des études dans la littérature.

Les effets des modalités, continue et intermittente, sont analysés sur l'ensemble des paramètres de qualité osseuse : propriétés biomécaniques de l'os, la microarchitecture et macroarchitecture trabéculaire et corticale et les propriétés tissulaires et cellulaires du tissu osseux.

### **a. Effet sur les propriétés biomécaniques de l'os**

Les propriétés biomécaniques de l'os sont généralement évaluées par l'intermédiaire de mesures *ex vivo* de la résistance osseuse, et ce en utilisant principalement deux types d'examen : le test de flexion et le test de compression [16].

Les études portant sur les effets des différentes modalités de course sur ces propriétés osseuses sont peu nombreuses et donnent des résultats contradictoires. Entre les études qui montrent un effet positif [194,199–201], et d'autres qui montrent un effet négatif [202,203], il semble, à ce jour, difficile de conclure sur les effets des différentes modalités d'exercice sur ces propriétés mécaniques.

En 1999, Peng et *al.*, ont montré que l'exercice de course de type continu à intensité modérée améliore la charge maximale du col fémoral et de l'humérus chez les rates ovariectomisées entraînées par rapport aux sédentaires [199]. La pratique de cet exercice sur des durées plus

longues (40 semaines) a aussi pu modifier positivement la résistance osseuse chez les rats, et ce dès la 4<sup>ème</sup> semaine de l'exercice jusqu'à la fin du protocole expérimentale (40 semaines) [201]. La course intermittente sur tapis roulant a pu également améliorer la résistance à la flexion chez les rats sains entraînés par rapport aux sédentaires après 4 semaines d'exercice seulement [194]. Une autre étude a montré que ces deux protocoles de course, continu à intensité modérée et intermittent sont bénéfiques pour l'optimisation des propriétés biomécaniques et tissulaire de l'os [200].

A l'inverse, l'exercice sur tapis roulant de type continu ne semble ne pas toujours avoir un effet sur les capacités biomécaniques de l'os [203], ou voire même un effet néfaste sur celles-ci [202].

### **b. Effet sur la densité minérale osseuse**

La densité minérale osseuse est un paramètre déterminant du statut minéral osseux. Elle se mesure par absorptiométrie biphotonique à rayons X (DEXA ou DXA), et largement utilisée pour le diagnostic de l'ostéopénie et l'ostéoporose [16]. Nombreuses sont les études qui ont examiné la DMO lors des protocoles de course sur tapis roulant, mais encore une fois, aucun consensus n'a été rapporté concernant l'effet de ces exercices. Ces effets semblent dépendre de plusieurs facteurs notamment du protocole expérimental, du sexe et de l'âge.

La course continue à intensité modérée est la modalité la plus utilisée pour l'étude des effets de l'activité physique sur la DMO. Dans l'ensemble, nous pouvons noter que cette modalité améliore la DMO. En 2003, Joo et *al.*, ont démontré qu'un protocole de course continue d'une durée de 10 semaines augmente la DMO trabéculaire et corticale au niveau du fémur [204]. Cependant, cet effet positif est particulièrement observé au niveau de la diaphyse et des métaphyses, et aucune modification n'a été enregistrée pour les épiphyses. Les effets des contraintes sur la DMO semblent donc dépendre de la localisation anatomique [204].

La durée de la pratique d'un protocole donné est un déterminant de l'efficacité de l'exercice au niveau osseux. La comparaison de deux protocoles de course continue avec des durées différentes, courte durée (30 min/jour) et longue durée (180 min/jour) pendant 8 semaines chez des rats en croissance, a montré des résultats surprenants [205]. La course de courte durée a augmenté la DMO tibiale, alors que l'exercice maintenu pendant une longue durée a engendré la diminution de la DMO chez les rats entraînés par rapport aux sédentaires [205].

Un protocole de course continue maintenu pendant une période prolongée (12 semaines) a également augmenté la DMO chez des rats jeunes adultes [206], comme chez les rats matures (âgés de 47 semaines) [207]. Une durée plus courte de ce protocole de course (6 semaines) a également entraîné des améliorations de la DMO [203].

La course continue ne montrait pas toujours un effet positif sur la DMO. De nombreuses études ne rapportent aucun changement de la DMO après des périodes importantes d'exercice [195,208,209]. D'autres études mettent en évidence une détérioration de la DMO en réponse à un exercice de course intense [205,210].

Quant à la course sur tapis roulant de type intermittent, avec une durée d'exercice de seulement 4 semaines, elle enregistre des gains de DMO de 13 mg/cm<sup>2</sup> chez des jeunes rats mâles [194], et de 5% chez des rates femelles ovariectomisées par rapport aux animaux non exercés [198]. Une étude récente a montré que l'entraînement intermittent, et avec une période d'entraînement 30% inférieure à un entraînement continu, a pu développer de plus de 20% la DMO du corps entier et du fémur chez le rat [197]. L'efficacité de la course intermittente a également montré son potentiel à prévenir la perte de la DMO dans un modèle d'arthrose chimiquement induite [196].

### **c. Effet sur la macro et la microarchitecture osseuse**

La macroarchitecture de l'os traduit sa géométrie générale (longueur, taille, dimensions). Au niveau de l'os cortical, la macroarchitecture est principalement liée à l'épaisseur corticale, un élément souvent évalué dans la littérature. De nombreuses études ont cherché à savoir si l'épaisseur corticale est modifiée ou non par la pratique physique. Dans l'ensemble, la course continue modérée sur tapis roulant ne montrait pas d'effet sur l'épaisseur corticale. Lors de l'étude de Gao et *al.*, (2017) aucune différence significative n'a été observée entre les jeunes rates femelles sédentaires et les jeunes rates femelles entraînées en continu modéré pendant 8 semaines [211]. Un protocole plus prolongé de cette modalité de course, pendant 14 semaines, n'a également pas entraîné une modification de l'épaisseur corticale chez des rats mâles en bonne santé [195]. Il est suggéré que l'effet de la course continue sur l'épaisseur corticale dépend de l'âge des animaux à entraîner. En effet, chez des souris adultes (âgés de 35 semaines) entraînés en continu modéré, une augmentation de l'épaisseur corticale et de la surface corticale a été enregistrée par rapport aux témoins adultes sédentaires, alors qu'aucune différence n'a été observée chez les souris jeunes de 8 semaines [212]. Par ailleurs, une étude

récente a montré que la course sur tapis roulant de type intermittent, quant à elle, a augmenté l'épaisseur corticale chez des rats femelles de 5% par rapport aux témoins sédentaires [213].

La microarchitecture osseuse est définie par un ensemble des paramètres déterminant la qualité de l'os trabéculaire principalement. Il s'agit entre autres du volume osseux trabéculaire (BV/TV), du nombre des trabécules (Tb.N), de l'épaisseur des trabécules (Tb.Th) et de l'espace séparant les trabécules (Tb.Sp).

Comme c'est le cas pour l'ensemble des paramètres osseux précédemment discutés, il est également jusqu'à ce jour difficile d'établir un protocole de course sur tapis roulant permettant une amélioration des paramètres structuraux et architecturaux de l'os. Il est néanmoins bien connu dans la littérature que la course de type continu a généralement des effets bénéfiques sur la structure et la microarchitecture osseuse. Ce type d'entraînement montre des adaptations de l'os trabéculaire tibial (augmentation du volume osseux trabéculaire et augmentation du nombre de travées) dès la troisième semaine d'exercice chez des jeunes rats mâles [210]. La pratique de cette modalité d'exercice continue à intensité modérée sur une période de cinq semaines a augmenté le BV/TV et le Tb.N tibiaux de 25% et 21% respectivement chez les rats mâles en bonne santé par rapport aux rats sédentaires [214]. Cela était associé à des trabécules plus épaisses et une séparation trabéculaire plus réduite [214].

Au niveau du fémur, l'exercice continu durant de 10 semaines a pu améliorer la résistance osseuse tout en modifiant positivement la microarchitecture osseuse trabéculaire [204]. Il s'agit notamment d'une augmentation de l'épaisseur trabéculaire, du nombre de trabéculaires et du volume osseux trabéculaire [204]. De la même manière, l'entraînement en continu pendant 12 semaines a augmenté le volume osseux trabéculaire au niveau du tibia [193]. De plus, ces réponses micro-architecturales se diffèrent également en fonction du site osseux analysé. Les améliorations par l'exercice de l'os trabéculaire dans l'étude de Iwamoto et *al.*, (1999) étaient plus élevées dans le tibia distal qu'en proximal [193].

Cependant, de nombreuses études dans la littérature ne rapportent aucun effet de l'exercice sur la microarchitecture osseuse [203,215], voire même un effet délétère de la course continue [210]. Quant à la course intermittente, une seule étude récente a montré que cette modalité de course sur tapis roulant pourrait augmenter le nombre de trabécules (Tb.N) chez les rats entraînés par rapport aux sédentaires [216]. Cependant aucune donnée n'existe, à notre

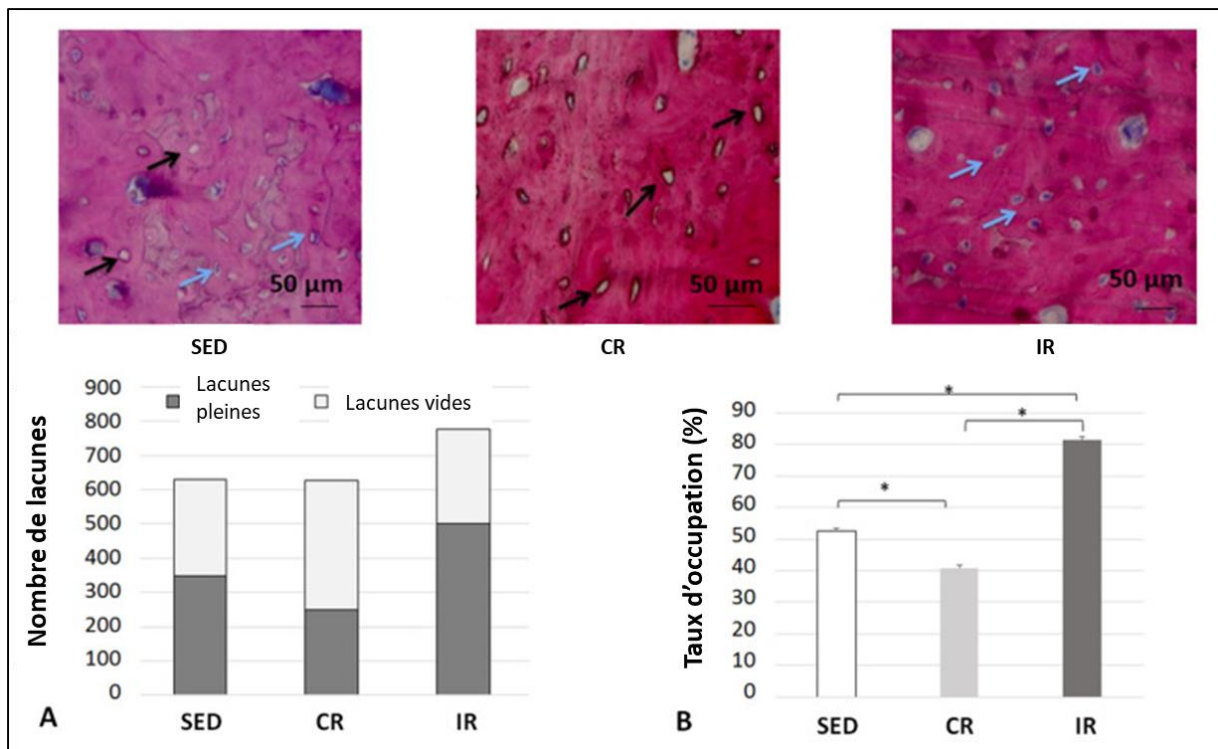
connaissance, dans la littérature concernant les effets la course de type combiné sur les paramètres microarchitecturaux.

#### **d. Effet sur les propriétés cellulaires et tissulaires**

Les études mettant en évidence les effets des différents protocoles de course sur les propriétés cellulaires du tissu osseux sont limitées. Les effets de ces études sont controversés sur la lignée ostéoblastique/ostéocytaire comme sur la lignée ostéoclastique. Les variations des réponses adaptatives cellulaires entre les études existantes dans la littérature dépendent principalement des protocoles d'exercice adoptés.

En 2015, Iijima et *al.*, ont rapporté le rôle important d'un exercice modéré continu (marche) sur tapis roulant dans la suppression de l'apoptose ostéocytaire induite par l'arthrose chez des rats mâles de 12 semaines [217]. L'entraînement en continu à intensité modérée semble pouvoir non seulement limiter et réduire la mort cellulaire des ostéocytes, mais aussi augmenter leur nombre et leur densité chez des rats mâles entraînés [192] comme chez des femelles entraînés par rapport aux sédentaires [218]. Une augmentation rapide du recrutement des ostéoblastes suite à un entraînement continu modéré est également suggéré dans la littérature [219]. L'entraînement intermittent peu également augmenter la surface complète des lacunes ostéocytaires et le taux d'occupation ostéocytaire de plus de 60% par rapport à l'état sédentaire [196].

L'entraînement physique n'entraîne pas toujours que des effets ostéogéniques. Des réponses cellulaires négatives (diminution de l'activité ostéoblastique) conduisant à une perte osseuse suite à une pratique sur tapis roulant (de type continu notamment) ont été remarquées [210]. De plus, une étude très récente a montré pour la première fois des résultats surprenants sur l'activité cellulaire d'un protocole de course intermittente vs continue modérée chez le rat [220]. En effet, sur la même durée d'entraînement, le taux d'occupation des lacunes ostéocytaires dans le groupe de course intermittente était supérieur de 50 % à celui observé dans le groupe de course continue [220].

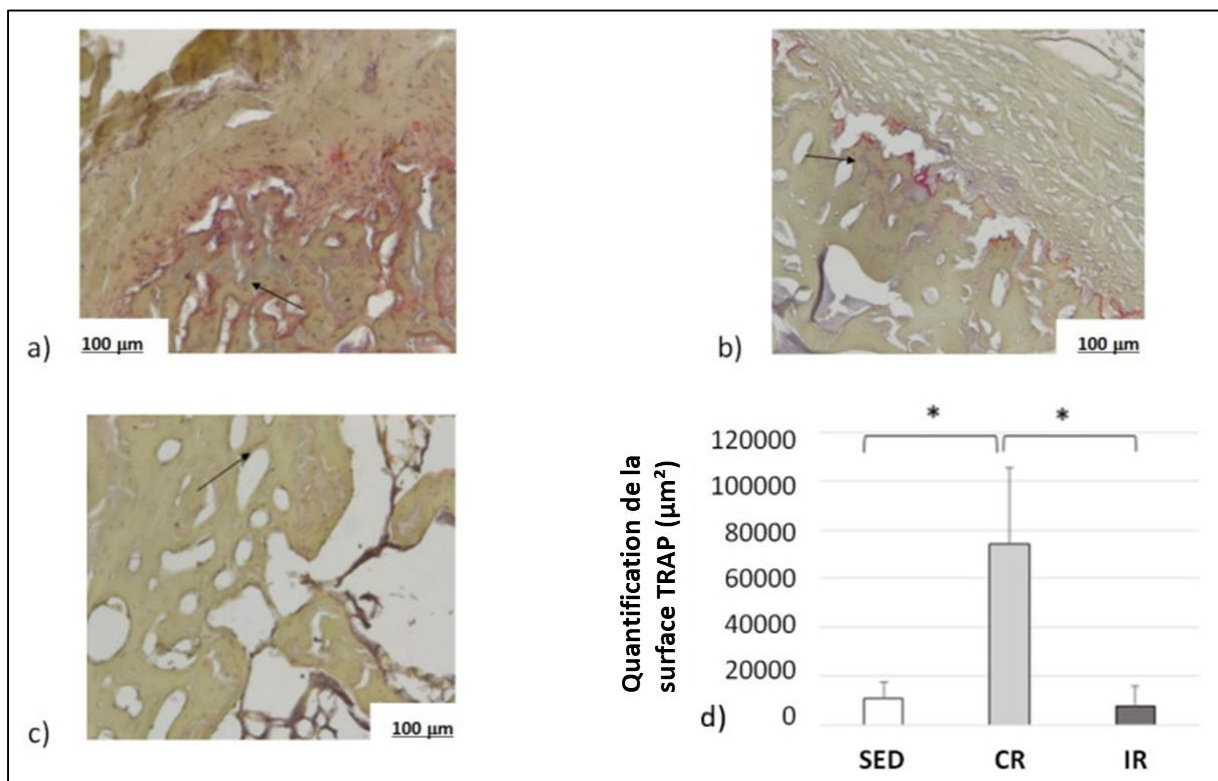


**Figure 21.** *Lacunae ostéocytaires au niveau d'une coupe transversale de la partie corticale du tibia du rat chez les groupes contrôle sédentaire (SED), de course continue (CR) et de course intermittente (IR). Les flèches bleues montrent des lacunes pleines (qui contient un ostéocyte), les flèches noires montrent des lacunes vides. A) résume le nombre de lacunes pleines et vides dans les trois groupes et B) inclut le taux d'occupation des lacunes (%). D'après [220].*

L'effet des protocoles de course sur la lignée ostéoclastique reste mal compris. Des études dans la littérature ont rapporté des effets ostéogéniques et positifs de l'exercice continu modéré [217,219] et de l'exercice intermittent [220] sur les cellules ostéoclastiques. Ces effets positifs sur la lignée ostéoclastique se traduisent par une diminution du nombre de ces cellules [217,219,221], ou par une diminution de la surface de résorption ostéoclastique, avec la coloration TRAP (pour tartrate-resistant acid phosphatase ou phosphatase acide tartrate-résistante) [220] et donc en conséquence, une diminution de l'activité de résorption osseuse.

Cependant, ces effets positifs ne sont pas toujours garantis par une pratique physique. L'étude de Gorge et *al.*, (2021) a montré encore une fois lors de la comparaison entre l'exercice en course continue modérée et l'exercice en course intermittente que la surface TRAP (témoin d'une activité de résorption ostéoclastique) était beaucoup plus élevée dans le groupe de rats « continu » par rapport aux sédentaires et à ceux entraînés en intermittent [220]. De plus, le

groupe d'exercice en course intermittente a enregistré une activité ostéoclastique très basse par rapport au groupe sédentaire [220].



**Figure 22.** *Activité des ostéoclastes dans la partie corticale du tibia du rat chez les groupes contrôle sédentaire (a, SED), de course continue (b, CR) et de course intermittente (c, IR). Les flèches noires montrent l'activité TRAP des ostéoclastes (révélée en rouge). d) inclut la surface de l'activité TRAP de la partie corticale de tibia. D'après [220].*

A noter que les effets négatifs ou positifs de l'entraînement sur les cellules osseuses ne sont pas toujours présents dans les études chez le rat. Des études n'ont rapporté aucun effet de l'exercice sur les cellules de la lignée ostéocytaire [192,206].

Enfin et au-delà des réponses cellulaires, des adaptations tissulaires peuvent aussi être remarquées après des périodes de pratique physique importantes. L'exercice de course continue maintenu pendant 3 mois augmente le taux d'apposition minéral associé à un taux de formation osseuse et d'os trabéculaire plus élevé [221]. De plus, l'augmentation de la synthèse du collagène de type 1 (Col1) et la régulation à la hausse de l'expression de son ARNm, suite à un entraînement maintenu sur plusieurs semaines, sont prouvées dans la littérature [192].

#### **e. Les effets de l'entraînement en course sur tapis roulant sur des facteurs sanguins et le liquide extra-cellulaire**

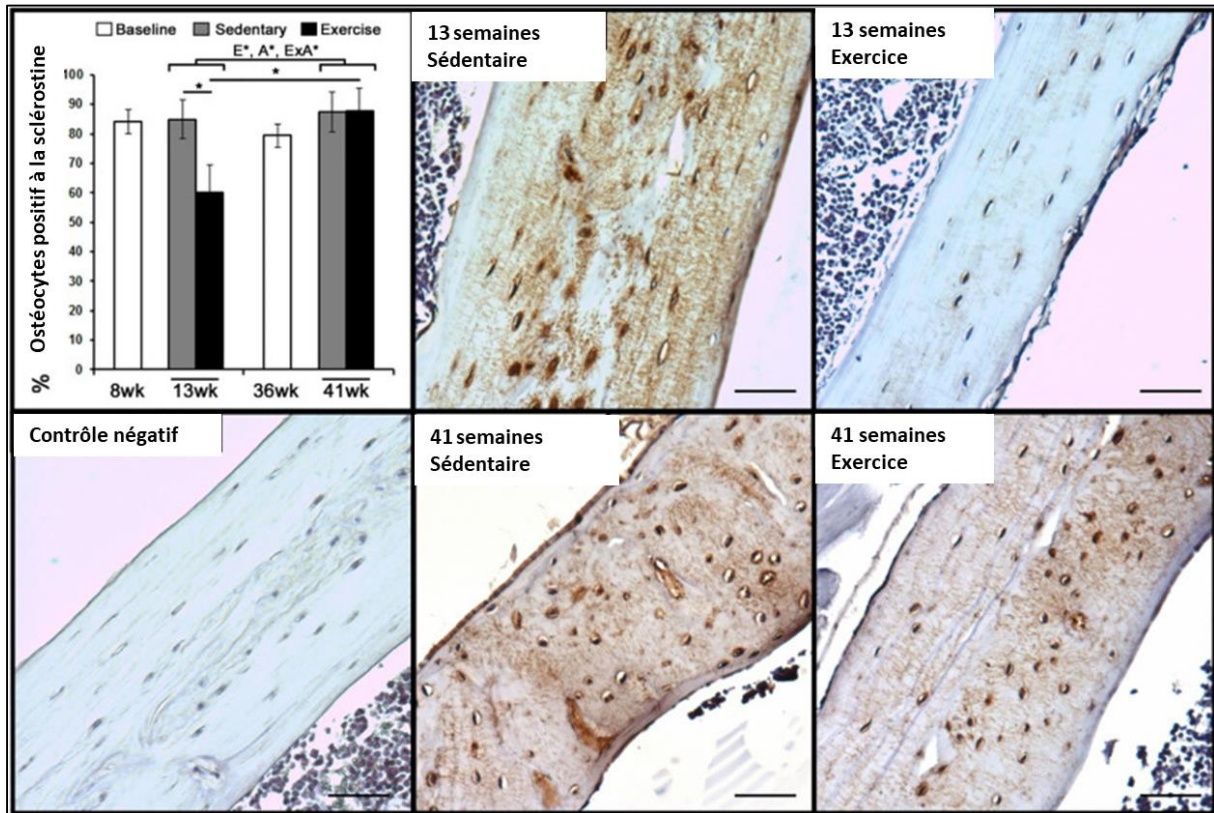
Comme précédemment mentionné, le tissu osseux est fortement affecté par les contraintes mécaniques qu'il subit. Sa force et sa solidité sont conditionnées par le niveau de ces contraintes [177]. On estime qu'uniquement 30 à 50 % de la masse osseuse peut se développer en absence de contrainte d'exercice [222]. La sensibilité de l'os aux contraintes mécaniques est assurée par l'intermédiaire de l'ostéocyte, le composé numéro 1 (90 à 95% des cellules osseuses) et qui vit le plus longtemps [90]. En fait, ce sont à la fois les contraintes mécaniques agissant directement sur l'os (impact au sol, traction des attaches musculaires) et les agents biochimiques transportés par le sang (hormones, cytokines) qui permettent l'anabolisme osseux [13].

La pratique physique d'un exercice d'une intensité modérée à intense induit un impact sur l'os. En conséquence, une déformation de la matrice osseuse se met en place, induisant à une forte circulation du liquide interstitiel dans le réseau lacuno-canaliculaire [223]. De plus, les contraintes mécaniques appliquées sur l'os lors de l'exercice modifient et favorisent l'écoulement des fluides dans ce réseau lacuno-canaliculaire qui interconnecte les ostéocytes entre eux, et avec les autres cellules de la surface osseuse [90]. Par ailleurs, la modification du flux de fluide dans le réseau lacuno-canaliculaire par l'exercice favorisent la libération et la sécrétion, par les ostéocytes, des molécules connues par leur effet anabolisant sur le tissu osseux [13,224]. Il s'agit principalement de l'oxyde nitrique, des prostaglandines, des protéines Wnt et du calcium [13,224]. Cela conduit à une réduction de l'expression des inhibiteurs de la formation osseuse tel que le gène de la sclérostine (Sost), et une diminution de l'expression des stimulateurs de la résorption osseuse tels que le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B ligand (RANKL), ainsi qu'une diminution de l'apoptose. Ceci est couplé à une augmentation des facteurs anaboliques osseux comme les Wnt (responsables de la voie Wnt- $\beta$  caténine) qui favorise la différenciation ostéoblastique et en conséquence la formation osseuse et une augmentation des inhibiteurs de la résorption comme l'ostéoprotégérine (OPG).

Dans la littérature, il a été mis en évidence qu'après des cycles d'exercice le taux de sclérostine diminue (élément sécrété inhibant la formation osseuse) [14,212]. De plus il a également été démontré que l'exercice physique entraîne une hausse de certains biomarqueurs osseux comme l'ostéocalcine, marqueur de formation osseuse, et une diminution du taux du



NTX [195] et de la TRAP [192], marqueurs de résorption osseuse. Cela suggère le rôle de l'exercice physique dans la stimulation de la formation osseuse et la limitation de la résorption en revanche.



**Figure 23.** L'immunohistochimie de la sclérostine dans l'os cortical du tibia de souris contrôles et âgés de 13 et de 41 semaines. L'exercice pendant 5 semaines sur tapis roulant diminue l'expression de la sclérostine par les ostéocytes chez les jeunes souris, mais pas chez les souris adultes. D'après [212].

Au-delà des mécanismes locaux directement liés au tissu osseux, d'autres phénomènes biologiques et physiologiques peuvent être acteurs dans la réponse anabolique de l'os à l'exercice physique. La communication avec les muscles voisins, le réseau vasculaire et le couplage avec le processus d'angiogenèse sont les facteurs les plus impliqués dans cette réponse.

### **3. Effet de l'exercice physique sur la vascularisation**

#### **3.1 Les effets hors tissu osseux**

L'activité physique est utilisée comme un médicament et une thérapie dans le traitement de plusieurs maladies, non seulement liées au tissu osseux, mais aussi des maladies musculaires, neurologiques, métaboliques, pulmonaires et dans l'amélioration des troubles liés au système cardiovasculaire [4].

Lorsqu'il est correctement prescrit et pratiqué, l'exercice physique améliore chez l'Homme le système cardiovasculaire et diminue la pression artérielle [225]. Un entraînement physique de type aérobie entraîne des adaptations importantes du système cardiovasculaire : une amélioration du débit cardiaque maximal, un élargissement de la dimension cardiaque et une augmentation du volume sanguin [226]. De plus ce type d'entraînement favorise également une adaptation des artères, des artérioles et des capillaires en structure et en nombre. Les diamètres des artères et des vaisseaux sont augmentés, ce qui minimise la résistance à l'écoulement sanguin du débit cardiaque dans le corps entier [226]. Il a également été démontré que l'exercice aérobie, en particulier à long terme (d'une durée supérieure à 6 mois) améliore le volume diastolique et systolique et les propriétés vasculaires chez les patients stables atteints d'insuffisance cardiaque [227].

Lors des maladies coronariennes, l'exercice physique d'une intensité modérée à élevée augmente significativement le débit sanguin [228]. Ainsi, un entraînement en continu pendant 4 semaines a pu améliorer la vasodilatation et atténuer la vasoconstriction dans les vaisseaux coronaires épicaux et dans les vaisseaux chez les patients [229]. Par ailleurs, une étude comparative entre les deux protocoles d'entraînement physique, continu à intensité modérée et intermittent de haute intensité, a démontré que ces deux protocoles différents améliorent de façon identique, la fonction endothéliale chez les patients [230].

L'effet de l'exercice physique sur le système vasculaire est élargi sur l'ensemble des organes de l'organisme. Au niveau cérébral, l'exercice physique améliore la fonction cérébrale et retarde la neurodégénérescence en favorisant un ensemble de processus notamment l'angiogenèse [231]. En effet, il a été démontré que l'exercice physique, de type intermittent de haute intensité, augmente chez les souris le taux de la protéine VEGF-A cérébrale et la densité capillaire après 7 semaines d'entraînement uniquement [232].

Au niveau musculaire et particulièrement au niveau du muscle cardiaque, le myocarde, différentes modalités d'exercice (continu, intervalle de haute intensité, exercices de résistance) améliorent la densité capillaires et ce chez les sujets atteints de coronaropathie et les sujets sains [233]. Pour les muscles périphériques, l'exercice aérobie augmente la capacité de perfusion musculaire et le réseau microvasculaire du muscle, ce qui augmente l'apport d'oxygène grâce à une grande surface de diffusion [226]. Chez les rats âgés, l'exercice d'étirement musculaire quotidien pendant 4 semaines augmente le flux sanguin vers le muscle squelettique. Cela était associé avec une amélioration de la vasodilatation des vaisseaux musculaires et une augmentation des marqueurs angiogéniques [234].

En résumé, l'exercice est l'un des processus physiologiques qui active la réponse angiogénique au niveau musculaire chez les adultes. L'exercice peut augmenter l'expression des facteurs de croissance angiogéniques et des capillaires des muscles squelettiques, ces modifications sont les adaptations les plus bénéfiques et les bien connues chez l'Homme et l'animal en bonne santé [235].

Ces données bibliographiques indiquent que les différentes modalités d'exercice physique, notamment de type aérobie, entraînent des adaptations vasculaires et microvasculaires au niveau cardiaque mais aussi, qui peuvent être généralisées sur l'ensemble de l'organisme. Ces adaptations contribuent principalement à augmenter le débit cardiaque, le flux sanguin périphérique et le nombre et la structure des microvaisseaux dans les différents organes.

### **3.2 Effet de l'exercice physique sur la vascularisation osseuse**

A ce jour, il est classiquement admis le rôle important de l'exercice physique dans le maintien ou l'augmentation de la masse osseuse et ce via les stimulations mécaniques et la production de facteurs systémiques (hormones, facteurs de croissance, etc.) [236]. Les mécanismes pertinents impliqués dans ce processus d'ostéogenèse induite par l'exercice peuvent inclure une augmentation de la vascularisation osseuse, comme cela a été rapporté dans des études antérieures, qui tendent à montrer un lien entre les processus d'angiogenèse, de la vascularisation et d'ostéogenèse impliqués dans la formation du tissu osseux lors de l'exercice physique [237]. Les effets de l'exercice sur ces paramètres nécessitent cependant des investigations complémentaires [237].

Malheureusement, les données de la littérature sur le rôle et les effets de l'exercice physique sur la vascularisation et l'angiogenèse osseuse demeurent très limitées. Les principales études qui décrivent le rôle de différentes modalités d'activité physique dans le lien entre l'angiogenèse et l'ostéogenèse *in vitro*, en préclinique chez l'Homme et sur des modèles animaux sont résumées dans le tableau ci-dessous. Ces travaux se sont concentrés sur un ensemble de paramètres angiogéniques et vasculaires, notamment le flux sanguin, la fonction endothéliale, les propriétés artérielles, etc. L'ensemble de ces études ont fait l'objet d'une revue de questions que nous avons publié dans le journal international « Life » (annexe 1).

**Tableau 1 :** Effets de divers protocoles d'exercices sur les paramètres vasculaires généraux et osseux

Type d'exercice	Durée	Espèce	Site	Paramètres	Effets	Référence
Tapis roulant	10-12 semaines	Rat	Fémur Tibia Fibula	Débit sanguin et conductance vasculaire	+++	[238]
Tapis roulant	10-12 semaines	Rat	Fémur	Flux sanguin de la moelle osseuse, vasodilatation, voies de signalisation de l'endothélium	+++	[239]
Natation	8 semaines	Rat	Fémur	Micro-vascularisation osseuse	+++	[240]
Exercice de résistance (escalade)	8 semaines	Rat	Aorte	Concentration d'endothéline-1, expression de la protéine d'oxyde nitrique endothélial (NO)	+++	[159]
Natation	8 semaines	Rat	Aorte	Concentration d'endothéline-1, expression de la protéine eNOS	+++	[159]
Tapis roulant	7 semaines 3 semaines	Rat Ssouris	Humérus Fémur Tibia	Adaptations vasculaires, volume de globules rouges circulant, volume sanguin circulant	+++	[241]
Tapis roulant	6 semaines	Rat	fémur	Diamètre et volume des vaisseaux sanguins, expression des eNOS dans les vaisseaux	+++	[242]

Tapis roulant	5 semaines	Rat	Tibia	Nombre de vaisseaux, ARNm du VEGFR1	+++	[214]
Tapis roulant	4 semaines	Rat	Fémur	Débits sanguins osseux, calleux et musculaires totaux	+++	[243]
Tapis roulant	3 semaines	Souris	Moelle osseuse	Nombre de CPE circulant CPE dans la moelle osseuse, taux sérique de VEGF	+++	[244]
Exercice de roue de libre accès	3 semaines	Souris	Défauts osseux crâniens	Zone de défaut osseux, nombre et diamètre des vaisseaux sanguins	+++	[245]
Vélo ergomètre	4 semaines	Homme	Sang	Nombre de CPE circulant	+++	[244]

#### **a- Effet des différentes modalités d'exercice sur la vascularisation osseuse**

Outre la course sur tapis roulant, certaines études ont intéressé à évaluer l'effet d'autres sources de contraintes mécaniques sur le tissu osseux et sa vascularisation, notamment la natation, le vélo et les stimulations mécaniques par tests mécaniques, comme le test de compression.

L'étude de Matsuzaki et *al.*, (2007) ont montré que la sollicitation mécanique des membres antérieurs chez le rat produisait une augmentation rapide de la vascularisation périostée associée à une augmentation du capital osseux à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'application de contraintes [246]. Les auteurs ont remarqué que l'augmentation de la vascularisation lors de cette étude a été associée à une augmentation de la surface osseuse régionale. Cela suggère donc que l'angiogenèse et l'ostéogenèse sont spatialement coordonnées, en réponse à différentes stimulations mécaniques [246]. En revanche, l'étude de Boerckel et *al.*, (2011) a montré, chez un modèle de rat en régénération de gros défaut osseux, que l'application d'une

charge mécanique précoce (au moment de l'implantation des plaques de fixation) inhibe l'invasion vasculaire et réduit la formation osseuse par rapport aux témoins. Cependant, retarder la mise en place de la charge mécanique (à 4 semaines après la fixation) améliore la formation osseuse, stimule le remodelage vasculaire et augmente le nombre de gros vaisseaux [247]. Toujours dans le contexte de guérison osseuse, l'exercice de roue en libre accès pendant 4 semaines a également pu diminuer la zone de défaut osseux crânien et augmenter le diamètre des vaisseaux chez les souris par rapport à celles hébergées dans des cages sans roues [245]. Ce résultat suggère donc que l'exercice de roue en libre accès accélère la guérison des défauts osseux et stimule l'angiogenèse pendant la réparation osseuse, même au niveau des os non porteurs [245]. Ce type d'exercice a aussi augmenté le nombre des CPE (les cellules progénitrices endothéliales) circulant dans le sang périphérique des souris entraînées par rapport aux contrôles, accompagné par une augmentation similaire des CPE dans la moelle osseuse et du taux sériques de facteur de croissance endothélial vasculaire, et par une réduction du taux d'apoptose des CPE [244].

Les effets de la natation sur le modelage osseux et la vascularisation ont également été étudiés [240]. Ils sont moins probants. Viboolvorakul et *al.*, (2009) ont démontré que 8 semaines de natation pouvaient améliorer les altérations vasculaires capillaires osseuses induites par l'âge chez le rat [240]. De même, Park et *al.*, (2014) ont montré que la natation pendant 8 semaines chez des rates ovariectomisées supprimait le dysfonctionnement endothélial des artères périphériques mais n'empêchait pas la perte osseuse [159].

En revanche, l'exercice d'escalade volontaire a entraîné des améliorations significatives à la fois de la fonction endothéliale et de la masse osseuse dans le modèle de rat post-ménopausique [159].

Enfin, Laufs et *al.*, (2004) ont observé chez les patients atteints de maladie coronarienne stable une augmentation significative des CPE circulantes après un entraînement sur vélo ergométrique avec un taux d'apoptose réduit par rapport à ceux mesurés avant l'entraînement [244].

### **b- Effet de la course sur tapis roulant sur la vascularisation osseuse**

Les études portant sur les effets de la course au tapis roulant sur la vascularisation osseuse sont très rares. Une ancienne étude évaluant des programmes d'entraînement de course

modérée (3 semaines) et intensive (7 semaines) sur tapis roulant chez des rats et des souris, a démontré des adaptations vasculaires dans les os longs, en particulier un volume sanguin circulant significativement plus important chez les animaux entraînés par rapport aux résultats respectifs chez les animaux sédentaires [241]. De plus, chez les animaux entraînés, le volume sanguin circulant dans les fémurs était plus élevé que dans les tibias ou les humérus. Ce résultat peut s'expliquer par des différences d'intensité de contraintes mécaniques subies par ces différents os au cours de l'effort, et en conséquence des réponses adaptatives vasculaires différentes [241].

Stabley et *al.*, (2014) ont montré une augmentation de l'hyperémie généralisée des membres postérieurs et de la moelle osseuse pendant et après l'entraînement physique [238]. Par conséquent, les auteurs ont suggéré qu'une augmentation du flux sanguin dans les os et la moelle osseuse pendant et après l'entraînement physique entraîne une augmentation de la pression dans différentes régions osseuses et favorise l'écoulement du liquide interstitiel osseux de la zone à haute pression vers la zone à basse pression, favorisant ainsi l'ostéogenèse et l'intégrité osseuse [238]. Ce soutien de l'ostéogenèse par l'angiogenèse est accentué en cas de fracture osseuse. En effet, une augmentation du flux sanguin osseux avec une plus grande vascularisation dans la zone calleuse a été observée chez des rats entraînés 4 semaines après avoir subi une ostéotomie fémorale [243]. En revanche, dans l'étude de Spodaryk et *al.*, (1991) un exercice exhaustif à court terme sur un tapis roulant n'a eu aucun effet sur le flux sanguin total dans la moelle osseuse fémorale et n'a augmenté que le flux sanguin dans les régions métaphysaires par rapport à la région diaphysaire [248]. La durée et l'intensité de l'exercice sont des facteurs qui affectent l'angiogenèse et donc potentiellement l'intégrité de l'os et sa qualité.

En 2004, Yao et *al.*, ont montré pour la première fois que, par rapport à la sédentarité, seulement 2 semaines d'exercice de course chez le rat multipliaient par 20 le nombre de vaisseaux dans la métaphyse tibiale proximale et induisaient une régulation positive de l'ARNm du récepteur du VEGF [214]. Cependant, lorsqu'un traitement anti-VEGF était utilisé, les adaptations induites par l'exercice (en particulier les augmentations de la densité minérale osseuse, du volume osseux trabéculaire et de la densité des vaisseaux) étaient atténuées et une augmentation des surfaces ostéoclastiques était observée [214]. Pris ensemble, ces résultats ont fourni la preuve que l'angiogenèse et l'ostéogenèse sont étroitement liées, et qu'ils peuvent être améliorés par la pratique physique.

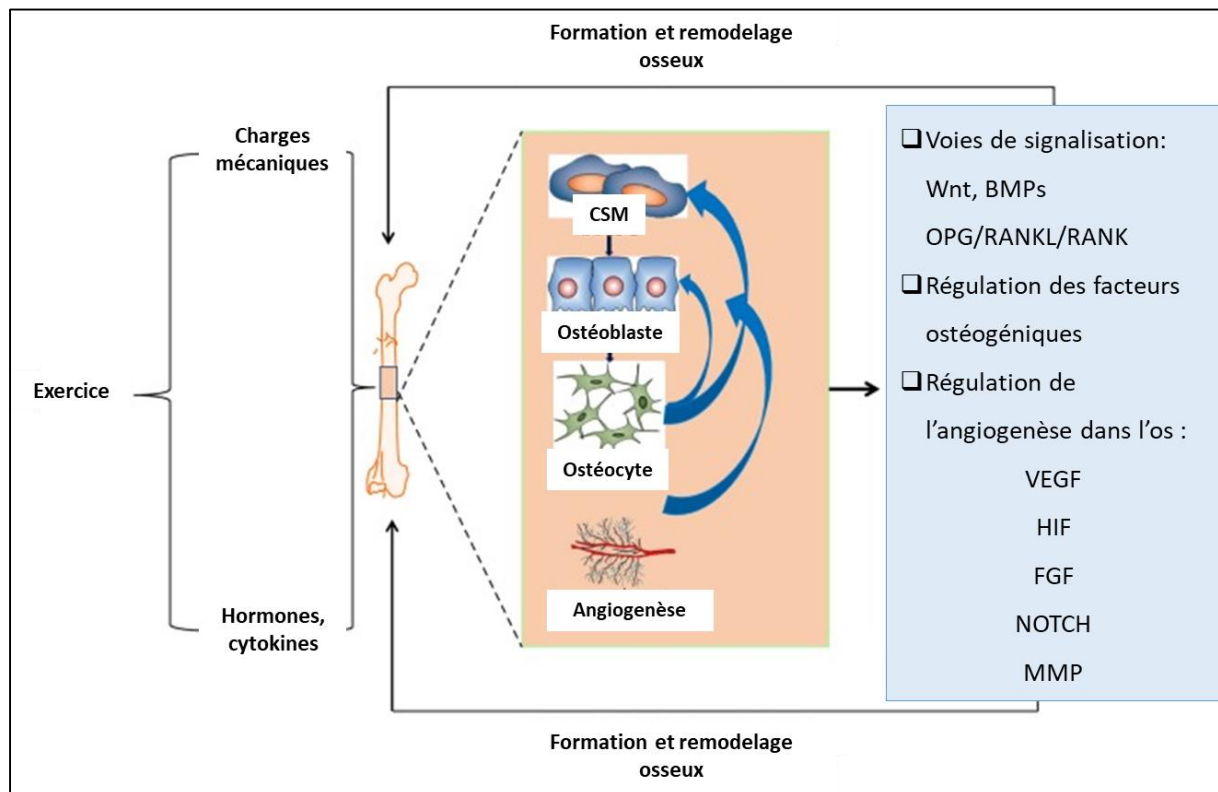


De plus, chez les rats, Dominguez et *al.*, (2010) ont montré que l'augmentation du débit sanguin osseux et l'activation de la voie de signalisation NOS, induits par l'exercice sur tapis roulant, étaient associées à une augmentation du volume osseux trabéculaire dans le fémur distal des animaux jeunes et âgés de 34 % et 26 %, respectivement, par rapport aux résultats respectifs obtenus chez les animaux sédentaires [239]. Dans le même sens, une étude récente menée chez des rates ovariectomisées a démontré qu'en plus de l'intégrité de l'os trabéculaire, l'angiogenèse fémorale était significativement améliorée chez les rates qui courent. Ceci a été associé à une amélioration de la vasodilatation de l'artère fémorale chez les rates exercées [242]. Encore une fois, ces résultats confirment que l'angiogenèse osseuse est étroitement liée à l'ostéogenèse induite par l'exercice et qu'elle est essentielle pour le gain osseux recherché par l'exercice, aussi bien dans des contextes sains [214], vieillissants ou pathologiques (ostéoporose) [239,242]. Ce couplage s'explique généralement par l'augmentation de la vasodilatation dépendante de l'oxyde nitrique (NO) induite par l'entraînement physique, associée à une augmentation de la production et du nombre de cellules progénitrices endothéliales circulantes (CPE) dans le système vasculaire osseux chez les animaux [244]. Cette vasodilatation favorise l'apport sanguin et l'angiogenèse, qui, à son tour, booste l'ostéogenèse au niveau des différents sites osseux.

La production du NO, principal facteur de régulation de la vasodilatation, est médiée par la NO synthase endothéliale (eNOS). L'activation d'eNOS repose sur une cascade d'activation. La première étape de cette cascade d'activation dépend du  $Ca^{2+}$  [233]. Lors de l'augmentation de la contrainte de cisaillement par l'entraînement physique, la cascade d'activation de cette voie de signalisation est initiée par l'activation de récepteurs mécaniques, tels que le récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) ou la molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires 1 (PECAM 1) (ou également appelée CD31) [233]. Cependant, la migration des CPE de la moelle osseuse vers les sites périphériques dépend de nombreux facteurs, mais le mécanisme de cette mobilisation et différenciation n'est pas encore bien défini. Des études suggèrent que ces cellules peuvent favoriser l'angiogenèse locale en sécrétant des facteurs angiogéniques via une voie paracrine [249]. Il convient également de noter que le nombre des CPE est fortement influencé par des facteurs tels que les médicaments, les facteurs de croissance et, bien sûr, l'exercice physique [249]. Tous ces éléments suggèrent que les CPE sont un acteur important à étudier dans le cadre des effets vasculaires de l'exercice physique chez l'Homme.

Dans l'ensemble, l'exercice physique est classiquement connu comme un agent anabolisant osseux [250]. De plus, l'exercice est également connu pour améliorer les

adaptations angiogéniques osseuses grâce à la régulation des médiateurs angiogéniques clés (VEGF, FGF, etc.) [237] . Ces adaptations dans le système vasculaire précèdent celles qui se produisent dans l'os en réponse à des stimulations mécaniques. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes angiogéniques et ostéogéniques induits par différents types d'exercices physiques devrait permettre d'identifier de nouvelles stratégies non pharmacologiques pour prévenir la fragilité osseuse.



**Figure 24.** Les mécanismes potentiels de l'exercice dans la promotion de l'ostéogenèse et de l'angiogenèse. Modifiée d'après [237].

## Problématique, hypothèses et objectifs

Le renforcement et le maintien de la solidité osseuse est le but principal des différents protocoles d'exercice physique. L'exercice induit des contraintes mécaniques qui entraînent des déformations de la matrice et une forte activité hormonale et biologique, ce qui stimule l'ostéogenèse et l'angiogenèse. Malgré l'importance de l'exercice physique pour la qualité du tissu osseux et sa vascularisation, il existe malheureusement peu d'études traitant ce sujet. De plus, les études comparatives des effets de différentes modalités d'exercice physique sur le statut osseux et vasculaire demeurent très limitées. En conséquence, il n'y a à ce jour pas de consensus sur le protocole d'exercice physique, notamment de type course sur tapis roulant, le plus ostéogéniques et angiogéniques au niveau de l'os. Ce manque d'information sur le protocole d'entraînement physique le plus ostéogénique limite la prescription pour des fins thérapeutiques ou voire même préventives.

La course de type modéré continu semble avoir des effets positifs sur le tissu osseux trabéculaire, et elle améliore davantage la DMO. Cependant, la course dite intermittente ou par intervalles a montré dans la littérature des effets rapides sur la DMO et des effets ostéogéniques sur l'os cortical. En revanche, à notre connaissance, il existe à l'heure actuelle aucune donnée concernant les effets de la course de type combiné (protocole alternant entre la course continue et intermittente) sur la qualité du tissu osseux et sa vascularisation.

De ce fait, les objectifs de cette thèse sont de comparer et analyser pour la première fois les effets de trois différentes modalités d'exercice physique : continu à intensité modérée, intermittent et combiné

- 1) Sur différents paramètres de qualité osseuse (microarchitecture, structure trabéculaire, activité cellulaire)
- 2) Sur la micro-vascularisation et l'angiogenèse osseuses

Etant donné que les deux protocoles d'exercice, continu à intensité modéré et intermittent, ont déjà montré des effets controversés sur les différents compartiments osseux, un protocole combiné de ces deux différentes modalités pourrait avoir des effets plus ostéogéniques et angiogéniques au niveau du tissu osseux.

# **Partie II**

## **Matériels et méthodes**

## **1. Animaux**

L'étude a été menée sur des rats Wistar, issus de l'élevage Janvier (Le Genet-St-Isle, France). Tous les animaux étaient âgés de 5 semaines et pesaient entre 182 et 217 grammes à l'arrivée au laboratoire. Pendant 2 semaines, les rats ont été d'abord acclimatés au sein de l'animalerie du laboratoire de Biologie, Bio-ingénierie et Bio-imagerie ostéo-articulaire (B3OA) (UMR CNRS 7052 INSERM U1271) qui est une unité de recherche mixte située à Paris, sous tutelle de l'[Institut des Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes du CNRS](#), de l'[INSERM](#), de l'[Université de Paris Cité](#) et de l'[Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort](#). Le comité d'éthique de la recherche animale du site Lariboisière/Villemin à Paris et le Ministère de l'agriculture français (APAFIS #9505) ont validé et approuvé le protocole expérimental. De plus, le protocole expérimental a été suivi et conduit dans le respect de la directive 2010/63/EU correspondante à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

Toute la partie expérimentation animale et toutes les analyses de la présente étude ont été réalisées au sein du laboratoire de Biologie, Bio-ingénierie et Bio-imagerie ostéo-articulaire (B3OA) (UMR CNRS 7052 INSERM U1271) en collaboration avec le laboratoire APERE (EA 3300).

## **2. Protocole d'entraînement physique des animaux de l'étude**

### **2.1. Acclimatation**

Lors de la période d'acclimatation, les rats ont été habitués au tapis roulant, pendant les 5 derniers jours d'acclimatation, et ce en utilisant un tapis à 10 couloirs dédié à l'entraînement des rats [251]. Les animaux étaient simplement posés sur le tapis et dans les couloirs sans aucune activation de la marche lors de la première journée. Lors du deuxième jour, une vitesse correspondante à la marche des rats (2-5 m/min) pendant 10 minutes a été mise en place. La durée et la vitesse d'entraînement pour les animaux ont été progressivement augmentées lors des derniers jours d'acclimatation au tapis roulant.

### **2.2. Mesure de la vitesse maximale aérobie (VMA)**

La vitesse maximale aérobie (VMA) correspond à la vitesse pour laquelle l'animal atteint sa consommation maximale d'oxygène. Le test de la VMA était réalisé pour les rats lors du 5<sup>ème</sup> jour d'acclimatation. Un échauffement pendant 5 minutes à une vitesse moyenne de 13 m/min précédait chaque test de VMA. La vitesse de course était ensuite progressivement

augmentée toutes les 2 minutes en début de protocole puis toutes les 3 minutes à partir de 17 minutes d'exercice. Quand un rat venait se reposer sur la grille des couloirs, montrant ainsi une résistance à l'exercice malgré les stimulations, le test était arrêté. La vitesse immédiatement inférieure à celle d'épuisement du rat était enregistrée comme la VMA du rat concerné.

### **2.3. Protocol d'entraînement physique**

Après la période d'acclimatation et le test de VMA, les rats ont été divisés en 4 groupes expérimentaux : d'un groupe contrôle (SED ; n=10), un groupe d'exercice de course continue (EC ; n=10), un groupe d'exercice de course intermittente (EI ; n=10) et un dernier groupe d'exercice de course combinée (COM ; n=9).

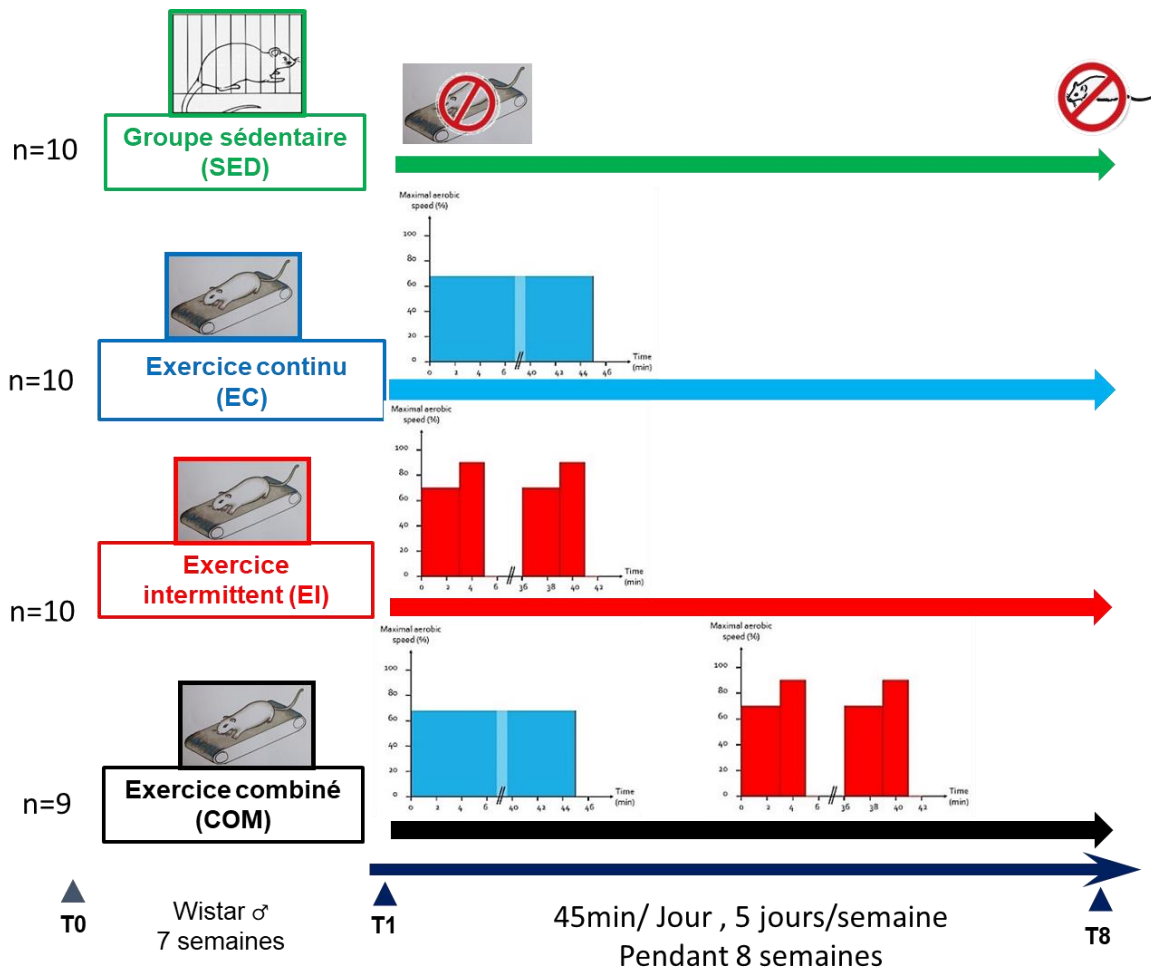
Au début de l'entraînement (T1) tous les rats étaient âgés de 7 semaines. L'entraînement a été mené sur un tapis roulant plat sans inclinaison, et ce pendant 45 minutes par jour, 5 jours par semaine, pendant 8 semaines consécutives (rats âgés de 15 semaines correspondant à T8 dans l'étude).

Tous les protocoles de course débutaient par un échauffement de 5 minutes à une vitesse de 12 m/min. Les modalités d'exercice différaient ensuite selon le groupe considéré :

- Le groupe d'exercice continu (EC) faisait une course de 40 minutes à 70% de la VMA (équivalent d'une vitesse de 15 m/min).
- Le groupe de course intermittente (ou dite par intervalle) (EI), réalisait d'une répétition de 7 blocs de 3 minutes à 50% de la VMA, 2 minutes à 100% de la VMA et une minute de repos.
- Le groupe de course combinée (COM) se composait d'une alternance de ces deux protocoles de course sur les cinq jours de la semaine (3 jours d'exercice continu et 2 jours d'exercice intermittent).

Les rats du groupe contrôle (SED) ne pratiquaient aucune activité hors des déplacements dans leur cage, et aucune roue n'était disponible dans celle-ci.

Après les huit semaines d'entraînement, un nouveau test de VMA a été réalisé afin d'évaluer la vitesse maximale aérobie (VMA).



**Figure 25.** Les différents protocoles d'exercice physique effectués par les différents groupes expérimentaux de la présente étude.

### 3. Mesure des paramètres corporels et des paramètres sanguins des animaux

Les poids corporels et les longueurs des rats (du museau à l'anus) ont été mesurés à T0 (rats de 5 semaines) et à T8 (fin du protocole d'entraînement et rats de 8 semaines). L'index de masse corporelle (IMC) a été calculé selon la formule suivante :  $IMC = \text{poids (g)} / \text{taille}^2 (\text{cm}^2)$  [252]. A noter que les consommations d'aliments et d'eau étaient également enregistrées quotidiennement pendant la période d'entraînement.

Des marqueurs de métabolisme osseux ont été mesurés dans le plasma sanguin. Il s'agit de la phosphatase alcaline (ALP), marqueur de la formation osseuse, du NTX (Télopeptide N-terminal du collagène de type I), marqueur de résorption osseuse, et la parathormone (PTH) qui est une hormone de régulation du métabolisme phosphocalcique osseux. Ces marqueurs ont été dosés par des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) au sein du laboratoire

B3OA. Ces analyses étaient réalisées sur du plasma obtenu après centrifugation à 700g à 4 °C du sang des rats, obtenu lors de l'exsanguination en fin de protocole.

**NB :** Il est important de mentionner que toute la partie d'expérimentation animale et les analyses des paramètres corporels et sanguins ont été faites en amont de la présente thèse. En effet, cette première partie a été réalisé dans le cadre d'une thèse mené au laboratoire B3OA, soutenue en 2019 et dont le sujet portait sur l'exercice physique et la réparation osseuse, plus précisément sur l'effet de la course modérée continue et de la course intermittente sur la qualité et la réparation osseuse de l'os tibial chez le rat wistar.

#### **4. Analyse ex-vivo du tissu osseux**

Après les huit semaines d'entraînement, les rats ont été sacrifiés et les fémurs droits et gauches ont été récupérés, nettoyés des tissu mous et fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% v/v à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure pour analyse du tissu osseux. Immédiatement après le sacrifice et l'élimination du tissu conjonctif, la longueur des fémurs gauches, les diamètres antéro-postérieur (AP) et latéro-médial (LM) ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique (résolution 0,1 mm : Werckmann®, Pays-Bas).

##### **4.1. Micro-CT**

Les épiphyses proximales et distales des fémurs gauches de chaque rat ont été imagé à l'aide d'un  $\mu$ CT in-vitro de haute résolution (Skyscan® 1172, Bruker Biospin, Belgique). Pour les paramètres micro-architecturaux et la densité minérale osseuse trabéculaire, les images  $\mu$ CT ont été acquises avec les paramètres suivants : tension et intensité de la source des rayons réglés à 80 kV, courant de la source à 100  $\mu$ A, temps d'exposition est fixé à 175 ms et le pas de rotation à 0,3 degré. Un filtre aluminium de 0,5 mm d'épaisseur et une résolution de 9,81  $\mu$ m ont également étaient choisi comme paramètres.

Les images ont été reconstruites à l'aide du logiciel NRecon, 16 bits (v1.7.0.4, Skyscan). Elles ont ensuite été segmentées en images binaires en utilisant des méthodes simples de seuillage global, en raison du faible bruit et de la bonne résolution des ensembles de données.

L'analyse des images a été effectuée à l'aide du logiciel CTAn (v1.6.1, Skyscan). Pour l'évaluation de la microarchitecture trabéculaire et de la DMO, les volumes trabéculaires d'intérêt (VOI) ont été déterminés en dessinant manuellement une région d'intérêt (ROI) suivant les limites endocorticales, toutes les 20 images sur un sous-ensemble de 200 images



situées immédiatement distales du bord ventral de la tête fémorale pour la partie proximale du fémur, et immédiatement proximales de la plaque de croissance distale pour la partie distale du fémur. Le logiciel a extrapolé la ROI entre les ROIs dessinées. La DMO trabéculaire (Tb.BMD, gHA/cm<sup>3</sup>) a été calculée à partir du VOI en utilisant des fantômes d'hydroxyapatite pour la calibration [253].

Les variables de l'os trabéculaire récupérées comprenaient également la fraction volumique de l'os trabéculaire Tb.BV/TV (volume de l'os/volume du tissu, c'est-à-dire fraction volumique de l'os en %), le nombre de trabécules Tb.N (1/mm), la séparation des trabécules Tb.Sp (mm) et l'épaisseur des trabécules Tb.Th (mm) [253].

## **4.2. Histologie**

### **a. Décalcification des échantillons osseux**

Après la fixation en PFA, les fémurs gauches entiers et les diaphyses des fémurs droits des rats ont été décalcifiés en plusieurs bains d'EDTA 177 g/L, pH 7,0-7,3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) pendant 4 semaines à 6 semaines, en changeant les bains tous les 2 jours. Lors de la décalcification, nous avons contrôlé nos échantillons aux rayons X (Appareil FAXITRON X-Ray Corporation) afin de nous assurer de l'avancée de celle-ci avant l'inclusion en paraffine.

### **b. Inclusion en paraffine, réalisation des coupes et préparation des lames histologiques**

Après la décalcification, les échantillons (fémurs gauches et diaphyses des fémurs droits) ont été inclus en paraffine. La première étape de cette inclusion est l'imprégnation qui s'est fait dans l'automate Eprexia TM STP120 (Spain) après plusieurs étapes de déshydratation :

1) Alcool 40% (1h)	2) Alcool 70% (1h)	3) Alcool 80% (1h)
4) Alcool 90% (1h)	5) Alcool 95% (1)	6) Alcool 100% (1h)
7) Alcool 100% (1h)	8) Xylène;1er bain (1h)	9) Xylène;2ème bain (1h)
10) Paraffine liquide (1h30)	11) Paraffine liquide (1h30)	Fin du cycle

Une fois que le cycle d'imprégnation en paraffine est terminé, l'inclusion des échantillons dans des blocs en paraffine a été réalisée avec la plaque d'enrobage ou également appelée plaque d'inclusion. Les blocs ont ensuite été gardés dans le froid jusqu'au durcissement de la paraffine.

Après l'inclusion, les échantillons ont été coupés à une épaisseur de 4-5  $\mu\text{m}$  avec un microtome (DIS MIR S.C.I.L.) et montés sur des lames d'histologie. Des coupes transversales ont été réalisées pour la diaphyse des fémurs droits, et des sections longitudinales ont été faites sur les fémurs gauches. Les coupes de paraffine fines de 4 à 5  $\mu\text{m}$  permettent des traitements histologiques et immuno-histologiques, et une analyse en microscopie optique. Avant la coloration, toutes les sections de tissus ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans une série d'alcools descendants (100, 90, 80, 70 et 40 %), avec un rinçage final à l'eau courante.

### **c. Etude histologique du tissu osseux**

Afin de mesurer des paramètres histomorphométriques du fémur, notamment l'épaisseur corticale fémorale, une coloration à base d'Hématoxyline (Sigma Aldrich HHS32) et d'éosine (VWR HX305255) (HE) a été réalisée sur les coupes transversales des fémurs droits des rats. Cette coloration permet via l'hématoxyline d'observer les noyaux des ostéocytes et par l'éosine, la matrice extracellulaire osseuse. Après le déparaffinage, les lames sont placées dans le colorant hématoxyline pendant 2 minutes, puis lavées à l'eau courante, et puis sont placées dans le colorant éosine pendant une minute. A la fin un montage des lamelles est effectué afin de préserver les échantillons sur les lames. Un nombre de 3 coupes par rat, pour les rats de chaque groupe expérimental été traité.

### **d. Etude histochimique du tissu osseux**

Les phosphatases acides tartrate résistantes (TRAP) sont des enzymes qui possèdent une activité enzymatique abondante dans les ostéoclastes et qui sont considérées comme un marqueur de la résorption osseuse. Le marquage TRAP est donc une méthode histochimique qui donne des colorations en utilisant des substrats de réaction [254], ici le Naphtol AS-TR (Sigma Aldrich N6125).

Pour la réalisation de ce marquage nous commençons tout d'abord par le déparaffinage des lames avec des bains successifs de xylène et d'alcool. Ensuite la détection enzymatique des

phosphatases acides est réalisée avec une concentration bien définie d'acide tartrique et du naphthol AS-TR. Après avoir recouvert tous les échantillons avec nos solutions, ils ont été incubés dans une chambre humide à 37°C pendant une 1 heure. La contre-coloration était réalisée avec l'hématoxyline pendant une minute. Ce marquage TRAP, une fois positif, donne une coloration rouge indiquant l'activité de la résorption osseuse ostéoclastique. Un nombre de 2 coupes (2 lames) par rat, pour les rats de chaque groupe expérimental été traité pour ce marquage TRAP. Ce marquage a été réalisé sur les coupes longitudinales des fémurs gauches des rats.

#### **e. Etude immuno-histochimique du tissu osseux**

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode qui consiste à mettre en évidence une protéine d'intérêt sur une coupe de tissu à l'aide d'un anticorps spécifique. L'IHC est donc basée sur le principe qu'un anticorps se lie spécifiquement à un antigène selon la réaction antigène-anticorps [255], L'anticorps spécifique est couplé directement ou indirectement, via un anticorps secondaire, à une enzyme qui convertit un substrat incolore en un produit coloré à l'endroit où le complexe antigène-anticorps s'est formé [255].

Dans la présente étude, nous visons à évaluer l'apoptose ostéocytaire (la mort cellulaire programmée des ostéocytes), la vascularisation osseuse et l'angiogenèse sur des coupes longitudinales de fémurs gauches des rats. Pour ce faire, nous avons respectivement réalisé l'immuno-marquage de la caspase-3 clivée, du CD31 et du VEGFR2. Il est à noter que chacun de ces marquages ont été réalisé sur des coupes distinguées, un nombre de 2 coupes par rat, pour les rats de chaque groupe expérimental.

- ✚ Pour évaluer l'apoptose des ostéocytes, une immuno-coloration pour la caspase-3 clivée a été réalisée. La caspase-3 clivée est une protéase qui fait partie de la famille des caspases dont l'activation est un marqueur de dommage cellulaire [256]. Elle est connue pour être une caspase effectrice dans le processus de mort cellulaire, et donc un marqueur important de l'initiation de l'apoptose cellulaire [257]. Les échantillons ont été incubés pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-caspase-3 (caspase-3 clivée (Asp175) (5A1E) mAb de lapin #9664, Ozyme, dilution 1/400), un anticorps primaire largement utilisé dans la recherche sur l'apoptose [258]. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 minutes dans une chambre humide à température ambiante avec les anticorps secondaires (SignalStain Boost IHC Detection Reagent, HRP, Rabbit, Ozyme, dilué).

- ✚ Pour mettre en évidence le processus d'angiogenèse, un immuno-marquage pour le VEGFR2 a été réalisé. Le VEGFR2 est le principal récepteur du VEGF-A et est exprimé par les cellules endothéliales, dont il régule la survie, la migration et la prolifération [143]. Le consensus le plus généralement accepté est que le VEGFR2 est capable d'induire tous les effets biologiques du VEGF-A (16). Les échantillons ont été incubés pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-VEGFR2 (VEGF Receptor 2 (D5B1) Rabbit mAb #9698, Ozyme, dilution 1/800), puis incubés pendant 30 min dans une chambre humide à température ambiante avec les anticorps secondaires (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Ozyme, dilution 1/1000).
- ✚ Pour évaluer les cellules endothéliales, nous avons également effectué un immuno-marquage du CD31. Le CD31, aussi appelé molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires 1 (PECAM-1), est une protéine transmembranaire exprimée en grande quantité à la surface des cellules endothéliales qui joue un rôle dans la régulation de l'inflammation. Cette protéine est présente au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales, où elle régule la mécano-transduction et la perméabilité vasculaire. Les échantillons ont été incubés pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-CD31 (CD31 (PECAM-1) (D8V9E) XP® Rabbit mAb #77699, Ozyme, dilution 1/100), puis incubés pendant 30 min dans une chambre humide à température ambiante avec les anticorps secondaires (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Ozyme, dilution 1/1000).

Pour ces trois protocoles, la révélation est effectuée avec une incubation au DAB (SignalStain DAB Substrate Kit #8059, Ozyme, dilué) pendant 10 min. Le chromogène DAB réagit chimiquement avec l'enzyme HRP couplée aux anticorps secondaires Caspase-3 clivée, VEGF2 et CD31, induisant ainsi une coloration brune. La contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline pendant une minute pour mettre en évidence les cellules osseuses (ostéocytes).

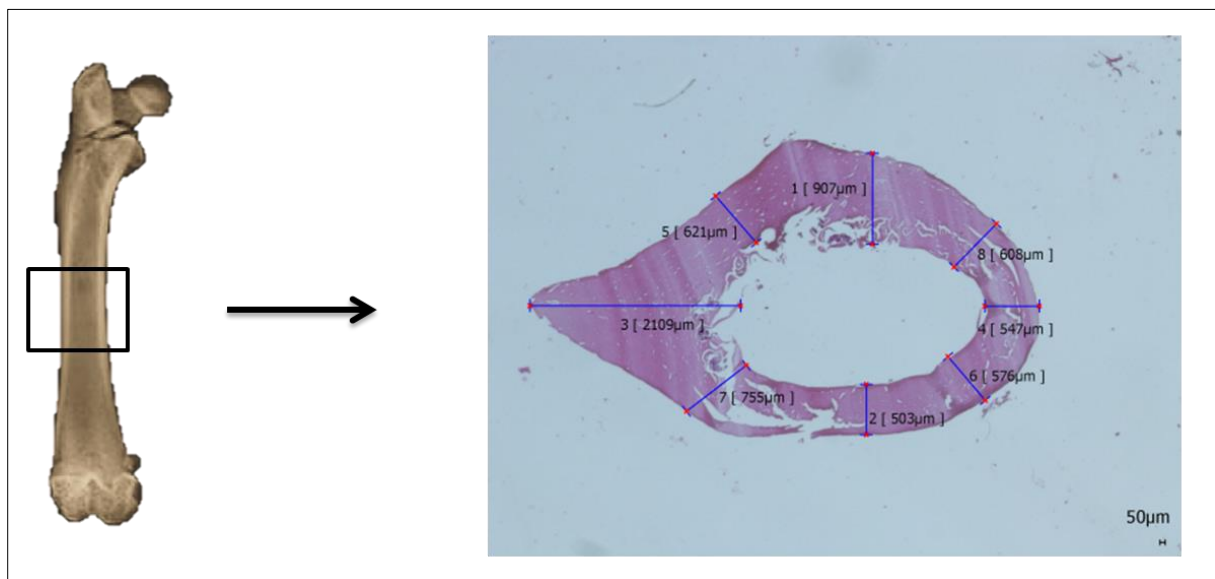
Des étapes préalables au marquage aux anticorps sont nécessaires : le démasquage de l'antigène avec une solution de démasquage (citrate ou trypsine), et ainsi la désactivation des peroxydases cellulaires par le peroxyde d'hydrogène 3% v/v pendant 10 min afin d'éliminer toute tentative de liaisons non spécifiques.

Avant la réalisation des protocoles d'immunohistochimie, une mise au point était nécessaire. Donc nous avons tout d'abord testé nos différents anticorps (anti-caspase-3 clivée, anti-CD31 et anti-VEGFR2) avec différentes concentrations d'anticorps primaire. De plus, à

chaque instant du marquage de nos échantillons, nous avons traité également des échantillons d'autres tissus connus par leur positivité en caspase-3 clivée, en CD31 et en VEGFR2. Il s'agit notamment des échantillons de rate, de rein et de foie. Ces échantillons donc sont considérés comme des témoins positifs de nos protocoles.

#### f. Méthodes de quantification des différents paramètres étudiés

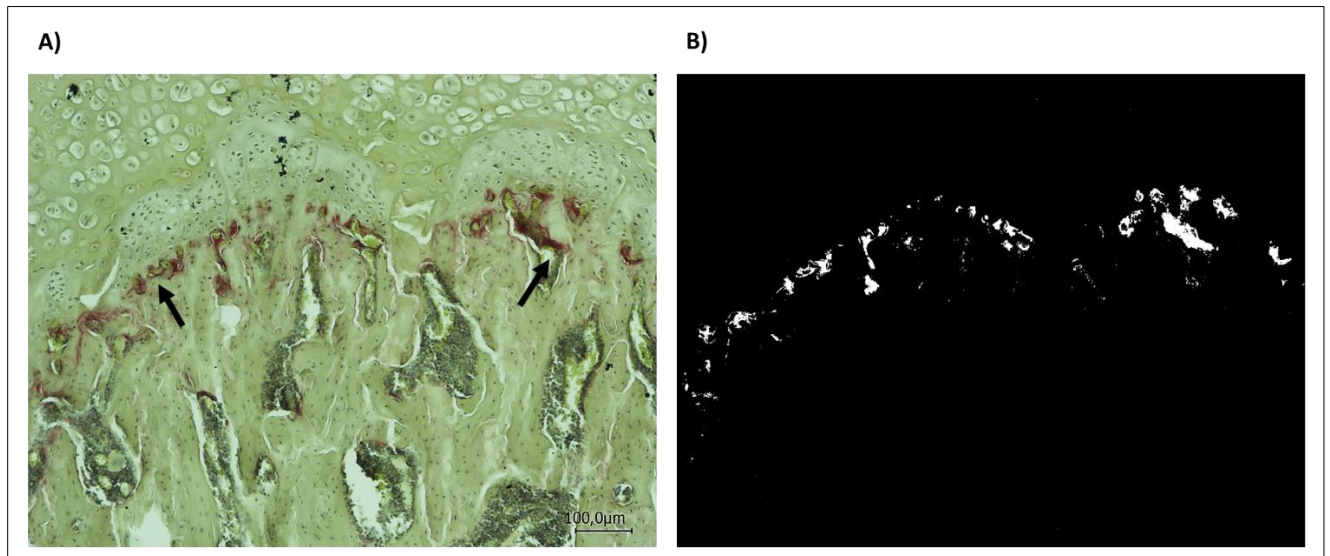
- ✚ Pour mesurer l'épaisseur corticale fémorale, des acquisitions des coupes transversales des fémurs droits des rats, colorées à l'HE ont été effectuées par le microscope numérique Keyence (VHX-2000) à un grossissement de 10x. En utilisant la boîte à outils Keyence dédiée, l'épaisseur corticale a été mesurée à 8 endroits différents sur 3 sections consécutives pour un seul rat. La moyenne des résultats obtenus a été calculée pour obtenir une épaisseur corticale moyenne par rat, et une épaisseur corticale moyenne au niveau crânien, caudal, latéral et médial (Figure 26).



**Figure 26.** Méthode utilisée pour la mesure de l'épaisseur corticale fémorale sur les coupes transversales des fémurs droits des rats. Coloration histologique par HE.

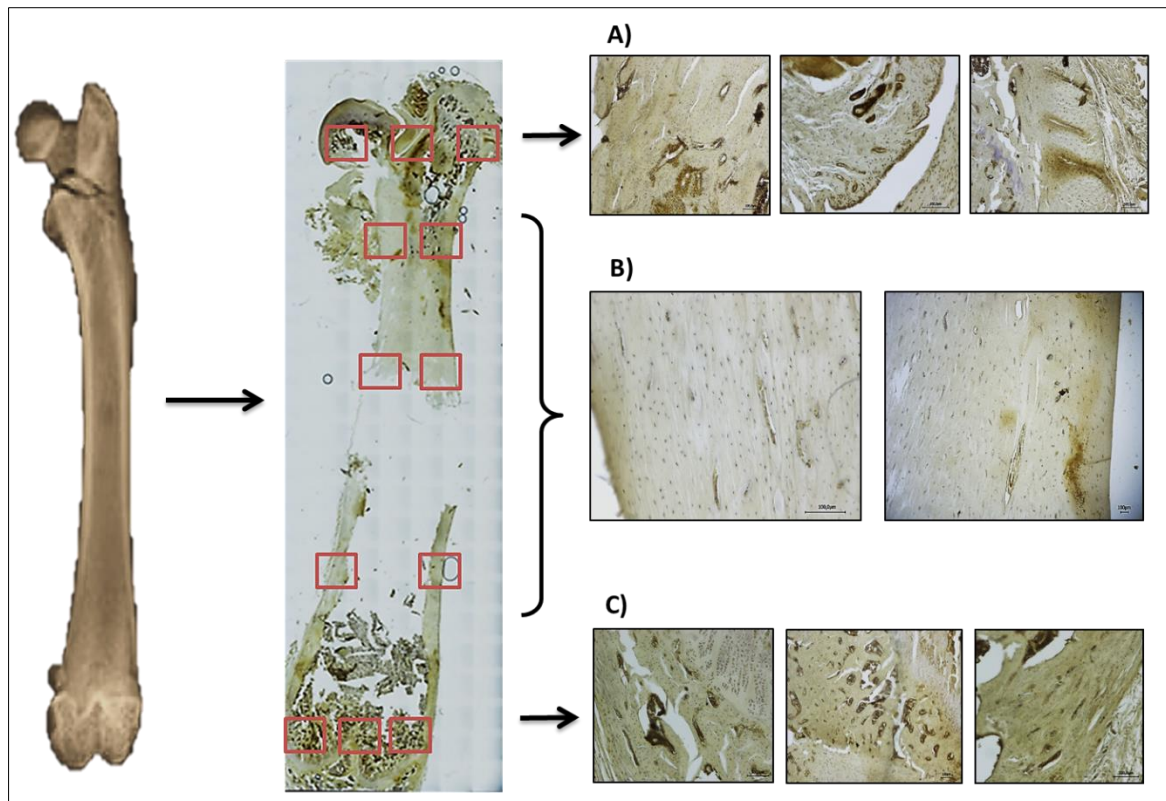
- ✚ Pour le marquage TRAP : Les images ont été obtenues à l'aide du microscope numérique (Keyence, VHX-2000) à un grossissement de 200x. Six images ont été obtenues pour chacune des deux sections longitudinales par rat comme suit : 3 images pour chaque épiphyse, proximale et distale (3 acquisitions sur une ligne transversale sans chevauchement). Il est à noter qu'aucun marquage TRAP n'a été observé sur les parties diaphysaires de nos échantillons.

En utilisant le logiciel de traitement d'image "ImageJ" (National Institute of Health, 1987), et via les outils de convolution de couleur, d'ajustement de contraste, de seuillage et de suppression du bruit, le marquage TRAP a été quantifié pour tous les échantillons (Figure 27). Nous avons fixé comme paramètre de quantification "la zone de résorption ostéoclastique" témoignant de l'activité de résorption osseuse ostéoclastique. Ce paramètre est calculé et présenté comme un pourcentage (%) de la zone de résorption par rapport à la zone totale des images, qui est égale dans les différents groupes expérimentaux.



**Figure 27.** Méthode de quantification du marquage TRAP. A) Exemple d'acquisition du marquage TRAP sur nos échantillons du tissu osseux. Les flèches noires indiquent le marquage TRAP attestant l'activité de résorption ostéoclastique. B) Traitement d'image avec le logiciel « ImageJ » pour quantifier le marquage TRAP ou la surface de résorption ostéoclastique.

- ✚ Pour l'immuno-marquage du caspase-3 clivée, CD31 et VEGFR2 : les images ont été obtenues à l'aide du microscope numérique (Keyence, VHX-2000) à un grossissement de 500x pour le marquage de la caspase-3 clivée et à un grossissement de 400x pour le marquage du CD31 et du VEGFR2. Pour chacun de ces trois marquages, un total de 12 images a été obtenu à partir de chacune des deux sections longitudinales par rat, comme suit : 3 images de chacune des épiphyses proximale et distale (3 acquisitions sur une ligne transversale sans chevauchement), et 3 images pour chacun des cotés latéral et médial de la diaphyse (3 acquisitions sur une ligne longitudinale sans chevauchement) (Figure 28).



**Figure 28.** Méthode utilisée pour la quantification de l'immuno-marquage de la caspase-3 clivée, du CD31 et du VEGFR2 sur les coupes longitudinales des fémurs gauches des rats. A) acquisitions au niveau de l'épiphyse proximale. B) acquisitions au niveau de la diaphyse. C) acquisitions au niveau de l'épiphyse distale.

En utilisant Image J (National Institute of Health, 1987), le nombre de lacunes apoptotiques, pleines et vides a été déterminé dans une zone de  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$  située au centre de chaque image. Le nombre de chaque type de lacunes comptées a été additionné pour les 12 images d'une même section et additionné pour les deux sections d'un même rat. Ce nombre a ensuite été reporté au nombre des images de comptage pour chaque échantillon. Trois paramètres ont été calculés à partir des images : le nombre de lacunes apoptotiques, le taux d'occupation des ostéocytes (lacunes pleines / lacunes totales  $\times 100$ ) et le taux d'apoptose (lacunes apoptotiques / lacunes totales  $\times 100$ ).

De la même façon et toujours en utilisant le logiciel Image J, le nombre de vaisseaux marqués au CD31 et au VEGFR2 a été déterminé dans une zone de  $400 \times 400 \mu\text{m}^2$  située au centre de chaque image. Le nombre de vaisseaux comptés a été additionné pour les 12 images d'une même section et additionné pour les deux sections d'un même rat. Ce nombre a ensuite été reporté au nombre des images de comptage pour chaque échantillon.

Pour la comparaison des groupes selon les régions anatomiques du fémur, les valeurs sont additionnées par région pour une seule section et additionnées pour les deux sections pour un seul rat, et ensuite reportées au nombre total des images de comptages correspondantes à la région anatomiques concernée.

#### **4.3. PCR quantitative en temps réel**

Les extrémités distales des fémurs droits ont été conservées dans des tubes à -80°C, dépourvues de leurs tissus mous. Pour obtenir l'ADNc (ADN complémentaire) à partir des explants osseux, la première étape de traitement des échantillons est le broyage du tissu osseux afin de récupérer l'ARNm. Etant donné que l'objectif est de récupérer de l'ARNm, l'ensemble des étapes ont été réalisées en condition « RNase free ».

##### **a. Broyage du tissu osseux**

Le broyage osseux a été réalisé en ajoutant une bille (QIAGEN Stainless Steel Beads) à chacun des tubes contenant les échantillons, et les placés ensuite dans le support vibreur de l'appareil broyeur (Retsh® MM 301). Le broyage se fait à une fréquence de 30 Hz/seconde, durant 30 secondes. Le processus a été répété jusqu'à l'obtention d'une poudre d'os. Durant cette étape de broyage osseux, tout le matériel utilisé (les tubes, les échantillons, les portoirs de l'appareil) a été refroidi par l'azote liquide qui facilite le broyage mécanique en rendant cassant le tissu osseux.

Une fois le broyage est terminé on y ajoute du Trizol (TRIZOL® Reagent, Ambion by life technologies N°15596018), dont l'activité RNase préserve les ARNm. Les échantillons ont ensuite été stockés à -80°C pour les étapes suivantes.

##### **b. Extraction de l'ARN**

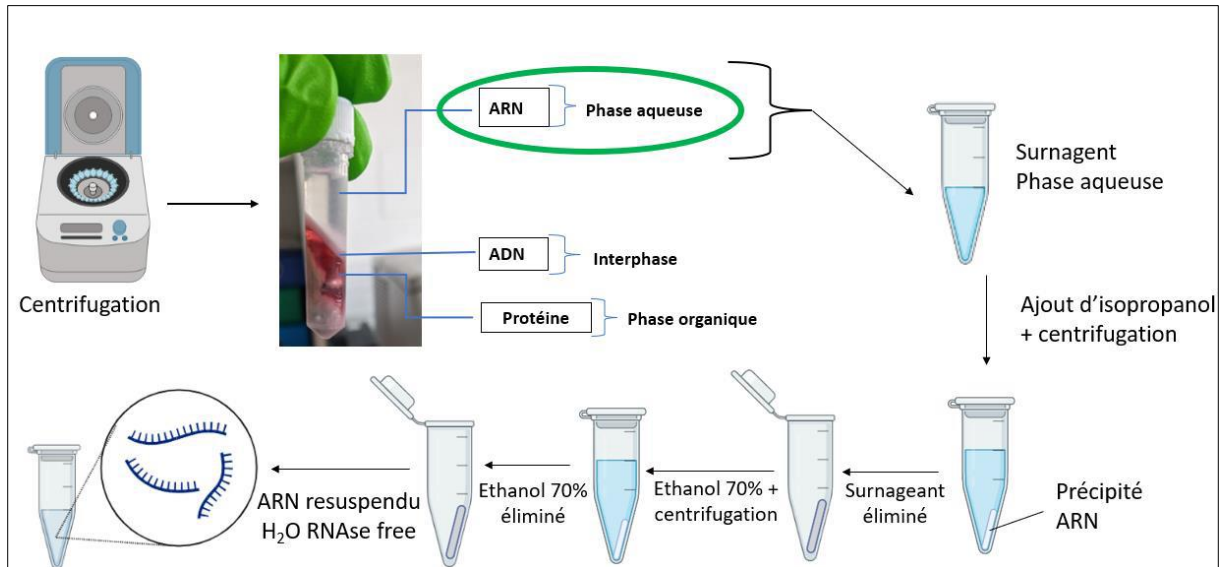
Pour séparer les acides nucléiques (ADN et ARN) des protéines, les broyats osseux baignés dans le tampon de lyse ont été récupérés afin d'y ajouter 200µl de chloroforme (SIGMA – ALDRICH c2432-26ML) qui permet la séparation des phases (Figure 29). Le processus repose sur une différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines. Le tout est centrifugé 10 min à 12 000g à 4°C (Eppendorf Centrifuge 5424 R).

La phase aqueuse (phase supérieur) (figure 29) contenant les ARNm a été récupérée avec un ajout de l'isopropanol (SIGMA 2-Propanol 19516-500ML) qui a pour rôle de précipiter



l'ARNm. La solution a ensuite été incubée 10 min à température ambiante avant d'être centrifugé 10 min 12 000g à 4°C.

Le surnageant est éliminé tout en gardant le culot dont l'ARNm totale est précipité. Le culot est extrincé avec de l'éthanol 70% puis centrifugé 5 min 7 500g à 4°C. Après centrifugation, l'éthanol 70% est éliminé par retournement. Le culot est suspendu dans 40µl d'H<sub>2</sub>O RNase Free (GIBCO Distilled Water DNase/ RNase Free10977-35) puis conservé à -80°C.



**Figure 29.** Les différentes étapes du protocole d'extraction de l'ARN.

### c. Mesure de la Densité Optique (DO)

Cette étape permet de contrôler la pureté des échantillons en ARN. La mesure de la DO a été effectuée à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm et 280nm (MOLECULAR DEVICES SpectraMax®ABS Plus). La mesure a été réalisée en déposant 2µl de l'ARNm par échantillon de rat sur une plaque, qui a ensuite été placée sur un socle puis recouvert d'une lamelle permettant d'égaliser la taille des gouttes de 2µl. Le tout est placé dans le spectrophotomètre pour l'analyse.

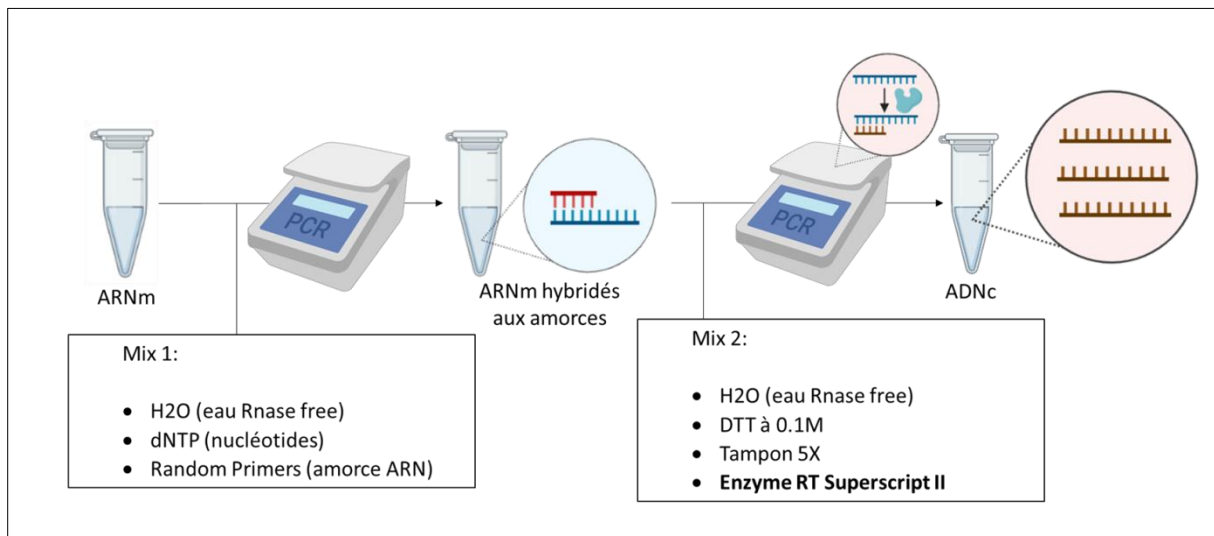
La concentration finale d'ARNm doit être de 100ng/µl. Donc des dilutions des ARN a été effectué en cas de besoin selon la formule suivante «  $C_i \times V_i = C_f \times V_f$  » avec  $C_i$  : concentration initiale obtenue via la DO ;  $V_i$  : le volume initial dans la suspension (20µl) ;  $C_f$  : concentration finale (100ng/µl) et  $V_f$  : le volume final. Le tout a ensuite été stocké à -80°C.

#### d. Reverse transcription (RT-PCR)

Les échantillons précédemment traités ont été récupérés pour y ajouter une solutions « mix-1 » composé de 3 µl H<sub>2</sub>O (eau Rnase free) / tube, 1 µl dNTP (nucléotides) / tube et 1µl Random Primers (amorce ARN) / tube (figure 30). Les tubes ont ensuite été centrifugés puis placé dans le thermocycleur. Les ARNm obtenus seront hybridés avec les « primers », permettant ainsi à l'ADN polymérase de se fixer et de synthétiser les ADNc.

Durant cette étape d'hybridation des « Primers », la solution « mix-2 » a été préparé, qui est composé de 3 µl H<sub>2</sub>O (eau Rnase free) / tube, 2 µl DTT à 0.1M / tube, 4 µl de Tampon 5X / tube et 1µl enzyme RT Superscript II / tube (figure 30). A la fin du cycle du thermocycleur, 10 µl de mix-2 est ajouté par tube. Le tout a été centrifugé puis placé dans le thermocycleur afin de lancer la synthèse de l'ADNc.

Après 1h25, la concentration en ADNc est très élevé dans les tubes. Les tubes ont été dilués au 1/10<sup>e</sup> avec de l'H<sub>2</sub>O puis transféré dans des tubes 0.5 ml. Les échantillons ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

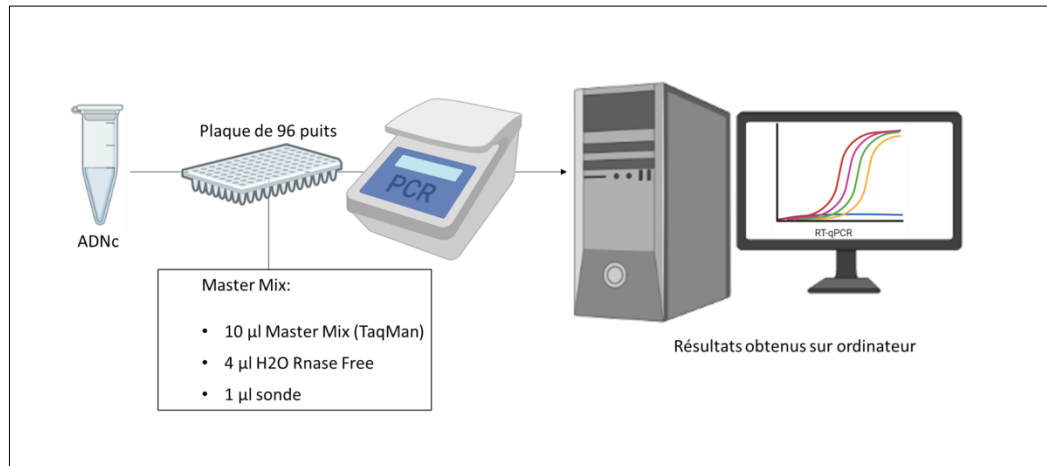


**Figure 30.** Les différentes étapes du protocole de synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN.

#### e. PCR quantitative en temps réel

L'ADNc généré pour chaque échantillon de rat par l'étape de RT-PCR a été récupéré pour y ajouter le mix de la q-PCR qui est composé de 10µl de Master Mix (TaqMan) / puits, de 4µl H<sub>2</sub>O Rnase Free / puits et du 1µl sonde / puits (Figure 31).

Dans une plaque de 96 puits, 15µl du mix ont été placés plus 5µl de ADNc pour un volume final de 20µl/ puits. La plaque a ensuite été centrifugée puis placée dans le thermocycleur afin de lancer la q-PCR en temps réel (Figure 31). L'amplification a commencé à 50 °C pendant 2 min puis 10 min à 95°C comme première étape, suivie de 45 cycles de PCR : à 95 °C pendant 15 s et à 58 °C pendant 1 min successivement.



**Figure 31.** Les différentes étapes du protocole de la PCR quantitative en temps réel.

Pour la recherche des gènes qui nous intéressent, nous avons utilisé les sondes suivantes qui sont des sondes spécifiques et ciblent le 18s : VEGFA, PECAM1, Emcn, Notch1, ANGPT1, Hifa, Dll4, Runx2, BGLAP, SPARC, ALPL1, OPG, MEPE, Sost, PDGFB et PDPN (Voir tableau 2).

**Tableau 2 :** Les sondes des gènes analysés en q-PCR et leurs références commerciales

<b>Sondes</b>	<b>Références</b>
18s	Thermo Fisher Scientific HKG / Eukaryotic 18S rRNA (Hs99999901_s1)
VEGFA	Thermo Fisher Scientific Rn00582935_m1
PECAM 1	Thermo Fisher Scientific Rn01467262_m1
Emcn	Thermo Fisher Scientific Rn01521919_m1
NOTCH 1	Thermo Fisher Scientific Rn01758633_m1
ANGPT1	Thermo Fisher Scientific Rn00585552_m1
HIFa	Thermo Fisher Scientific Rn00577560_m1
Dll4	Thermo Fisher Scientific Rn01512886_m1
Runx2	Thermo Fisher Scientific Rn01512298_m1
BGLAP	Thermo Fisher Scientific Rn01455285_g1
SPARC	Thermo Fisher Scientific Rn00561955_m1
ALPL 1	Thermo Fisher Scientific Rn01516028_m1
OPG	Thermo Fisher Scientific Rn00563499_m1
MEPE	Thermo Fisher Scientific Rn01443747_m1
Sost	Thermo Fisher Scientific Rn00577971_m1
PDGFB	Thermo Fisher Scientific Rn01502596_m1
PDPN	Thermo Fisher Scientific Rn00571195_m1

## 5. Statistiques

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  l'écart type (SD) pour l'analyse micro-CT, et en moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM) pour les analyses histologiques et PCR. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel « GraphPad Prism 6 ». La première étape de l'analyse statistique consiste à tester tout d'abord la normalité des données de chaque groupe en utilisant le test Shapiro-Wilk, puis de tester l'homogénéité des variances par le test F de Fisher. Dans cette étude, l'ensemble de nos données ne suivait pas la loi normale et non homogènes, elles sont donc considérées des données non-paramétriques. De ce fait, la comparaison des 4 groupes est faite par le test « Kruskal-Wallis ». Et le test « U de Mann-Whitney » est utilisé pour comparer entre deux groupes.

Le seuil de significativité est fixé pour  $p < 0,05$ . Les graphiques de ce présent travail ont également été réalisés par le logiciel « GraphPad Prism 6 ».

# **Partie III**

## **Résultats**

Les résultats de ce travail sont présentés sous formes d'études. Chaque étude est présentée d'un résumé contenant une introduction, les matériels et méthodes spécifiquement utilisés, les principaux résultats et la conclusion retenue. Chaque étude est ensuite suivie de l'article faisant l'objet d'une publication. Nos trois études sont :

**Etude I** : Les effets de trois modalités de course sur la qualité de l'os fémoral chez le rat.

- Article : « Comparative effects of various exercise running modalities on rat femoral bone quality ». Wazzani R, Bourzac C, Elhafci H, Germain P, Ahmaidi S, Pallu S, Jaffré C and Portier H.
- L'article sera prochainement soumis dans le journal international « Bone research ».
- Communication affichée « Effects of intermittent, continuous and combined exercise running on femoral bone quality parameters in rats », 'The 27th Annual Congress of the European College of Sport Science between 30 August - 2 September 2022 in Sevilla – Spain'.

**Etude II** : Les effets de trois modalités de course sur la vascularisation de l'os fémoral chez le rat.

- Article : « Effects of a running protocol on femoral vascularization in rats ». Wazzani R, Bourzac C, Pallu S, Elhafci H, Krim S Ahmaidi S, Portier H and Jaffré C.
- L'article est soumis dans le journal international « Bone ».
- Communication affichée « "Mixed exercise", an activity combining intermittent and continuous running: a new approach for bone health? » 'The 49th European Calcified Tissue Society Congress Helsinki, Finland, 09/05/2022-09/05/2022'.

**Etude III** : Les effets de trois modalités de course sur l'expression des gènes du remodelage osseux et de la vascularisation osseuse au niveau de l'os fémoral chez le rat.

- Article : « Different running protocols result in different expressions of bone remodeling and bone vascularization mRNAs ». Wazzani R, Bourzac C, Maroquenne M, Vestris X, Ahmaidi S, Portier H, Jaffré C and Stéphane Pallu.
- L'article est en phase terminale de rédaction et sera publié prochainement.

# Etude I

## Les effets de trois modalités de course sur la qualité de l'os fémoral chez le rat.

### Introduction

Les effets de l'entraînement sur le tissu osseux sont variables selon les études : parfois elles montrent un effet positif [220], parfois un effet négatif [210] et parfois aucun effet [203,215]. De ce fait, il n'y a à l'heure actuelle aucun consensus sur l'effet de l'exercice de course sur l'os. Notre étude a pour objectif l'évaluation et l'analyse des effets des trois modalités de course (continue, intermittente et combinée) sur les paramètres microarchitecturaux trabéculaires, les paramètres de remodelage osseux (apoptose ostéocytaire et résorption ostéoclastique) et les paramètres histomorphométriques corticaux (épaisseur corticale et taux d'occupation ostéocytaire) au niveau fémoral chez le rat wistar.

### Matériels et méthodes

La microarchitecture trabéculaire de l'os fémoral a été évalué par la technique de micro-CT. Cette analyse microscanner a été menée aux épiphyses féromales proximale et distales. Des coupes longitudinales des fémurs gauches des rats ont été utilisée pour analyser les paramètres de remodelage osseux. Pour l'évaluation de l'apoptose ostéocytaire et le taux d'occupation ostéocytaire, nous avons utilisé l'immunomarquage de la caspase-3 clivée. La technique d'histochemie (coloration TRAP) a été utilisée pour mesurer la surface de résorption ostéoclastique. Des coupes transversales des fémurs droits des rats, colorées avec l'hématoxyline-éosine, ont été utilisées pour mesurer l'épaisseur cortical fémorale. Les groupes comprenaient : n=10 pour les groupes contrôle (SED), intermittent (IE) et le groupe continu (EC) et n=9 pour le groupe combiné (COM). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  l'écart type pour l'analyse micro-CT, et en moyenne  $\pm$  l'erreur standard pour les analyses histologiques

### Résultats

L'épaisseur trabéculaire au niveau du fémoral proximal était plus importante dans le groupe d'exercice combiné par rapport aux autres groupes d'exercice, et par rapport au contrôle ( $p < 0,0001$ ). Cependant, la DMO trabéculaire était plus élevée chez le groupe intermittent par rapport aux autres groupes expérimentaux, notamment au niveau de l'os

fémoral proximal. Une diminution de l'épaisseur trabéculaire chez le groupe intermittent vs combiné au niveau du fémur distal a également été enregistrée (tableau ci-dessous).

**Epaisseur trabéculaire et DMO au niveau des extrémités proximale et distale du fémur  
chez nos 4 groupes**

	<i>Paramètres</i>	<i>SED</i>	<i>EI</i>	<i>EC</i>	<i>COM</i>
<i>Fémur proximal</i>	Tb.Th (mm)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.007 ¶	0.11 ± 0.008 ¶	0.13 ± 0.006 *
	Tb.BMD (gHA/cm <sup>3</sup> )	0.6 ± 0.12	0.68 ± 0.04*,§,¶	0.52 ± 0.05 ¶	0.59 ± 0.06
<i>Fémur distal</i>	Tb.Th (mm)	0.09 ± 0.006	0.08 ± 0.006 ¶	0.09 ± 0.004	0.09 ± 0.007

Tb.Th: épaisseur trabéculaire; Tb.BMD: DMO trabéculaire; \* p < 0,05 vs SED; § p < 0,05 vs EC; ¶ p < 0,05 vs COM.

L'épaisseur corticale, le taux d'occupation des lacunes ostéocytaires, le nombre de lacunes ostéocytaires apoptotiques et la surface de résorption ostéoclastique ne diffèrent pas entre les groupes. Des différences statistiques sont parfois notées en fonction de la région anatomique traitée du fémur.

**Conclusion**

Les résultats de la première étude suggèrent premièrement que les réponses osseuses adaptatives diffèrent selon la modalité d'exercice pratiquée. Deuxièmement, que l'exercice combiné a un effet plus important sur la microarchitecture trabéculaire osseuse au niveau de l'os fémoral. L'exercice intermittent améliore la DMO au niveau de l'os trabéculaire proximal fémoral.



# Comparative effects of various exercise running modalities on rat femoral bone quality

Rkia Wazzani <sup>1</sup>, Céline Bourzac <sup>2,3</sup>, Hanane Elhafci <sup>2</sup>, Philippe Germain <sup>4</sup>, Said Ahmaidi <sup>1</sup>, Stéphane Pallu <sup>2,4</sup>, Christelle Jaffré <sup>1</sup> and Hugues Portier <sup>2,4\*</sup>

1 Laboratoire APERE, Université de Picardie Jules Verne, Avenue Paul Claudel F-80000 Amiens, France; [rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr](mailto:rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr), [said.ahmaidi@u-picardie.fr](mailto:said.ahmaidi@u-picardie.fr), [christelle.jaffre@u-picardie.fr](mailto:christelle.jaffre@u-picardie.fr)

2 B3OA Laboratory, CNRS 7052, INSERM 1271, University of Paris, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, France; [celine.bourzac@vet-alfort.fr](mailto:celine.bourzac@vet-alfort.fr), [hugues.portier@univ-orleans.fr](mailto:hugues.portier@univ-orleans.fr), [stephane.pallu@univ-orleans.fr](mailto:stephane.pallu@univ-orleans.fr); [hanane.el-hafci@univ-paris-diderot.fr](mailto:hanane.el-hafci@univ-paris-diderot.fr)

3 Plateforme de recherche biomédicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, F-94700 Maisons-Alfort, France

4 UFR Science & Technique, 1 rue de Chartres Université d'Orléans. F-45100 Orléans, France

\*Correspondence author: [hugues.portier@univ-orleans.fr](mailto:hugues.portier@univ-orleans.fr)

## Abstract

It is now well established that physical exercise is an effective preventive method to reduce and treat certain chronic diseases, particularly musculoskeletal disorders. At the bone level, running exercise is well known for its positive effect on various parameters of bone quality. There is, however, no consensus regarding the effects of different running exercise modalities on bone quality.

**Purpose** Thus, the objective of this study was to compare the effects of three treadmill running modalities: intermittent, moderate continuous, and a combination of both - on bone quality parameters in rats.

**Methods** Thirty-nine, 5 week-old, male Wistar rats were randomly divided in 4 groups: sedentary control (SED; n=10), intermittent running exercise (IE; n=10), continuous exercise (CE; n=10) and combined exercise (COME; n=9). Rats in running groups were exercised 45 min/day, 5 days/week, for 8 consecutive weeks. Femoral micro-architectural parameters were assessed by micro-CT, femoral osteocyte apoptosis, osteoclast resorption and bone histomorphometry were assessed.

**Results** Femoral trabecular thickness in the combined running group was increased ( $p < 0.0001$ ) compared to respective results in the other running groups. The cortical thickness, osteocyte lacunae occupancy rate in whole femur, numbers of apoptotic osteocytes and

osteoclastic resorption surfaces were not significantly different between groups. Statistical differences were occasionally noted depending on the femoral anatomical region.

**Conclusion** These results suggest that the bone response differs according to the running modality.

**Keywords:** intermittent exercise; continuous exercise; combined running; bone quality; femur; rat

## 1. Introduction

Bone is a dynamic living tissue, in which the modeling and re-modeling processes are affected by the mechanical stresses it undergoes [1]. The bone sensitivity to mechanical stresses is achieved through the osteocytes, which represents 90-95% of all bone cells in adult bone tissue) [2]. The activity of this cell associated with other bone cells, i.e. osteoblasts and osteoclasts, constitutes an important parameter of bone quality, with other well-defined multi-scale parameters [3]. These latter include various bone properties, including overall bone geometry, microarchitecture and tissue properties based on cell density, balance of cellular activities, degree of mineralization and collagen stability [3]. Bone quality depends on the level of stress and constraints received by the bone [3].

In the literature, physical exercise is considered as a real constraint applied to the bone [4,5]. Indeed, physical exercise provokes mechanical strains directly affecting the bone through the impact on the ground, torsion, traction of tendons for example [4]. Also, according to Wolff's law (1886), physical exercise leads to modifications causing bone resorption or anabolism, thus modifying the internal architecture and external morphology of the bone [1]. Numerous animal and human studies have demonstrated the importance of physical exercise with an optimal load level to maintain the integrity of the skeleton [6].

Multiple exercise modalities have been studied in animal models. Among them, treadmill running is one of the most widely used protocol to modulate exercise in rats, to study its bone effects [7].

According to a recent review, this kind of exercise protocol have induced positive results on bone tissue in 67.7% of studies analyzed [7]. However, the parameters of this exercise protocol (i. e. intensity duration etc.) differ from one study to another and therefore it is difficult to draw solid conclusions. Indeed, running exercise exists in the literature in different modalities with scattered and controversial effects on bone quality. Most of the protocols for

this exercise focus on running at moderate and continuous intensity, while few studies have focused on the so-called “intermittent” or “interval” running, where a period of rest is inserted between the exercise periods [8–10].

Moderate continuous running induces adaptations in the biomechanical properties of bone [5], in the trabecular bone microarchitecture (increase in the trabecular volume (BV/TV) [5,11], trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular number (Tb.N) [12]), and in bone mineral density compared to the sedentary condition [12,13]. Intermittent running also improved bone mineral density [8,14], the surface area of osteocyte lacunae and their occupancy rate in subchondral bone in osteoarthritis rat model [9] compared to the sedentary condition. However, only one study directly compared the two exercise modalities, demonstrated that intermittent running can improve bone mineral density (BMD) by 20% compared to the moderate continuous running, even with a 30% shorter training period [10]. Moderate continuous running is also known to stimulate bone formation and limit bone resorption to a certain extent. This is sustained by the increase in bone formation biomarkers levels, including osteocalcin, and the decrease in Cross-linked N-Telopeptide of type I collagen (NTx), a bone resorption marker, after training sessions [15].

In spite of all these studies showing the positive effect of running on bone, there are other studies in which no effect [13,16–18], or even a negative effect of running [15,19] were reported.

To date, there is no consensus regarding the effects of intermittent and continuous running on bone quality because there are few comparable protocols for the effects of these modalities on bone. In addition, to our knowledge, there are no studies that have investigated the effects of the combination of these 2 running modalities, i.e. alternating between intermittent and continuous exercise during a training program, on the quality of bone tissue. Therefore, the objective of this study was to compare the effects of three treadmill running modalities: intermittent running, moderate continuous running and the combination of the two, on bone quality in rats.

Combined exercise is expected to have more positive effects on various bone parameters investigated in the present study by accumulating the benefits of both running (intermittent and continuous) modalities.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

Experiments were carried out on thirty-nine 5-week-old, male, Wistar rats. All the rats were housed in controlled facilities (4 rats per standard cage, maintained on a 12h light/dark cycle, at a constant temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A commercial standard diet (Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided ad libitum to all animals.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lariboisiere/Villemin (Paris, France) and by the French Ministry of Agriculture (Paris, France, reference number APAFIS # 9505).

Body weight, body lengths (nose to anus), body mass index ( $\text{BMI} = \text{body weight (g)} / \text{length}^2 \text{ (cm}^2)$ ) [20]) were recorded at the beginning (T0) and end (T8) of the experimental protocol.

### **2.2 Exercise protocol**

Rats were randomly assigned to one of the four following groups: sedentary control (SED) (n=10), intermittent running exercise (IE) group (n=10), continuous running exercise (CE) group (n=10), and combined running exercise (COME) group (n=9). SED rats had only normal movement in their cage as a daily activity. Rats in the exercise groups performed running treadmill exercise 5 days per week, for 8 consecutive weeks.

At the end of the protocol, after induction of general anesthesia with ~5% isoflurane in air, rats were sacrificed by cardiac puncture and exsanguination.

After one week of acclimation, treadmill running learning (25 minutes per day, at different speeds) was carried out during 4 consecutive days before any testing.

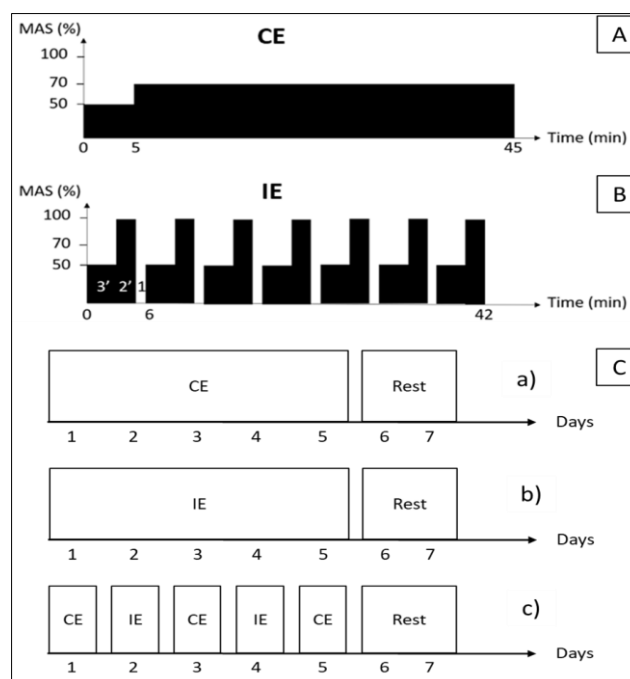
#### **a. Maximal aerobic speed test**

To determine running speeds, each rat underwent a maximal aerobic velocity (MAS) test on day 5 of running acclimation, following the progressive running test protocol [21]. The test began with a warm-up session at an incline of  $10^\circ$  and a speed of 13 m/min for 5 min, followed by increments of 4 m/min every 2 min until 17 min was reached, and then increments of 4 min/min every 1min30s. The test was conducted until the rats could no longer keep up with the treadmill speed, despite 2 consecutive stimulations with compressed air sprays. The test was therefore stopped and the last fully sustained incremental speed was defined as the rat's MAS.

A MAS test was also performed at the end of the exercise protocols to validate the exercise program.

### b. Treadmill running protocol

The 8-week exercise protocol consisted of different running modalities depending on the group involved. Continuous running consisted of running at a constant pace for 45 min per day at 70% (MAS) intensity (Fig. 1 (A)), intermittent running consisted of 7 repetitions of 3-min blocks at 50% MAS, followed by 2 min at 100% MAS and 1 min of passive rest (Fig. 1(B)), and combined exercise was built on an alternation of continuous and intermittent running over the week (Fig. 1C).



**Fig. 1** Running exercise protocols. A) Continuous exercise (CE) and B) Intermittent exercise (IE) modalities. C) Running protocols for the different groups. a) Protocol for CE group, b) protocol for IE group and c) protocol for combined exercise group (COME) consisting of alternation of running modalities (IE and CE) during the week.

### c. Average Intensity training.

It is considered that rats are walking under 10 m/min [22], are running at slight speed until 15 m/min [23], are running at moderate speed until 20 m/min [24,25], and are running at intense speed above 20 m/min [22]. Intensity scores were adapted in order to obtain three intensity levels (I#1, I#2 and I#3) corresponding to three coefficients (I#1: low speed  $\leq$  15 m/min,

coefficient 1; I#2 moderate speed: 15 to 20 m/min, coefficient 2; I#3 intensive speed: >20 m/min, coefficient 3). Then, scores were calculated based on the following equation [10,26]:

$$\text{Intensity score} = \frac{(\text{time spent at I\#1}) \times 1 + (\text{time spent at I\#2}) \times 2 + (\text{time spent at I\#3}) \times 3}{\text{total time}}$$

The intensity score (in arbitrary unit) was calculated each week for the tree training groups. Then, the averaged intensity score was calculated as the mean value of each week's score. This score gives information about the difficulty of the exercise. The higher the score is, the more difficult the exercise is (Table 1).

**Table 1:** Mean intensity training

	<b>IE</b>	<b>CE</b>	<b>COME</b>
Averaged Intensity scores (a u)	1.64	1.71	1.68

IE: interval exercise. CE: continuous exercise, COME : Combined exercise. Intensity scores were calculated as described in Materials and Methods section (arbitrary unit).

### **2.3 Blood collecting**

During exsanguination, cardiac blood was collected on heparinized tubes, immediately cooled and centrifuged at 700 g at 4°C for 10 min and plasma stored frozen at -80°C until assays were performed.

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

Cross linked N-Telopeptide of type I collagen (NTx), a bone resorption marker, 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, and Immunotopics, Inc., San Clemente, CA, USA, respectively) following the manufacturers' instructions. The intra-/inter-assay coefficients of variation and limit of detection for NTx were < 12 % and 2.47 ng/mL respectively. The intra-/inter-assay coefficients of variation and limit of detection for PTH were < 8.9 % and 3 pg/mL respectively.

## **2.4 Bones collecting and parameters**

Femurs were retrieved and cleared of soft tissue then stored and fixed in 4% v/v paraformaldehyde at 4°C until further analysis.

### **a. Bone morphometric parameters**

Immediately after sacrifice and removal of connective tissue, the length of the left femurs, the antero-posterior (AP) and the latero-medial (LM) diameters were measured using a digital caliper (resolution 0.1 mm: Werckmann®, Netherlands).

### **b. Bone analysis by in-vitro micro-Computed Tomography ( $\mu$ CT)**

The left distal and proximal femur of each rat were imaged using a high-resolution in-vitro  $\mu$ CT (Skyscan 1172, Bruker, Belgium). For micro-architectural parameters and trabecular bone mineral density, the  $\mu$ CT images were acquired at the following setting: source voltage 80 kV, source current 100  $\mu$ A, matrix 1000x668, exposure time 175 ms, rotation step 0.3-degree, frame averaging 10, filter aluminum 0.5 mm thick, pixel size 9.81  $\mu$ m. Images were reconstructed using NRecon software, 16 bits (v1.7.0.4, Skyscan). They were then segmented into binary images using simple global thresholding methods, because of the low noise and good resolution of the data sets.

Image analysis was performed using CTAn software (v1.6.1, Skyscan). For trabecular microarchitectural and BMD evaluation, trabecular volumes of interest (VOI) were determined by manually drawing a region of interest (ROI) following the endocortical boundaries every 20 images on a subset of 200 images located immediately distal to the ventral border of the femoral head for the proximal part of the femur, and immediately proximal to the distal growth plate for the distal part of the femur. The software extrapolated the ROI between drawn ones. Trabecular BMD (Tb.BMD, gHA/cm<sup>3</sup>) was computed from the VOI using hydroxyapatite phantoms for calibration [27]. The trabecular bone variables retrieved also included trabecular bone volume fraction Tb.BV/TV (bone volume/tissue volume, i.e. bone volume fraction, %), trabecular number Tb.N (1/mm), trabecular spacing Tb.Sp (mm) and trabecular thickness Tb.Th (mm) [27].

### **c. Bone histology and immunohistochemistry analysis**

After fixation, the diaphysis of the right femurs and the whole left femurs were decalcified with EDTA 177 g/L, pH 7.0–7.3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) during 4 weeks, then embedded in paraffin, and cut to a thickness of 4-5  $\mu\text{m}$  with a microtome (cross sections for the right femur diaphysis, and longitudinal sections for the left femurs). Before staining, all tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of graded alcohols (100, 90, 80, 70, and 40 %), with a final rinse in water.

#### **c.i. Bone histomorphometrical analysis**

Right femur cross-sections were stained with Harris hematoxylin (10047107, VWR Chemicals) and eosin (117081, VWR Chemicals).

The diaphyseal cortical thickness was evaluated by histomorphometric analysis. Images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 10x magnification. Using the dedicated Keyence toolbox, the cortical thickness was measured at 8 different locations on 3 consecutive sections in distal diaphysis. The results obtained were averaged to obtain a mean cortical thickness per rat, and a mean cortical thickness for the cranial, caudal, lateral and medial regions.

#### **c.ii. Bone histochemical analysis (TRAP)**

Longitudinal sections from the left femurs were used for histochemical labelling of the Tartrate-Resistant Acid Phosphatase activity (TRAP labeling).

TRAP labelling is a histochemical method that produces staining using reaction of Naphthol AS-TR substrate [28]. The enzymatic detection of acid phosphatases was performed with a defined concentration of naphthol substrate (naphthol AS-TR) (16mg in 1ml of dimethylformamide) and of tartaric acid (100mg of tartaric acid per 100ml of prepared solution) After coating all samples with our solutions, they were incubated in a humidity chamber at 37°C for one hour. The counter-staining was performed with hematoxylin for one minute. The TRAP labelling, when positive, gave a red fading, indicating osteoclastic bone resorption.

Images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 200x magnification. Six images, i.e. 3 images from both proximal and distal epiphyses (each set of 3 being on a transversal line without overlap), were obtained for each of two longitudinal sections per rat. Using the image processing software “ImageJ” (National Institute of Health,



1987), and through color convolution, contrast adjustment, threshold and noise suppression tools, the TRAP labelling was quantified for all samples. We set as a quantification parameter "the area of osteoclastic bone resorption", testifying to osteoclastic bone resorption activity. This parameter is calculated as the percentage of resorption area (red discoloration area) related to the total area of the images, which was the same in the different experimental groups.

### **c.iii. Bone immunohistochemistry analysis**

Longitudinal sections of the left femur were used to evaluate the osteocyte apoptosis, using immunostaining for cleaved caspase-3. Cleaved caspase-3 is known to be an effector caspase in the cell death process, and therefore an important marker of the initiation of cell apoptosis [29]. Samples were incubated overnight at 4°C with an anti-cleaved caspase-3 antibody (cleaved caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb #9664, Ozyme, 1/400 dilution), [30]. Samples were then incubated for 30 min in a humid chamber at room temperature with the secondary antibodies (SignalStain Boost IHC Detection Reagent, HRP, Rabbit, Ozyme, diluted).

The revelation was performed with DAB (SignalStain DAB Substrate Kit #8059, Ozyme, diluted) incubation for 10 min (for adequate staining intensity). The chromogen DAB reacts chemically with the HRP enzyme coupled with cleaved caspase-3 secondary antibody, therefore inducing a brown fading. Finally, the counter-staining was performed with hematoxylin for one minute. Images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 500x magnification. A total of 12 images was obtained from each of two longitudinal sections per rat, as follows: 3 images from each of the proximal and the distal epiphysis (each set of 3 images being on a transversal line without overlap), and 3 images for each of the lateral and medial aspects of the diaphysis (each set of 3 images being on a longitudinal line without overlap). Using Image J (National Institute of Health, 1987), the numbers of full (living osteocyte, counterstained with hematoxylin), apoptotic and empty lacunae were determined in an area of 400 x 400  $\mu\text{m}^2$  located in the center of each image. The number of each type of lacunae counted was reported on the counting area for each image. Then the values were summed for all 12 images and was added together for the 2 sections for a single rat. Three parameters were retrieved from the images: the numbers of apoptotic lacunae, the osteocyte occupancy rate ("full lacunae/total lacunae" x 100), and the apoptosis rate ("apoptotic lacunae/total lacunae" x 100).

## 2.5 Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Descriptive data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for the micro-architectural parameters, and as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for the histological parameters. After the normality tests, and because the data were non-parametric, the Kruskal-Wallis test was used to compare the four groups. A U-Mann-Whitney test was then performed, when applicable, to compare between 2 groups. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Body and femurs parameters

Results are summarized in Table 1. The weight, the length and the BMI were similar between groups at the end of the protocol. The measured lengths of the femurs were similar between the different experimental groups.

The weight gains were not statistically different between groups at the end of the protocol (T8).

### 3.2 Maximal aerobic speed

Maximal aerobic speeds (MAS) did not statistically differ between groups at the beginning of the study. Compared to respective results at T0, an increase in the MAS at T8 was observed in each exercise group, whereas the MAS in the sedentary group remained similar (Table 1), validating the exercise program.

**Table 2:** Body and femurs parameters at T0 (beginning of the study), and T8 (end of the running protocol); MAS at T0 and T8 in SE and exercised groups (IE, CE, COME).

<i>Parameters</i>	<i>Time</i>	<i>SED</i>	<i>IE</i>	<i>CE</i>	<i>COME</i>
<i>Weight (g)</i>	T0	199 $\pm$ 8	197 $\pm$ 7	192 $\pm$ 6 * <sup>¶</sup>	201 $\pm$ 9
	T8	492 $\pm$ 36	475 $\pm$ 31	486 $\pm$ 33	491 $\pm$ 16
<i>Rat Length (cm)</i>	T0	19.8 $\pm$ 0.5	19.8 $\pm$ 0.4	19.7 $\pm$ 0.4	19.6 $\pm$ 0.5
	T8	26.7 $\pm$ 1.1	26.4 $\pm$ 0.6	26.4 $\pm$ 0.6	26.5 $\pm$ 0.7

<i>Rat BMI</i> (g/cm <sup>2</sup> )	T0	0.51 ± 0.02	0.5 ± 0.02 ¶	0.49 ± 0.01 ¶	0.53 ± 0.03
	T8	0.69 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.04
<i>MAS (m/min)</i>	T0	28 ± 9	32 ± 5	33 ± 6	31 ± 8
	T8	23 ± 6	34,7 ± 11 *	33 ± 8 *	37 ± 3 *
<i>Femurs parameters</i>	<b>Time</b>	<b>SED</b>	<b>IE</b>	<b>CE</b>	<b>COME</b>
	<i>Length (cm)</i>	T8	37.9 ± 1.3	38.6 ± 0.9	38.2 ± 1.4
<i>AP diameter</i>	T8	3.2 ± 0.7	3.2 ± 0.6	3.6 ± 0.5	3.6 ± 0.9
<i>LM diameter</i>	T8	3.9 ± 0.6	3.9 ± 0.6	4 ± 0.9	4.2 ± 1

BMI: body mass index; MAS: maximal aerobic speed; AP: anteroposterior; LM: lateromedial; n=10 for SED, n=10 for IE, n=10 for CE and n=9 for COME. T0: beginning of the study; T8: end of the running protocol; T1: after 1 week of running protocol. \*p < 0,05 vs SED; ¶ p < 0,05 vs COME.

### 3.3 Femoral trabecular micro-architecture parameters

Results are summarized in Table 2. In the combined exercise group, the trabecular thickness in the proximal femur was increased compared to respective results in the other exercise groups. In the distal femur, however, the trabecular thickness was increased compared to respective results in the IE group only. In contrast, the Tb.BMD in the proximal femur was increased in the IE group compared to respective results in the other experimental groups (p<0.05).

**Table 3:** Femoral micro-architectural and trabecular bone mineral density parameters in SED and the different exercise groups (IE, CE, COME) at proximal and distal parts.

	Parameters	SED	IE	CE	COME
<i>Proximal femur</i>	<b>BV/TV (%)</b>	43.57 ± 5.99	42.05 ± 4.02	43.12 ± 3.43	46.63 ± 3.88
	<b>Tb.N (1/mm)</b>	3.72 ± 0.40	3.63 ± 0.49	3.72 ± 0.36	3.41 ± 0.33
	<b>Tb.Th (mm)</b>	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.007 ¶	0.11 ± 0.008 ¶	0.13 ± 0.006 *
	<b>Tb.Sp (mm)</b>	0.06 ± 0.007	0.07 ± 0.004	0.06 ± 0.008	0.07 ± 0.007
	<b>Tb.BMD (gHA/cm3)</b>	0.6 ± 0.12	0.68 ± 0.04*,§,¶	0.52 ± 0.05 ¶	0.59 ± 0.06
<i>Distal femur</i>	<b>BV/TV (%)</b>	39.42 ± 6.8	35.93 ± 5.10	39.88 ± 6.97	42.83 ± 8.08
	<b>Tb.N (1/mm)</b>	4.11 ± 0.54	4.04 ± 0.56	4.27 ± 0.63	4.36 ± 0.55
	<b>Tb.Th (mm)</b>	0.09 ± 0.006	0.08 ± 0.006 ¶	0.09 ± 0.004	0.09 ± 0.007
	<b>Tb.Sp (mm)</b>	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
	<b>Tb.BMD (gHA/cm3)</b>	0.40 ± 0.06	0.40 ± 0.07	0.41 ± 0.08	0.46 ± 0.12

BV/TV: bone volume fraction; Tb.N: trabecular number; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.Sp: trabecular spacing; Tb.BMD: trabecular bone mineral density; n=10 for SED, n=10 for IE, n=10 for CE and n=9 for COME. \*p < 0,05 vs SED; § p < 0,05 vs CE; ¶ p < 0,05 vs COME.

### 3.4 Bone histomorphometrical parameters

#### a. Femoral cortical bone thickness

The mean cortical bone thickness did not significantly differ between the groups. Looking at the various anatomical regions, the cortical thickness only differed in the medial region, where it was lower ( $p < 0.05$ ) in the IE groups than the respective results in the CE and SED groups (fig 2).

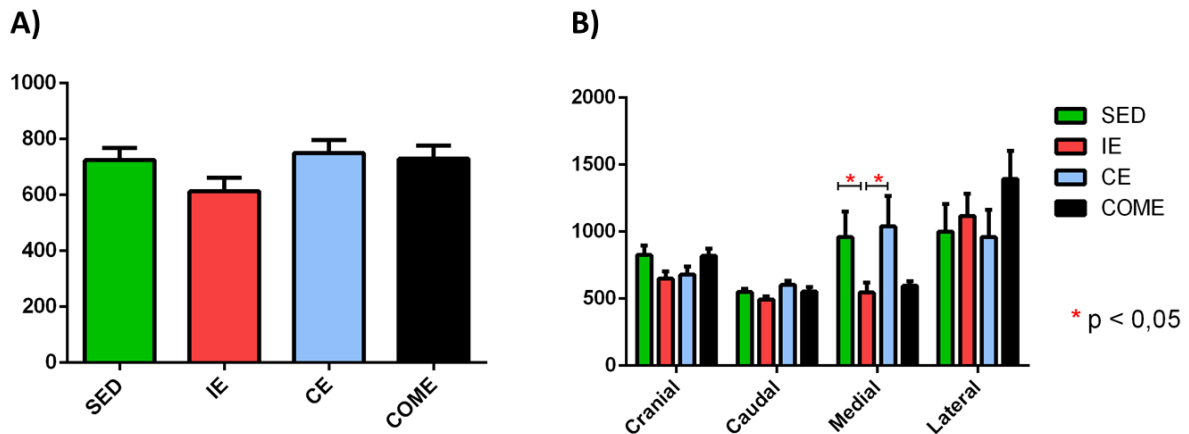


Fig. 2 Cortical bone thickness in the femoral diaphysis from sedentary (SED) and exercise groups (IE: intermittent exercise; CE: continuous exercise; COME: combined exercise). A) Mean cortical thickness for the whole diaphysis, and B) Mean cortical thickness per anatomical region, measured on transversal sections ( $n=10$  for SED;  $n=10$  for IE,  $n=10$  for CE and  $n=9$  for ME). Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

#### b. Osteocyte lacunar density

The osteocyte occupancy rate statistically differed neither in the whole femur nor in the different anatomical regions (proximal epiphysis, diaphysis, and distal epiphysis) between the groups (Table 4). A representative image of the coloring is given in the Fig.3 (A).

**Table 4:** The osteocyte occupancy rate in the whole femur and in the different anatomical locations of the femur in SED and the different exercise groups (IE, CE, COME).

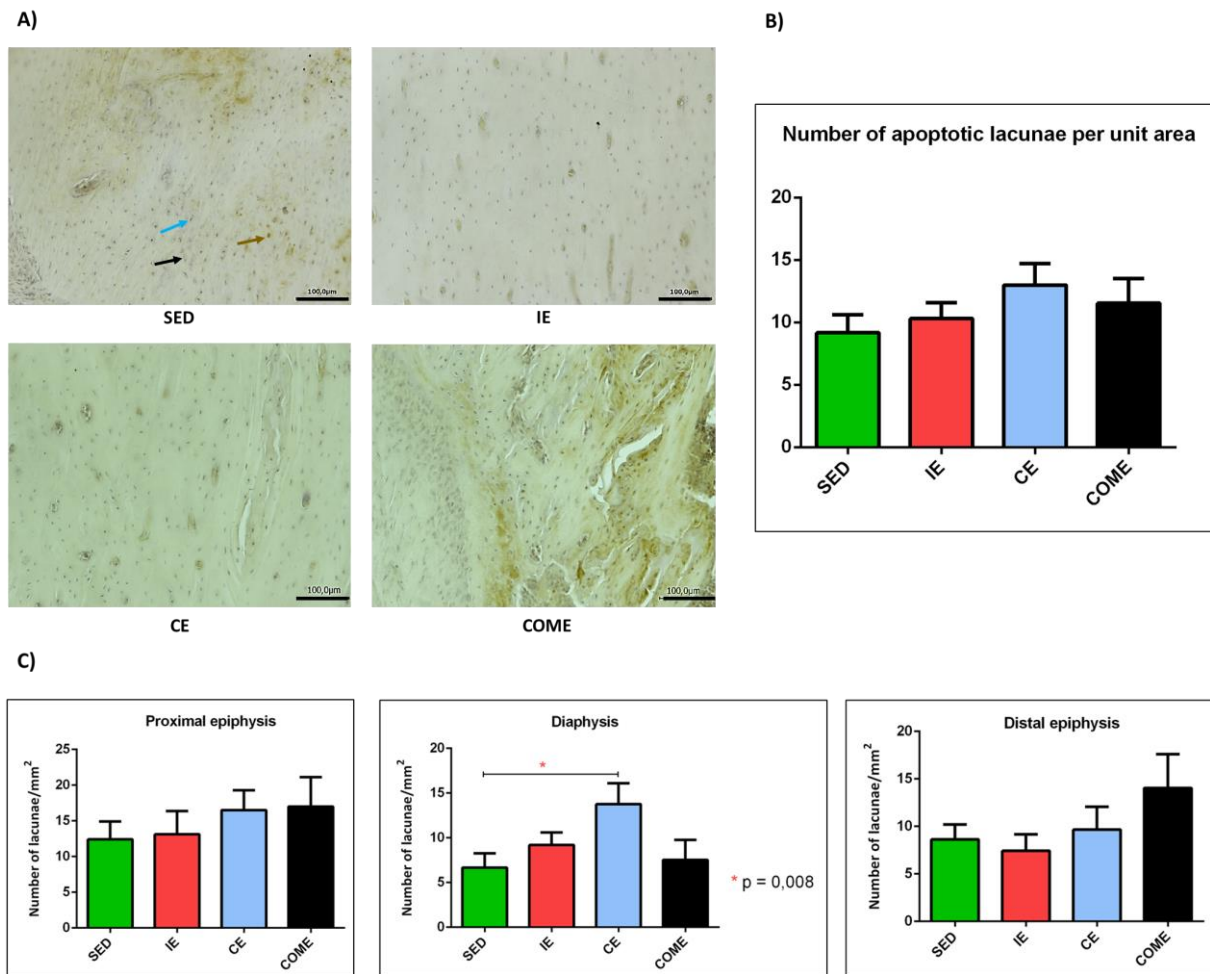
osteocyte occupancy rate		SED	IE	CE	COME
<b>Whole femur</b>	Total	87.63 ± 3.5	84.27 ± 3.4	81.41 ± 6.8	82.69 ± 7.9
<b>femur locations</b>	Proximal epiphysis	83.65 ± 5.8	81.82 ± 7.4	78.32 ± 4.4	77.64 ± 10
	Diaphysis	90.9 ± 4.57	86.08 ± 4.1	81.57 ± 8.5	86 ± 10.7
	Distal epiphysis	85.01 ± 8.9	84.82 ± 6.3	82.75 ± 10.9	81.58 ± 9.29

n=10 for sedentary group (SED); n=10 for intermittent exercise group (IE); n=10 for continuous exercise group (CE) and n=8 for combined exercise group (COME).

### 3.5 Bone histochemical and immunohistochemical results

#### a. Osteocyte apoptosis

The total numbers of apoptotic lacunae assessed by cleaved caspase-3 immunostaining were not significantly different between the groups (fig. 3 (B)). However, a slightly statistically insignificant higher number of apoptotic osteocytes ((p=0.008) was observed in the diaphysis from CE rats, compared to respective results in SED rats (fig. 3 (C)).



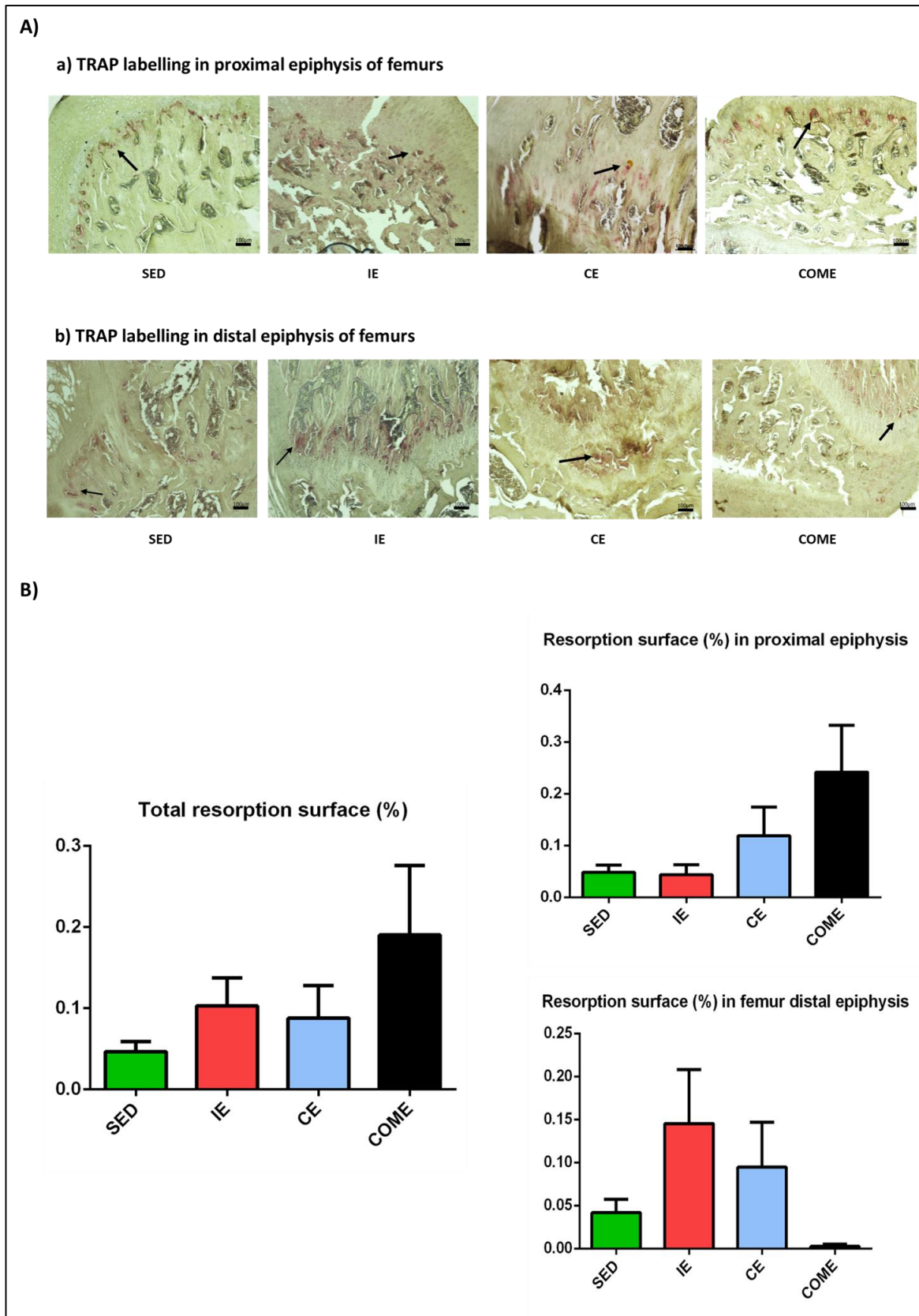
**Fig. 3** Osteocyte lacunae apoptosis in the femur (longitudinal sections) from sedentary (SED) rats and rats subjected to intermittent running (IE), continuous running (CE) and combined running (COME). A) Representative picture fields for the quantification of apoptotic lacunae for the different groups by cleaved caspase-3 immunohistochemical staining. Black arrows indicate apoptotic lacunae; blue arrows indicate full lacunae containing an osteocyte. B) Relative result for the total number of apoptotic lacunae in the different groups. C) Relative result for the number of apoptotic lacunae in the different anatomical locations of the femurs (proximal epiphysis, diaphysis and distal epiphysis); n=10 for SED , n= 10 for IE , n=10 for CE and n=8 for COME . Scale bar = 100µm. Data are presented as means ± SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

Similarly, the osteocyte apoptotic rate for the whole femur did not statistically differ between the groups and a higher rate of apoptosis in the diaphysis of CE rats was observed, compared to respective results from both COME and SED rats ( $p=0.005$  and  $p=0.03$  respectively).

### **b. Osteoclastic bone resorption (TRAP labeling)**

The representative images of the TRAP labeling are given in fig. 4 (A). The overall surface of osteoclastic bone resorption and the surface of osteoclastic bone resorption in both the proximal and distal epiphyses, measured following TRAP labelling, were not significantly different between the groups (fig. 4 (B)).





**Fig. 4** Osteoclastic bone resorption surface in the femur longitudinal sections from sedentary (SED) and rats subjected to intermittent running exercise (IE), continuous running exercise (CE) and combined running exercise (COME). A) Representative picture fields for the

quantification of TRAP labelling in the proximal and distal epiphyses of the femurs in the different groups. Black arrows indicate osteoclastic bone resorption surface. B) Relative results of resorption surface (%) in whole femurs (total resorption surface) and in the proximal and distal epiphyses; n=10 for SED, n= 10 for IE, n=10 for CE and n=8 for ME. Scale bar = 100µm. Data are presented as means ± SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

### **3.6 Systemic bone turnover markers**

At the end of the protocol, the total plasmatic concentrations ALP, NTx and PTH were not statistically different between the experimental groups.

## **Discussion**

To our knowledge, the present study is the first to compare the effects of three different running modalities (intermittent running, moderate continuous running, and combination of the 2) on various bone quality parameters.

The results of this study showed that combined exercise increases the trabecular thickness, particularly in the proximal femur, while continuous exercise improves trabecular BMD. In contrast, in the distal femur, intermittent running activity decreases the trabecular thickness. The other bone parameters (cortical thickness, osteocyte density and viability, osteoclastic resorption activity) did not differ between the different groups in the whole femur. Some significant differences were, however, observed between the groups, according to the anatomical regions of the femur. Because there was no difference for the average intensity (work load) between the three exercise groups, it is possible to compare the results of this study. The results of the studies on the effect of running exercise on bone are heterogeneous that the results are not comparable because the protocols are not identical in terms of overall intensity, duration and frequency [7,10,12,31]. Continuous running is well known in the literature to improve trabecular bone structure and microarchitecture. For instance, this type of training induces adaptations in the tibial trabecular bone after 3 weeks of exercise in young male rats [22]. Compared to sedentariness, it also increases tibial trabecular volume and number by 25% and 21% respectively [31] These increases are associated with thicker trabeculae and reduced trabecular spacing [31]. In the femur, 10 weeks of continuous endurance exercise improves bone strength and positively alters trabecular bone

microarchitecture [12]. More specifically, it increases trabecular thickness, trabecular numbers and trabecular bone volume [12]. Similarly, continuous training for 12 weeks increases the trabecular bone volume in the tibia in rat [11].

Taken together, these data show that the length of running protocols is a factor affecting the adaptive responses in the bones. In the context of bone healing, a recent study in rats showed that 8 weeks of preventive continuous running improves BV/TV in a healing tibial defect as early as 2 weeks following a non-critical bone defect surgery, whereas it improves BV/TV in the healing femur defect only after 4 weeks [21]. Another key factor is the anatomical site within a bone, as reported by Iwamoto et al., 1999, who showed that continuous running exercise improves the trabecular bone parameters in the distal tibia to a greater extent than in the proximal tibia [32]. The results of these studies suggest that the adaptation of trabecular bone to continuous moderate treadmill exercise is site-specific. This is likely due to variations in the distribution of mechanical stresses according to the site. This theory could explain our result concerning the Tb.BMD, which was also different between the groups, in the proximal but not in the distal femur.

The Tb.BMD was the highest in the intermittent running group, whereas the lowest value was recorded in the continuous running group. Data in the literature show that compared to sedentariness, intermittent running consistently improves femoral [8,14] and tibial BMD [9]. In addition, in the study by Joo et al., 2003, the increase in BMD was recorded in the proximal and distal femoral metaphysis but not in the epiphyses [12]. The comparison between these two protocols showed that intermittent running improved BMD of the whole body and femur in rats by more than 20% compared to moderate continuous running even with a 30% shorter training period [10]. This can be explained by the important and adequate stimulation by intermittent running of cell communication via interstitial bone fluid flow. Indeed, bone cell communication is mediated by molecules that are released in greater quantities with fluid flow [33]. These molecules are known to promote bone formation and bone remodeling and are modified by exercise. For example, compared to sedentary rats, a decreased level of sclerostin (secreted element inhibiting bone formation) is recorded in rats subjected to cycles of intermittent running exercise and free-fall exercise [34].

Our results showed no effect of different exercise protocols on other femoral microarchitectural parameters (Tb.N and Tb.Sp). Previous studies in the literature report no effect of exercise on femoral bone microarchitecture [35], or even a deleterious effect of continuous running in the tibia [19]. However, no data exist on combined-type running.

Considering cortical bone parameters, our results showed no significant differences in whole cortical bone thickness between the different groups. Although not statistically significant, however, continuous and combined running decreased the osteocyte occupancy rate, both in the whole femur and at each of the proximal and distal epiphyses, and diaphysis, compared to respective results in the intermittent and sedentary groups. Continuous running usually has no effect or even a negative effect on cortical bone in short duration protocols [15,36]. In contrast, extending this protocol over longer periods (10-12 weeks) allow for cell responses that translate into higher numbers of osteocytes [5,37]. This reinforces the hypothesis that important adaptive responses are conditioned by more enduring and longer running protocols. As for intermittent running, recent studies have demonstrated its effect in increasing femoral cortical thickness [38] and osteocyte occupancy rate by more than 60% compared to sedentariness [9]. To date, only one study compared intermittent and continuous running, showing a 50% higher osteocyte occupancy rate in the tibia in the intermittent running group compared to respective results in the continuous running group [39]. This is in contrast with the study herein and may be explained by the differences in intensity and distribution of stresses between the femur and tibia due to the relative orientation of these bones when the limb contacts the ground, and resulting in an attenuation of the mechanical stimulus in the femur compared to the tibia [40].

Moreover, the difference in the effect of these two running protocols (intermittent and continuous running) could be explained by the difference in the mechanical loads applied during each protocol. The continuous load applied to the osteocyte can be considered very important, thus causing an imbalance in the remodeling process. However, the qualitative notion of rest inserted during intermittent running seems to be an indicator and a criterion of physical practice performance. The benefit of this resting time can be summed up in its necessity to regain sufficient sensitivity to mechanical strains in order to benefit as much as possible from the exercise performed [41]. Indeed, it has been shown in the literature that after a few minutes of exercise, bone sensitivity to stress decreases. Therefore, passive recovery phases (resting time) are desirable to restore the osteocyte's receptivity to the induced constraints [42]. This may therefore also explain the propensity of moderate continuous and combined exercises to have more apoptotic osteocyte lacunae compared to sedentariness and intermittent exercise.

No differences were observed in the whole femur or the proximal and distal femur for osteoclastic activity assessed by TRAP labelling between the groups. Although not statistically significant, greater osteoclastic activity was recorded in the combined exercise group for the whole femur and the proximal femur. In the distal femur, however, a higher osteoclastic resorptive surface was recorded in the intermittent running group. Previous studies have reported osteogenic and positive effects of continuous moderate [19,43] and intermittent [39] running exercise on osteoclastic cells in the tibia. These positive effects on the osteoclastic lineage have been previously reflected by a decrease in the number of these cells [19,43], or by a decrease in the osteoclastic resorption surface [39]. A significant increase in osteoclastic resorption activity has been observed in the continuous running group compared to respective results in the intermittent running group by George et al., 2022 [39]. This suggests again a variability in mechanical constraints applied to the bone between these two protocols, and consequently, a variability in bone adaptive responses according to the running protocol.

To our knowledge, unfortunately there are no studies in the literature about the effect of a combined exercise on cortical parameters in order to discuss the results obtained with regard to this type of exercise in the best possible way. Such a training program was chosen and defined in the present study in order to imitate the reality of sports practice in athletes and patients. It is important to mention that the controversial results showed by our study obtained regarding this training method (absence of effect or even negative effect of this modality on bone), could be explained by the increased mechanical stress for the animals while the alternation between the two different protocols. Indeed, the difficulty of the rats in this group to perform this combined running protocol prevented the practice of the exercise in a regular way. As a consequence, a dispersion of the results within the group was observed. A prolonged rest period should have been implemented to avoid putative mechanical overload by the combined running protocol.

Elsewhere we had tried to explain the effects of running on bone tissue by analyzing systemic markers of bone remodeling. We have noticed that none of these markers was affected by the running protocols studied. In this study, most of the parameters studied were not affected by exercise. This could be due to the short length of exercise to have effects especially at the

femur, a site distant from the impact point. Indeed, in comparison with the tibia, the femur represents an anatomical site that receives less mechanical stress in rats, because of its horizontal position at the time of impact with the ground. Therefore, we believe that the adaptive responses at the tibial level will be more important than at the femoral level.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge all the participants in this study. We thank Christine Chappard, Morad Bensidhoum, Sara Krim and Louis Lebreton for technical support.

### **Formatting of funding sources**

This research was funded by “EnvA appel à projet 2018”.

### **Disclosures**

No conflicts of interest are declared by the authors.

## REFERENCES

1. Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1986; ISBN 978-3-642-71033-9.
2. Bonewald, L.F. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011, 26, 229–238, doi:10.1002/jbmr.320.
3. Fonseca, H.; Moreira-Gonçalves, D.; Coriolano, H.-J.A.; Duarte, J.A. Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility. *Sports Med* 2014, 44, 37–53, doi:10.1007/s40279-013-0100-7.
4. Rubin, C.T.; Lanyon, L.E. Regulation of Bone Formation by Applied Dynamic Loads. *J Bone Joint Surg Am* 1984, 66, 397–402.
5. Vicente, W.S.; dos Reis, L.M.; Graciolli, R.G.; Graciolli, 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, doi:10.1371/journal.pone.0064725.
6. Barlet, J.P.; Coxam, V.; Davicco, M.J. [Physical exercise and the skeleton]. *Arch Physiol Biochem* 1995, 103, 681–698, doi:10.3109/13813459508998138.
7. Portier, H.; Benaitreau, D.; Pallu, S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life (Basel)* 2020, 10, E217, doi:10.3390/life10100217.
8. Nakajima, D.; Kim, C.S.; Oh, T.W.; Yang, C.Y.; Naka, T.; Igawa, S.; Ohta, F. Suppressive Effects of Genistein Dosage and Resistance Exercise on Bone Loss in Ovariectomized Rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2001, 20, 285–291, doi:10.2114/jpa.20.285.
9. Boudenot, A.; Presle, N.; Uzbekov, R.; Toumi, H.; Pallu, S.; Lespessailles, E. Effect of Interval-Training Exercise on Subchondral Bone in a Chemically-Induced Osteoarthritis Model. *Osteoarthritis Cartilage* 2014, 22, 1176–1185, doi:10.1016/j.joca.2014.05.020.
10. Boudenot, A.; Maurel, D.B.; Pallu, S.; Ingrand, I.; Boisseau, N.; Jaffré, C.; Portier, H. Quick Benefits of Interval Training versus Continuous Training on Bone: A Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Comparative Study. *Int J Exp Pathol* 2015, 96, 370–377, doi:10.1111/iep.12155.
11. 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, doi:10.1016/s8756-3282(98)00189-6.
12. 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, doi:10.1016/s8756-3282(03)00212-6.

13. Hamann, N.; Kohler, T.; Müller, R.; Brüggemann, G.-P.; Niehoff, A. The Effect of Level and Downhill Running on Cortical and Trabecular Bone in Growing Rats. *Calcif Tissue Int* 2012, 90, 429–437, doi:10.1007/s00223-012-9593-6.
14. Chen, X.; Aoki, H.; Fukui, Y. Effect of Exercise on the Bone Strength, Bone Mineral Density, and Metal Content in Rat Femurs. *Biomed Mater Eng* 2004, 14, 53–59.
15. 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. *Joint Bone Spine* 2013, 80, 492–498, doi:10.1016/j.jbspin.2012.12.005.
16. Chang, T.-K.; Huang, C.-H.; Huang, C.-H.; Chen, H.-C.; Cheng, C.-K. The Influence of Long-Term Treadmill Exercise on Bone Mass and Articular Cartilage in Ovariectomized Rats. *BMC Musculoskelet Disord* 2010, 11, 185, doi:10.1186/1471-2474-11-185.
17. Maurel, D.B.; Boisseau, N.; Ingrand, I.; Dolleans, E.; Benhamou, C.-L.; Jaffre, C. Combined Effects of Chronic Alcohol Consumption and Physical Activity on Bone Health: Study in a Rat Model. *Eur J Appl Physiol* 2011, 111, 2931–2940, doi:10.1007/s00421-011-1916-1.
18. Nordsletten, L.; Kaastad, T.S.; Madsen, J.E.; Reikerås, O.; Ovstebø, R.; Strømme, J.H.; Falch, J. The Development of Femoral Osteopenia in Ovariectomized Rats Is Not Reduced by High Intensity Treadmill Training: A Mechanical and Densitometric Study. *Calcif Tissue Int* 1994, 55, 436–442, doi:10.1007/BF00298557.
19. 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* 1995, 10, 1745–1752, doi:10.1002/jbmr.5650101118.
20. 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, doi:10.1258/002367707779399518.
21. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using MCT. *Life (Basel)* 2020, 10, E308, doi:10.3390/life10120308.
22. Bourrin, S.; Genty, C.; Palle, S.; Gharib, C.; Alexandre, C. Adverse Effects of Strenuous Exercise: A Densitometric and Histomorphometric Study in the Rat. *J Appl Physiol (1985)* 1994, 76, 1999–2005, doi:10.1152/jappl.1994.76.5.1999.
23. Patch, L.D.; Brooks, G.A. Effects of Training on VO<sub>2</sub> Max and VO<sub>2</sub> during Two Running Intensities in Rats. *Pflugers Arch* 1980, 386, 215–219, doi:10.1007/BF00587471.
24. Chae, C.-H.; Kim, H.-T. Forced, Moderate-Intensity Treadmill Exercise Suppresses Apoptosis by Increasing the Level of NGF and Stimulating Phosphatidylinositol 3-Kinase



Signaling in the Hippocampus of Induced Aging Rats. *Neurochem Int* 2009, 55, 208–213, doi:10.1016/j.neuint.2009.02.024.

25. Ip, T.Y.; Peterson, J.; Byrner, R.; Tou, J.C. Bone Responses to Body Weight and Moderate Treadmill Exercising in Growing Male Obese (Fa/Fa) and Lean Zucker Rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009, 9, 155–166.

26. Mujika, I.; Chatard, J.C.; Busso, T.; Geysant, A.; Barale, F.; Lacoste, L. Effects of Training on Performance in Competitive Swimming. *Can J Appl Physiol* 1995, 20, 395–406, doi:10.1139/h95-031.

27. 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, doi:10.1002/jbmr.141.

28. Filgueira, L. Fluorescence-Based Staining for Tartrate-Resistant Acidic Phosphatase (TRAP) in Osteoclasts Combined with Other Fluorescent Dyes and Protocols. *J Histochem Cytochem* 2004, 52, 411–414, doi:10.1177/002215540405200312.

29. Nicholson, D.W.; Ali, A.; Thornberry, N.A.; Vaillancourt, J.P.; Ding, C.K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P.R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y.A. Identification and Inhibition of the ICE/CED-3 Protease Necessary for Mammalian Apoptosis. *Nature* 1995, 376, 37–43, doi:10.1038/376037a0.

30. Fan, Y.; Bergmann, A. The Cleaved-Caspase-3 Antibody Is a Marker of Caspase-9-like DRONC Activity in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2010, 17, 534–539, doi:10.1038/cdd.2009.185.

31. Yao, Z.; Lafage-Proust, M.-H.; Plouët, J.; Bloomfield, S.; Alexandre, C.; Vico, L. Increase of Both Angiogenesis and Bone Mass in Response to Exercise Depends on VEGF. *J Bone Miner Res* 2004, 19, 1471–1480, doi:10.1359/JBMR.040517.

32. 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, doi:10.1016/s8756-3282(98)00189-6.

33. Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* 2008, 42, 606–615, doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.

34. Boudenot, A.; Pallu, S.; Uzbekov, R.; Dolleans, E.; Toumi, H.; Lespessailles, E. Free-Fall Landing and Interval Running Have Different Effects on Trabecular Bone Mass and Microarchitecture, Serum Osteocalcin, Biomechanical Properties, SOST Expression and on Osteocyte-Related Characteristics. *Appl Physiol Nutr Metab* 2021, 46, 1525–1534, doi:10.1139/apnm-2020-0683.

35. Hamann, N.; Kohler, T.; Müller, R.; Brüggemann, G.-P.; Niehoff, A. The Effect of Level and Downhill Running on Cortical and Trabecular Bone in Growing Rats. *Calcif Tissue Int* 2012, 90, 429–437, doi:10.1007/s00223-012-9593-6.

36. Gao, J.; Fang, J.; Gong, H.; Gao, B. Morphological and Microstructural Alterations of the Articular Cartilage and Bones during Treadmill Exercises with Different Additional Weight-Bearing Levels. *J Healthc Eng* 2017, 2017, 8696921, doi:10.1155/2017/8696921.
37. Li, K.C.; Zernicke, R.F.; Barnard, R.J.; Li, A.F. Differential Response of Rat Limb Bones to Strenuous Exercise. *J Appl Physiol* (1985) 1991, 70, 554–560, doi:10.1152/jappl.1991.70.2.554.
38. Scott, J.M.; Swallow, E.A.; Metzger, C.E.; Kohler, R.; Wallace, J.M.; Stacy, A.J.; Allen, M.R.; Gasier, H.G. Iron Deficiency and High-Intensity Running Interval Training Do Not Impact Femoral or Tibial Bone in Young Female Rats. *Br J Nutr* 2021, 1–8, doi:10.1017/S0007114521004426.
39. George, D.; Pallu, S.; Bourzac, C.; Wazzani, R.; Allena, R.; Rémond, Y.; Portier, H. Prediction of Cortical Bone Thickness Variations in the Tibial Diaphysis of Running Rats. *Life* 2022, 12, 233, doi:10.3390/life12020233.
40. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using MCT. *Life (Basel)* 2020, 10, doi:10.3390/life10120308.
41. Umemura, Y.; Baylink, D.J.; Wergedal, J.E.; Mohan, S.; Srivastava, A.K. A Time Course of Bone Response to Jump Exercise in C57BL/6J Mice. *J Bone Miner Metab* 2002, 20, 209–215, doi:10.1007/s007740200030.
42. Umemura, Y.; Ishiko, T.; Yamauchi, T.; Kurono, M.; Mashiko, S. Five Jumps per Day Increase Bone Mass and Breaking Force in Rats. *J Bone Miner Res* 1997, 12, 1480–1485, doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1480.
43. 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. *Osteoarthritis Cartilage* 2015, 23, 1563–1574, doi:10.1016/j.joca.2015.04.015.

# Etude II

## **Les effets de trois modalités de course sur la vascularisation de l'os fémoral chez le rat.**

### **Introduction**

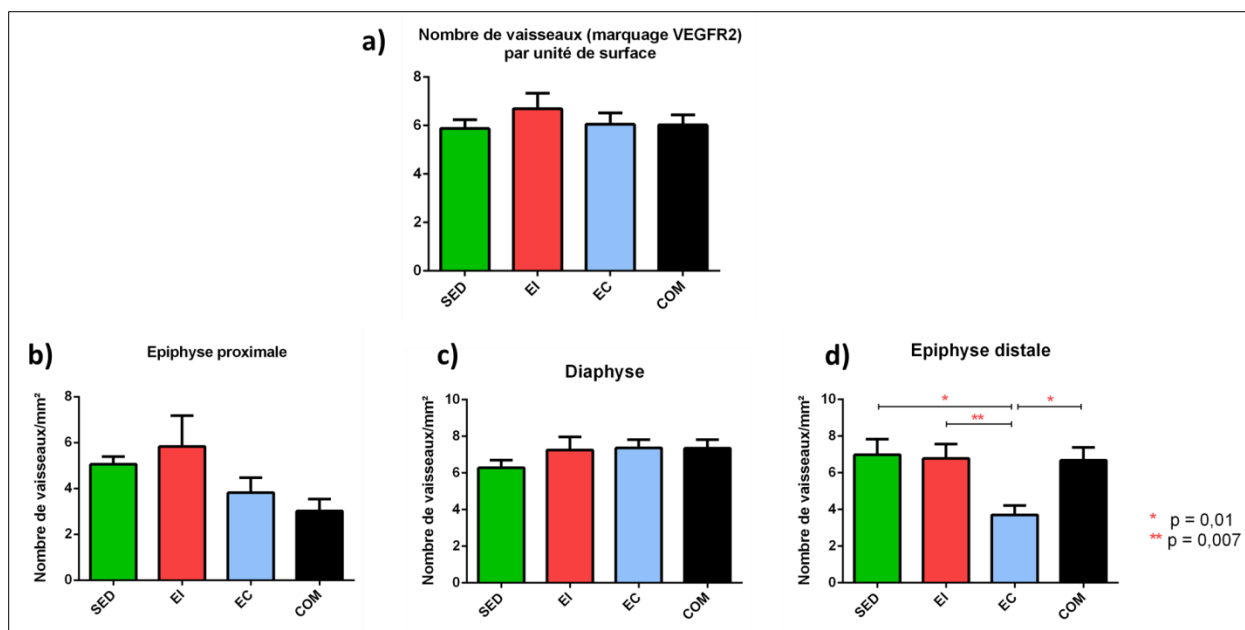
Les effets de différents protocoles d'exercice, et en particulier de la course au tapis roulant, sur la vascularisation et l'angiogenèse osseuses restent très peu déterminés dans la littérature. De ce fait, notre deuxième étude a pour objectif de décrire les effets de trois protocoles de course (intermittent, continu et combiné) sur la vascularisation et l'angiogenèse osseuses.

### **Matériels et méthodes**

La techniques d'immunohistologie a été utilisé pour mettre en évidence la vascularisation osseuse lors de cette étude. Pour quantifier les vaisseaux sanguins des rats des différents groupes, nous avons reliés sur des coupes longitudinales des fémurs des rats deux marquages vasculaires différents : l'immunomarquage du VEGFR2 et du CD31. Nos groupes comprennent n=10 pour les groupes contrôle (SED), intermittent (IE) et le groupe continu (EC) et n=9 pour le groupe combiné (COM). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  l'erreur standard.

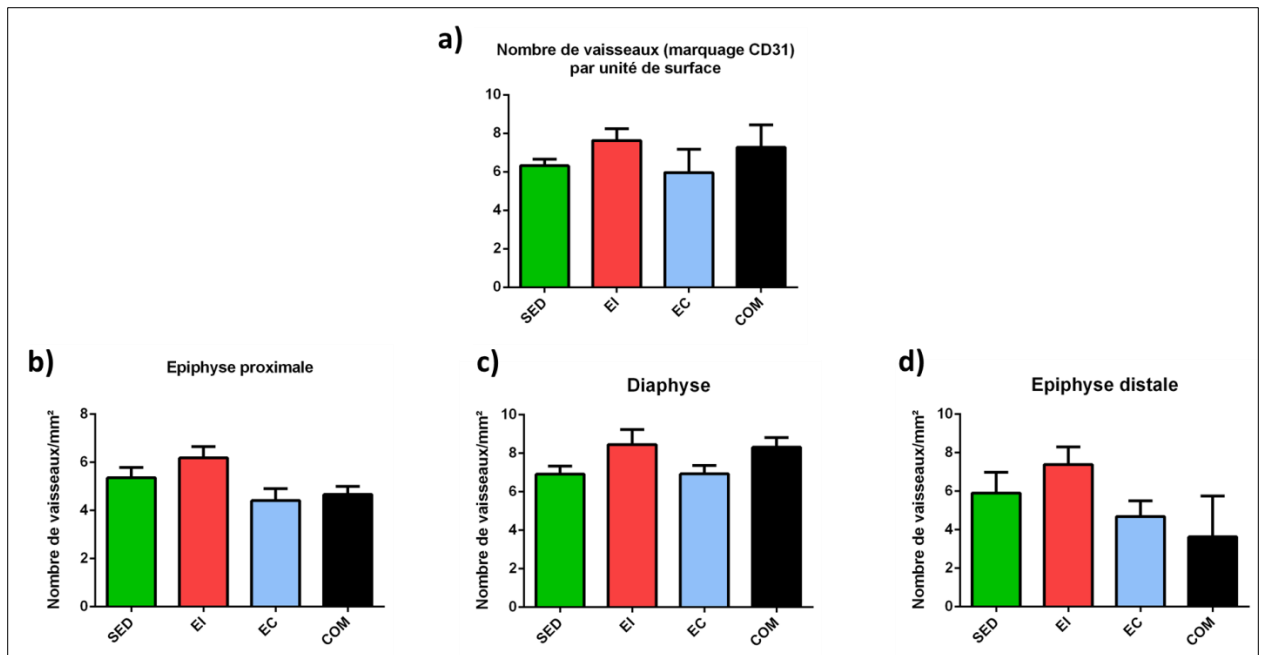
### **Résultats**

Il n'existe pas de différence statistique dans le marquage au VEGFR2 entre les groupes expérimentaux au niveau du fémur entier (figure 32 a). Au niveau de l'épiphyse proximale et de la diaphyse fémorales aucune différence significative n'a également été observée. Cependant au niveau de l'épiphyse distale fémorale une diminution du nombre de vaisseaux marqués au VEGFR2 a été enregistré chez le groupe de course continue par rapport aux autres groupes expérimentaux (figure 32).



**Figure 32.** Résultats du nombre de vaisseaux marqués au VEGFR2. a) Nombre total de vaisseaux au niveau du fémur entier ; b) Nombre de vaisseaux au niveau de l'épiphyse proximale du fémur ; c) Nombre de vaisseaux au niveau de la diaphyse fémorale ; d) Nombre de vaisseaux au niveau de l'épiphyse distale du fémur.

Les résultats du marquage CD31 n'ont pas montré des différences significatives concernant le nombre de vaisseaux, ni au niveau du fémur entier et ni au niveau des différentes localisations anatomiques fémorales : épiphyse proximale, diaphyse et épiphyse distale (figure 33). En revanche, le groupe de course intermittente semble avoir un nombre de vaisseaux plus important par rapport aux autres groupes, alors que les niveaux les plus bas du nombre de vaisseaux est enregistré chez le groupe de course continue (figure 33).



**Figure 33.** Résultats du nombre de vaisseaux marqués au CD31. a) Nombre total de vaisseaux au niveau du fémur entier ; b) Nombre de vaisseaux au niveau de l'épiphyse proximale du fémur ; c) Nombre de vaisseaux au niveau de la diaphyse fémorale ; d) Nombre de vaisseaux au niveau de l'épiphyse distale du fémur.

## Conclusion

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que les protocoles de course intermittent et combiné tendent à favoriser la vascularisation au niveau de l'os fémoral. L'exercice continu semble entraîner une diminution de ce paramètre notamment au niveau de l'épiphyse fémorale distale. Des différences de réponses sont remarquables entre les groupes en fonction du site anatomique fémoral analysé.

A l'issue de cette étude, nous présentons un article portant uniquement sur les effets du protocole de course combinée vs contrôle sur la vascularisation au niveau fémoral (page 125), afin de présenter ce protocole d'exercice pour la première fois dans la littérature.

# Effects of a running protocol on femoral vascularization in rats

Rkia Wazzani <sup>1</sup>, Céline Bourzac <sup>2,3</sup>, Hanane Elhafci <sup>2</sup>, Sara Krim<sup>2</sup>, Said Ahmaidi <sup>1</sup>,  
Hugues Portier <sup>2,4</sup>, Stéphane Pallu <sup>2,4</sup> and Christelle Jaffré <sup>1\*</sup>

1 Laboratoire APERE, Université de Picardie Jules Verne, Avenue Paul Claudel F-80000 Amiens- France; [rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr](mailto:rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr) ; [said.ahmaidi@u-picardie.fr](mailto:said.ahmaidi@u-picardie.fr) ; [christelle.jaffre@u-picardie.fr](mailto:christelle.jaffre@u-picardie.fr)

2 Laboratoire B3OA, Université de Paris, Avenue de Verdun F-75010 Paris- France ; [celine.bourzac@vet-alfort.fr](mailto:celine.bourzac@vet-alfort.fr) ; [hugues.portier@univ.orleans.fr](mailto:hugues.portier@univ.orleans.fr), [stephane.pallu@univ.orleans.fr](mailto:stephane.pallu@univ.orleans.fr) ; [hanane.el-hafci@univ-paris-diderot.fr](mailto:hanane.el-hafci@univ-paris-diderot.fr) ; [krim.sara10@hotmail.com](mailto:krim.sara10@hotmail.com)

3 Plateforme de recherche biomédicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du général de Gaulle, F-94700 Maisons-Alfort, France

4 UFR Science & Technique, 2 allée du château, Université d'Orléans. F-45100 Orléans, France

\* Corresponding author: [christelle.jaffre@u-picardie.fr](mailto:christelle.jaffre@u-picardie.fr)

## Abstract

Running exercise from moderate to strenuous intensity is known for its positive effects on bone health and structure. However, the studies describing the effects of running exercise on bone vascularization are very little developed. Thus, the cellular and molecular mechanisms related to angiogenesis-osteogenesis coupling are still poorly understood. The objective of this study was to describe the effects of a combined running protocol (alternating continuous and intermittent running) on bone vascularization and bone parameters quality.

Nineteen male Wistar rats (5 weeks old) were randomly divided in 2 groups: sedentary control (SED, n=10), and combined running (RUN, n=9). RUN rats were exercised 5 days/week, alternating continuous (3 days/week) and intermittent (2 days/week) running for 8 consecutive weeks. Femoral micro-architectural parameters were assessed by micro-CT, femoral osteocyte occupancy rate by histological analysis and femoral bone angiogenesis and vascularization by immunohistochemical analysis.

The trabecular bone properties in the proximal femur, in particular the trabecular thickness, and the overall number of full osteocyte lacunae from RUN rats were improved compared to SED rats. About, vascularization, CD31-labeled vessels in the diaphysis of RUN rats tended

to be more numerous ( $7.27 \pm 1.26$ ) compared to respective results in SED rats ( $6.31 \pm 1.05$ ) ( $p=0.05$ ).

These results showed that, compared to sedentariness, combined running exercise improves the trabecular microarchitectural parameters and the overall osteocyte lacuna occupancy in the half distal femur. In conclusion, this running protocol tends to promote femoral diaphysis neoangiogenesis.

**Keywords** physical exercise ; intermittent running ; continuous running ; bone quality ; vascularization ; angiogenesis.

**NEW & NOTEWORTHY** This study is the first one to present the effect of a combined running protocol, alternating continuous and intermittent running in bone quality parameters and vascularization. This type of exercise improves bone microarchitectural and tends to improve bone angiogenesis in femoral level.

## **Introduction**

Bone is a dynamic tissue that is modeled and reshaped according to the constraints applied to it (1). In the bone mechanostat hypothesis developed by Frost (2, 3), the bone (micro)structure is dependent on a given “stimulus” being mechanically driven. Yet, as a living material, bone will evolve not only from the mechanical point of view, but also from the biological one since bones are dependent on living cell activities.

To respond to mechanical strains and strengthen, bone tissue, as a dynamic tissue, requires a combination of elements, including angiogenesis, which are essential in bone remodeling, repair and regeneration (4). In contrast, in the absence of mechanical load, the development of bone mass is estimated at only 30% to 50% of its potential (5).

Physical exercise is recognized as the externally applied mechanical load and as with muscle, exercise is therefore necessary for bone strengthening. It causes mechanical stresses (impacts on the ground, shocks, traction at muscular insertions) that directly affect bone (6) and biochemical agents transported by blood (hormones, cytokines) favoring bone anabolism (7, 8).

Different running exercise modalities has been presented in literature (moderate continuous running on a treadmill, interval training running on a treadmill, voluntary wheel running) (9, 10). Among these, moderate continuous running on a treadmill is the most commonly described in the literature. For instance, Maurel et al. (2013) have shown that in a male, alcohol-induced osteoporosis model, such a protocol prevents the deterioration of bone microarchitectural parameters, specifically the decrease in trabecular (Tb.Th) and cortical (Ct.Th) thicknesses and the increase in cortical porosity (Ct.Po) due to alcohol consumption (11).

The effects of the interval training modality on bone status have been studied by few research teams (10, 12). Recently, Boudenot et al. (2016, have compared the effects of both continuous and interval running modalities in a young adult male Wistar rat model. They have shown that using a 30% shorter training period, the interval training group presented more than 20% higher whole body and femur bone mineral density (BMD) gains compared to the moderate continuous modality (13).

More recently, Bourzac (2020) (14) has compared continuous and interval running modalities during a 8 week-training period in young adult, male, Wistar rats. This work demonstrated



that moderate continuous training has positive effects on microarchitectural trabecular bone while interval training rather presents osteogenic effects on the cortical bone. In order to benefit from the advantages of both the modalities on bone status, we have developed a combined protocol (14).

Nowadays, physical exercise is considered as a biotherapy by the World Health Organization to prevent bone diseases such as osteoporosis (15). Recently, a literature review devoted to the effects of physical exercise on bone status in experimental models has shown that two third of the publications reported osteogenic consequences (16). Nevertheless, the effects of different exercise protocols, and particularly running, on capillary bone vascularization, bone blood flow, and bone angiogenesis remain strongly unclear (17). Few factors are involved in the angiogenesis – osteogenesis coupling in the physical activity context, including VEGF, CD31 or Endomucin (17).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a key role both in vascular development and angiogenesis. Bone is a highly vascularized organ and angiogenesis is of crucial significance in osteogenesis (18). VEGFR2 is the main VEGF signaling receptor and is mostly expressed in endothelial cells to mediate neoangiogenesis and vasculogenesis, as well as promotion of vessel permeability in response to VEGF (19).

A subtype of capillary, type H vessels, is defined by high expression of CD31 and Endomucin (20). Type H vessels can actively achieve bone formation by production of factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors in the bone marrow and release factors promoting osteogenesis (20–22).

However, while the studies on bone tissue are numerous (16), to date, study data on the effects of exercise on angiogenic-osteogenic responses is scarce. Moreover, not to even mention the effects of physical activity, very little is known about the cellular and molecular mechanisms related to angiogenesis-osteogenesis coupling (20).

Due to this lack of knowledge, our study aimed at describing the effects of a combined running protocol (i.e. alternating continuous and intermittent running) on bone vascularization. We hypothesized that, compared to sedentariness, combined running would improve bone angiogenesis.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Experiments were carried out on nineteen 5-week-old, male, Wistar rats. All the rats were housed in controlled facilities (3 rats per standard cage, maintained on a 12-h light/dark cycle, at a constant temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A commercial standard diet (Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided ad libitum to all animals.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lariboisiere/Villemin (Paris, France) and by the French Ministry of Agriculture (Paris, France, reference number APAFIS # 9505).

### **Body parameters follow-up**

Body weights and lengths (nose to anus) were recorded upon arrival (time-point T0) and at the end of the protocol (T8 = the end of the protocol, after 8 weeks of running protocols). The body mass index (BMI), calculated as body weight (g)/length<sup>2</sup> (cm<sup>2</sup>), was determined also at T0 and T8 (23).

### **Experimental exercise protocol design**

At the beginning of the protocol, rats were randomly allocated to one of the following groups: sedentary control (SED) (n=10) and running (RUN) (n=9).

After one week of acclimation, treadmill running training (25 minutes per day, at different speeds) was carried out during 4 consecutive days before any testing. SED rats did not perform any daily physical activity beyond normal movements in their cages. RUN rats performed treadmill exercise 5 days per week during 8 consecutive weeks.

At the end of the protocol, rats were sacrificed by cardiac puncture and exsanguination, after induction of general anesthesia with 5 % v/v isoflurane (Forene®) in oxygen.

### **Maximal aerobic speed test**

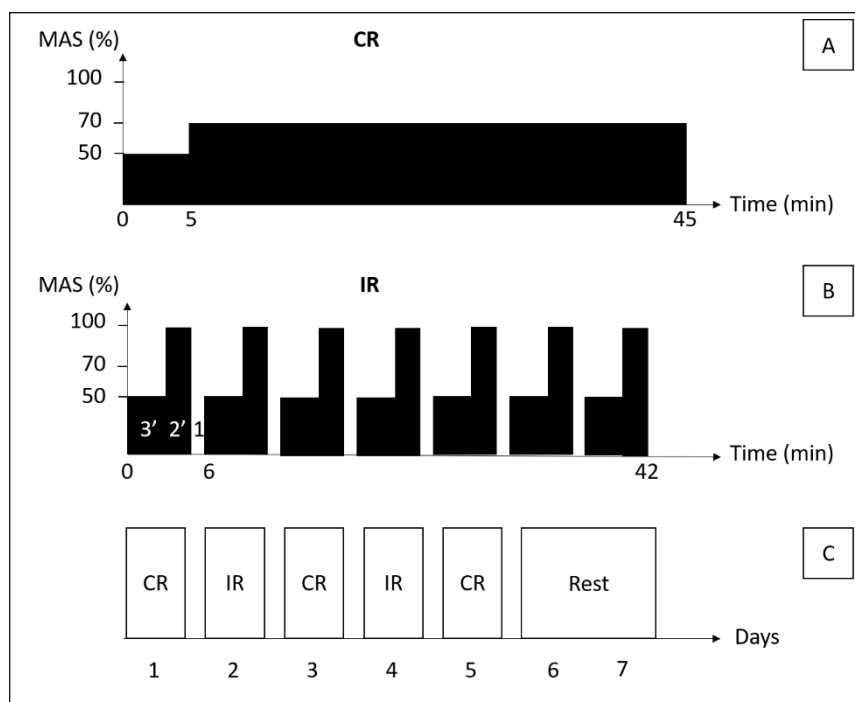
On the 5th day of acclimation, each rat underwent maximal aerobic speed (MAS) testing, using a progressive running test (23), to determine subsequent running speeds. It started with a warming session at 10° inclination and a speed of 13 m/min for 5 min, followed by increments of 4 m/min every 2 min until 17 min were reached, then increments of 4 min/min every 1min30s. The test was conducted until the rats could no longer keep pace with the

treadmill speed, despite 2 consecutive stimulations with air-compressed sprays. The test was therefore stopped and the last fully sustained increment speed defined as the MAS for the rat.

A MAS test was also conducted at the end of the exercise protocols to validate exercise program.

### Running protocol

The 8-week running protocol was built on an alternation of continuous and intermittent running modalities (Fig.1). The continuous running modality consisted in running at a constant speed for 45 minutes per day, at an intensity of 70 % of MAS (Fig.1 A), the intermittent running modality consisted in 7 repetitions of blocks of 3 minutes at 50% MAS, followed immediately by 2 min at 100% MAS and 1 min of passive rest (Fig.1 B).



**Fig. 1** Exercise protocol. A) Continuous running (CR) and B) Intermittent running (IR) modalities. C) Combined running protocol, consisting of alternation of running modalities (IR and CR) during the week.

### **Tissue collection**

Femurs were excised and cleared of connective soft tissues, then stored in 4 % v/v paraformaldehyde at 4°C until further analyses.

### **Bone morphometric parameters**

Immediately after sacrifice and clearing of connective soft tissues, the length of the femurs was recorded using an analogical caliper.

### **Post-mortem micro-Computed Tomography ( $\mu$ CT)**

The left distal and proximal femur of each rat were imaged using a high-resolution  $\mu$ CT (Skyscan 1172, Bruker, Belgium). For microarchitectural parameters and bone mineral density, the  $\mu$ CT images were acquired at the following settings: source voltage 80 kV, source current 100  $\mu$ A, matrix 1000x668, exposure time 175 ms, rotation step 0.3-degree, frame averaging 10, filter aluminum 0.5 mm thick, pixel size 9.81  $\mu$ m. Images were reconstructed using NRecon software, 16 bits (v1.7.0.4, Skyscan). They were then segmented into binary images using simple global thresholding methods, because of the low noise and good resolution of the data sets.

Image analysis was performed using CTAn software (v1.6.1, Skyscan). The trabecular bone parameters evaluated were trabecular BMD (Tb.BMD, gHA/cm<sup>3</sup>), bone volume fraction (BV/TV, bone volume/tissue volume, %), trabecular number (Tb.N, 1/mm), trabecular separation (Tb.Sp, mm) and trabecular thickness (Tb.Th, mm) (24).

For trabecular microarchitectural and BMD evaluation, trabecular volumes of interest (VOI) were determined by manually drawing a region of interest (ROI) following the endocortical boundaries every 20 images on a subset of 200 images located immediately distal to the ventral border of the femoral head for (24) part of the femur. The software extrapolated the ROI between drawn ones. Trabecular BMD was computed from the VOI using hydroxyapatite phantoms for calibration (24).

### **Tissue preparation for histology and immunohistochemistry**

After fixation, the diaphysis of the right femurs and the whole left femurs were decalcified with EDTA 177 g/L, pH 7.0–7.3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) during 4 weeks, then embedded in paraffin, and cut to a thickness of 4-5  $\mu$ m with a microtome (cross sections for the right femur diaphysis, and longitudinal sections for the left femurs). Before

staining, all tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of graded alcohols (100, 90, 80, 70, and 40 %), with a final rinse in water.

### **Bone histological analysis**

Right femur cross-sections were stained by Harris hematoxylin (10047107, VWR Chemicals) and eosin (117081, VWR Chemicals).

- The thickness of the cortical diaphysis was evaluated by histomorphometric analysis. Images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 10x magnification. Using the dedicated Keyence toolbox, the cortical thickness was measured at 8 different locations on 3 consecutive sections. The results obtained were averaged to obtain a total mean cortical thickness per rat, and a mean cortical thickness for the anterior, posterior, lateral and medial locations.
- To assess the osteocyte lacunar density and the occupancy rate of osteocyte lacunae (ORL), pictures were obtained from the same slides with a microscope Nikon (Nikon, digital camera DXM 1200-F) at x40 magnification. Using Image J (National Institute of Health, 1987), the number of empty lacunae and lacunae containing an osteocyte (full lacunae) were determined in one picture field (i.e. an area of 0,033 mm<sup>2</sup>) for each location (anterior, posterior, lateral and medial), on each of the 3 slides. The whole counting area represented 0.396 mm<sup>2</sup> for each rat. The osteocyte lacunar density was expressed in osteocyte lacunae/unit area (a unit area being 0.396 mm<sup>2</sup>) and the ORL (%) was calculated as: number of lacunae with an osteocyte / (number of lacunae with an osteocyte + number of empty lacunae) x 100. The results obtained from each location were added, and then added from the 3 slides to obtain an ORL per rat. It should be noted that the osteocyte occupancy rate is calculated in the half distal femur.

### **Bone vascularization analysis by immunohistochemistry**

Longitudinal sections of the left femur were used for immunohistochemical staining (VEGFR2 and CD31). It should be noted that each labelling is achieved on different sections and not on the same ones.

- To highlight the angiogenesis process, immunostaining for VEGFR2 was performed. Samples were incubated overnight at 4°C with an anti-VEGFR2 antibody (VEGF Receptor 2 (D5B1) Rabbit mAb #9698, Ozyme, dilution 1/800), and then incubated for 30 min in a

humid chamber at room temperature with the secondary antibodies (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Ozyme, dilution 1/1000).

- To evaluate the endothelial cell labelling, we also performed CD31 immunostaining. Samples were incubated overnight at 4°C with an anti-CD31 antibody (CD31 (PECAM-1) (D8V9E) XP® Rabbit mAb #77699, Ozyme, dilution 1/100), and then incubated for 30 min in a humid chamber at room temperature with the secondary antibodies (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074, Ozyme, dilution 1/1000).

Finally, the revelation is performed with DAB (SignalStain DAB Substrate Kit #8059, Ozyme, diluted) incubation for 10 min (for adequate staining intensity). The chromogen DAB reacts chemically with the HRP enzyme coupled with both VEGF2 and CD31 secondary antibodies, therefore inducing a brown coloration. Images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 400x magnification for both VEGFR2 and CD31 evaluations. For each of these parameters, a total of 12 images was obtained from each of two longitudinal sections, as follows: 3 images from each of the proximal and the distal epiphyses (each set of 3 being on a transversal line without overlap), and 3 images for each of the lateral and medial aspects of the diaphysis (each set of 3 being on a longitudinal line without overlap). Using Image J (National Institute of Health, 1987), the number of vessels (VEGFR2 and CD31 labeling) was determined in an area of 400 x 400  $\mu\text{m}^2$  located in the center of each image. The number of vessels is reported on the counting area for each image. Then, the values were summed for all 12 images for a single section and summed for both sections for a single rat. To compare the groups according to the anatomical regions of the femur, the values are summed by region for a single section and summed for both sections for a single rat.

### **Data analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Descriptive data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for the micro-architectural parameters, and as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for the histological parameters. The normality and the homogeneity of the variances were tested using the Shapiro-Wilk test and the Fisher F test, respectively. Given that data were non-parametric, comparisons between-the 2 groups were performed using the U-Mann-Whitney test and comparisons within a same group were performed using the Wilcoxon signed rank test. The level of significance was set at  $p < .05$ .

## Results

### Body parameters intake

Results are summarized in Table 1. Based on weights, body lengths and body mass indexes (BMI), groups were comparable at the beginning of the study. The aforementioned parameters, as well as weight gains ( $293 \pm 31$  and  $290 \pm 18$  g for SED and RUN groups, respectively,  $p=1$ ), remained similar among groups at the end of the study protocol.

### Maximal aerobic speed

Maximal aerobic speeds (MAS) did not statistically differ between groups at the beginning of the study. After 8 weeks of training (T8), the MAS in the RUN group, but not in the SED group, was significantly improved (Table 1), validating the exercise program.

**Table 1:** Body parameters and maximal aerobic speed at different time-points in male Wistar rats subjected either to sedentariness (SED) or combined running exercise (RUN).


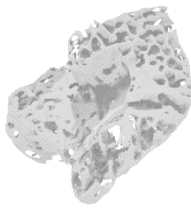
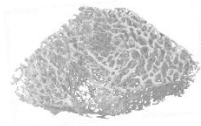
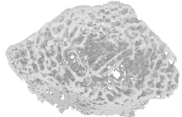
<i>Parameters</i>	<i>Time</i>	<i>SED</i>	<i>RUN</i>	<i>p-value</i>
Weight (g)	T0	$199.20 \pm 8.31$	$201.10 \pm 8.78$	0.52
	T8	$492.10 \pm 36.43$	$490.85 \pm 16.46$	0.60
Length (cm)	T0	$19.75 \pm 0.54$	$19.55 \pm 0.49$	0.27
	T8	$26.65 \pm 1.10$	$26.50 \pm 0.66$	0.24
BMI ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )	T0	$0.51 \pm 0.01$	$0.52 \pm 0.02$	0.26
	T8	$0.69 \pm 0.01$	$0.70 \pm 0.04$	0.79
MAS (m/min)	T1	$27.80 \pm 9.43$	$30.60 \pm 7.82$	0.39
	T8	$22.90 \pm 5.70$	$36.60 \pm 2.95$	0.0001
Length of femurs	T8	$37.85 \pm 1.31$	$37.74 \pm 1.30$	0.64

BMI: body mass index; MAS: maximal aerobic speed;  $n=10$  for SED,  $n=9$  for RUN. T0= upon arrival of animals; T1= after one week of running protocols; T8= The end of the experimental protocol (after 8 weeks of exercise protocols). Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

## Effects of running on femoral trabecular micro-architecture

Results are summarized in Table 2. The trabecular thickness (Tb.Th) in the proximal femur in the RUN group were statistically increased, compared to results in the SED group. All the other micro-architectural parameters in the proximal femurs were not statistically different between groups.

**Table 2:** Femoral trabecular micro-architectural and bone mineral density parameters in male Wistar rats subjected either to sedentariness (SED) or mixed running exercise (RUN).

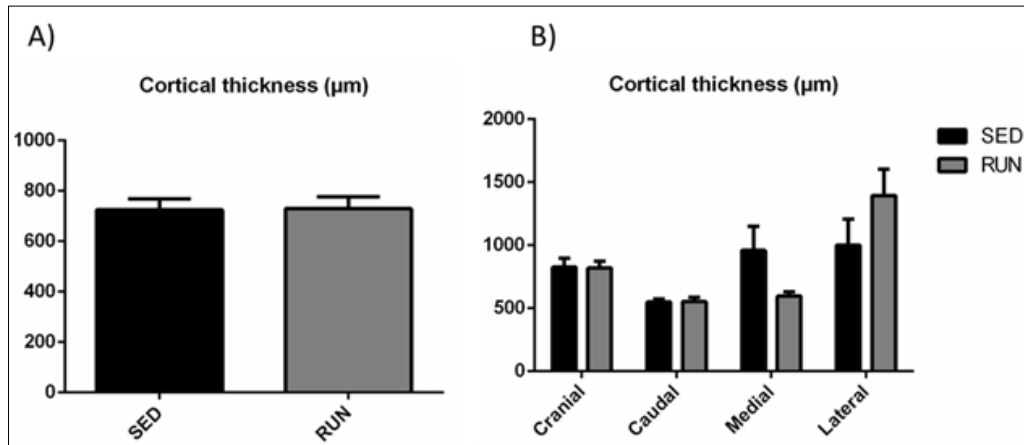
<i>Parameters</i>	<i>SED</i>	<i>RUN</i>	<i>p-value</i>
<i>Proximal femur</i>			
BV/TV (%)	43.575 ± 5.991	46.635 ± 3.889	0.274
Tb.N (1/mm)	3.720 ± 0.404	3.417 ± 0.331	0.078
Tb.Th (mm)	0.117 ± 0.012	0.136 ± 0.006	0.0003
Tb.Sp (mm)	0.068 ± 0.008	0,073 ± 0,008	0.274
Tb.BMD (gHA/cm <sup>3</sup> )	0.602 ± 0.121	0.577 ± 0.050	0.826
<i>Distal femur</i>			
BV/TV (%)	39.423 ± 6.808	42.839 ± 8.086	0.706
Tb.N (1/mm)	4.115 ± 0.547	4.361 ± 0.553	0.489
Tb.Th (mm)	0.095 ± 0.006	0.097 ± 0.007	0.440
Tb.Sp (mm)	0.095 ± 0.02	0.084 ± 0.014	0.309
Tb.BMD (gHA/cm <sup>3</sup> )	0.408 ± 0.066	0.468 ± 0.120	0.593

BV/TV: bone volume fraction; Tb.N: trabecular number; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.Sp: trabecular separation; Tb.BMD: trabecular bone mineral density; n=10 for SED, n=9 for RUN. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .



## Effects of running on cortical bone thickness

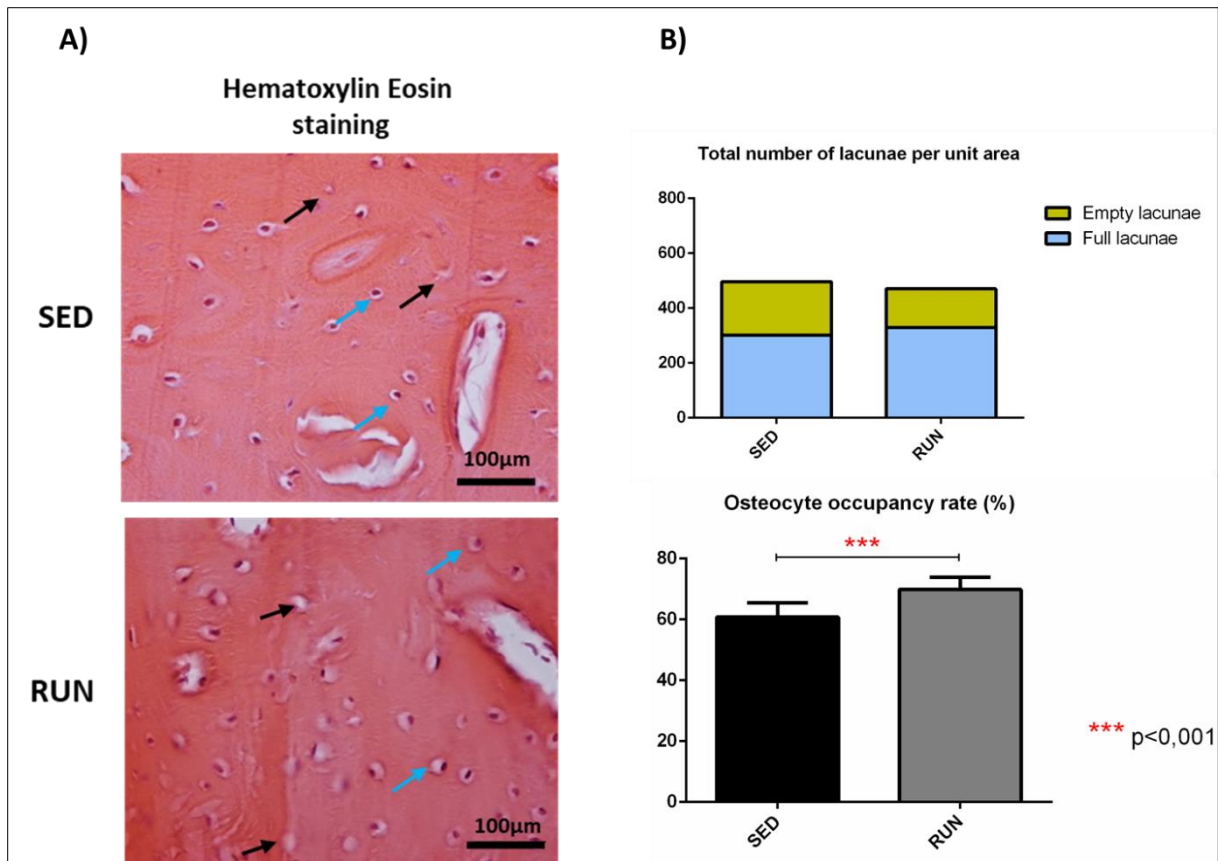
The total mean thickness and the lean thickness per anatomical cortical bone regions bone did not differ between groups (Fig.2).



**Fig. 2** Cortical bone thickness in the femoral diaphysis from sedentary (SED) rats and rats subjected to combined exercise (RUN). A) Total mean cortical thickness, and B) Average cortical thickness per anatomical region measured on transversal sections (n=10 for SED; n=9 for RUN). Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

## Effects of running on osteocyte lacunar occupancy

The total number of osteocyte lacunae was similar among groups. The occupancy rate of osteocyte lacunae in RUN rats, however, was significantly higher compared to respective results in SED rats ( $p < 0.001$ , Fig.3).

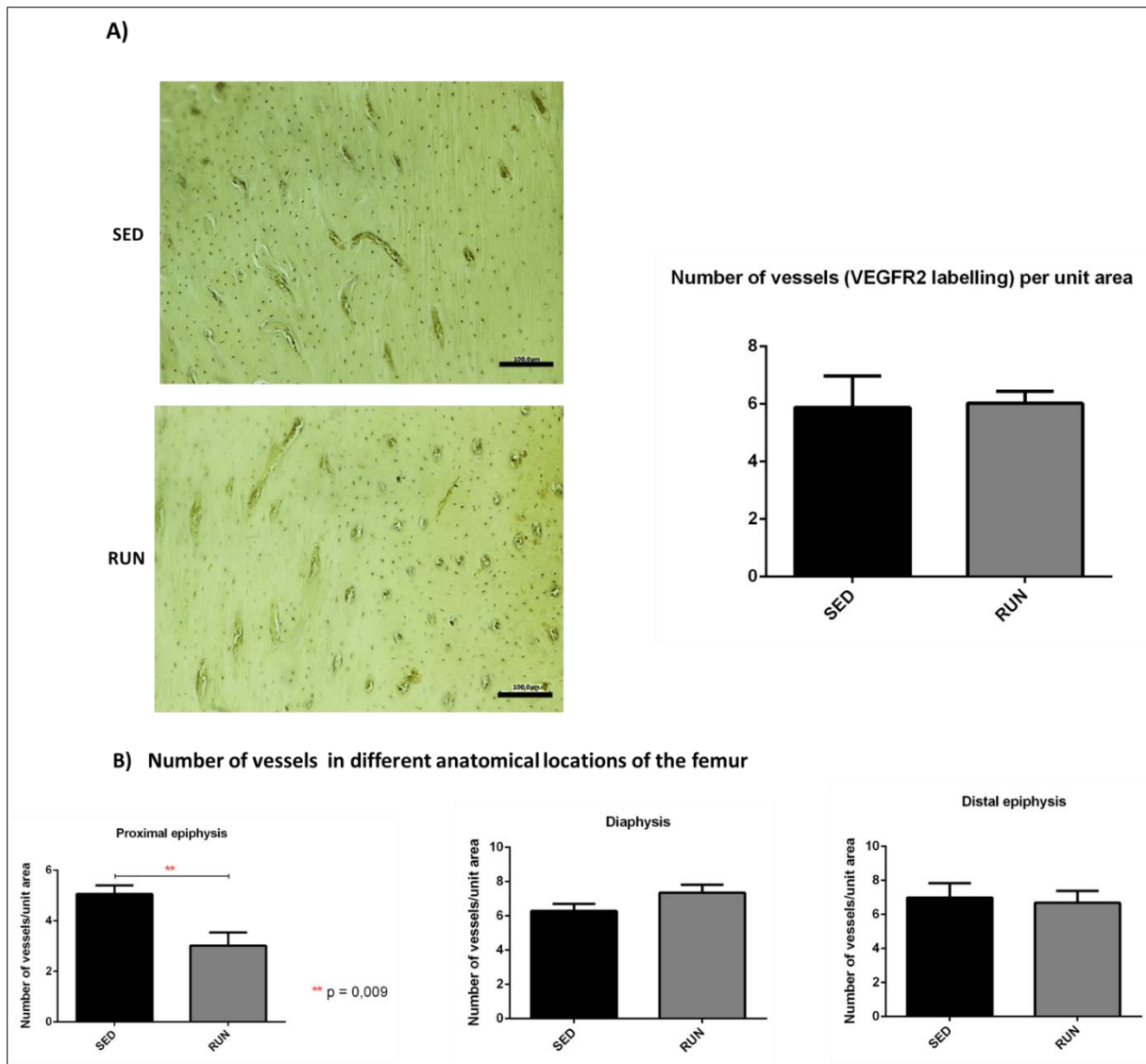


**Fig. 3** Osteocyte viability in the half distal femur of Wistar rats subjected either to sedentariness (SED) or combined running exercise (RUN). A) Representative picture fields for the quantification of osteocyte lacunar occupancy in the half distal femur. Black arrows indicate empty lacunae; blue arrows indicate full lacunae containing an osteocyte; n=10 for SED, n=9 for RUN). B) Relative results for the total number of lacunae per unit area (0.396 mm<sup>2</sup>) and lacunar occupancy rate. Data are presented as means ± SEM. Statistical significance set at p < 0.05

### Effects of running on bone angiogenesis and vascularization

- **VEGFR2**

The total numbers of VEGFR2-labeled vessels were not statistically different between SED and RUN groups. Taking into account anatomical regions, the number of vessels in the proximal epiphysis in RUN rats, however, were lower (p=0.009) compared to respective results in SED rats. Numbers of vessels for the distal epiphysis and diaphysis were similar between groups (Fig.4).

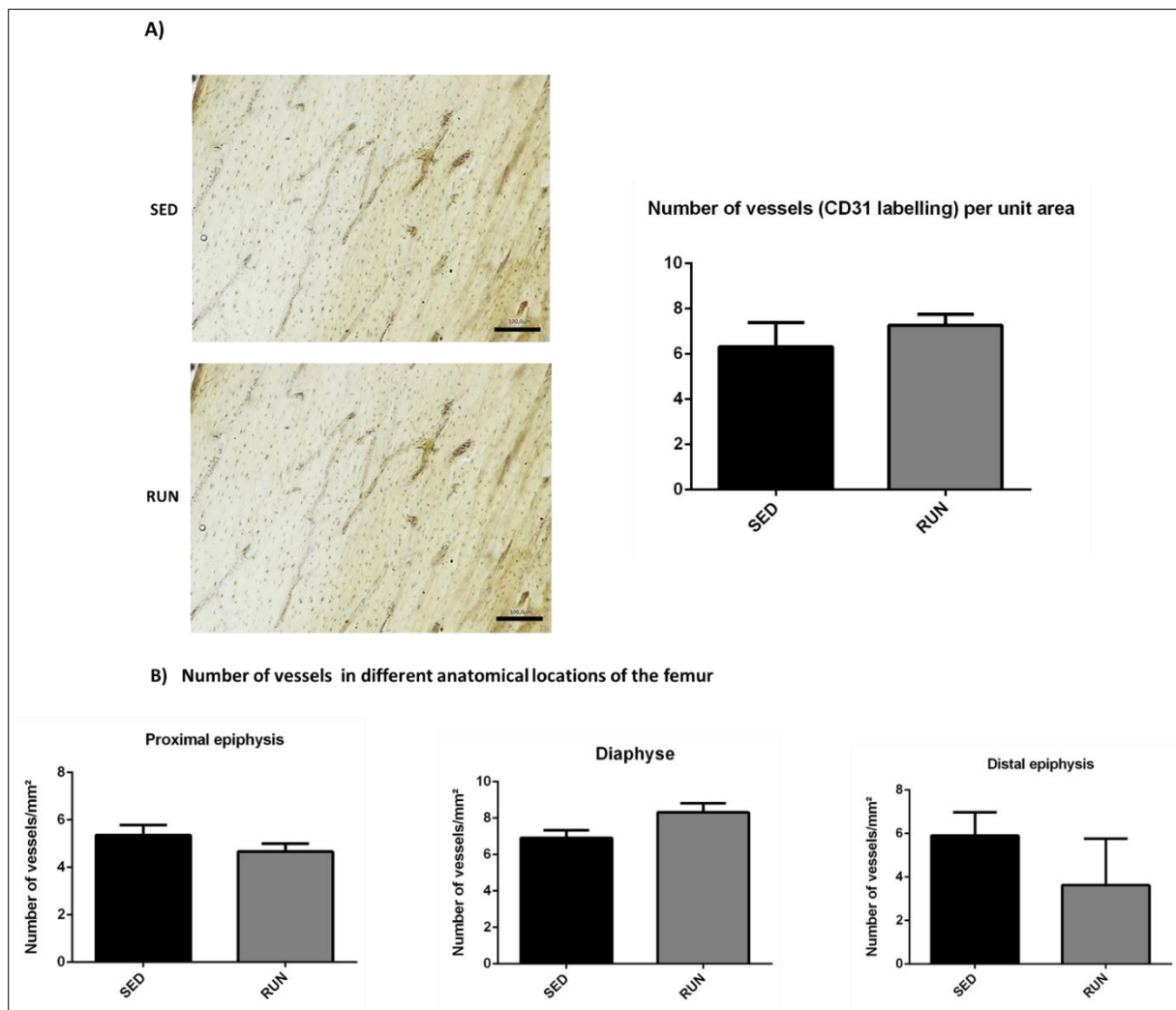


**Fig. 4** VEGFR2 labelling for bone angiogenesis in the femur from Wistar rats subjected either to sedentariness (SED) or combined running exercise (RUN). A) Left panel: representative picture fields for the quantification of the angiogenesis process and bone vascularization with VEGFR2 immunostaining; n=10 for SED, n=8 for RUN. Scale bar = 100µm. Right panel: relative results for the total number of vessels per unit area (3.84mm<sup>2</sup>). B) Relative results for the number of vessels in different anatomical locations of the femur. Data are presented as means ± SEM. Statistical significance set at p < 0.05.

- **CD31**

The femoral total number of CD31-labeled vessels did not significantly differ between SED and RUN groups. Similarly, there was no statistical difference in the regional distribution of CD31-labeled vessels (femoral proximal epiphysis and distal epiphysis) between the groups.

However, CD31-labeled vessels in the diaphysis of RUN rats tended to be more numerous ( $7.27 \pm 1.26$ ) compared to respective results in SED rats ( $6.31 \pm 1.05$ ) ( $p=0.05$ ) (Fig.5).



**Fig. 5** CD31 labelling for bone vascularization in the femur from rats subjected either to sedentariness (SED) or combined running exercise (RUN). A) Left panel: representative picture fields for the quantification of the bone vascularization with CD31 immunostaining;  $n=10$  for SED,  $n=8$  for RUN. Scale bar = 100  $\mu$ m. Right panel: relative results for the total number of vessels per unit area (3.84 mm<sup>2</sup>). B) Relative results for the number of vessels in different anatomical locations of the femur. Data is presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

## Discussion

To our knowledge, this study is the first to analyze the effects of a physical exercise combined running protocol on bone femoral vascularization in Wistar rat model. Eight weeks of a combined running protocol translated into modifications of bone angiogenesis, specifically a decrease in the VEGFR2 expression in the proximal epiphysis, and a slight, although statistically insignificant, increase in the numbers of CD31-labeled-vessels located in the diaphysis. It was accompanied by structural changes in bone tissue at sites submitted to mechanical strains (distal femur). In the distal femur from RUN rats, the trabecular thickness seems to be higher and the trabecular separation seems to be lower compared to respective results in SED rats. In the proximal femur from RUN rats, the trabecular thickness was statistically increased compared to respective results in SED rats. These modifications were accompanied by a higher osteocyte occupancy rate in RUN rats in the half distal femur.

Our study investigated the effects of a combined running exercise protocol on the bone tissue including vascular and trabecular parameters in the femur. Such a training program was defined to mimic the reality of sports practice in athletes and patients. To understand the mechanisms and consequences of physical exercise on the bone system, most studies only looked at a single type of running (intermittent or continuous, separately) and did not use a combination of these activities in the same program to develop experimental models, in particular in rats (16). These protocols in rats have sometimes resulted in such high intensities that it was difficult to implement in healthy subjects and patients. It seems interesting to experiment a combined running training model, which combines both moderate continuous and interval training running, to evaluate their different osteogenic effects, in particular on bone microarchitecture. (25). We therefore designed a training protocol consisting in an alternation of moderate continuous and intermittent running modalities at intensities that are sustainable for healthy and pathological subjects.

Our study mainly focused on the effects of combined running on bone vascularization. We chose to analyze VEGFR2 and CD31 for different reasons: first, VEGFR2 is the main VEGF signaling receptor and is mostly expressed in endothelial cells to mediate neoangiogenesis and vasculogenesis. It also promotes vessel permeability in response to VEGF (19); secondly, CD31 is an endothelial marker of the endothelial progenitor cells as well as VEGFR2. It is

expressed in two types of vessels in bone: H and L; its expression is higher in type H vessels (20).

In the RUN group, differential VEGFR2 labeling was observed, depending on the anatomical regions of the femur. The VEGFR2 expression in the RUN group was statistically decreased in the proximal epiphysis, and tended to increase in the diaphysis, compared to respective results in the SED group. The VEGFR2 expression in the distal epiphysis was, however, similar between groups. The overall VEGFR2 expression did not differ between groups. Taking together, these results suggest that angiogenesis preferentially develops towards the distal femur. Exercise works as a stress stimulus during and after its execution and causes inflammation (26, 27). When exposed to hypoxia during inflammation, osteoblasts release factors VEGF, through the HIF-1 $\alpha$  pathway, activating endothelial cells, and promoting vessel permeability (28). The increased angiogenesis brings bone-forming progenitors as well as nutrition, oxygen and minerals necessary for mineralization (29). VEGF also binds to VEGFR2 in osteoclasts and promotes their survival through stimulation of PI3K/Akt signaling (30).

In contrast, there was no difference in CD31-labeling between RUN and SED groups, regardless the anatomical region. A subtype of capillary, specifically type H vessels, is defined by high expression of CD31 and Endomucin (20). Type H vessels can directly activate bone formation through the production of factors that stimulate the proliferation and differentiation of osteoprogenitors localized in the bone marrow and the release of factors promoting osteogenesis (20–22). In our study, the lack of change in CD31-labeling between groups may indicate that type H vessels are not stimulated by such a combined running program. Consequently, bone formation appears similar in the SED and RUN groups.

Bone remodeling is tightly regulated by a cross-talk between bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts (31). Continuous remodeling is required to preserve both metabolic and mechanical functions by preventing accumulation of bone damages and maintaining both the mechanical strength of bone and calcium homeostasis (32). These processes take place in the “Bone Multicellular Units” (BMU). The BMU are formed by osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, bone lining cells and blood vessels, and are a special site where a team of bone cells work all together (33). Osteocytes are essential to control BMU functions (7, 34, 35). In our study, the osteocyte occupancy rate in the half distal femur was higher in the RUN group. It is likely that these changes are the result of an increased osteocyte activity. This increase in osteocyte function induces an increase in energy and O<sub>2</sub>

requirements. A previous study (20) demonstrated that the spatial distribution of arteries and arteriole-capillary connections determine regional differences in oxygenation and metabolic activity.

These observations were sustained by micro-architectural bone parameters. Specifically, we observed a significant increase in the trabecular thickness in the proximal femur from RUN rats. This is consistent with a progressive thickening and increased connectivity of the trabecular bone induced by the mechanical strains (36) associated with this kind of running program. The consequences in the proximal femur are an increase in the trabecular tissue strength, without a change in bone mass (37). The mechanical strains act on bone trabecular parameters but also on vasculature. It is well known that mechanical stimuli through strains, stretch and shear stress, increase expression of VEGF and increase the capillarization of rat skeletal muscles (38–40). In bone, due to the mineralization, the stretching component is probably less effective than shear stresses.

In conclusion, the combined running protocol exercise tends to promote distal femur angiogenesis. This phenomenon appears to occur to the detriment of proximal femur. It is likely that the differential mechanical strains according to the anatomical regions may account for these differences in bone vascularization, and thus in bone microarchitecture.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the participation of all subjects in this study. We thank Christine Chappard, Morad Bensidhoum, Caroline Caron, Benedicte Lagofun and Philippe Germain for technical support.

### **GRANTS**

This research was funded by “EnvA appel à projet 2018”.

### **Disclosures**

No conflicts of interest are declared by the authors.

## References

1. Wolff J. The Law of Bone Remodelling [Online]. Springer-Verlag. <https://www.springer.com/gp/book/9783642710339> [21 Jun. 2019].
2. Frost HM. Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *Anat Rec* 219: 1–9, 1987. doi: 10.1002/ar.1092190104.
3. Frost HM. Bone’s mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275: 1081–1101, 2003. doi: 10.1002/ar.a.10119.
4. Sivan U, De Angelis J, Kusumbe AP. Role of angiocrine signals in bone development, homeostasis and disease. *Open Biol* 9: 190144, 2019. doi: 10.1098/rsob.190144.
5. Santos L, Elliott-Sale KJ, Sale C. Exercise and bone health across the lifespan. *BioGerontology* 18: 931–946, 2017. doi: 10.1007/s10522-017-9732-6.
6. Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am* 66: 397–402, 1984.
7. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 281–290, 2007. doi: 10.1196/annals.1402.018.
8. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42: 606–615, 2008. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.224.
9. 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* 22: 578–588, 2007. doi: 10.1359/jbmr.070117.
10. Nakajima D, Kim CS, Oh TW, Yang CY, Naka T, Igawa S, Ohta F. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 20: 285–291, 2001. doi: 10.2114/jpa.20.285.
11. Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou C-L, Jaffre C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint Bone Spine* 80: 492–498, 2013. doi: 10.1016/j.jbspin.2012.12.005.
12. Chen X, Aoki H, Fukui Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Biomed Mater Eng* 14: 53–59, 2004.
13. Boudenot A, Maurel DB, Pallu S, Ingrand I, Boisseau N, Jaffré C, Portier H. 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, 2015. doi: 10.1111/iep.12155.
14. Bourzac C. Effets comparatifs de protocoles de course sur la qualité et la réparation osseuse chez le rat Wistar [Online]. Université Paris Cité: 2020. <http://www.theses.fr/2020UNIP7061> [9 Jul. 2022].



15. Physical activity [Online]. [date unknown]. <https://www.who.int/health-topics/physical-activity> [6 Sep. 2022].
16. Portier H, Benaitreau D, Pallu S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life (Basel)* 10: E217, 2020. doi: 10.3390/life10100217.
17. Wazzani R, Pallu S, Bourzac C, Ahmaïdi S, Portier H, Jaffré C. Physical Activity and Bone Vascularization: A Way to Explore in Bone Repair Context? *Life (Basel)* 11: 783, 2021. doi: 10.3390/life11080783.
18. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* 8: 263–271, 2005. doi: 10.1007/s10456-005-9013-x.
19. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669–676, 2003. doi: 10.1038/nm0603-669.
20. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507: 323–328, 2014. doi: 10.1038/nature13145.
21. Xu R, Yallowitz A, Qin A, Wu Z, Shin DY, Kim J-M, Debnath S, Ji G, Bostrom MP, Yang X, Zhang C, Dong H, Kermani P, Lalani S, Li N, Liu Y, Poulos MG, Wach A, Zhang Y, Inoue K, Di Lorenzo A, Zhao B, Butler JM, Shim J-H, Glimcher LH, Greenblatt MB. Targeting skeletal endothelium to ameliorate bone loss. *Nat Med* 24: 823–833, 2018. doi: 10.1038/s41591-018-0020-z.
22. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* 507: 376–380, 2014. doi: 10.1038/nature13146.
23. Bourzac C, Bensidhoum M, Manassero M, Chappard C, Michoux N, Pallu S, Portier H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using  $\mu$ CT. *Life (Basel)* 10, 2020. doi: 10.3390/life10120308.
24. Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25: 1468–1486, 2010. doi: 10.1002/jbmr.141.
25. Beck BR, Daly RM, Singh MAF, Taaffe DR. Exercise and Sports Science Australia (ESSA) position statement on exercise prescription for the prevention and management of osteoporosis. *J Sci Med Sport* 20: 438–445, 2017. doi: 10.1016/j.jsams.2016.10.001.
26. Cerqueira É, Marinho DA, Neiva HP, Lourenço O. Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise—A Systematic Review. *Front Physiol* 10: 1550, 2020. doi: 10.3389/fphys.2019.01550.
27. Silveira LS, Antunes B de MM, Minari ALA, Dos Santos RVT, Neto JCR, Lira FS. Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 26: 115–132, 2016. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016015920.

28. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Boussein ML, Faugere M-C, Guldborg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL. The hypoxia-inducible factor  $\alpha$  pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117: 1616–1626, 2007. doi: 10.1172/JCI31581.
29. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 91: 30–38, 2016. doi: 10.1016/j.bone.2016.06.013.
30. Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L, Hauschka PV. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. *Matrix Biol* 27: 589–599, 2008. doi: 10.1016/j.matbio.2008.06.005.
31. Kim J-M, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim J-H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9: E2073, 2020. doi: 10.3390/cells9092073.
32. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6: 121–145, 2011. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203.
33. Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* 26: 319–323, 2000. doi: 10.1016/S8756-3282(00)80937-0.
34. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229–238, 2011. doi: 10.1002/jbmr.320.
35. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol* 82: 485–506, 2020. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034332.
36. Peng J, Zhou Y, Min L, Zhang W, Luo Y, Zhang X, Zou C, Shi R, Tu C. [Analysis of correlation between trabecular microstructure and clinical imaging parameters in fracture region of osteoporotic hip]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 28: 576–580, 2014.
37. Turner CH, Robling AG. Designing exercise regimens to increase bone strength. *Exerc Sport Sci Rev* 31: 45–50, 2003. doi: 10.1097/00003677-200301000-00009.
38. Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, Goldstein J, Brown MD, Egginton S, Hansen FM, Hudlicka O, Haas TL. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch-versus shear stress-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1430-1438, 2002. doi: 10.1152/ajpheart.00082.2002.
39. Ando J, Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal* 15: 1389–1403, 2011. doi: 10.1089/ars.2010.3361.
40. Hotta K, Behnke BJ, Arjmandi B, Ghosh P, Chen B, Brooks R, Maraj JJ, Elam ML, Maher P, Kurien D, Churchill A, Sepulveda JL, Kabolowsky MB, Christou DD, Muller-Delp JM. Daily muscle stretching enhances blood flow, endothelial function, capillarity, vascular volume and connectivity in aged skeletal muscle. *J Physiol* 596: 1903–1917, 2018. doi: 10.1113/JP275459.

# Etude III

## **Les effets de trois modalités de course sur l'expression des gènes du remodelage osseux et de vascularisation osseuse au niveau de l'os fémoral chez le rat.**

### **Introduction**

L'effet de l'exercice physique sur l'expression génique des marqueurs ostéogéniques est rapporté dans la littérature. Cependant, les études soulignant l'amélioration par l'exercice de l'expression des gènes pro-angiogéniques au niveau osseux sont rares. La troisième étude de ce travail vise à examiner et à décrire l'expression de différents gènes pro-ostéogéniques et pro-angiogéniques au niveau de l'épiphyse distale fémorale, en réponse à différents protocoles d'exercice de course sur tapis roulant, la course continue, la course intermittente et la course combinée.

### **Matériels et méthodes**

Des explants osseux, notamment les épiphyses distales des fémurs des rats, ont été utilisés pour la réalisation de la technique Q-PCR en temps réel. L'objectif est de mesurer l'expression des ARNm de nombreux gènes de remodelage osseux (Runx2, ALP1, OPG, BGLAP, SPACR, MEPE, Sost, PDPN) et de vascularisation osseuse (VEGFA, PECAM1, Notch1, Dll4, Emcn, ANGPT1, PDGFB, Hifa). Les groupes comprennent : n=10 pour les groupes contrôle, intermittent et continu et n=9 pour le groupe d'exercice combiné. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'erreur standard.

### **Résultats**

Les expressions de la phosphatase alcaline (ALP1), de l'ostéoprotégérine (OPG) et des marqueurs biologiques des ostéocytes (Sost et MEPE) sont significativement plus élevées dans le groupe d'exercice combiné que dans les autres groupes expérimentaux. L'ensemble des marqueurs biologiques vasculaires évalués, s'expriment également davantage avec l'exercice de course combinée, tandis que le VEGFA est également augmenté par l'exercice intermittent par rapport à l'exercice continu dans l'épiphyse fémorale distale.

## **Conclusion**

L'exercice de course combiné semble être la modalité de course la plus efficace pour augmenter l'expression des différents marqueurs angiogéniques. Il favorise également les marqueurs du remodelage osseux. La course intermittente favorise l'angiogenèse via une augmentation de l'expression du VEGFA. Or, la course continue reste la modalité avec moins d'effets sur l'expression des différents gènes ostéogéniques et angiogéniques au niveau de l'épiphyse distale fémorale.

# Different running protocols result in different expressions of bone remodeling and bone vascularization mRNAs

Rkia Wazzani <sup>1</sup>, Céline Bourzac <sup>2,3</sup>, Manon Maroquenne <sup>2</sup>, Xavier Vestris<sup>2</sup>, Said Ahmaidi <sup>1</sup>, Hugues Portier <sup>2,4</sup>, Christelle Jaffré <sup>1</sup> and Stéphane Pallu <sup>2,4\*</sup>

1 Laboratoire APERE, Université de Picardie Jules Verne, Avenue Paul Claudel F-80000 Amiens- France; [rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr](mailto:rkia.wazzani@etud.u.picardie.fr) , [said.ahmaidi@u-picardie.fr](mailto:said.ahmaidi@u-picardie.fr) , [christelle.jaffre@u-picardie.fr](mailto:christelle.jaffre@u-picardie.fr)

2 Laboratoire B3OA, Université de Paris, Avenue de Verdun F-75010 Paris- France ; [celine.bourzac@vet-alfort.fr](mailto:celine.bourzac@vet-alfort.fr), [hugues.portier@univ.orleans.fr](mailto:hugues.portier@univ.orleans.fr), [stephane.pallu@univ.orleans.fr](mailto:stephane.pallu@univ.orleans.fr) , [manon.maroquenne@cnsr.fr](mailto:manon.maroquenne@cnsr.fr) , [xavier.agasson.vestris@gmail.com](mailto:xavier.agasson.vestris@gmail.com)

3 Plateforme de recherche biomédicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du général de Gaulle, F-94700 Maisons-Alfort, France

4 UFR Science & Technique, 2 allée du château, Université d'Orléans. F-45100 Orléans, France

\* Corresponding author: [stephane.pallu@univ.orleans.fr](mailto:stephane.pallu@univ.orleans.fr)

## Abstract

**Context** Physical activity is known as a non-pharmacological approach to the treatment of many conditions. For bone tissue, physical activity causes mechanical stresses that lead to deformations of the bone matrix but also to an increase of biological agents activity, improving bone anabolism. Bone angiogenesis is also a phenomenon involved in osteogenesis and mediated by exercise. In this study we aim to examine the expression of different pro-ostegenic and pro-angiogenic genes in bone in response to different exercise protocols.

**Materials and methods** Thirty-nine male Wistar rats (5 weeks old) were randomly divided in 4 groups: sedentary control (SED; n=10), intermittent exercise group (IE; n=10), continuous exercise group (CE; n=10) and combined exercise group (COME; n=9). Exercise groups rats were exercised 5 days/week, for 8 consecutive weeks. RT PCR for bone remodeling and angiogenic genes was done from bone explants of distal femoral epiphysis.

**Results** Alkaline phosphatase (ALP1), osteoprotegerin (OPG) and osteocyte biological markers (Sost and MEPE) expressions were significantly in the combined exercise group compared to the other experimental groups. The vascular bio-marker were also more

expressing with the combined running exercise, while VEGFA was increased by intermittent exercise compared to continuous exercise in the distal femoral epiphysis

**Conclusion** Combined running exercise appears to be the most effective running modality for enhancing the expression of the various angiogenic markers, but it remains less interesting in terms of osteoblastic/osteocyte lineage. Continuous running remains the modality with the most negative effects, however intermittent running promotes angiogenesis via an increase in VEGFA expression.

**Keywords:** Physical exercise, osteogenesis, angiogenesis, RT-PCR, bone

## **Introduction**

Physical exercise is recognized in the literature as an effective non-pharmacological approach to many diseases [1–3]. It is admired as a drug and a therapy in the treatment of several psychiatric, neurological, metabolic, cardiovascular, pulmonary pathologies [4], and in musculoskeletal disorders [4,5].

For bone, as a dynamic tissue sensitive to mechanical constraints, physical exercise represents a concrete example of constraint that we can apply to it. Indeed, physical exercise causes mechanical constraints directly affecting the bone via the impact on the ground, torsion and traction of the tendons [6]. In addition, physical exercise also promotes the activity of biochemical agents transported by the blood (hormones, proteins, cytokines), promoting bone anabolism [7,8], consequently modifying the internal architecture and the external morphology of the bone [9].

In the literature, different models of physical exercise have shown positive effects on bone quality. More specifically, on bone parameters such as bone mineral density, mechanical and micro-architectural properties, cellular activity of osteoblasts, osteocytes and osteoclasts [10]. However, the effects of different exercise modalities on capillary bone vascularization, bone blood flow, and bone angiogenesis remain poorly understood and unclear [11]. Furthermore, studies showing the modification of bone remodeling and bone vascularization gene expressions by physical exercise remain limited.

A recent study in 2021 showed that exercise can decrease both bone resorption and bone formation breakdown. In this study, groups of exercised animals had significantly lower expression of sclerostin mRNA (a bone formation inhibiting element "SOST") compared to groups of sedentary animals [12]. This effect of exercise on sclerostin expression is maintained in aging. Indeed, exercise reduced SOST mRNA levels in the groups of trained aged rats compared with aged control rats. This was associated with an increase in COL1A1 protein and MMP-2 activity, highlighting the importance of exercise on bone health and in mechanisms involved in age-related changes [13]. Compared with the sedentary state, exercise also increased collagen-1 (COL I) mRNA expression and decreased TRAP mRNA expression by 124% and 35% respectively [14]. The increase of TGF- $\beta$ 1 and TGF-I mRNA expression by exercise is also reported in the literature [15].

At the vascular bone level, physical training has been shown to upregulate VEGF and VEGFR1 mRNA expression in the tibia [16], and seems have a tendency to increase eNOS

gene expression in the femur [17]. These data suggest that bone angiogenesis mediated by VEGF and eNOS signaling is an adaptive response of bone to exercise.

Studies highlighting exercise-induced enhancement of pro-angiogenic gene expression in bone are rare. However, beyond bone tissue, many studies have shown the increase of pro-angiogenic and anti-atherogenic genes expression, by exercise in the cardiovascular system [18–20] and of pro-angiogenic genes expression in skeletal muscle [21–24]. Moreover, to our knowledge, there are no studies that compare these effects between different treadmill running protocols, as there is controversial effect of different running protocols on bone quality parameters [10].

According to this, the objective of the present study is to evaluate the expression of different bone remodeling and bone angiogenesis genes in response to the practice of different treadmill running protocols: continuous moderate running, intermittent running and the combined type running. We suggest that running protocols will enhance pro-osteogenic and pro-angiogenic gene expression compared to sedentary state. Of more, we also expect to have significant differences between the different exercise protocols.

## **Materials and Methods**

- **Animals**

Experiments were carried out on thirty-nine 5-week-old, male, Wistar rats. Animals were housed in controlled facilities (3 rats per standard cage, maintained on a 12-h light/dark cycle, at a constant temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A commercial standard diet (Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided ad libitum to all animals.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lariboisiere/Villemin (Paris, France) and by the French Ministry of Agriculture (Paris, France, reference number APAFIS # 9505).

Rats were randomly assigned to four different groups: sedentary control (SED) (n=10), intermittent running exercise (IE) group (n=10), continuous running exercise (CE) group (n=10), and combined running exercise (COME) group (n=9). Rats in the exercise groups performed running treadmill exercise 5 days per week for 8 consecutive weeks, while SED rats had only normal movement in their cage as a daily activity.



At the end of the protocol, after induction of general anesthesia with ~5% isoflurane in air, rats were sacrificed by cardiac puncture and exsanguination.

- **Exercise protocol**

After one week of acclimation, treadmill running learning (25 minutes per day, at different speeds) was carried out during 4 consecutive days before any testing.

To determine running speeds, each rat underwent a maximal aerobic velocity (MAS) test on day 5 of running acclimation, following the progressive running test protocol [25]. The test began with a warm-up session at an incline of 10° and a speed of 13 m/min for 5 min, followed by increments of 4 m/min every 2 min until 17 min was reached, and then increments of 4 m/min every 1min30s. The test was conducted until the rats could no longer keep up with the treadmill speed, despite 2 consecutive stimulations with compressed air sprays. The test was therefore stopped and the last fully sustained incremental speed was defined as the rat's MAS.

A MAS test was also performed at the end of the exercise protocols to validate the exercise program.

The running sessions were done on a flat surface (no treadmill incline) and lasted 45 min per day, once a day, and 5 days a week for 8 consecutive weeks. The running protocols started with a 5-min warm-up at a speed of 12 m/min. In the CE group, the warm-up was followed by 40 min at the speed corresponding to 70% of the VMA (i.e. 15 m/min). In the IE group, it was followed by the repetition of 7 blocks of 6 min, i.e. 3 min 12 m/min, followed by 2 min at 100% of the VMA (i.e. 21 m/min) and finally one minute of rest (i.e. a speed of 0 m/min). Protocol for combined exercise group (COME) consisting of alternation of running modalities (IE and CE) during the week.

- **Quantitative RT-PCR protocol**

- a. Bone grinding**

After sacrifice right femurs were retrieved and cleared of soft tissue. Then the distal femoral epiphysis were stored at -80 until the time of the experiment. They were used to obtain complementary DNA to study specific genes of bone remodeling and angiogenesis. Bone grinding was performed by adding a ball (QIAGEN Stainless Steel Beads) to each of the tubes containing the specimens, and then placing them in the grinding device (Retsh® MM 301). The grinding is performed at a frequency of 30 Hz/second for 30 seconds. The process is

repeated until bone powder is obtained. After grinding, Trizol (TRIZOL® Reagent, N°15596018) is added to preserve the integrity of the RNA.

#### **b. RNA extraction**

To separate the nucleic acids (DNA and RNA) from the proteins, a volume of 200µl of chloroform (SIGMA - ALDRICH c2432-26ML) was added to the bone grindings, allowing the separation of the aqueous (RNA) and organic (protein) phases, and this by centrifuging for 10 min at 12000g.

#### **c. Optical Density Measurement**

This step allows to control the integrity of the RNA samples. OD measurement was performed using a spectrophotometer at a 260nm and 280nm wavelength (MOLECULAR DEVICES SpectraMax® ABS Plus). The measurement was performed by depositing 2µl of mRNA per rat sample on a plate, which was then placed on a base and covered with a coverslip to equalize the size of the 2µl drops. The whole is placed in the spectrophotometer for analysis.

#### **d. Reverse Transcription**

During this step, a "mix 1" solution composed of 3 µl H<sub>2</sub>O (Rnase free water) / tube, 1 µl dNTP (nucleotides) / tube and 1µl Random Primers (RNA primer) / tube was added to each sample tube. The tubes were then centrifuged and placed in the thermocycler. The mRNAs obtained will be hybridized with the primers, allowing the DNA polymerase to attach and synthesize the cDNAs. During this phase of hybridization of the primers, the "mix 2" solution was prepared, which is composed of 3 µl H<sub>2</sub>O (Rnase free water) / tube, 2 µl DTT at 0.1M / tube, 4 µl 5X Buffer / tube and 1µl RT Superscript II enzyme / tube. At the end of the thermocycler cycle, 10 µl of mix 2 is added per tube. The whole was centrifuged and then placed in the thermocycler to start the cDNA synthesis.

After 1h25, the cDNA concentration is very high in the tubes. The tubes are diluted to 1/10th with H<sub>2</sub>O and transferred to 0.5 ml tubes (Figure 16 d). The samples are stored at -80°C until use.

#### **e. Quantitative real-time PCR**

Using the cDNA generated by the previous step, we proceeded to the real-time qPCR phase. The q-PCR Mix is composed of 10 µl Master Mix (TaqMan) / well, 4 µl H<sub>2</sub>O Rnase Free / well and 1 µl probe / well. These probes are specific and target 18s (reference gene), targets for targets for modulation of osteoblastic differentiation (ALP1, BGLAP, OPG, Runx2,

SPARC), targets for modulation of osteocyte differentiation (Sost, MEPE, PDPN) and characterization of vascularization (VEGFa, PECAM1, HIFa, Notch1, Emcn, ANGPT1, Dll4 and PDGFB).

In a 96-well plate of 15µl Mix, are placed 5µl of cDNA for a final volume of 20µl/well. The plate is then centrifuged and placed in the thermocycler to start real-time qPCR about 1.5 hours. Amplification started at 50°C for 2 minutes and then for 10 minutes at 95°C as the first step, followed by 45 cycles of PCR: at 95°C for 15 seconds and at 58°C for 1 minute successively.

- **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Descriptive data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). After the normality tests, and because the data were non-parametric, the Kruskal-Wallis test was used to compare the four groups. A Mann-Whitney test post-hoc test was performed to compare between two groups. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

- **Maximal aerobic speed**

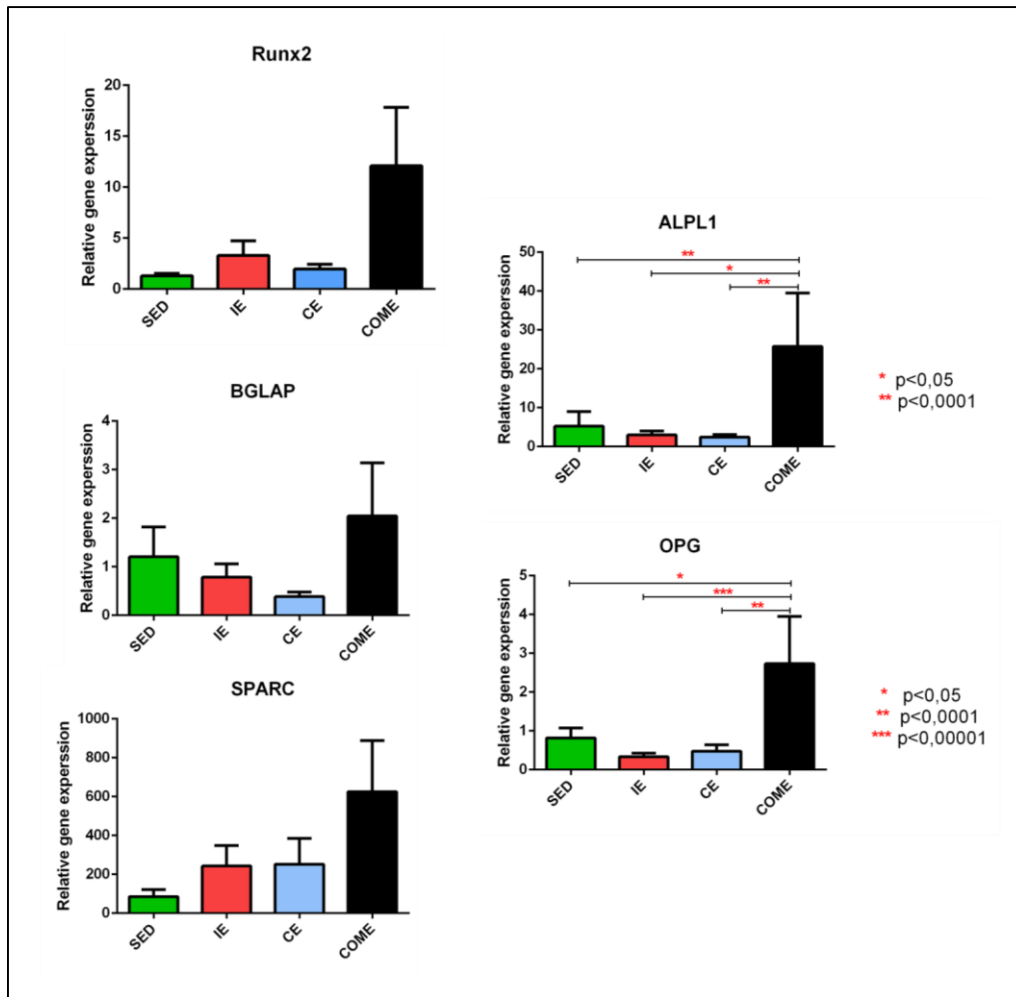
In the beginning of the study, the maximal aerobic speed (MAS) did not statistically differ between groups. An increase in the maximal aerobic speeds values in each exercise group was observed in the end of the study, while the MAS in the sedentary group was decrease at the end of the exercise protocol (Table 1). Statistically, a significant difference was recorded between each exercise group and the sedentary group, validating the exercise program ( $p=0.002$  for SED vs IE;  $p=0.003$  for SED vs CE;  $p=0.0001$  for SED vs ME).

**Table 1:** Maximal aerobic speed (MAS) at the beginning and the end of the exercise protocol in SED and exercised groups (IE, CE, COME)

<i>PARAMETERS</i>	<i>Time</i>	<i>SED</i>	<i>IE</i>	<i>CE</i>	<i>COME</i>
<i>MAS</i> ( <i>M/MIN</i> )	Beginning of exercise	28 ± 9	32 ± 5	33 ± 6	31 ± 8
	End of exercise	23 ± 6	34,7 ± 11 *	33 ± 8 *	37 ± 3 *

- **Gene expression of osteoblast markers**

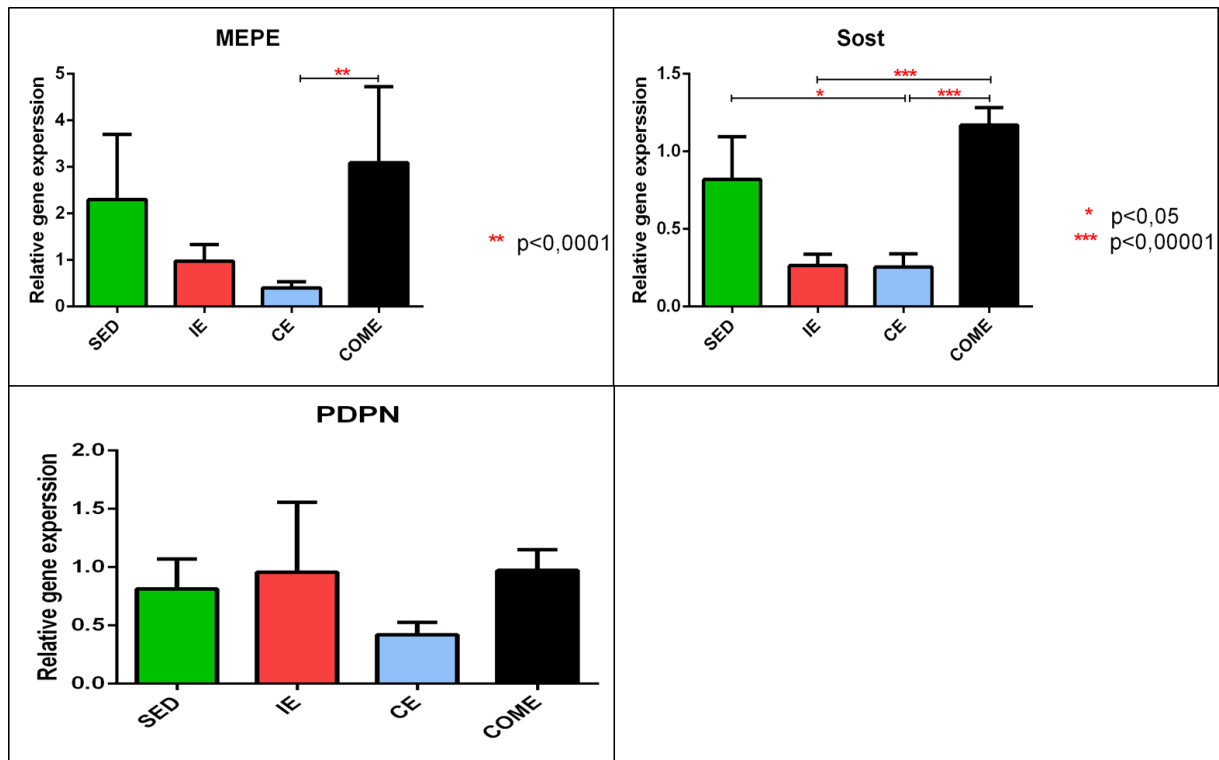
For the expression of osteoblastic markers in the distal femoral epiphysis, the results showed that Runx2, BGLAP and SPARC markers did not reveal any significant difference between the different experimental groups (fig.1). However, for the markers of alkaline phosphatase (ALP1) and osteoprotegerin (OPG) a significantly high expression was recorded in the combined exercise group compared to the other experimental groups (sedentary, intermittent and continuous exercise groupes) (fig.1).



**Fig.1** Expression of mRNAs of different osteoblastic differentiation markers in the distal femoral epiphysis in SED rats and rats exposed to different treadmill running modalities (IE: intermittent exercise; CE: continuous exercise; COME: combined exercise); (n=10 for SED; n= 10 for IE, n=10 for CE and n=9 for COME). Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

- **Gene expression of osteocyte markers**

Concerning the osteocyte marker genes in the distal femoral epiphysis, the results did not show any significant difference for the Podoplanin marker (PDPN) (fig.2). For the MEPE marker, a significantly lower expression was observed in the continuous exercise group compared to the combined exercise group. Sclerostin gene expression (Sost) was significantly lower in the continuous exercise group compared with the sedentary and combined exercise groups. Low expression of this gene was also observed in the intermittent exercise group compared to the combined exercise group (fig.2).



**Fig.2** Expression of mRNAs of different osteocyte differentiation markers in the distal femoral epiphysis in SED rats and rats exposed to different treadmill running modalities (IE: intermittent exercise; CE: continuous exercise; COME: combined exercise); (n=10 for SED; n= 10 for IE, n=10 for CE and n=9 for COME). Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

- **Gene expression of vascularization and angiogenesis markers**

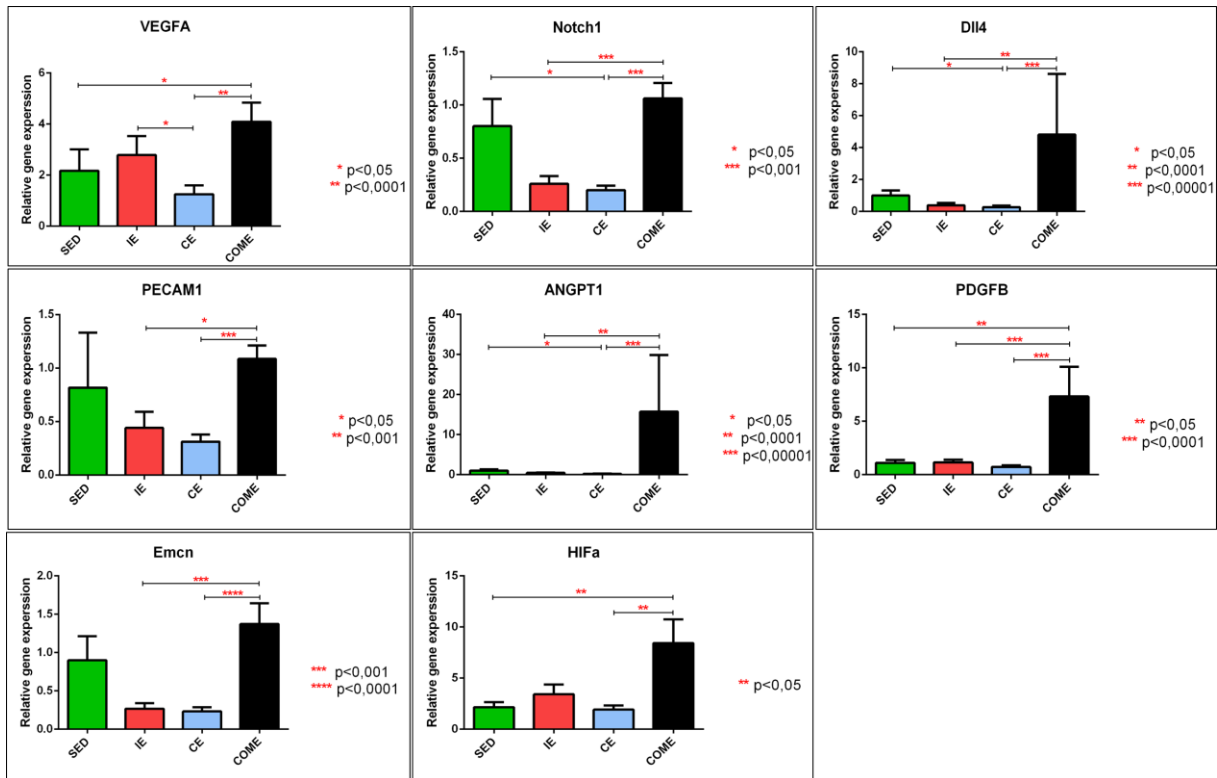
The results of the vascularization and angiogenesis genes showed overall high expression in the combined exercise group, however the continuous moderate running group recorded the lowest expression of these different genes in the distal femoral epiphysis.

For VEGFA, the master gene of angiogenesis, a very high expression was recorded in the combined exercise group compared to the continuous running and sedentary group. High expression was also recorded in the intermittent exercise group compared to the continuous exercise group (fig.3).

Expression of mRNAs for the Notch-1, DII4, PDGFB and ANGPT1 markers was significantly elevated in the combined exercise group compared with the other exercise modalities, continuous and intermittent. Low expression of these genes was recorded in the continuous exercise group compared to the sedentary case (fig.3).

Also, for the markers PECAM1 and Emcn, a high expression was recorded in the combined exercise group compared to the continuous and intermittent exercise groups (fig.3).

The expression of HIFa was significantly higher in the combined exercise group compared to the continuous exercise group and the sedentary group ( $p < 0.05$ ) (fig.3).



**Fig.3** Expression of mRNAs of different vascularization and angiogenesis markers in the distal femoral epiphysis in SED rats and rats exposed to different treadmill running modalities (IE: intermittent exercise; CE: continuous exercise; COME: combined exercise); (n=10 for SED; n= 10 for IE, n=10 for CE and n=9 for COME). Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ .

## Discussion

In the present study, we attempted, for the first time, to compare the effects of three different treadmill running modalities on the expression of different bone formation, bone remodeling, and bone vascularization genes in wistar rats. Our experiments were conducted in young adult male rats, and Q-PCR analyses were performed on bone explants from distal femoral epiphysis.

To date, studies showing the upregulation of bone remodeling and bone vascularization gene expressions by physical activity remain limited. Regarding biological markers of bone formation and remodeling, our results revealed a very high expression of these markers (ALP1, OPG, MEPE, PDGFP, Sost) by combined type exercise. In contrast, continuous running exercise appeared to have the lowest values of the levels of these different markers. However, intermittent treadmill exercise showed no change in these markers in the distal femoral epiphysis compared with sedentary condition.

According to these results, it seems that combined running exercise has an osteogenic effect because it upregulates the expression of mRNAs of bone formation and remodeling genes, notably ALP1, and OPG. Nevertheless, this exercise seems to accelerate the process of osteocyte aging as it increases the expression of podoplanin (PDPN) and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), considered markers of osteocyte aging [26].

In addition, sclerostin (Sost), a bone formation inhibitor and biomarker of mature osteocytes [27], was also highly expressed following combined exercise. Unfortunately, no studies showing the effects of combined exercise on the expression of remodeling genes exist in the literature to our knowledge. However, the effect of other exercise modalities on decreasing Sost expression is known in the literature. A recent study showed that intermittent treadmill exercise significantly decreased Sost mRNA expression compared to sedentary exercise in young adult wistar rats [12]. Continuous type exercise also showed a positive effect on Sost expression, it was demonstrated that continuous exercise decreases this expression in young mice, however this positive effect seems to be deprived with the age of the animals despite the maintaining of the exercise [28].

The results of the present study show that there is no significant effect of intermittent and continuous exercise on most of the genes studied at the distal femoral epiphysis. This could be explained by the anatomical location of the distal epiphysis which is considerably distant from the point of impact, and therefore receives less mechanical stress and consequently less



adaptive responses. A second hypothesis is that it seems necessary to evaluate these adaptive responses on very long term running protocols in order to better understand the mechanisms involved in physiological and structural bone changes.

For vascular gene mRNAs, intermittent running exercise significantly increased the expressed level of VEGFA mRNA compared with continuous exercise in the distal femoral epiphysis. However, in another study, continuous exercise resulted in upregulation of VEGFR2 and VEGF mRNA in the proximal tibia and in the metaphyseal bone in young adult rats only after 10 days of training [16]. The difference between these results can again be justified by the theory of a site-dependent effect of physical exercise, on vascular parameters in particular.

The link between osteogenesis and angiogenesis is mediated by the different populations of cells (osteoblasts, osteocytes and endothelial cells). These cells will express biomarkers such as VEGFA, Endomucin (Emcn), Angiopoietin (ANGPT1), Notch1, Dll4, Pecam1 and Hifa [11,29].

In addition to VEGFA, all other markers were significantly more expressed in the combined exercise group compared with the other exercise modality. In addition, continuous running exercise recorded a more decreased expression of Notch1, Dll4, and ANGPT1 compared with the sedentary group. These three biomarkers indeed promote endothelial cell proliferation and vascular growth, thereby promoting angiogenesis [29,30]. We can therefore conclude that continuous moderate running could have negative effects on bone vascular status, however combined running seems to be the most efficient running modality in terms of the expression of different vascular genes and thus by extension the most efficient for endothelial cell proliferation and new vessel formation (angiogenesis). Intermittent running does not appear to have a pronounced effect on all vascular genes except VEGFA and hypoxia-inducible factor (HIFa), triggering many processes including angiogenesis via VEGFA expression [31].

In conclusion, the combined running seems to be the most effective running modality regarding the expression of the different angiogenic markers, but it remains less interesting in terms of osteoblastic/osteocytic lineage. This controversial result can be explained by the difficulty of the rats to perform this race protocol. Indeed, some rats in the combined running group did not perform the running protocol consistently, which could partly explain the dispersion of the intra-group results. Continuous running remains the modality with the most negative effects, however intermittent running promotes angiogenesis via increased VEGFA

expression, and does not result in any changes in the rest of the gene markers of bone remodeling and bone vascularization.

## References

1. Korsager Larsen, M.; Matchkov, V.V. Hypertension and Physical Exercise: The Role of Oxidative Stress. *Medicina (Kaunas)* **2016**, *52*, 19–27, doi:10.1016/j.medici.2016.01.005.
2. Saeed, S.A.; Cunningham, K.; Bloch, R.M. Depression and Anxiety Disorders: Benefits of Exercise, Yoga, and Meditation. *Am Fam Physician* **2019**, *99*, 620–627.
3. De Sousa, R.A.L.; Improtá-Caria, A.C.; Aras-Júnior, R.; de Oliveira, E.M.; Soci, Ú.P.R.; Cassilhas, R.C. Physical Exercise Effects on the Brain during COVID-19 Pandemic: Links between Mental and Cardiovascular Health. *Neurol Sci* **2021**, 1–10, doi:10.1007/s10072-021-05082-9.
4. Pedersen, B.K.; Saltin, B. Exercise as Medicine - Evidence for Prescribing Exercise as Therapy in 26 Different Chronic Diseases. *Scand J Med Sci Sports* **2015**, *25 Suppl 3*, 1–72, doi:10.1111/sms.12581.
5. Zhang, W.; Nuki, G.; Moskowitz, R.W.; Abramson, S.; Altman, R.D.; Arden, N.K.; Bierma-Zeinstra, S.; Brandt, K.D.; Croft, P.; Doherty, M.; et al. OARSI Recommendations for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis: Part III: Changes in Evidence Following Systematic Cumulative Update of Research Published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, *18*, 476–499, doi:10.1016/j.joca.2010.01.013.
6. Rubin, C.T.; Lanyon, L.E. Regulation of Bone Formation by Applied Dynamic Loads. *J Bone Joint Surg Am* **1984**, *66*, 397–402.
7. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, *1116*, 281–290, doi:10.1196/annals.1402.018.
8. Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* **2008**, *42*, 606–615, doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.
9. Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1986; ISBN 978-3-642-71033-9.
10. Portier, H.; Benaitreau, D.; Pallu, S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life* **2020**, *10*, 217, doi:10.3390/life10100217.
11. Wazzani, R.; Pallu, S.; Bourzac, C.; Ahmaïdi, S.; Portier, H.; Jaffré, C. Physical Activity and Bone Vascularization: A Way to Explore in Bone Repair Context? *Life (Basel)* **2021**, *11*, 783, doi:10.3390/life11080783.
12. Boudenot, A.; Pallu, S.; Uzbekov, R.; Dolleans, E.; Toumi, H.; Lespessailles, E. Free-Fall Landing and Interval Running Have Different Effects on Trabecular Bone Mass and Microarchitecture, Serum Osteocalcin, Biomechanical Properties, SOST Expression and on Osteocyte-Related Characteristics. *Appl Physiol Nutr Metab* **2021**, *46*, 1525–1534, doi:10.1139/apnm-2020-0683.

13. de Farias Junior, G.C.; de Sousa Neto, I.V.; Guzzoni, V.; Pisani, G.D.; Royer, C.; de Lima, C.L.; de Assis Rocha Neves, F.; Bogni, F.H.; Nonaka, K.O.; Durigan, J.L.Q.; et al. Remodeling Process in Bone of Aged Rats in Response to Resistance Training. *Life Sci* **2020**, *256*, 118008, doi:10.1016/j.lfs.2020.118008.
14. Vicente, W.S.; dos Reis, L.M.; Graciolli, R.G.; Graciolli, 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, doi:10.1371/journal.pone.0064725.
15. Yu, X.; Zhang, X.; Zeng, B. [Expression of transforming growth factor beta1 and insulin-like growth factor I in the regenerated bones after low frequency micro movement]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **2006**, *20*, 685–689.
16. Yao, Z.; Lafage-Proust, M.-H.; Plouët, J.; Bloomfield, S.; Alexandre, C.; Vico, L. Increase of Both Angiogenesis and Bone Mass in Response to Exercise Depends on VEGF. *J Bone Miner Res* **2004**, *19*, 1471–1480, doi:10.1359/JBMR.040517.
17. Li, W.; Zhang, Y.; Xu, X.; Wang, K.; Ding, W. Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Ovariectomized Osteoporotic Rats after Exercise Training. *Int J Clin Exp Pathol* **2017**, *10*, 11438–11449.
18. Padilla, J.; Jenkins, N.T.; Roberts, M.D.; Arce-Esquivel, A.A.; Martin, J.S.; Laughlin, M.H.; Booth, F.W. Differential Changes in Vascular mRNA Levels between Rat Iliac and Renal Arteries Produced by Cessation of Voluntary Running. *Exp Physiol* **2013**, *98*, 337–347, doi:10.1113/expphysiol.2012.066076.
19. Laughlin, M.H.; Newcomer, S.C.; Bender, S.B. Importance of Hemodynamic Forces as Signals for Exercise-Induced Changes in Endothelial Cell Phenotype. *J Appl Physiol (1985)* **2008**, *104*, 588–600, doi:10.1152/jappphysiol.01096.2007.
20. Newcomer, S.C.; Thijssen, D.H.J.; Green, D.J. Effects of Exercise on Endothelium and Endothelium/Smooth Muscle Cross Talk: Role of Exercise-Induced Hemodynamics. *J Appl Physiol (1985)* **2011**, *111*, 311–320, doi:10.1152/jappphysiol.00033.2011.
21. Kivelä, R.; Silvennoinen, M.; Lehti, M.; Jalava, S.; Vihko, V.; Kainulainen, H. Exercise-Induced Expression of Angiogenic Growth Factors in Skeletal Muscle and in Capillaries of Healthy and Diabetic Mice. *Cardiovasc Diabetol* **2008**, *7*, 13, doi:10.1186/1475-2840-7-13.
22. Gavin, T.P.; Drew, J.L.; Kubik, C.J.; Pofahl, W.E.; Hickner, R.C. Acute Resistance Exercise Increases Skeletal Muscle Angiogenic Growth Factor Expression. *Acta Physiol (Oxf)* **2007**, *191*, 139–146, doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01723.x.
23. Audet, G.N.; Meek, T.H.; Garland, T.; Olfert, I.M. Expression of Angiogenic Regulators and Skeletal Muscle Capillarity in Selectively Bred High Aerobic Capacity Mice. *Exp Physiol* **2011**, *96*, 1138–1150, doi:10.1113/expphysiol.2011.057711.
24. Bloor, C.M. Angiogenesis during Exercise and Training. *Angiogenesis* **2005**, *8*, 263–271, doi:10.1007/s10456-005-9013-x.
25. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using MCT. *Life (Basel)* **2020**, *10*, E308, doi:10.3390/life10120308.

26. Bonewald, L.F. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res* **2011**, *26*, 229–238, doi:10.1002/jbmr.320.
27. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann N Y Acad Sci* **2007**, *1116*, 281–290, doi:10.1196/annals.1402.018.
28. Gardinier, J.D.; Rostami, N.; Juliano, L.; Zhang, C. Bone Adaptation in Response to Treadmill Exercise in Young and Adult Mice. *Bone Rep* **2018**, *8*, 29–37, doi:10.1016/j.bonr.2018.01.003.
29. Kusumbe, A.P.; Ramasamy, S.K.; Adams, R.H. Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone. *Nature* **2014**, *507*, 323–328, doi:10.1038/nature13145.
30. Félétou, M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*; Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease; Morgan & Claypool Life Sciences: San Rafael (CA), 2011;
31. Lin, C.; McGough, R.; Aswad, B.; Block, J.A.; Terek, R. Hypoxia Induces HIF-1alpha and VEGF Expression in Chondrosarcoma Cells and Chondrocytes. *J Orthop Res* **2004**, *22*, 1175–1181, doi:10.1016/j.orthres.2004.03.002.

# **Partie IV**

## **Discussion générale**

## Discussion et limites

La présente étude est la première, à notre connaissance, à comparer et à analyser les effets de trois modalités de course, sur différents paramètres de qualité osseuse et la vascularisation osseuse au niveau fémoral chez le rat Wistar Wistar. Les principaux résultats de cette étude mettent en évidence que :

- L'exercice continu ne semble pas modifier les paramètres microarchitecturaux et vasculaires.
- L'exercice intermittent se caractérise par un effet ostéogénique en augmentant la DMO trabéculaire, avec un effet angiogénique précoce (VEGFA).
- L'exercice de type combiné (alternance entre le continu et l'intermittent) a un effet ostéogénique au niveau du tissu trabéculaire et un effet angiogénique au niveau de l'os fémoral.

Nos résultats ne montrent pas de différences significatives entre les différentes modalités au niveau de l'os cortical. Ainsi, l'épaisseur corticale, le taux d'occupation ostéocytaire et le nombre de lacunes ostéocytaires apoptotiques ne diffèrent pas statistiquement d'un groupe expérimental à l'autre.

La course continue est connue dans la littérature pour absence d'effet ou pour son retentissement négatif sur l'os cortical (épaisseur et taux d'occupation ostéocytaire) dans les protocoles de courte durée (8 semaines) [211,220]. Par contre, pour des protocoles de durées plus importantes (10 à 12 semaines), les études rapportent un nombre d'ostéocytes plus élevé dans la fraction corticale [192,218]. La durée du protocole semble donc être un facteur essentiel des réponses ostéocytaires au niveau cortical.

Concernant l'exercice intermittent, des études récentes ont montré une augmentation de l'épaisseur corticale fémorale [213] et du taux d'occupation ostéocytaire de plus de 60% par rapport à un groupe contrôle [196]. Par ailleurs, notre équipe a comparé la course intermittente à une course continue. Nous avons ainsi montré que le taux d'occupation ostéocytaire était supérieur de 50% dans le groupe intermittent par rapport au groupe continu [220] (Annexe 2). Les variations d'application des charges mécaniques mises en jeu lors de l'exercice intermittent vs l'exercice continu pourraient expliquer ces modifications corticales. Ces variations tiennent compte des notions d'amplitude mais aussi de fréquence. En effet, la

notion qualitative du repos inséré lors de la course intermittente et ignoré pour la course continue, semble être un indicateur et un critère de performance de la pratique physique. Ce temps de repos permet aux ostéocytes de retrouver une sensibilité suffisante aux contraintes mécaniques [189]. En effet, il a été démontré dans la littérature qu'après quelques minutes d'exercice, la sensibilité osseuse aux contraintes diminue. Des phases de récupération passive (temps de repos) sont nécessaires pour rétablir la sensibilité de l'ostéocyte aux contraintes mécaniques induites [260].

L'exercice intermittent est caractérisé par la diminution de l'activité ostéoclastique, évaluée par le marquage TRAP, par rapport à l'exercice continu [220]. Cependant dans notre étude, aucune différence n'a été observée entre les groupes concernant la surface de résorption ostéoclastique. Il est à noter que l'activité ostéoclastique rapportée dans la littérature porte généralement sur le tibia [220]. Or, dans notre étude, les analyses ont porté sur le fémur. Nous pouvons poser l'hypothèse que les contraintes mécaniques sont moindres au niveau du fémur par rapport au tibia. Dès lors, cette même hypothèse est applicable à l'absence globale de modifications au niveau de l'os cortical fémoral quelque soit la modalité d'exercice.

À notre connaissance, il ne semble pas exister de données concernant les effets de l'exercice combiné sur le compartiment cortical. L'absence de différences avec les autres modalités d'exercice dans notre étude est très probablement liée au site anatomique étudié (fémur vs tibia).

Au niveau trabéculaire nous avons constaté des différences statistiques entre les groupes. Concernant la DMO trabéculaire la différence statistiquement valide entre les groupes s'exprime uniquement au niveau du fémur proximal (aucune différence n'a été enregistrée pour le fémur distal). La valeur la plus élevée de la DMO trabéculaire est observée dans le groupe intermittent, alors que la valeur la plus faible est enregistrée dans le groupe d'exercice continu. En comparaison avec un groupe contrôle, l'exercice intermittent a toujours amélioré la DMO fémorale [194,198]. La comparaison entre l'exercice continu et l'exercice intermittent, a montré que l'exercice intermittent améliore significativement la DMO du corps entier et du fémur de plus de 20% par rapport à l'exercice continu, même avec une durée d'entraînement 30% plus réduite [197]. L'exercice intermittent est associé à une augmentation possible de la communication cellulaire suite à la stimulation importante via les contraintes mécaniques qui l'engendre. En effet, la communication cellulaire osseuse est assurée par des molécules qui sont libérées en plus grandes quantités lors l'écoulement de fluide au sein des

canalicules [13]. Ces molécules sont connues pour favoriser la formation osseuse et le remodelage osseux et leur production/libération sont modifiées par l'exercice [13]. Elles traduiraient une activation des ostéocytes lors de l'exercice intermittent, qui engendrerait une augmentation de la fixation du calcium et donc une augmentation du contenu minéral observable via la DMO. Pour l'exercice continu, dans l'étude de Joo et *al.*, (2003) l'augmentation de la DMO a été enregistrée que dans les métaphyses fémorales proximale et distale et non pas dans les épiphyses [204]. Par ailleurs, dans le contexte de guérison osseuse, une étude récente a montré que l'exercice continu améliore le BV/TV chez les rats entraînés à la 6ème, à la 7ème et à la 8ème semaine par rapport au sédentaire au niveau du tibia, cependant, au niveau du fémur, le BV/TV chez les rats entraînés n'était pas élevé qu'à la 8ème semaine seulement [259]. Les résultats de ces études suggèrent que l'adaptation de l'os trabéculaire à l'exercice modéré continu sur tapis roulant est spécifique au sites et qu'il s'agit bien d'une variabilité de distribution de contraintes mécaniques en fonction des sites anatomiques analysés. Dans notre étude, le groupe d'exercice combiné a enregistré une valeur de DMO trabéculaire intermédiaire entre les deux autres groupes d'exercice (intermittent et continu). L'alternance des contraintes lors de cet exercice combiné pourrait expliquer ce résultat remarquable uniquement au niveau du fémur proximal. Cette différence est encore une fois liée au distribution différente de contraintes mécaniques en fonction du site fémoral.

Dans notre étude, la course combinée augmente l'épaisseur trabéculaire au niveau du fémur proximal par rapport aux autres groupes (exercice intermittent, continu et contrôle). Au niveau du fémur distal, la différence ne persiste qu'entre le groupe d'exercice combiné et le groupe d'exercice intermittent. Alors que l'exercice continu ne semble pas affecter ce paramètre. Or, dans la littérature, il est rapporté que la course continue modérée a des effets positifs sur la microarchitecture osseuse dans le modèle murin. Au niveau fémoral, ce type d'exercice pendant 10 semaines, augmente la résistance osseuse en modifiant entre autres positivement la microarchitecture osseuse trabéculaire [204]. Ainsi, il est rapporté une augmentation de l'épaisseur trabéculaire, du nombre des trabécules et du volume osseux trabéculaire [210]. Au niveau tibial, l'entraînement continu modéré montre des adaptations de l'os trabéculaire dès la troisième semaine d'exercice [210]. Cinq semaines d'entraînement en continu favorisent des trabécules plus épaisses (Tb.Th) et une séparation trabéculaire (Tb.Sp) plus réduite [214]. De plus, la pratique de ce type d'exercice pendant 12 semaines augmente le volume osseux trabéculaire [193]. Ces réponses microarchitecturales diffèrent aussi en



fonction du site osseux analysé. Dans l'étude de Iwamoto *et al.*, (1999) les paramètres microarchitecturaux sont plus élevés au niveau du tibia distal comparé au tibia proximal [193]. Cela met en avant encore une fois que l'adaptation du tissu osseux aux contraintes mécaniques subies est fortement variables en fonction de la localisation anatomique.

Dans notre étude, l'expression des ARNm des gènes de la phosphatase alcaline (ALPL1) et de l'ostéoprotégérine (OPG), au niveau de l'épiphyse distale fémorale, est statistiquement supérieure dans le groupe combiné comparé aux autres trois autres groupes. Ces données suggèrent que la course combinée améliore le processus de formation osseuse tout en favorisant la différenciation ostéoblastique. Cela est associé à une forte expression des ARNm de la phosphoglycoprotéine extracellulaire matricielle (MEPE), marqueur du vieillissement ostéocytaire [90], par rapport au groupe continu. Et de même, la sclérostine (Sost), élément inhibiteur de formation osseuse et marqueur biologique des ostéocytes matures [96] est plus élevée dans le groupe combiné comparé aux autres modalités d'exercice. L'ensemble de ces éléments mettent en avant l'hypothèse que l'exercice de course combinée entraîne une meilleure stimulation des cellules ostéocytaires (qui envoient des signaux d'activation aux ostéoblastes) tout en favorisant l'apoptose des ostéocytes âgés. En conséquence, l'exercice combiné pourrait être considéré un bon activateur du remodelage osseux physiologique. Par ailleurs, l'exercice combiné tend à améliorer les paramètres microarchitecturaux (BV/TV, Tb.N, et Tb.BMD) comparé aux autres groupes. Nous aurions donc une première expression génétique des effets bénéfiques de l'exercice combiné qui serait suivie d'une adaptation morphologique au niveau osseux. Cette adaptation morphologique semble être conditionnée par une durée d'entraînement plus longue.

Cette chronologie des événements est confortée par une observation : l'épaisseur trabéculaire est statistiquement diminuée par l'exercice intermittent comparé au combiné. Cette diminution est accompagnée d'une diminution de l'expression génique (ALPL1 et OPG). Pour le groupe continu, aucune différence n'a été observée, concernant l'épaisseur trabéculaire, en comparaison avec le combiné. Plusieurs hypothèses peuvent être retenues pour expliquer l'absence d'adaptation de l'épaisseur trabéculaire chez le groupe continu, au regard des modifications génétiques :

- 1) La charge du travail dans le groupe d'exercice continu pourrait être très élevée pour les animaux, ce qui rend l'exercice difficile à effectuer. Dans notre étude cette hypothèse semble être ignorée vu que les charges de travail étaient identiques dans les groupes d'exercice.

- 2) Même avec des charges de travail identiques, les modalités d'exercice dans notre étude sont différentes. Les temps de repos et d'exercice sont variables entre les groupes. En conséquence, les adaptations au niveau ostéocytaire se diffèrent entre les groupes. Cela engendre donc une émission de signaux différents vers les ostéoblastes et des expressions géniques différentes. Il est probable que cette expression soit quantitativement non suffisante pour entraîner des modifications structurales de l'os trabéculaire notamment chez le groupe d'exercice continu.
- 3) Pour s'attendre à des réponses adaptatives plus importantes en regard de l'ensemble des modalités d'exercice, il est probablement judicieux d'accumuler ces contraintes sur des durées beaucoup plus longues, afin de faire apparaître des modifications de DMO et microarchitecturales.

L'ensemble de ces modifications microarchitecturales, enregistrées dans cette étude, sont liées à des modifications d'ordre cellulaire. Or, les cellules pour fonctionner nécessitent des apports en nutriments et en O<sub>2</sub> accrus pour répondre aux exigences liées à l'activité physique. Ces apports se font entre autres via le système sanguin. Une analyse de vascularisation peut donc nous permettre d'appréhender ces apports.

A l'échelle vasculaire, nous avons choisi d'analyser par technique d'immunohistochimie le VEGFR2 et le CD31. Le VEGFR2 est le principal récepteur de signalisation du VEGF et est principalement exprimé dans les cellules endothéliales pour promouvoir l'angiogenèse. Il favorise également la perméabilité des vaisseaux en réponse au VEGF [154]. Le CD31 est un marqueur endothélial des cellules progénitrices endothéliales ainsi que du VEGFR2. Le CD31 est aussi le composant le plus abondant des jonctions cellulaires endothéliales. Son rôle est important dans l'angiogenèse, en raison de l'emplacement stratégique à la frontière cellule-cellule endothéliale dans l'endothélium de différents types de vaisseaux et dans le réseau capillaire tridimensionnel, ainsi que son rôle dans l'initiation des contacts cellule-cellule [261].

Les résultats d'immunohistochimie sur le nombre total (fémur entier) de vaisseaux exprimant le VEGFR2 ne diffèrent pas entre les groupes. Aucune différence statistique n'est également observée au niveau de l'épiphyse proximale du fémur et au niveau de la diaphyse. En revanche, dans l'épiphyse distale fémorale, la course continue s'accompagne d'une expression de ce marqueur significativement plus faible comparée aux autres groupes. Cela

est associé à une expression plus faible des ARNm du VEGFA au niveau de l'épiphyse distale fémorale, chez le groupe continu par rapport aux autres modalités de course (intermittente et continue). D'après ces résultats nous pouvons poser l'hypothèse que la course continue a potentiellement un effet délétère au niveau de l'expression du gène VEGFA, entraînant une réduction du nombre de vaisseaux dans l'épiphyse distale fémorale. À contrario, le groupe intermittent semble présenter une amélioration de l'angiogenèse, à la fois au niveau proximal et au niveau diaphysaire. En revanche, au niveau distal, il ne semble pas y avoir d'augmentation du nombre de vaisseaux. Nous pouvons toutefois observer une expression de VEGFA supérieure dans le groupe intermittent comparé au contrôle, mais qui n'est pas statistiquement valide. Cette dernière observation est aussi valable pour le groupe combiné. Il est probable que la durée de l'entraînement soit le facteur modulant la réponse angiogénique au niveau osseux.

Notre résultat concernant l'expression des ARNm du gène HIF $\alpha$  au niveau de l'épiphyse distale fémorale suit la même tendance que les résultats relatifs à l'expression du VEGFR2 et du VEGFA. Cela pourrait être justifié par le rôle important joué par la voie HIF-1 $\alpha$  dans la libération du VEGF par les ostéoblastes, et ainsi dans l'activation des cellules endothéliales et le processus d'angiogenèse [172].

Quant au marquage du CD31 (également appelé PECAM1) aucune différence significative n'est observée entre les groupes, et cela quelle que soit la région anatomique analysée. Un sous-type de capillaire, spécifiquement les vaisseaux de type H, est défini par une forte expression de CD31 et d'Endomucine [21]. L'Endomucine (Emcn) est une protéine sécrétée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et considérée comme un marqueur des vaisseaux sanguins [262]. Les vaisseaux de type H peuvent activer directement la formation osseuse par la production de facteurs qui stimulent la prolifération et la différenciation des ostéoprogéniteurs localisés dans la moelle osseuse et la libération de facteurs favorisant l'ostéogenèse [20,21]. Dans notre étude, l'expression génique des marqueurs PECAM1 et Emcn est statistiquement supérieure dans le groupe de course combinée par rapport aux autres modalités de course. Cela pourrait indiquer que les vaisseaux de type H semblent être stimulés par ce programme de course combiné. En revanche, la course continue, semble affecter négativement le nombre de vaisseaux exprimant le CD31. L'exercice intermittent semble préserver le nombre des vaisseaux exprimant le CD31 en immunohistochimie, et constituerait une modalité intermédiaire entre le continu et le combiné. Par conséquent, la course

combinée apparaît comme étant potentiellement la meilleure modalité pour développer le réseau vasculaire et pouvant expliquer à moyen terme l'amélioration des trabécules osseuses.

Les résultats de RT-qPCR montrent une forte expression des gènes AGPT1, Notch1 et Dll4 chez le groupe de course combinée par rapport aux autres modalités d'exercice, et une diminution dans le groupe continu comparé au contrôle. Pour le PDGFB, l'expression est élevée dans le groupe combiné par rapport aux autres groupes expérimentaux.

L'angiopoïétine-1 (AGPT1) contribue, avec le VEGF, à l'angiogenèse tout au long du développement et à l'âge adulte [263]. La voie de signalisation Notch via entre autres le récepteur Notch1 et son ligands Dll4 favorise la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales et la croissance des vaisseaux [264]. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes B (PDGFB) intervient dans la formation des vaisseaux de type H lors de la formation du nouvel os pendant le modelage et le remodelage osseux [265].

Nous pouvons en déduire que la croissance vasculaire médiée par l'AGPT1, et la prolifération des cellules endothéliales activée par la voie Notch semblent moins efficaces par les courses intermittente et continue. De plus, le course continue semble détériorer ces processus vasculaires. Cette détérioration ne pourrait probablement être qu'une première réponse vasculaire troublée. Alors que la prolongation de ce type d'exercice continu pourrait potentiellement engendrer une réponse adaptative positive plus importante. Par ailleurs, la course combinée semble être la modalité de course la plus efficace à la prolifération de cellules endothéliales et donc à la formation de nouveaux vaisseaux (de type H plus précisément), et ce en réponse à l'activation du remodelage osseux.

Nous pouvons toutefois reporter quelques limites à notre travail. Pour des raisons techniques la réalisation de certaines mesures n'était pas possible. En effet, le fait d'être limité en termes des échantillons (fémurs), et en techniques de stockage a réduit les chances d'aller plus loin dans nos choix d'analyse du tissu osseux. Par ailleurs, aucune étude n'existe dans la littérature concernant la modalité de course combinée, à notre connaissance, pour pouvoir discuter au mieux les résultats obtenus. Un tel programme d'entraînement a été choisi et défini dans la présente étude afin d'imiter la réalité de la pratique sportive chez les athlètes et les patients. Il est important de mentionner que les résultats controversés obtenus par ce mode d'entraînement peuvent être expliqués par le stress mécanique augmenté chez les animaux avec l'alternance entre les deux protocoles différents (modéré continu et intermittent). En effet, la difficulté des rats de ce groupe à effectuer ce protocole de course

combinée a empêché la pratique de l'exercice de manière régulière. En conséquence une variabilité inter-individus peut affecter les résultats observés. Enfin, comme nous l'avons indiqué tout le long de la discussion, il est probable que l'une des principales limites de cette étude réside dans la durée de l'entraînement, qui ne nous a pas permis de clarifier toutes les réponses adaptatives.

## Conclusion et perspectives

En conclusion, l'exercice combiné tend à favoriser l'angiogenèse de façon différentielle en fonction des régions fémorales. Il est probable que ces différences soient liées à des niveaux de contraintes mécaniques différents selon le site anatomique analysé. Ces mêmes observations conduisent à de mêmes modifications microarchitecturales osseuses. La course intermittente connue dans la littérature par son effet ostéogénique, tend à avoir un effet angiogénique moindre comparée à une course combinée. Enfin, dans notre étude, la course continue ne semble pas avoir les effets antérieurement observés dans la littérature sur la qualité osseuse. De plus, cette modalité semble même avoir des effets négatifs sur quelques paramètres angiogéniques, dans le cadre de notre protocole expérimental.

Nos résultats demandent à être complétés par l'évaluation et l'analyse du phénomène du couplage de l'angiogenèse et de l'ostéogenèse dans le cadre de la pratique physique. L'étude de ce phénomène via plusieurs paramètres (Runx2, Emcn, CD31, Osterix) permettra de tracer une vision générale sur le développement du système vasculaire osseux, en réponse aux différentes modalités d'exercice physique. D'autre part, une étude comparative des effets de ces différentes modalités de course sur le tibia semble nécessaire. En effet, en comparaison avec le tibia, le fémur représente un site anatomique recevant moins de contraintes mécaniques chez le rat, vu sa position horizontale au moment d'impact au sol. De ce fait, nous estimons que les réponses adaptatives au niveau tibial seront plus importantes qu'au niveau fémoral. Le recours à un modèle murin ostéoporotique ou à un modèle avec défaut osseux demeure un choix judicieux pour, premièrement étudier le volet curatif de ces différentes modalités de course sur le tissu osseux. Et deuxièmement pour escompter avoir des réponses adaptatives plus importantes sur un tissu osseux préalablement stimulé. Finalement, des études approfondies avec des protocoles de course de plus longue durée sont indispensables afin de déterminer de manière très détaillée les effets positifs et négatifs des différents protocoles d'exercice physique sur les paramètres de qualité osseuse, afin de bien décrire des pratiques physiques à conseiller dans le cadre préventif comme dans le cadre curatif.

## Références

1. Ambrose, K.R.; Golightly, Y.M. Physical Exercise as Non-Pharmacological Treatment of Chronic Pain: Why and When. *Best Pract Res Clin Rheumatol***2015**, *29*, 120–130, doi:10.1016/j.berh.2015.04.022.
2. De Sousa, R.A.L.; Improtta-Caria, A.C.; Aras-Júnior, R.; de Oliveira, E.M.; Soci, Ú.P.R.; Cassilhas, R.C. Physical Exercise Effects on the Brain during COVID-19 Pandemic: Links between Mental and Cardiovascular Health. *Neurol Sci***2021**, 1–10, doi:10.1007/s10072-021-05082-9.
3. Warburton, D.E.R.; Nicol, C.W.; Bredin, S.S.D. Health Benefits of Physical Activity: The Evidence. *CMAJ***2006**, *174*, 801–809, doi:10.1503/cmaj.051351.
4. Pedersen, B.K.; Saltin, B. Exercise as Medicine - Evidence for Prescribing Exercise as Therapy in 26 Different Chronic Diseases. *Scand J Med Sci Sports***2015**, *25 Suppl 3*, 1–72, doi:10.1111/sms.12581.
5. Zhang, W.; Nuki, G.; Moskowitz, R.W.; Abramson, S.; Altman, R.D.; Arden, N.K.; Bierma-Zeinstra, S.; Brandt, K.D.; Croft, P.; Doherty, M.; et al. OARSI Recommendations for the Management of Hip and Knee Osteoarthritis: Part III: Changes in Evidence Following Systematic Cumulative Update of Research Published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage***2010**, *18*, 476–499, doi:10.1016/j.joca.2010.01.013.
6. Rosa Neto, J.C.; Lira, F.S.; Oyama, L.M.; Zanchi, N.E.; Yamashita, A.S.; Batista, M.L.; Oller do Nascimento, C.M.; Seelaender, M. Exhaustive Exercise Causes an Anti-Inflammatory Effect in Skeletal Muscle and a pro-Inflammatory Effect in Adipose Tissue in Rats. *Eur J Appl Physiol***2009**, *106*, 697–704, doi:10.1007/s00421-009-1070-1.
7. Cabral-Santos, C.; Gerosa-Neto, J.; Inoue, D.S.; Panissa, V.L.G.; Gobbo, L.A.; Zagatto, A.M.; Campos, E.Z.; Lira, F.S. Similar Anti-Inflammatory Acute Responses from Moderate-Intensity Continuous and High-Intensity Intermittent Exercise. *J Sports Sci Med***2015**, *14*, 849–856.
8. Barlet, J.P.; Coxam, V.; Davicco, M.J. [Physical exercise and the skeleton]. *Arch Physiol Biochem***1995**, *103*, 681–698, doi:10.3109/13813459508998138.
9. Lombardi, G.; Ziemann, E.; Banfi, G. Physical Activity and Bone Health: What Is the Role of Immune System? A Narrative Review of the Third Way. *Front Endocrinol (Lausanne)***2019**, *10*, 60, doi:10.3389/fendo.2019.00060.
10. Frost, H.M. Bone's Mechanostat: A 2003 Update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol***2003**, *275*, 1081–1101, doi:10.1002/ar.a.10119.
11. Rubin, C.T.; Lanyon, L.E. Regulation of Bone Formation by Applied Dynamic Loads. *J Bone Joint Surg Am***1984**, *66*, 397–402.
12. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann N Y Acad Sci***2007**, *1116*, 281–290, doi:10.1196/annals.1402.018.
13. Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone***2008**, *42*, 606–615, doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.
14. Janik, M.; Stuss, M.; Michalska-Kasiczak, M.; Jegier, A.; Sewerynek, E. Effects of Physical Activity on Sclerostin Concentrations. *Endokrynol Pol***2018**, *69*, 142–149, doi:10.5603/EP.a2018.0008.
15. Marques, E.A.; Mota, J.; Carvalho, J. Exercise Effects on Bone Mineral Density in Older Adults: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Age (Dordr)***2012**, *34*, 1493–1515, doi:10.1007/s11357-011-9311-8.

16. Portier, H.; Benaitreau, D.; Pallu, S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life***2020**, *10*, 217, doi:10.3390/life10100217.
17. Fonseca, H.; Moreira-Gonçalves, D.; Coriolano, H.-J.A.; Duarte, J.A. Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility. *Sports Med***2014**, *44*, 37–53, doi:10.1007/s40279-013-0100-7.
18. Bloor, C.M. Angiogenesis during Exercise and Training. *Angiogenesis***2005**, *8*, 263–271, doi:10.1007/s10456-005-9013-x.
19. Xu, R.; Yallowitz, A.; Qin, A.; Wu, Z.; Shin, D.Y.; Kim, J.-M.; Debnath, S.; Ji, G.; Bostrom, M.P.; Yang, X.; et al. Targeting Skeletal Endothelium to Ameliorate Bone Loss. *Nat Med***2018**, *24*, 823–833, doi:10.1038/s41591-018-0020-z.
20. Ramasamy, S.K.; Kusumbe, A.P.; Wang, L.; Adams, R.H. Endothelial Notch Activity Promotes Angiogenesis and Osteogenesis in Bone. *Nature***2014**, *507*, 376–380, doi:10.1038/nature13146.
21. Kusumbe, A.P.; Ramasamy, S.K.; Adams, R.H. Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone. *Nature***2014**, *507*, 323–328, doi:10.1038/nature13145.
22. Neumann, P.E.; Gest, T.R. How Many Bones? Every Bone in My Body. *Clin Anat***2020**, *33*, 187–191, doi:10.1002/ca.23425.
23. Woolf, A.D.; Akesson, K. Preventing Fractures in Elderly People. *BMJ***2003**, *327*, 89–95, doi:10.1136/bmj.327.7406.89.
24. Buckwalter, J.A.; Cooper, R.R. Bone Structure and Function. *Instr Course Lect***1987**, *36*, 27–48.
25. van Gestel, N.; Carmeliet, G. Metabolic Regulation of Skeletal Cell Fate and Function in Physiology and Disease. *Nat Metab***2021**, *3*, 11–20, doi:10.1038/s42255-020-00321-3.
26. Arias, C.F.; Herrero, M.A.; Echeverri, L.F.; Oleaga, G.E.; López, J.M. Bone Remodeling: A Tissue-Level Process Emerging from Cell-Level Molecular Algorithms. *PLoS One***2018**, *13*, e0204171, doi:10.1371/journal.pone.0204171.
27. Frost, H.M. Bone “Mass” and the “Mechanostat”: A Proposal. *Anat Rec***1987**, *219*, 1–9, doi:10.1002/ar.1092190104.
28. Neve, A.; Corrado, A.; Cantatore, F.P. Osteocytes: Central Conductors of Bone Biology in Normal and Pathological Conditions. *Acta Physiol (Oxf)***2012**, *204*, 317–330, doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02385.x.
29. Cancedda, R.; Castagnola, P.; Cancedda, F.D.; Dozin, B.; Quarto, R. Developmental Control of Chondrogenesis and Osteogenesis. *Int J Dev Biol***2000**, *44*, 707–714.
30. Olsen, B.R.; Reginato, A.M.; Wang, W. Bone Development. *Annu Rev Cell Dev Biol***2000**, *16*, 191–220, doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.191.
31. Hall, B.K.; Miyake, T. The Membranous Skeleton: The Role of Cell Condensations in Vertebrate Skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)***1992**, *186*, 107–124, doi:10.1007/BF00174948.
32. Berendsen, A.D.; Olsen, B.R. Bone Development. *Bone***2015**, *80*, 14–18, doi:10.1016/j.bone.2015.04.035.
33. Biga, L.M.; Dawson, S.; Harwell, A.; Hopkins, R.; Kaufmann, J.; LeMaster, M.; Matern, P.; Morrison-Graham, K.; Quick, D.; Runyeon, J. 6.3 Bone Structure. **2019**.
34. Biga, L.M.; Dawson, S.; Harwell, A.; Hopkins, R.; Kaufmann, J.; LeMaster, M.; Matern, P.; Morrison-Graham, K.; Quick, D.; Runyeon, J. 6.4 Bone Formation and Development. **2019**.
35. Gerstenfeld, L.C.; Cullinane, D.M.; Barnes, G.L.; Graves, D.T.; Einhorn, T.A. Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation. *J. Cell. Biochem.***2003**, *88*, 873–884, doi:10.1002/jcb.10435.



36. Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Fracture Healing: Mechanisms and Interventions. *Nat Rev Rheumatol***2015**, *11*, 45–54, doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
37. Victoria, G.; Petrisor, B.; Drew, B.; Dick, D. Bone Stimulation for Fracture Healing: What's All the Fuss? *Indian J Orthop***2009**, *43*, 117–120, doi:10.4103/0019-5413.50844.
38. Bahney, C.S.; Zondervan, R.L.; Allison, P.; Theologis, A.; Ashley, J.W.; Ahn, J.; Miclau, T.; Marcucio, R.S.; Hankenson, K.D. Cellular Biology of Fracture Healing. *J Orthop Res***2019**, *37*, 35–50, doi:10.1002/jor.24170.
39. Marsell, R.; Einhorn, T.A. The Biology of Fracture Healing. *Injury***2011**, *42*, 551–555, doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
40. Granero-Moltó, F.; Weis, J.A.; Miga, M.I.; Landis, B.; Myers, T.J.; O'Rear, L.; Longobardi, L.; Jansen, E.D.; Mortlock, D.P.; Spagnoli, A. Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. *Stem Cells***2009**, *27*, 1887–1898, doi:10.1002/stem.103.
41. LaStayo, P.C.; Winters, K.M.; Hardy, M. Fracture Healing: Bone Healing, Fracture Management, and Current Concepts Related to the Hand. *J Hand Ther***2003**, *16*, 81–93, doi:10.1016/s0894-1130(03)80003-0.
42. Weiner, S.; Wagner, H.D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.***1998**, *28*, 271–298, doi:10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
43. Reznikov, N.; Shahar, R.; Weiner, S. Bone Hierarchical Structure in Three Dimensions. *Acta Biomater***2014**, *10*, 3815–3826, doi:10.1016/j.actbio.2014.05.024.
44. Baig, M.A.; Bacha, D. Histology, Bone. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
45. Bandovic, I.; Holme, M.R.; Futterman, B. Anatomy, Bone Markings. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
46. Zebaze, R.M.D.; Ghasem-Zadeh, A.; Bohte, A.; Iuliano-Burns, S.; Mirams, M.; Price, R.I.; Mackie, E.J.; Seeman, E. Intracortical Remodelling and Porosity in the Distal Radius and Post-Mortem Femurs of Women: A Cross-Sectional Study. *Lancet***2010**, *375*, 1729–1736, doi:10.1016/S0140-6736(10)60320-0.
47. Nahian, A.; Chauhan, P.R. Histology, Periosteum And Endosteum. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
48. Ascenzi, M.-G.; Roe, A.K. The Osteon: The Micromechanical Unit of Compact Bone. *Front Biosci (Landmark Ed)***2012**, *17*, 1551–1581, doi:10.2741/4003.
49. Noble, B.S. The Osteocyte Lineage. *Arch Biochem Biophys***2008**, *473*, 106–111, doi:10.1016/j.abb.2008.04.009.
50. Pazzaglia, U.E.; Bonaspetti, G.; Ranchetti, F.; Bettinsoli, P. A Model of the Intracortical Vascular System of Long Bones and of Its Organization: An Experimental Study in Rabbit Femur and Tibia. *J Anat***2008**, *213*, 183–193, doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00932.x.
51. Mori, R.; Kodaka, T.; Sano, T.; Yamagishi, N.; Asari, M.; Naito, Y. Comparative Histology of the Lamellar Bone between Young Calves and Foals. *Cells Tissues Organs***2003**, *175*, 43–50, doi:10.1159/000073436.
52. Shipov, A.; Zaslansky, P.; Riesemeier, H.; Segev, G.; Atkins, A.; Shahar, R. Unremodeled Endochondral Bone Is a Major Architectural Component of the Cortical Bone of the Rat (*Rattus Norvegicus*). *J Struct Biol***2013**, *183*, 132–140, doi:10.1016/j.jsb.2013.04.010.
53. Wang, L. Solute Transport in the Bone Lacunar-Canalicular System (LCS). *Curr Osteoporos Rep***2018**, *16*, 32–41, doi:10.1007/s11914-018-0414-3.

54. Currey, J.D.; Shahar, R. Cavities in the Compact Bone in Tetrapods and Fish and Their Effect on Mechanical Properties. *J Struct Biol***2013**, *183*, 107–122, doi:10.1016/j.jsb.2013.04.012.
55. Cooper, D.M.L.; Kawalilak, C.E.; Harrison, K.; Johnston, B.D.; Johnston, J.D. Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr Osteoporos Rep***2016**, *14*, 187–198, doi:10.1007/s11914-016-0319-y.
56. Bala, Y.; Zebaze, R.; Seeman, E. Role of Cortical Bone in Bone Fragility. *Curr Opin Rheumatol***2015**, *27*, 406–413, doi:10.1097/BOR.000000000000183.
57. Isojima, T.; Sims, N.A. Cortical Bone Development, Maintenance and Porosity: Genetic Alterations in Humans and Mice Influencing Chondrocytes, Osteoclasts, Osteoblasts and Osteocytes. *Cell Mol Life Sci***2021**, *78*, 5755–5773, doi:10.1007/s00018-021-03884-w.
58. Kral, R.; Osima, M.; Borgen, T.T.; Vestgaard, R.; Richardsen, E.; Bjørnerem, Å. Increased Cortical Porosity and Reduced Cortical Thickness of the Proximal Femur Are Associated with Nonvertebral Fracture Independent of Fracture Risk Assessment Tool and Garvan Estimates in Postmenopausal Women. *PLoS One***2017**, *12*, e0185363, doi:10.1371/journal.pone.0185363.
59. Ahmed, L.A.; Shigdel, R.; Joakimsen, R.M.; Eldevik, O.P.; Eriksen, E.F.; Ghasem-Zadeh, A.; Bala, Y.; Zebaze, R.; Seeman, E.; Bjørnerem, Å. Measurement of Cortical Porosity of the Proximal Femur Improves Identification of Women with Nonvertebral Fragility Fractures. *Osteoporos Int***2015**, *26*, 2137–2146, doi:10.1007/s00198-015-3118-x.
60. Nissen, F.I.; Andreasen, C.; Borgen, T.T.; Bjørnerem, Å.; Hansen, A.K. Cortical Bone Structure of the Proximal Femur and Incident Fractures. *Bone***2022**, *155*, 116284, doi:10.1016/j.bone.2021.116284.
61. Augat, P.; Schorlemmer, S. The Role of Cortical Bone and Its Microstructure in Bone Strength. *Age Ageing***2006**, *35 Suppl 2*, ii27–ii31, doi:10.1093/ageing/afl081.
62. Zioupos, P.; Currey, J.D. Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone with Age. *Bone***1998**, *22*, 57–66, doi:10.1016/s8756-3282(97)00228-7.
63. Morgan, E.F.; Unnikrisnan, G.U.; Hussein, A.I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng***2018**, *20*, 119–143, doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-121139.
64. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol***2008**, *3 Suppl 3*, S131-139, doi:10.2215/CJN.04151206.
65. Wong, A.J.N.; Wong, M.; Kutschera, P.; Lau, K.K. Dual-Energy CT in Musculoskeletal Trauma. *Clin Radiol***2021**, *76*, 38–49, doi:10.1016/j.crad.2020.08.006.
66. Oftadeh, R.; Perez-Viloria, M.; Villa-Camacho, J.C.; Vaziri, A.; Nazarian, A. Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. *J Biomech Eng***2015**, *137*, doi:10.1115/1.4029176.
67. Keaveny, T.M.; Wachtel, E.F.; Ford, C.M.; Hayes, W.C. Differences between the Tensile and Compressive Strengths of Bovine Tibial Trabecular Bone Depend on Modulus. *J Biomech***1994**, *27*, 1137–1146, doi:10.1016/0021-9290(94)90054-x.
68. Blake, G.M.; Fogelman, I. The Clinical Role of Dual Energy X-Ray Absorptiometry. *Eur J Radiol***2009**, *71*, 406–414, doi:10.1016/j.ejrad.2008.04.062.
69. Asadipooya, K.; Abdalbary, M.; Ahmad, Y.; Kakani, E.; Monier-Faugere, M.-C.; El-Husseini, A. Bone Quality in CKD Patients: Current Concepts and Future Directions - Part I. *Kidney Dis (Basel)***2021**, *7*, 268–277, doi:10.1159/000515534.
70. Harvey, N.C.; Glüer, C.C.; Binkley, N.; McCloskey, E.V.; Brandi, M.-L.; Cooper, C.; Kendler, D.; Lamy, O.; Laslop, A.; Camargos, B.M.; et al. Trabecular Bone Score

- (TBS) as a New Complementary Approach for Osteoporosis Evaluation in Clinical Practice. *Bone***2015**, 78, 216–224, doi:10.1016/j.bone.2015.05.016.
71. Shevroja, E.; Cafarelli, F.P.; Guglielmi, G.; Hans, D. DXA Parameters, Trabecular Bone Score (TBS) and Bone Mineral Density (BMD), in Fracture Risk Prediction in Endocrine-Mediated Secondary Osteoporosis. *Endocrine***2021**, 74, 20–28, doi:10.1007/s12020-021-02806-x.
  72. Robinson, R.A. Bone Tissue: Composition and Function. *Johns Hopkins Med J***1979**, 145, 10–24.
  73. Aerssens, J.; Dequeker, J.; Mbuyi-Muamba, J.M. Bone Tissue Composition: Biochemical Anatomy of Bone. *Clin Rheumatol***1994**, 13 Suppl 1, 54–62.
  74. Walker, C.; Mojares, E.; Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci***2018**, 19, E3028, doi:10.3390/ijms19103028.
  75. Brown, N.H. Extracellular Matrix in Development: Insights from Mechanisms Conserved between Invertebrates and Vertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2011**, 3, a005082, doi:10.1101/cshperspect.a005082.
  76. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The Extracellular Matrix at a Glance. *J Cell Sci***2010**, 123, 4195–4200, doi:10.1242/jcs.023820.
  77. Entchev, E.V.; González-Gaitán, M.A. Morphogen Gradient Formation and Vesicular Trafficking. *Traffic***2002**, 3, 98–109, doi:10.1034/j.1600-0854.2002.030203.x.
  78. Uhler, C.; Shivashankar, G.V. Regulation of Genome Organization and Gene Expression by Nuclear Mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol***2017**, 18, 717–727, doi:10.1038/nrm.2017.101.
  79. Jordana, F.; Le Visage, C.; Weiss, P. [Bone substitutes]. *Med Sci (Paris)***2017**, 33, 60–65, doi:10.1051/medsci/20173301010.
  80. Schlesinger, P.H.; Blair, H.C.; Beer Stolz, D.; Riazanski, V.; Ray, E.C.; Tourkova, I.L.; Nelson, D.J. Cellular and Extracellular Matrix of Bone, with Principles of Synthesis and Dependency of Mineral Deposition on Cell Membrane Transport. *Am J Physiol Cell Physiol***2020**, 318, C111–C124, doi:10.1152/ajpcell.00120.2019.
  81. Oreffo, R.O.C.; Cooper, C.; Mason, C.; Clements, M. Mesenchymal Stem Cells: Lineage, Plasticity, and Skeletal Therapeutic Potential. *Stem Cell Rev***2005**, 1, 169–178, doi:10.1385/SCR:1:2:169.
  82. Chambers, T.J. The Birth of the Osteoclast. *Ann N Y Acad Sci***2010**, 1192, 19–26, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05224.x.
  83. Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. The Cell Biology of Bone Metabolism. *J Clin Pathol***2008**, 61, 577–587, doi:10.1136/jcp.2007.048868.
  84. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R. da S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int***2015**, 2015, 421746, doi:10.1155/2015/421746.
  85. Kular, J.; Tickner, J.; Chim, S.M.; Xu, J. An Overview of the Regulation of Bone Remodelling at the Cellular Level. *Clin Biochem***2012**, 45, 863–873, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021.
  86. Komori, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci***2019**, 20, E1694, doi:10.3390/ijms20071694.
  87. Komori, T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *J Cell Biochem***2006**, 99, 1233–1239, doi:10.1002/jcb.20958.
  88. Manolagas, S.C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev***2000**, 21, 115–137, doi:10.1210/edrv.21.2.0395.

89. Franz-Odenaal, T.A.; Hall, B.K.; Witten, P.E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. *Dev Dyn***2006**, *235*, 176–190, doi:10.1002/dvdy.20603.
90. Bonewald, L.F. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res***2011**, *26*, 229–238, doi:10.1002/jbmr.320.
91. Dallas, S.L.; Prideaux, M.; Bonewald, L.F. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocr Rev***2013**, *34*, 658–690, doi:10.1210/er.2012-1026.
92. Tatsumi, S.; Ishii, K.; Amizuka, N.; Li, M.; Kobayashi, T.; Kohno, K.; Ito, M.; Takeshita, S.; Ikeda, K. Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metab***2007**, *5*, 464–475, doi:10.1016/j.cmet.2007.05.001.
93. Robling, A.G.; Bonewald, L.F. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol***2020**, *82*, 485–506, doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034332.
94. Qiu, S.; Rao, D.S.; Fyhrie, D.P.; Palnitkar, S.; Parfitt, A.M. The Morphological Association between Microcracks and Osteocyte Lacunae in Human Cortical Bone. *Bone***2005**, *37*, 10–15, doi:10.1016/j.bone.2005.01.023.
95. Bakker, A.; Klein-Nulend, J.; Burger, E. Shear Stress Inhibits While Disuse Promotes Osteocyte Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun***2004**, *320*, 1163–1168, doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.056.
96. Bonewald, L.F. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision***2006**, *3*, 7–15, doi:10.1138/20060233.
97. Bakker, A.D.; Soejima, K.; Klein-Nulend, J.; Burger, E.H. The Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E(2) by Primary Bone Cells Is Shear Stress Dependent. *J Biomech***2001**, *34*, 671–677, doi:10.1016/s0021-9290(00)00231-1.
98. Ajubi, N.E.; Klein-Nulend, J.; Alblas, M.J.; Burger, E.H.; Nijweide, P.J. Signal Transduction Pathways Involved in Fluid Flow-Induced PGE2 Production by Cultured Osteocytes. *Am J Physiol***1999**, *276*, E171-178, doi:10.1152/ajpendo.1999.276.1.E171.
99. Johnson: The Gene for High Bone Mass - Google Scholar Available online: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Endocrinologist&title=The+gene+for+high+bone+mass&author=ML+Johnson&author=JL+Picconi&author=RR+Recker&volume=12&issue=5&publication\\_year=2002&pages=445-53&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Endocrinologist&title=The+gene+for+high+bone+mass&author=ML+Johnson&author=JL+Picconi&author=RR+Recker&volume=12&issue=5&publication_year=2002&pages=445-53&) (accessed on 22 March 2022).
100. Hemmatian, H.; Bakker, A.D.; Klein-Nulend, J.; van Lenthe, G.H. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep***2017**, *15*, 401–411, doi:10.1007/s11914-017-0402-z.
101. Verborgt, O.; Gibson, G.J.; Schaffler, M.B. Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling after Fatigue in Vivo. *J Bone Miner Res***2000**, *15*, 60–67, doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.60.
102. Roodman, G.D. Osteoclast Differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med***1991**, *2*, 389–409, doi:10.1177/10454411910020030601.
103. Athanasou, N.A. The Osteoclast--What's New? *Skeletal Radiol***2011**, *40*, 1137–1140, doi:10.1007/s00256-011-1180-9.
104. Møller, A.M.J.; Delaissé, J.-M.; Olesen, J.B.; Canto, L.M.; Rogatto, S.R.; Madsen, J.S.; Sørensen, K. Fusion Potential of Human Osteoclasts In Vitro Reflects Age, Menopause, and In Vivo Bone Resorption Levels of Their Donors-A Possible Involvement of DC-STAMP. *Int J Mol Sci***2020**, *21*, E6368, doi:10.3390/ijms21176368.
105. Boissy, P.; Saltel, F.; Bouniol, C.; Jurdic, P.; Machuca-Gayet, I. Transcriptional Activity of Nuclei in Multinucleated Osteoclasts and Its Modulation by Calcitonin. *Endocrinology***2002**, *143*, 1913–1921, doi:10.1210/endo.143.5.8813.
106. Zaidi, M. Skeletal Remodeling in Health and Disease. *Nat Med***2007**, *13*, 791–801, doi:10.1038/nm1593.

107. Tamma, R.; Zallone, A. Osteoblast and Osteoclast Crosstalks: From OAF to Ephrin. *Inflamm Allergy Drug Targets***2012**, *11*, 196–200, doi:10.2174/187152812800392670.
108. Chen, X.; Wang, Z.; Duan, N.; Zhu, G.; Schwarz, E.M.; Xie, C. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect Tissue Res***2018**, *59*, 99–107, doi:10.1080/03008207.2017.1290085.
109. Udagawa, N.; Koide, M.; Nakamura, M.; Nakamichi, Y.; Yamashita, T.; Uehara, S.; Kobayashi, Y.; Furuya, Y.; Yasuda, H.; Fukuda, C.; et al. Osteoclast Differentiation by RANKL and OPG Signaling Pathways. *J Bone Miner Metab***2021**, *39*, 19–26, doi:10.1007/s00774-020-01162-6.
110. Boyce, B.F. Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions. *J Dent Res***2013**, *92*, 860–867, doi:10.1177/0022034513500306.
111. Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Kelley, M.; Chang, M.S.; Lüthy, R.; Nguyen, H.Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell***1997**, *89*, 309–319, doi:10.1016/s0092-8674(00)80209-3.
112. Cappariello, A.; Maurizi, A.; Veeriah, V.; Teti, A. The Great Beauty of the Osteoclast. *Arch Biochem Biophys***2014**, *558*, 70–78, doi:10.1016/j.abb.2014.06.017.
113. Yasuda, H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG System. *J Bone Miner Metab***2021**, *39*, 2–11, doi:10.1007/s00774-020-01175-1.
114. Miller, S.C.; de Saint-Georges, L.; Bowman, B.M.; Jee, W.S. Bone Lining Cells: Structure and Function. *Scanning Microsc***1989**, *3*, 953–960; discussion 960-961.
115. Parfitt, A.M. Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling: The Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone. *J Cell Biochem***1994**, *55*, 273–286, doi:10.1002/jcb.240550303.
116. Parfitt, A.M.; Mundy, G.R.; Roodman, G.D.; Hughes, D.E.; Boyce, B.F. A New Model for the Regulation of Bone Resorption, with Particular Reference to the Effects of Bisphosphonates. *J Bone Miner Res***1996**, *11*, 150–159, doi:10.1002/jbmr.5650110203.
117. Pazzaglia, U.E.; Congiu, T.; Basso, P.; Alessandri, I.; Cucca, L.; Raspanti, M. The Application of Heat-Deproteinization to the Morphological Study of Cortical Bone: A Contribution to the Knowledge of the Osteonal Structure. *Microsc Res Tech***2016**, *79*, 691–699, doi:10.1002/jemt.22686.
118. Beaupied, H.; Lespessailles, E.; Benhamou, C.-L. Evaluation of Macrostructural Bone Biomechanics. *Joint Bone Spine***2007**, *74*, 233–239, doi:10.1016/j.jbspin.2007.01.019.
119. Guntur, A.R.; Rosen, C.J. Bone as an Endocrine Organ. *Endocr Pract***2012**, *18*, 758–762, doi:10.4158/EP12141.RA.
120. Karsenty, G.; Ferron, M. The Contribution of Bone to Whole-Organism Physiology. *Nature***2012**, *481*, 314–320, doi:10.1038/nature10763.
121. Confavreux, C.B. Bone: From a Reservoir of Minerals to a Regulator of Energy Metabolism. *Kidney Int Suppl***2011**, S14-19, doi:10.1038/ki.2011.25.
122. Ferron, M.; Hinoi, E.; Karsenty, G.; Ducy, P. Osteocalcin Differentially Regulates Beta Cell and Adipocyte Gene Expression and Affects the Development of Metabolic Diseases in Wild-Type Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A***2008**, *105*, 5266–5270, doi:10.1073/pnas.0711119105.
123. Quarles, L.D. Endocrine Functions of Bone in Mineral Metabolism Regulation. *J Clin Invest***2008**, *118*, 3820–3828, doi:10.1172/JCI36479.
124. Martin, A.; Liu, S.; David, V.; Li, H.; Karydis, A.; Feng, J.Q.; Quarles, L.D. Bone Proteins PHEX and DMP1 Regulate Fibroblastic Growth Factor Fgf23 Expression in Osteocytes through a Common Pathway Involving FGF Receptor (FGFR) Signaling. *FASEB J***2011**, *25*, 2551–2562, doi:10.1096/fj.10-177816.

125. Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci***2006**, *1092*, 385–396, doi:10.1196/annals.1365.035.
126. Nishida, T.; Kubota, S.; Takigawa, M. [The role of osteocytes in bone remodeling.]. *Clin Calcium***2017**, *27*, 1697–1703, doi:CliCa171216971703.
127. Currey, J.D. The Many Adaptations of Bone. *J Biomech***2003**, *36*, 1487–1495, doi:10.1016/s0021-9290(03)00124-6.
128. Frost, H.M. Skeletal Structural Adaptations to Mechanical Usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's Law: The Remodeling Problem. *Anat Rec***1990**, *226*, 414–422, doi:10.1002/ar.1092260403.
129. Kenkre, J.S.; Bassett, J. The Bone Remodelling Cycle. *Ann Clin Biochem***2018**, *55*, 308–327, doi:10.1177/0004563218759371.
130. Funck-Brentano, T.; Cohen-Solal, M. Le vieillissement osseux : les nouveaux acteurs de communication intercellulaire. *Médecine & Longévité***2010**, *2*, 200–204, doi:10.1016/j.mlong.2010.05.001.
131. Parfitt, A.M. Targeted and Nontargeted Bone Remodeling: Relationship to Basic Multicellular Unit Origination and Progression. *Bone***2002**, *30*, 5–7, doi:10.1016/s8756-3282(01)00642-1.
132. Eriksen, E.F. Cellular Mechanisms of Bone Remodeling. *Rev Endocr Metab Disord***2010**, *11*, 219–227, doi:10.1007/s11154-010-9153-1.
133. Siddiqui, J.A.; Partridge, N.C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)***2016**, *31*, 233–245, doi:10.1152/physiol.00061.2014.
134. Pneumaticos, S.G.; Triantafyllopoulos, G.K.; Basdra, E.K.; Papavassiliou, A.G. Segmental Bone Defects: From Cellular and Molecular Pathways to the Development of Novel Biological Treatments. *J Cell Mol Med***2010**, *14*, 2561–2569, doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01062.x.
135. Sims, N.A.; Martin, T.J. Coupling the Activities of Bone Formation and Resorption: A Multitude of Signals within the Basic Multicellular Unit. *Bonekey Rep***2014**, *3*, 481, doi:10.1038/bonekey.2013.215.
136. Kobayashi, S.; Takahashi, H.E.; Ito, A.; Saito, N.; Nawata, M.; Horiuchi, H.; Ohta, H.; Ito, A.; Iorio, R.; Yamamoto, N.; et al. Trabecular Minimodeling in Human Iliac Bone. *Bone***2003**, *32*, 163–169, doi:10.1016/s8756-3282(02)00947-x.
137. Ubara, Y.; Tagami, T.; Nakanishi, S.; Sawa, N.; Hoshino, J.; Suwabe, T.; Katori, H.; Takemoto, F.; Hara, S.; Takaichi, K. Significance of Minimodeling in Dialysis Patients with Adynamic Bone Disease. *Kidney Int***2005**, *68*, 833–839, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00464.x.
138. Nalla, R.K.; Kinney, J.H.; Ritchie, R.O. Mechanistic Fracture Criteria for the Failure of Human Cortical Bone. *Nat Mater***2003**, *2*, 164–168, doi:10.1038/nmat832.
139. Schuit, S.C.E.; van der Klift, M.; Weel, A.E. a. M.; de Laet, C.E.D.H.; Burger, H.; Seeman, E.; Hofman, A.; Uitterlinden, A.G.; van Leeuwen, J.P.T.M.; Pols, H. a. P. Fracture Incidence and Association with Bone Mineral Density in Elderly Men and Women: The Rotterdam Study. *Bone***2004**, *34*, 195–202, doi:10.1016/j.bone.2003.10.001.
140. Marenzana, M.; Arnett, T.R. The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res***2013**, *1*, 203–215, doi:10.4248/BR201303001.
141. Tomlinson, R.E.; Silva, M.J. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res***2013**, *1*, 311–322, doi:10.4248/BR201304002.
142. Santos, M.I.; Reis, R.L. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. *Macromol Biosci***2010**, *10*, 12–27, doi:10.1002/mabi.200900107.

143. Watson, E.C.; Adams, R.H. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med***2018**, *8*, doi:10.1101/cshperspect.a031559.
144. Filipowska, J.; Tomaszewski, K.A.; Niedźwiedzki, Ł.; Walocha, J.A.; Niedźwiedzki, T. The Role of Vasculature in Bone Development, Regeneration and Proper Systemic Functioning. *Angiogenesis***2017**, *20*, 291–302, doi:10.1007/s10456-017-9541-1.
145. Brookes, M. CORTICAL VASCULARIZATION AND GROWTH IN FOETAL TUBULAR BONES. *J Anat***1963**, *97*, 597–609.
146. Trueta, J. Blood Supply and the Rate of Healing of Tibial Fractures. *Clin Orthop Relat Res***1974**, 11–26.
147. Pazzaglia, U.E.; Congiu, T.; Raspanti, M.; Ranchetti, F.; Quacci, D. Anatomy of the Intracortical Canal System: Scanning Electron Microscopy Study in Rabbit Femur. *Clin Orthop Relat Res***2009**, *467*, 2446–2456, doi:10.1007/s11999-009-0806-x.
148. Hendriks, M.; Ramasamy, S.K. Blood Vessels and Vascular Niches in Bone Development and Physiological Remodeling. *Front Cell Dev Biol***2020**, *8*, 602278, doi:10.3389/fcell.2020.602278.
149. Ramasamy, S.K. Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone. *Stem Cells Int***2017**, *2017*, 5046953, doi:10.1155/2017/5046953.
150. Peng, Y.; Wu, S.; Li, Y.; Crane, J.L. Type H Blood Vessels in Bone Modeling and Remodeling. *Theranostics***2020**, *10*, 426–436, doi:10.7150/thno.34126.
151. Liu, Y.; Olsen, B.R. Distinct VEGF Functions during Bone Development and Homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)***2014**, *62*, 363–368, doi:10.1007/s00005-014-0285-y.
152. Ramasamy, S.K.; Kusumbe, A.P.; Schiller, M.; Zeuschner, D.; Bixel, M.G.; Milia, C.; Gamrekashvili, J.; Limbourg, A.; Medvinsky, A.; Santoro, M.M.; et al. Blood Flow Controls Bone Vascular Function and Osteogenesis. *Nat Commun***2016**, *7*, 13601, doi:10.1038/ncomms13601.
153. Gerber, H.-P.; Vu, T.H.; Ryan, A.M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. VEGF Couples Hypertrophic Cartilage Remodeling, Ossification and Angiogenesis during Endochondral Bone Formation. *Nat Med***1999**, *5*, 623–628, doi:10.1038/9467.
154. Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; LeCouter, J. The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nat Med***2003**, *9*, 669–676, doi:10.1038/nm0603-669.
155. Hu, K.; Olsen, B.R. The Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Repair and Regeneration. *Bone***2016**, *91*, 30–38, doi:10.1016/j.bone.2016.06.013.
156. Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System. *Nat Med***2003**, *9*, 677–684, doi:10.1038/nm0603-677.
157. Hannah, S.S.; McFadden, S.; McNeilly, A.; McClean, C. “Take My Bone Away?” Hypoxia and Bone: A Narrative Review. *J Cell Physiol***2021**, *236*, 721–740, doi:10.1002/jcp.29921.
158. Wan, C.; Shao, J.; Gilbert, S.R.; Riddle, R.C.; Long, F.; Johnson, R.S.; Schipani, E.; Clemens, T.L. Role of HIF-1 $\alpha$  in Skeletal Development. *Ann N Y Acad Sci***2010**, *1192*, 322–326, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x.
159. Park, J.; Omi, N. The Effects of Different Exercise Modes for Preventing Endothelial Dysfunction of Arteries and Bone Loss in Ovariectomized Rats. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry***2014**, *18*, 133–139, doi:10.5717/jenb.2014.18.2.133.
160. van't Hof, R.J.; Ralston, S.H. Nitric Oxide and Bone. *Immunology***2001**, *103*, 255–261, doi:10.1046/j.1365-2567.2001.01261.x.
161. Nakamae, A.; Sunagawa, T.; Ishida, O.; Suzuki, O.; Yasunaga, Y.; Hachisuka, H.; Ochi, M. Acceleration of Surgical Angiogenesis in Necrotic Bone with a Single Injection of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res***2004**, *22*, 509–513, doi:10.1016/j.orthres.2003.10.001.

162. Lowery, J.W.; Rosen, V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev***2018**, *98*, 2431–2452, doi:10.1152/physrev.00028.2017.
163. Roelen, B.A.J.; Dijke, P. ten Controlling Mesenchymal Stem Cell Differentiation by TGFβ Family Members. *J Orthop Sci***2003**, *8*, 740–748, doi:10.1007/s00776-003-0702-2.
164. Bautch, V.L. Bone Morphogenetic Protein and Blood Vessels: New Insights into Endothelial Cell Junction Regulation. *Curr Opin Hematol***2019**, *26*, 154–160, doi:10.1097/MOH.0000000000000492.
165. Paiva, K.B.S.; Granjeiro, J.M. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. *Prog Mol Biol Transl Sci***2017**, *148*, 203–303, doi:10.1016/bs.pmbts.2017.05.001.
166. Bahney, C.S.; Hu, D.P.; Mclau, T.; Marcucio, R.S. The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. *Front. Endocrinol.***2015**, *6*, doi:10.3389/fendo.2015.00004.
167. Wan, C.; Gilbert, S.R.; Wang, Y.; Cao, X.; Shen, X.; Ramaswamy, G.; Jacobsen, K.A.; Alaql, Z.S.; Eberhardt, A.W.; Gerstenfeld, L.C.; et al. Activation of the Hypoxia-Inducible Factor-1 Pathway Accelerates Bone Regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences***2008**, *105*, 686–691, doi:10.1073/pnas.0708474105.
168. Sathy, B.N.; Mony, U.; Menon, D.; Baskaran, V.K.; Mikos, A.G.; Nair, S. Bone Tissue Engineering with Multilayered Scaffolds—Part I: An Approach for Vascularizing Engineered Constructs *In Vivo*. *Tissue Engineering Part A***2015**, *21*, 2480–2494, doi:10.1089/ten.tea.2015.0098.
169. Maes, C.; Carmeliet, G.; Schipani, E. Hypoxia-Driven Pathways in Bone Development, Regeneration and Disease. *Nat Rev Rheumatol***2012**, *8*, 358–366, doi:10.1038/nrrheum.2012.36.
170. Sivan, U.; De Angelis, J.; Kusumbe, A.P. Role of Angiocrine Signals in Bone Development, Homeostasis and Disease. *Open Biol.***2019**, *9*, 190144, doi:10.1098/rsob.190144.
171. Hankenson, K.D.; Gagne, K.; Shaughnessy, M. Extracellular Signaling Molecules to Promote Fracture Healing and Bone Regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews***2015**, *94*, 3–12, doi:10.1016/j.addr.2015.09.008.
172. Wang, Y.; Wan, C.; Deng, L.; Liu, X.; Cao, X.; Gilbert, S.R.; Bouxsein, M.L.; Faugere, M.-C.; Guldberg, R.E.; Gerstenfeld, L.C.; et al. The Hypoxia-Inducible Factor  $\alpha$  Pathway Couples Angiogenesis to Osteogenesis during Skeletal Development. *J. Clin. Invest.***2007**, *117*, 1616–1626, doi:10.1172/JCI31581.
173. Laufs, U.; Urhausen, A.; Werner, N.; Scharhag, J.; Heitz, A.; Kissner, G.; Böhm, M.; Kindermann, W.; Nickenig, G. Running Exercise of Different Duration and Intensity: Effect on Endothelial Progenitor Cells in Healthy Subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil***2005**, *12*, 407–414, doi:10.1097/01.hjr.0000174823.87269.2e.
174. Korsager Larsen, M.; Matchkov, V.V. Hypertension and Physical Exercise: The Role of Oxidative Stress. *Medicina (Kaunas)***2016**, *52*, 19–27, doi:10.1016/j.medici.2016.01.005.
175. Saeed, S.A.; Cunningham, K.; Bloch, R.M. Depression and Anxiety Disorders: Benefits of Exercise, Yoga, and Meditation. *Am Fam Physician***2019**, *99*, 620–627.
176. Sousa, R.A.L. de; Hagenbeck, K.F.; Arsa, G.; Pardono, E. Moderate/high resistance exercise is better to reduce blood glucose and blood pressure in middle-aged diabetic subjects. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte***2020**, *34*, 165–175, doi:10.11606/1807-5509202000010165.
177. WOLFF, J. Das Gesetz Der Transformation Der Knochen, Berlin, A. Hirschwild. *The Law of Bone Remodeling***1892**.



178. Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1986; ISBN 978-3-642-71033-9.
179. Benedetti, M.G.; Furlini, G.; Zati, A.; Letizia Mauro, G. The Effectiveness of Physical Exercise on Bone Density in Osteoporotic Patients. *Biomed Res Int***2018**, *2018*, 4840531, doi:10.1155/2018/4840531.
180. Moghetti, P.; Bacchi, E.; Brangani, C.; Donà, S.; Negri, C. Metabolic Effects of Exercise. *Front Horm Res***2016**, *47*, 44–57, doi:10.1159/000445156.
181. Jorge, S.-P.; David, N.-V.; Alba, G.-C.; Germán, V.-R.; Antonio, C.J. Health Economic Evaluation of Exercise Interventions in People over 60 Years Old: A Systematic Review. *Exp Gerontol***2022**, *161*, 111713, doi:10.1016/j.exger.2022.111713.
182. Moreira, L.D.F.; Oliveira, M.L. de; Lirani-Galvão, A.P.; Marin-Mio, R.V.; Santos, R.N. dos; Lazaretti-Castro, M. Physical Exercise and Osteoporosis: Effects of Different Types of Exercises on Bone and Physical Function of Postmenopausal Women. *Arq Bras Endocrinol Metabol***2014**, *58*, 514–522, doi:10.1590/0004-2730000003374.
183. Newhall, K.M.; Rodnick, K.J.; van der Meulen, M.C.; Carter, D.R.; Marcus, R. Effects of Voluntary Exercise on Bone Mineral Content in Rats. *J Bone Miner Res***1991**, *6*, 289–296, doi:10.1002/jbmr.5650060311.
184. Bégot, L.; Collombet, J.; Renault, S.; Butigieg, X.; Andre, C.; Zerath, E.; Holy, X. Effects of High-Phosphorus and/or Low-Calcium Diets on Bone Tissue in Trained Male Rats. *Med Sci Sports Exerc***2011**, *43*, 54–63, doi:10.1249/MSS.0b013e3181e712eb.
185. Fonseca, H.; Moreira-Gonçalves, D.; Esteves, J.L.S.; Viriato, N.; Vaz, M.; Mota, M.P.; Duarte, J.A. Voluntary Exercise Has Long-Term in Vivo Protective Effects on Osteocyte Viability and Bone Strength Following Ovariectomy. *Calcif Tissue Int***2011**, *88*, 443–454, doi:10.1007/s00223-011-9476-2.
186. Swissa-Sivan, A.; Azoury, R.; Statter, M.; Leichter, I.; Nyska, A.; Nyska, M.; Menczel, J.; Samueloff, S. The Effect of Swimming on Bone Modeling and Composition in Young Adult Rats. *Calcif Tissue Int***1990**, *47*, 173–177, doi:10.1007/BF02555984.
187. Ju, Y.-I.; Sone, T.; Ohnaru, K.; Choi, H.-J.; Fukunaga, M. Differential Effects of Jump versus Running Exercise on Trabecular Architecture during Remobilization after Suspension-Induced Osteopenia in Growing Rats. *J Appl Physiol (1985)***2012**, *112*, 766–772, doi:10.1152/jappphysiol.01219.2011.
188. Aikawa, Y.; Wakasugi, Y.; Narukawa, T.; Yamashita, T.; Sasai, N.; Umemura, Y.; Omi, N.; Ohtsuki, M. Jump Exercise and Food Restriction on Bone Parameters in Young Female Rats. *Calcif Tissue Int***2019**, *105*, 557–566, doi:10.1007/s00223-019-00601-5.
189. Umemura, Y.; Sogo, N.; Honda, A. Effects of Intervals between Jumps or Bouts on Osteogenic Response to Loading. *J Appl Physiol (1985)***2002**, *93*, 1345–1348, doi:10.1152/jappphysiol.00358.2002.
190. Pasqualini, M.; Lavet, C.; Elbadaoui, M.; Vanden-Bossche, A.; Laroche, N.; Gnyubkin, V.; Vico, L. Skeletal Site-Specific Effects of Whole Body Vibration in Mature Rats: From Deleterious to Beneficial Frequency-Dependent Effects. *Bone***2013**, *55*, 69–77, doi:10.1016/j.bone.2013.03.013.
191. Xie, P.; Tang, Z.; Qing, F.; Chen, X.; Zhu, X.; Fan, Y.; Yang, X.; Zhang, X. Bone Mineral Density, Microarchitectural and Mechanical Alterations of Osteoporotic Rat Bone under Long-Term Whole-Body Vibration Therapy. *J Mech Behav Biomed Mater***2016**, *53*, 341–349, doi:10.1016/j.jmbbm.2015.08.040.
192. Vicente, W.S.; dos Reis, L.M.; Graciolli, R.G.; Graciolli, 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, doi:10.1371/journal.pone.0064725.
193. 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, doi:10.1016/s8756-3282(98)00189-6.
  194. Chen, X.; Aoki, H.; Fukui, Y. Effect of Exercise on the Bone Strength, Bone Mineral Density, and Metal Content in Rat Femurs. *Biomed Mater Eng***2004**, *14*, 53–59.
  195. 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. *Joint Bone Spine***2013**, *80*, 492–498, doi:10.1016/j.jbspin.2012.12.005.
  196. Boudenot, A.; Presle, N.; Uzbekov, R.; Toumi, H.; Pallu, S.; Lespessailles, E. Effect of Interval-Training Exercise on Subchondral Bone in a Chemically-Induced Osteoarthritis Model. *Osteoarthritis Cartilage***2014**, *22*, 1176–1185, doi:10.1016/j.joca.2014.05.020.
  197. Boudenot, A.; Maurel, D.B.; Pallu, S.; Ingrand, I.; Boisseau, N.; Jaffré, C.; Portier, H. Quick Benefits of Interval Training versus Continuous Training on Bone: A Dual-energy X-ray Absorptiometry Comparative Study. *Int J Exp Pathol***2015**, *96*, 370–377, doi:10.1111/iep.12155.
  198. Nakajima, D.; Kim, C.S.; Oh, T.W.; Yang, C.Y.; Naka, T.; Igawa, S.; Ohta, F. Suppressive Effects of Genistein Dosage and Resistance Exercise on Bone Loss in Ovariectomized Rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci***2001**, *20*, 285–291, doi:10.2114/jpa.20.285.
  199. Peng, Z.Q.; Väänänen, H.K.; Tuukkanen, J. Ovariectomy-Induced Bone Loss Can Be Affected by Different Intensities of Treadmill Running Exercise in Rats. *Calcif Tissue Int***1997**, *60*, 441–448, doi:10.1007/s002239900260.
  200. Huang, T.-H.; Chang, F.-L.; Lin, S.-C.; Liu, S.-H.; Hsieh, S.S.; Yang, R.-S. Endurance Treadmill Running Training Benefits the Biomaterial Quality of Bone in Growing Male Wistar Rats. *J Bone Miner Metab***2008**, *26*, 350–357, doi:10.1007/s00774-007-0831-3.
  201. Sjøgaard, C.H.; Danielsen, C.C.; Thorling, E.B.; Mosekilde, L. Long-Term Exercise of Young and Adult Female Rats: Effect on Femoral Neck Biomechanical Competence and Bone Structure. *J Bone Miner Res***1994**, *9*, 409–416, doi:10.1002/jbmr.5650090317.
  202. Hou, J.C.; Salem, G.J.; Zernicke, R.F.; Barnard, R.J. Structural and Mechanical Adaptations of Immature Trabecular Bone to Strenuous Exercise. *J Appl Physiol (1985)***1990**, *69*, 1309–1314, doi:10.1152/jappl.1990.69.4.1309.
  203. Hamann, N.; Kohler, T.; Müller, R.; Brüggemann, G.-P.; Niehoff, A. The Effect of Level and Downhill Running on Cortical and Trabecular Bone in Growing Rats. *Calcif Tissue Int***2012**, *90*, 429–437, doi:10.1007/s00223-012-9593-6.
  204. 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, doi:10.1016/s8756-3282(03)00212-6.
  205. 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, doi:10.1620/tjem.219.139.
  206. Swift, S.N.; Baek, K.; Swift, J.M.; Bloomfield, S.A. Restriction of Dietary Energy Intake Has a Greater Impact on Bone Integrity than Does Restriction of Calcium in Exercising Female Rats. *J Nutr***2012**, *142*, 1038–1045, doi:10.3945/jn.111.153361.

207. Leppänen, O.V.; Sievänen, H.; Jokihaara, J.; Pajamäki, I.; Kannus, P.; Järvinen, T.L.N. Pathogenesis of Age-Related Osteoporosis: Impaired Mechano-Responsiveness of Bone Is Not the Culprit. *PLoS One***2008**, *3*, e2540, doi:10.1371/journal.pone.0002540.
208. Sipos, W.; Rauner, M.; Skalicky, M.; Viidik, A.; Hofbauer, G.; Schett, G.; Redlich, K.; Lang, S.; Pietschmann, P. Running Has a Negative Effect on Bone Metabolism and Proinflammatory Status in Male Aged Rats. *Exp Gerontol***2008**, *43*, 578–583, doi:10.1016/j.exger.2008.03.008.
209. Iwamoto, J.; Shimamura, C.; Takeda, T.; Abe, H.; Ichimura, S.; Sato, Y.; Toyama, Y. Effects of Treadmill Exercise on Bone Mass, Bone Metabolism, and Calcitropic Hormones in Young Growing Rats. *J Bone Miner Metab***2004**, *22*, 26–31, doi:10.1007/s00774-003-0443-5.
210. Bourrin, S.; Genty, C.; Palle, S.; Gharib, C.; Alexandre, C. Adverse Effects of Strenuous Exercise: A Densitometric and Histomorphometric Study in the Rat. *J Appl Physiol (1985)***1994**, *76*, 1999–2005, doi:10.1152/jappl.1994.76.5.1999.
211. Gao, J.; Fang, J.; Gong, H.; Gao, B. Morphological and Microstructural Alterations of the Articular Cartilage and Bones during Treadmill Exercises with Different Additional Weight-Bearing Levels. *J Healthc Eng***2017**, *2017*, 8696921, doi:10.1155/2017/8696921.
212. Gardinier, J.D.; Rostami, N.; Juliano, L.; Zhang, C. Bone Adaptation in Response to Treadmill Exercise in Young and Adult Mice. *Bone Rep***2018**, *8*, 29–37, doi:10.1016/j.bonr.2018.01.003.
213. Scott, J.M.; Swallow, E.A.; Metzger, C.E.; Kohler, R.; Wallace, J.M.; Stacy, A.J.; Allen, M.R.; Gasier, H.G. Iron Deficiency and High-Intensity Running Interval Training Do Not Impact Femoral or Tibial Bone in Young Female Rats. *Br J Nutr***2021**, *1–8*, doi:10.1017/S0007114521004426.
214. Yao, Z.; Lafage-Proust, M.-H.; Plouët, J.; Bloomfield, S.; Alexandre, C.; Vico, L. Increase of Both Angiogenesis and Bone Mass in Response to Exercise Depends on VEGF. *J Bone Miner Res***2004**, *19*, 1471–1480, doi:10.1359/JBMR.040517.
215. Notomi, T.; Okazaki, Y.; Okimoto, N.; Saitoh, S.; Nakamura, T.; Suzuki, M. A Comparison of Resistance and Aerobic Training for Mass, Strength and Turnover of Bone in Growing Rats. *Eur J Appl Physiol***2000**, *83*, 469–474, doi:10.1007/s004210000316.
216. Boudenot, A.; Pallu, S.; Uzbekov, R.; Dolleans, E.; Toumi, H.; Lespessailles, E. Free-Fall Landing and Interval Running Have Different Effects on Trabecular Bone Mass and Microarchitecture, Serum Osteocalcin, Biomechanical Properties, SOST Expression and on Osteocyte-Related Characteristics. *Appl Physiol Nutr Metab***2021**, *46*, 1525–1534, doi:10.1139/apnm-2020-0683.
217. 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. *Osteoarthritis Cartilage***2015**, *23*, 1563–1574, doi:10.1016/j.joca.2015.04.015.
218. Li, K.C.; Zernicke, R.F.; Barnard, R.J.; Li, A.F. Differential Response of Rat Limb Bones to Strenuous Exercise. *J Appl Physiol (1985)***1991**, *70*, 554–560, doi:10.1152/jappl.1991.70.2.554.
219. 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***1995**, *10*, 1745–1752, doi:10.1002/jbmr.5650101118.
220. George, D.; Pallu, S.; Bourzac, C.; Wazzani, R.; Allena, R.; Rémond, Y.; Portier, H. Prediction of Cortical Bone Thickness Variations in the Tibial Diaphysis of Running Rats. *Life***2022**, *12*, 233, doi:10.3390/life12020233.

221. Barengolts, E.I.; Lathon, P.V.; Curry, D.J.; Kukreja, S.C. Effects of Endurance Exercise on Bone Histomorphometric Parameters in Intact and Ovariectomized Rats. *Bone Miner***1994**, *26*, 133–140, doi:10.1016/s0169-6009(08)80058-x.
222. Turner, C.H.; Robling, A.G. Designing Exercise Regimens to Increase Bone Strength. *Exerc Sport Sci Rev***2003**, *31*, 45–50, doi:10.1097/00003677-200301000-00009.
223. Qin, Y.-X.; Hu, M. Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways. *Biomed Res Int***2014**, *2014*, 863421, doi:10.1155/2014/863421.
224. Kamel, M.A.; Picconi, J.L.; Lara-Castillo, N.; Johnson, M.L. Activation of  $\beta$ -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***2010**, *47*, 872–881, doi:10.1016/j.bone.2010.08.007.
225. Moraes-Silva, I.C.; Mostarda, C.T.; Silva-Filho, A.C.; Irigoyen, M.C. Hypertension and Exercise Training: Evidence from Clinical Studies. *Adv Exp Med Biol***2017**, *1000*, 65–84, doi:10.1007/978-981-10-4304-8\_5.
226. Hellsten, Y.; Nyberg, M. Cardiovascular Adaptations to Exercise Training. *Compr Physiol***2015**, *6*, 1–32, doi:10.1002/cphy.c140080.
227. Chen, Y.M.; Li, Z.B.; Zhu, M.; Cao, Y.M. Effects of Exercise Training on Left Ventricular Remodelling in Heart Failure Patients: An Updated Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Int J Clin Pract***2012**, *66*, 782–791, doi:10.1111/j.1742-1241.2012.02942.x.
228. Möbius-Winkler, S.; Uhlemann, M.; Adams, V.; Sandri, M.; Erbs, S.; Lenk, K.; Mangner, N.; Mueller, U.; Adam, J.; Grunze, M.; et al. Coronary Collateral Growth Induced by Physical Exercise: Results of the Impact of Intensive Exercise Training on Coronary Collateral Circulation in Patients With Stable Coronary Artery Disease (EXCITE) Trial. *Circulation***2016**, *133*, 1438–1448; discussion 1448, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016442.
229. Hambrecht, R.; Wolf, A.; Gielen, S.; Linke, A.; Hofer, J.; Erbs, S.; Schoene, N.; Schuler, G. Effect of Exercise on Coronary Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med***2000**, *342*, 454–460, doi:10.1056/NEJM200002173420702.
230. Van Craenenbroeck, E.M.; Frederix, G.; Pattyn, N.; Beckers, P.; Van Craenenbroeck, A.H.; Gevaert, A.; Possemiers, N.; Cornelissen, V.; Goetschalckx, K.; Vrints, C.J.; et al. Effects of Aerobic Interval Training and Continuous Training on Cellular Markers of Endothelial Integrity in Coronary Artery Disease: A SAINTEX-CAD Substudy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol***2015**, *309*, H1876–1882, doi:10.1152/ajpheart.00341.2015.
231. Mahalakshmi, B.; Maurya, N.; Lee, S.-D.; Bharath Kumar, V. Possible Neuroprotective Mechanisms of Physical Exercise in Neurodegeneration. *Int J Mol Sci***2020**, *21*, E5895, doi:10.3390/ijms21165895.
232. Morland, C.; Andersson, K.A.; Haugen, Ø.P.; Hadzic, A.; Kleppa, L.; Gille, A.; Rinholm, J.E.; Palibrk, V.; Diget, E.H.; Kennedy, L.H.; et al. Exercise Induces Cerebral VEGF and Angiogenesis via the Lactate Receptor HCAR1. *Nat Commun***2017**, *8*, 15557, doi:10.1038/ncomms15557.
233. Adams, V.; Reich, B.; Uhlemann, M.; Niebauer, J. Molecular Effects of Exercise Training in Patients with Cardiovascular Disease: Focus on Skeletal Muscle, Endothelium, and Myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol***2017**, *313*, H72–H88, doi:10.1152/ajpheart.00470.2016.
234. Hotta, K.; Behnke, B.J.; Arjmandi, B.; Ghosh, P.; Chen, B.; Brooks, R.; Maraj, J.J.; Elam, M.L.; Maher, P.; Kurien, D.; et al. Daily Muscle Stretching Enhances Blood

- Flow, Endothelial Function, Capillarity, Vascular Volume and Connectivity in Aged Skeletal Muscle. *J Physiol***2018**, 596, 1903–1917, doi:10.1113/JP275459.
235. Guo, S.; Huang, Y.; Zhang, Y.; Huang, H.; Hong, S.; Liu, T. Impacts of Exercise Interventions on Different Diseases and Organ Functions in Mice. *J Sport Health Sci***2020**, 9, 53–73, doi:10.1016/j.jshs.2019.07.004.
  236. Goolsby, M.A.; Boniquit, N. Bone Health in Athletes. *Sports Health***2017**, 9, 108–117, doi:10.1177/1941738116677732.
  237. Tong, X.; Chen, X.; Zhang, S.; Huang, M.; Shen, X.; Xu, J.; Zou, J. The Effect of Exercise on the Prevention of Osteoporosis and Bone Angiogenesis. *BioMed Research International***2019**, 2019, 1–8, doi:10.1155/2019/8171897.
  238. Stabley, J.N.; Moningka, N.C.; Behnke, B.J.; Delp, M.D. Exercise Training Augments Regional Bone and Marrow Blood Flow during Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise***2014**, 46, 2107–2112, doi:10.1249/MSS.0000000000000342.
  239. Dominguez, J.M.; Prisby, R.D.; Muller-Delp, J.M.; Allen, M.R.; Delp, M.D. Increased Nitric Oxide-Mediated Vasodilation of Bone Resistance Arteries Is Associated with Increased Trabecular Bone Volume after Endurance Training in Rats. *Bone***2010**, 46, 813–819, doi:10.1016/j.bone.2009.10.029.
  240. Viboolvorakul, S.; Niimi, H.; Wongeak-in, N.; Eksakulkla, S.; Patumraj, S. Increased Capillary Vascularity in the Femur of Aged Rats by Exercise Training. *Microvascular Research***2009**, 78, 459–463, doi:10.1016/j.mvr.2009.07.003.
  241. Kiiskinen, A.; Suominen, H. Blood Circulation of Long Bones in Trained Growing Rats and Mice. *Europ. J. Appl. Physiol.***1975**, 34, 303–309, doi:10.1007/BF00999943.
  242. Li, W.; Zhang, Y.; Xu, X.; Wang, K.; Ding, W. Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Ovariectomized Osteoporotic Rats after Exercise Training. *Int J Clin Exp Pathol***2017**, 10, 11438–11449.
  243. Grundnes, O.; Reikerås, O. Effect of Physical Activity on Muscle and Bone Blood Flow after Fracture: Exercise Andtenotomy Studied in Rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica***1991**, 62, 67–69, doi:10.3109/17453679108993096.
  244. Laufs, U.; Werner, N.; Link, A.; Endres, M.; Wassmann, S.; Jürgens, K.; Miche, E.; Böhm, M.; Nickenig, G. Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation***2004**, 109, 220–226, doi:10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37.
  245. Holstein, J.H.; Becker, S.C.; Fiedler, M.; Scheuer, C.; Garcia, P.; Histing, T.; Klein, M.; Pohlemann, T.; Menger, M.D. Exercise Enhances Angiogenesis during Bone Defect Healing in Mice. *Journal of Orthopaedic Research***2011**, 29, 1086–1092, doi:https://doi.org/10.1002/jor.21352.
  246. Matsuzaki, H.; Wohl, G.R.; Novack, D.V.; Lynch, J.A.; Silva, M.J. Damaging Fatigue Loading Stimulates Increases in Periosteal Vascularity at Sites of Bone Formation in the Rat Ulna. *Calcif Tissue Int***2007**, 80, 391–399, doi:10.1007/s00223-007-9031-3.
  247. Boerckel, J.D.; Uhrig, B.A.; Willett, N.J.; Huebsch, N.; Guldberg, R.E. Mechanical Regulation of Vascular Growth and Tissue Regeneration in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A***2011**, 108, E674–680, doi:10.1073/pnas.1107019108.
  248. Spodaryk, K.; Dabrowski, Z. Blood Flow in Different Regions of Bone Marrow after Short-Term Exercise. *Acta Physiol Hung***1991**, 77, 13–17.
  249. Miller-Kasprzak, E.; Jagodziński, P.P. Endothelial Progenitor Cells as a New Agent Contributing to Vascular Repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)***2007**, 55, 247–259, doi:10.1007/s00005-007-0027-5.
  250. Prisby, R.D. Mechanical, Hormonal and Metabolic Influences on Blood Vessels, Blood Flow and Bone. *Journal of Endocrinology***2017**, 235, R77–R100, doi:10.1530/JOE-16-0666.

251. Chennaoui, M.; Drogou, C.; Gomez-Merino, D. Effects of Physical Training on IL-1beta, IL-6 and IL-1ra Concentrations in Various Brain Areas of the Rat. *Eur Cytokine Netw***2008**, *19*, 8–14, doi:10.1684/ecn.2008.0115.
252. 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, doi:10.1258/00236770779399518.
253. Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldborg, 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, doi:10.1002/jbmr.141.
254. Filgueira, L. Fluorescence-Based Staining for Tartrate-Resistant Acidic Phosphatase (TRAP) in Osteoclasts Combined with Other Fluorescent Dyes and Protocols. *J Histochem Cytochem***2004**, *52*, 411–414, doi:10.1177/002215540405200312.
255. Ramos-Vara, J.A.; Miller, M.A. When Tissue Antigens and Antibodies Get along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry--the Red, Brown, and Blue Technique. *Vet Pathol***2014**, *51*, 42–87, doi:10.1177/0300985813505879.
256. Lavrik, I.N.; Golks, A.; Krammer, P.H. Caspases: Pharmacological Manipulation of Cell Death. *J Clin Invest***2005**, *115*, 2665–2672, doi:10.1172/JCI26252.
257. Nicholson, D.W.; Ali, A.; Thornberry, N.A.; Vaillancourt, J.P.; Ding, C.K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P.R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y.A. Identification and Inhibition of the ICE/CED-3 Protease Necessary for Mammalian Apoptosis. *Nature***1995**, *376*, 37–43, doi:10.1038/376037a0.
258. Fan, Y.; Bergmann, A. The Cleaved-Caspase-3 Antibody Is a Marker of Caspase-9-like DRONC Activity in Drosophila. *Cell Death Differ***2010**, *17*, 534–539, doi:10.1038/cdd.2009.185.
259. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using MCT. *Life (Basel)***2020**, *10*, doi:10.3390/life10120308.
260. Umemura, Y.; Ishiko, T.; Yamauchi, T.; Kurono, M.; Mashiko, S. Five Jumps per Day Increase Bone Mass and Breaking Force in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research***1997**, *12*, 1480–1485, doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1480.
261. DeLisser, H.M.; Christofidou-Solomidou, M.; Strieter, R.M.; Burdick, M.D.; Robinson, C.S.; Wexler, R.S.; Kerr, J.S.; Garlanda, C.; Merwin, J.R.; Madri, J.A.; et al. Involvement of Endothelial PECAM-1/CD31 in Angiogenesis. *Am J Pathol***1997**, *151*, 671–677.
262. Kanda, H.; Tanaka, T.; Matsumoto, M.; Umemoto, E.; Ebisuno, Y.; Kinoshita, M.; Noda, M.; Kannagi, R.; Hirata, T.; Murai, T.; et al. Endomucin, a Sialomucin Expressed in High Endothelial Venules, Supports L-Selectin-Mediated Rolling. *Int Immunol***2004**, *16*, 1265–1274, doi:10.1093/intimm/dxh128.
263. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Mar;10(3):165-77. doi: 10.1038/nrm2639. PMID: 19234476.
264. Mao Y, Tang S, Yang L, Li K. Inhibition of the Notch Signaling Pathway Reduces the Differentiation of Hepatic Progenitor Cells into Cholangiocytes in Biliary Atresia. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):1074-1082. doi: 10.1159/000493290. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30196281.
265. Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, Li C, Xie L, Crane J, Wan M, Zhen G, Bian Q, Yu B, Chang W, Qiu T, Pickarski M, Duong LT, Windle JJ, Luo X, Liao E, Cao X.

PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis.  
Nat Med. 2014 Nov;20(11):1270-8. doi: 10.1038/nm.3668. Epub 2014 Oct 5. PMID:  
25282358; PMCID: PMC4224644.

## Production scientifique

### **Publication dans des journaux internationaux :**

**Wazzani, R.**, Pallu, S., Bourzac, C., Ahmaïdi, S., Portier, H., & Jaffré, C. (2021). Physical Activity and Bone Vascularization: A Way to Explore in Bone Repair Context?. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(8), 783. <https://doi.org/10.3390/life11080783> (Annexe 1)

George, D., Pallu, S., Bourzac, C., **Wazzani, R.**, Allena, R., Rémond, Y., & Portier, H. (2022). Prediction of Cortical Bone Thickness Variations in the Tibial Diaphysis of Running Rats. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(2), 233. <https://doi.org/10.3390/life12020233> (Annexe 2)

### **Communication affichée en congrès internationaux :**

Wazzani R, Bourzac C, Elhafci H, Ahmaïdi S, Pallu S, Jaffré C and Portier H. Effects of intermittent, continuous and combined exercise running on femoral bone quality parameters in rats. The 27th Annual Congress of the European College of Sport Science between 30 August - 2 September 2022 in Sevilla - Spain.

Wazzani R, Bourzac C, Pallu S Elhafci H, Krim S Ahmaïdi S, Portier H and Jaffré C. “Mixed exercise”, an activity combining intermittent and continuous running: a new approach for bone health?The 49th European Calcified Tissue Society Congress Helsinki, Finland, 09/05/2022-09/05/2022



## **Annexe 1**

Review

# Physical Activity and Bone Vascularization: A Way to Explore in Bone Repair Context?

Rkia Wazzani <sup>1,†</sup>, Stéphane Pallu <sup>2,3,†</sup>, Céline Bourzac <sup>2</sup> , Saïd Ahmaïdi <sup>1</sup>, Hugues Portier <sup>2,3,†</sup>   
and Christelle Jaffré <sup>1,2,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire APERE, Université de Picardie Jules Verne, CEDEX, F-80000 Amiens, France; rkia.wazzani@etud.u-picardie.fr (R.W.); said.ahmaïdi@u-picardie.fr (S.A.)

<sup>2</sup> Laboratoire B3OA, Université de Paris, CEDEX, F-75010 Paris, France; stephane.pallu@univ-orleans.fr (S.P.); c\_bourzac@yahoo.fr (C.B.); hugues.portier@univ-orleans.fr (H.P.)

<sup>3</sup> UFR Science & Technique, Université d'Orléans, CEDEX, F-45100 Orléans, France

\* Correspondence: christelle.jaffre@u-picardie.fr

† These four authors contributed equally to the manuscript.

**Abstract:** Physical activity is widely recognized as a biotherapy by WHO in the fight and prevention of bone diseases such as osteoporosis. It reduces the risk of disabling fractures associated with many comorbidities, and whose repair is a major public health and economic issue. Bone tissue is a dynamic supportive tissue that reshapes itself according to the mechanical stresses to which it is exposed. Physical exercise is recognized as a key factor for bone health. However, the effects of exercise on bone quality depend on exercise protocols, duration, intensity, and frequency. Today, the effects of different exercise modalities on capillary bone vascularization, bone blood flow, and bone angiogenesis remain poorly understood and unclear. As vascularization is an integral part of bone repair process, the analysis of the preventive and/or curative effects of physical exercise is currently very undeveloped. Angiogenesis–osteogenesis coupling may constitute a new way for understanding the role of physical activity, especially in fracturing or in the integration of bone biomaterials. Thus, this review aimed to clarify the link between physical activities, vascularization, and bone repair.

**Keywords:** physical activity; bone vascularization; angiogenesis; VEGF; bone repair



**Citation:** Wazzani, R.; Pallu, S.; Bourzac, C.; Ahmaïdi, S.; Portier, H.; Jaffré, C. Physical Activity and Bone Vascularization: A Way to Explore in Bone Repair Context? *Life* **2021**, *11*, 783. <https://doi.org/10.3390/life11080783>

Academic Editors: Angus Hunter and Peter Zioupos

Received: 17 March 2021

Accepted: 21 July 2021

Published: 2 August 2021

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



**Copyright:** © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Physical activity is widely recognized as a biotherapy by WHO (World Health Organization) in the fight and prevention of bone diseases such as osteoporosis in older subjects [1]. Physical exercise-induced improvement in bone mineral density (BMD) has also been observed in young patients treated with glucocorticoids [2] or suffering from excessive alcohol consumption [3], both of these substances affecting bone viability. Exercise reduces the risk of disabling fractures associated with many comorbidities, and whose repair is a major public health and economic issue. It is classically accepted that physical activity in this context helps maintaining or increasing bone mass through mechanical stimulation [4,5] and systemic factors' (hormones, growth factors, etc.) production [6]. Relevant mechanisms may also include an increase in vascularization within bone tissue, such as reported in previous studies that tend to show a link between the processes of angiogenesis, vascularization foundation, and osteogenesis involved in bone tissue formation [7].

**Hypothesis:** *As physical activity improves vascularization, it also improves bone healing.*

Thus, physical activity could promote the link between angiogenesis and osteogenesis through both the compressions generated and the growth factors produced. The effects of exercise on these parameters require, however, further investigations [7]. Finally, in the

treatment of osteoporosis, particular attention should be paid to the effects of physical activity on bone defect or fracture repair processes that take place in the osteoporotic bone. Although vascularization is highly involved in the bone repair process, studies demonstrating the preventive/curative effects of physical activity on bone repair have not investigated the contribution of vascularization to these effects specifically. Such studies are probably hindered, at least in humans, by the complexity of the approach and visualization of the results. That being said, the role of physical activity on the vascularization and repair of skeletal muscles or cardiovascular tissues is no longer to be demonstrated, which provides sound grounds for hypotheses to explore in a bone repair context.

The present work is at a crossroads: (1) It outlines the role of physical activity in the link between angiogenesis and osteogenesis in *in vitro* studies and pre-clinical animal model studies and (2) it proposes to expand these findings to the possible role of physical activity in the repair of non-critical-sized bone defects.

## 2. Physical Activities and Their Effects on Angiogenesis and Osteogenesis

It has been proven that moderate to vigorous physical activity improves health [5,8,9]. Increased attention is being paid to the effects of physical exercise on the skeleton and the whole body. Moderate to intense training or running exercise is known to improve body composition in humans [10]. In addition, intermittent (interval or fractionated) high-intensity training improves aerobic capacity and oxygen consumption in individuals [11]. Physical exercise is also characterized by its anti-inflammatory effect [12]. For bone, numerous studies have focused on the effects of different physical exercise modalities on bone quality [13] and on the bone parameters determining this quality: geometric parameters (cortical bone thickness, bone size, femoral neck geometry), architectural parameters (cortical porosity, trabeculae shape), and tissue properties (mineralization, cell density, osteocyte networks) [14]. Bone tissue is known for its sensitivity to mechanical stresses and its ability to support these [15]. Consequently, it is capable of adapting to these constraints in order to maintain its metabolic and phosphocalcic balance and constant remodeling [16]. The theories about bone response to stress include the production of multiple mechanical loads, along with the circulation of interstitial fluid in the lacuna-canalicular system [16]. To respond to mechanical strains and strengthen bone tissue, as a dynamic tissue, requires a combination of elements, including angiogenesis, which, besides, proved to be essential in bone repair and regeneration [17]. To date, literature data on the effects of exercise on angiogenic–osteogenic responses are scarce. Moreover, not to even mention the effects of physical activity, very little is known about the cellular and molecular mechanisms related to angiogenesis–osteogenesis coupling [18]. Yet, understanding these mechanisms should enable identifying new therapeutic approaches against bone diseases [19]. Indeed, the increased vascularization of bone tissue and the great impact induced by physical exercise on this tissue makes bone angiogenesis a target of choice for studies aiming at the prevention of bone loss diseases via non-pharmaceutical pathways. The works investigating the effect of physical exercise on bone vascular status have focused on different sets of angiogenic and vascular parameters including blood flow, endothelial function, arterial properties, etc. (Table 1).

**Table 1.** Effects of various exercises on vascular parameters. The effects are expressed in degree of positivity (+ to + + +).

Type of Exercise	Duration	Species	Site	Parameters	Effects	References
Treadmill walking	10–12 weeks	Rat	Femur Tibia Fibula	Blood flow and vascular conductance	+ + +	[20]
Treadmill exercise	10–12 weeks	Rat	Femur	Bone marrow blood flow	+	[21]
				Vasodilatation response	+	
				Endothelium signaling pathways	+	

Table 1. Cont.

Type of Exercise	Duration	Species	Site	Parameters	Effects	References
Swimming	8 weeks	Rat	Femur	Bone microvasculature Bone capillary vascularity	+++	[22]
Climbing resistance exercise	8 weeks	Rat	Aorta	Endothelin-1 concentration Expression of the endothelial nitric oxide (eNOS) protein	+++	[23]
Swimming	8 weeks	Rat	Aorta	Endothelin-1 concentration Expression eNOS protein	+++	[23]
Treadmill running	7 weeks 3 weeks	Rat Mouse	Humerus Femur Tibia	Vascular adaptations Circulating red cell volume Circulating blood volume	+++	[24]
Treadmill exercise	6 weeks	Rat	Femur	Diameter and volume of blood vessels Expression of eNOS in femoral vessels	+++	[25]
Treadmill running	5 weeks	Rat	Tibia	Number of vessels in the proximal metaphysis VEGF receptor 1 mRNA	+++	[26]
Treadmill running	4 weeks	Rat	Femur	Total bone, proximal, diaphyseal, callus, and muscle blood flows	+++	[27]
Treadmill running	3 weeks	Mouse	Bone marrow	Numbers of circulating EPCs EPCs in the bone marrow VEGF serum level	+++	[28]
Bicycle ergometer training	4 weeks	Human	Blood	Numbers of circulating EPCs	+++	[28]

The study by Matsuzaki et al. (2007), for instance, showed that mechanical loading of the anterior limbs from rats produces a rapid increase in periosteal vascularization associated with an increase in bone capital [29]. This indicates that angiogenesis and osteogenesis are spatially coordinated in the bone response to mechanical stimulation. A previous study, evaluating moderate (3 weeks) and intensive (7 weeks) treadmill training programs in rats and mice, demonstrated vascular adaptations in long bones, especially a significantly larger circulating blood volume in trained animals compared to respective results in sedentary animals [24]. Moreover, in trained animals, the circulating blood volume in femurs was higher than in tibias or humeri. This result may be explained by differences in mechanical stress intensities sustained by these different bones during exercise [24].

Stabley et al. (2014) showed an increase in generalized hyperemia in the posterior limbs and bone marrow during and after physical training [20]. Therefore, the authors suggested that increased bone and bone marrow blood flow during and after physical training leads to an increase in pressure in different bone regions and promotes bone interstitial fluid flow from the high-pressure area to the low-pressure area, thereby supporting osteogenesis and bone integrity [7,20]. This support of osteogenesis by osteoblastic formation is even accentuated in bone fracture. Indeed, an increase in bone blood flow with greater vascularization in the callus area was observed in rats trained 4 weeks after sustaining a femur osteotomy [27]. In contrast, short-term exhaustive exercise on a treadmill had no effect on total blood flow in the femoral bone marrow and only increased blood flow in the metaphyseal regions relative to the diaphyseal region [30]. The duration and intensity of the exercise are factors that affect angiogenesis and, thus, potentially bone repair.

In 2004, Yao et al. showed for the first time that, compared to sedentariness, only 2 weeks of running exercise in rats increased the number of vessels in the tibial proximal metaphysis by 20 folds and induced a positive regulation of VEGF receptor mRNA [26]. However, when an anti-VEGF treatment was used, exercise-induced adaptations (especially increases in bone mineral density, trabecular bone volume, and vessel density) were mitigated and an increase in osteoclastic surfaces was observed [26]. Taken together, these results provided evidence that angiogenesis and osteogenesis are tightly related.

Additionally, in rats, Dominguez et al. (2010) showed that the treadmill exercise-induced increase in bone blood flow and the NOS signaling pathway were associated with increased trabecular bone volume in the distal femur from young and old animals by 34% and 26%, respectively, compared to respective results obtained in sedentary animals [21]. In the same vein, a recent study conducted in ovariectomized rats demonstrated that, in addition to trabecular bone integrity, femoral angiogenesis was significantly improved in running rats. This was associated with improved femoral artery vasodilatation in running rats [25]. Taken together, these results confirm that bone angiogenesis is closely linked to exercise-induced osteogenesis and is essential for the bone gain sought by exercise, both in healthy [26], aging, or pathological contexts (osteoporosis) [21,25]. This coupling is generally explained by the increased NO-dependent vasodilation induced by physical training, associated with increased production and number of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in the bony vascular system in animals [28]. This vasodilatation promotes blood supply and angiogenesis, which, in turn, facilitates osteogenesis at different bone sites.

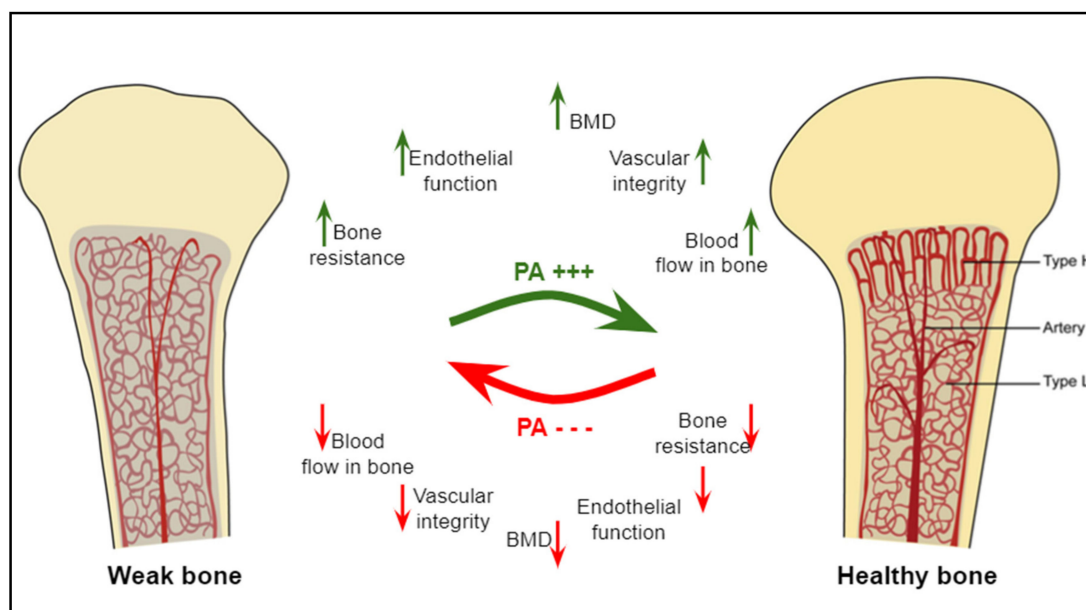
Apart from treadmill running, the effects of swimming on bone modeling have also been studied. They remain still questionable though [22]. Regarding bone vascular status, however, Viboolvorakul et al. (2009) demonstrated that 8 weeks of swimming could improve age-induced bone capillary vascular alterations in rats [22]. Similarly, Park et al. (2014) showed that swimming for 8 weeks in ovariectomized rats suppressed peripheral artery endothelial dysfunction but did not prevent bone loss [23]. In contrast, voluntary climbing exercise resulted in significant improvements in both endothelial function and bone mass in the postmenopausal rat model [23].

Until today, research works describing the effects of physical exercise on bone vascular parameters in humans have been very rare. A few years ago, the value of activity resumption (re-education) to regain the radial artery distensibility altered by fractured-arm immobilization in humans was demonstrated [31]. To our knowledge, however, there are no studies associating angiogenesis with osteogenesis and exercise modeling in humans or explaining the cellular and molecular mechanisms involved. Nevertheless, the positive effects of exercise on global vascular status have been well demonstrated by several studies. Laufs et al. (2004) observed a significant increase in circulating EPCs after bicycle ergometer training (Table 1) with a reduced apoptosis rate compared to respective results obtained pre-training [28]. In 2014, Ross et al. also demonstrated an increase in EPCs and angiogenic factors (VEGF in particular) for the first time in response to a resistance exercise [32]. Similarly, Adams et al. (2004) noted in patients with symptomatic coronary artery disease a significant increase in circulating EPCs in the peripheral blood, preceded by an increase in plasmatic VEGF in response to exercise-induced myocardial ischemia [33]. With this result, the authors confirmed that VEGF plays an important role in the migration of EPCs from the bone marrow to the peripheral blood. In 2005, Laufs et al. studied the effect of physical exercise on circulating EPC in healthy subjects this time [34]. Two different running protocols were evaluated. The results showed that 30 min of moderate-intensity running increased the number of circulating EPCs in contrast to the 10-min, moderate, short-term run [34]. Overall, other studies investigating the effects of physical exercise on EPCs showed that intense physical exercise significantly increases both the number of EPCs and the release and mobilization of EPCs in the peripheral blood [35,36].

In general, the migration of EPCs from bone marrow to peripheral sites depends on many factors, but the mechanism of this mobilization and differentiation is still not well

defined. Studies suggest, however, that these cells can promote local angiogenesis by secreting angiogenic factors via a paracrine pathway [37]. It should also be noted that the number of EPCs is strongly influenced by factors such as drugs, growth factors, and, of course, physical exercise [37]. All these elements suggest that EPCs are an important actor to study in the scope of the vascular effects of physical exercise in humans.

Overall, physical exercise is classically known as a bone anabolic agent [32]. Additionally, exercise is also known to improve bone angiogenic adaptations through the regulation of key angiogenic mediators (VEGF, FGF, etc.) [7]. These adaptations in the vascular system precede those occurring in bone in response to mechanical stimulations. Therefore, a better understanding of the angiogenic and osteogenic mechanisms induced by different types of physical exercise should allow the identification of new non-pharmacological strategies to prevent bone fragility (Figure 1).



**Figure 1.** The effects of physical activity or mechanical loading on bone parameters. The benefits of physical activity on bones, their microarchitecture, and microvasculature are multiple, including improved BMD, bone strength, bone blood flow, and the vascular integrity. The absence of physical activity deteriorates these bone and vascular parameters. Columnar type-H and sinusoidal type-L vessels are bone microvessels located in the metaphysis and in the diaphysis, respectively. Modified from [38].

### 3. Some Growth and Transcriptional Factors Involved in Osteogenesis/Angiogenesis Induced by Physical Activity

Bone remodeling in repair process depends on strong interactions between osteoblasts and other cells present within the bone microenvironment, especially vascular endothelial cells [39,40]. Some research teams have previously demonstrated the *in vitro* link between osteogenesis and angiogenesis [41]. Villars et al. (2002) demonstrated, by dye coupling assay with Lucifer yellow, a functional coupling between human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human bone marrow stromal cells (HBMSC). They showed by immunocytochemistry that the connexin 43 (C × 43), a gap junction protein, was expressed not only in HBMSC but also in the endothelial cell network, and that these two cell types communicated through a gap junctional channel constituted at least by C × 43 [41]. Moreover, they also showed that a 3-day to 3-week HUVEC (Human osteoprogenitor cells (HOP) co-culture) stimulated HOP differentiation and mineralization. Finally, they demonstrated by reverse-transcription, real-time quantitative PCR that in such a co-culture model, an up-regulation of the ALP expression in the co-cultured HOP was observed within the first 48 h [42].

Many factors are involved in this angiogenesis–osteogenesis coupling, but, to date, only few of them have been studied in the physical activity or mechanical loading context. We, therefore, limited the scope of this review to the principal factors analyzed, such as VEGF, HIF-1, eNOS, FGFs, BMPs, MMPs, and Notch ligands [43,44].

**VEGF:** The most studied factors were the vascular endothelial growth factors VEGFs, which are major regulators of angiogenesis and act in endothelial cell proliferation, migration, and activation [45,46]. Due to angiogenesis–osteogenesis coupling, VEGFs also influence skeletal development and postnatal bone repair. VEGFs come in five dimeric polypeptides forms: VEGFA (the prototype), VEGFB, VEGFC, VEGFD, and placenta growth factors (PlGF). They bind to VEGF receptors (1, 2, and 3), Nrp1, and Nrp2, and become activated upon ligand binding [47,48]. Studies have previously indicated that VEGF expression increases in various tissues (brain, lung, skeletal muscle, for instance) with different exercise trainings [49–52]. In cancellous bone, Yao et al. (2004) found a significant increase in VEGF and VEGF-r1 mRNA expressions after 10 days of running at 60%  $\text{VO}_2\text{max}$ ; these expressions were maintained up to 5 weeks after training was stopped [26]. It was accompanied in the tibial metaphysis by an increase in both the number of intramedullary vessels and cancellous bone formation as well as a decrease in resorption. It was also demonstrated in an *in vitro* model of osteocyte physical damage that mechanical stimuli had an additive effect on VEGF mRNA expression and its concentration in culture media [53]. Taken together, these few studies provide evidence of a positive effect of physical activity or mechanical strains on angiogenesis, via VEGF.

**HIF-1 $\alpha$ :** Physical activity is associated with reduced oxygen levels in numerous tissues (skeletal muscle, cardiac muscle, bone, etc.) and improve cellular response to hypoxia by the production of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). HIFs constitute a transcriptional regulator, which supports neo-angiogenesis [54] and regulates the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [55]. HIFs are heterodimers, composed of an oxygen-regulated  $\alpha$ -subunit and an oxygen-independent  $\beta$ -subunit. There are three HIF- $\alpha$  family proteins identified in humans: HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , and -3 $\alpha$  [56]. HIF-1 $\alpha$  plays an important role in coupling angiogenesis and osteogenesis, particularly in skeletal healing and development [57–59]. Physical training could increase HIFs, especially HIF-1 $\alpha$ , in skeletal muscle [60,61]. Using a mechanical loading protocol, consisting of either damaging or non-damaging axial compression of the right forelimb in mice, Tomlinson and Silva (2015) showed that HIF-1 $\alpha$  activity depended on loading characteristics: HIF-1 $\alpha$  was pro-osteogenic for woven bone formation under damaging loading conditions but anti-osteogenic for lamellar bone formation under non-damaging mechanical loading [62]. In another study [57], the authors showed that activation of the transcription factor HIF-1 $\alpha$  is a primary response to bone mechanical loading and that it would function in osteoblasts as a negative regulator of load-induced bone formation. Taken together, these studies suggest that the angiogenic response to mechanical loading is mediated through HIF-1 $\alpha$  expression and that HIF-1 $\alpha$  may alter bone formation and repair.

**eNOS:** Other factors could be activated by oxygen deficit. Nitric oxide (NO) is a free radical regulating bone cell function. The endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS) is constitutively expressed in bone, whereas inducible NOS is only expressed in response to inflammatory stimuli. The eNOS isoform seems to play a key role in regulating osteoblast activity and bone formation [63]. It has been shown that exercise training promotes eNOS production in coronary endothelial function [64] and left ventricular [65], and, by enhancing acetylcholine-induced femoral artery vasodilation and bone angiogenesis, improves the blood supply of bone, thus facilitating osteogenesis, in osteoporotic sites, for instance [25].

**FGFs:** Fibroblast growth factors are growth factors that play a role in cell proliferation, migration, and differentiation in various organs, including bone. The FGF family comprises three subfamilies known as canonical, hormone-like, and intracellular. The roles of canonical and hormone-like FGFs have been characterized in bone differentiation [66]. Concerning bone vascularization, FGF-2 administration may contribute to the treatment of

ischemic osteonecrosis [67]. Similarly, an absorbable collagen sponge with FGF-2 increased blood vessel and bone formation in rat calvarial critical-sized bone defects [68]. These studies confirm the role of FGF-2 in bone vascularization, in particular, during bone defect healing and, therefore, its involvement in bone repair processes. To our knowledge, there are no data about the effects of physical activity on FGFs in bone tissue. Previous studies have, however, identified their presence in muscles [69], tendons, and ligaments [70] following various exercise protocols, whereas they were absent in control subjects. Similar results could, therefore, be expected in bone tissue.

**BMPs:** Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) constitute the largest subdivision of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family of ligands. They initiate a biological cascade that involves multiple cell types and signaling events and culminates in the production of functional bone tissue [71]. For example, they initiate osteoblastic differentiation [72]. BMP signaling is central in endothelial cells of blood vessels [73]. Of note, BMP-7 mRNA and protein expression have been shown to increase in muscles with endurance training and gradual exercise [69,74]. In bone, the effects of training or exercise remain to be confirmed, even though Siamwala et al. (2015) highlighted, in a review on microgravity, the importance of physical activity on BMPs' expression in preventing bone loss [75].

**MMPs:** Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of endopeptidases ( $Zn^{+2}$  dependent), mediate various physiological processes by digesting components of the extracellular matrix [76], including osteoblast/osteocyte differentiation, bone formation, solubilization of the osteoid during bone resorption, osteoclast recruitment and migration, angiogenesis, and as a coupling factor in bone remodeling under physiological conditions [77,78]. Numerous studies have shown that physical activity and mechanical stresses are accompanied by a stimulation of MMPs' synthesis ( $-2$ ,  $-9$ ,  $-13$ ) and may play a role in angiogenesis (bone, muscles, vertebral disk, etc.) [79,80].

**Notch:** Notch signaling pathway contributes to regulate cell–cell interactions. In bone tissue, the activation of Notch signaling leads to enhanced osteogenesis and angiogenesis [19]. Many studies have indicated that physical training or mechanical loading stimulated Notch signaling pathway in different tissues [19]. However, in bone tissue, data are missing, especially in the presence of physical activity or mechanical loading.

#### 4. Vascularization and Bone Repair

Few studies have focused on the impact and evolution of vascularization in bone repair. Fractures are the most common large-organ, traumatic injuries to humans with, however, a very high regeneration capacity [81,82]. As for the development of bone, bone fracture healing is a complex multistep process. It starts with the formation of a hematoma around the fractured region of the bone and involves cytokine-secreting inflammatory cells for forming a fibrinous clot [17,83]. In the early callus, mesenchymal stem cells differentiate into chondrocytes, which further promote vascularization and bone formation through the secretion of several proteins (BMPs, MMP-13, alkaline phosphatase, VEGF, and placental growth factor). Chondrocytes in the callus also release anti-angiogenic factors, which limit blood vessel growth [84]. Additionally, the vascular network is essential for proper bone formation and functional bone restoration [17,18,85–89]. If blood flow is impaired, bone healing and repair may be delayed [90]. Indeed, it is admitted that the presence of blood vessels is critical for a successful bone regeneration [91,92]. The lack of blood supply induces local hypoxia, which may be maintained by subsequent inflammation [93]. The observed  $pO_2$  (partial pressure of oxygen) post-fracture is 1–3% [88]. This trauma-induced hypoxia causes endothelial cells (ECs) to upregulate bone morphogenic proteins (BMPs; i.e., BMP-2) to promote osteogenesis [17,89]. The hypoxia-induced transcription factor (HIF)- $\alpha$  pathway, activated in hypoxia, is considered a key mechanism for coupling bone growth to angiogenesis via increased expression of VEGF, the major vascular growth factor expressed by hypoxic osteoblasts [88]. In mice, where HIF $\alpha$  is overexpressed, the bones are highly vascularized [94]. In addition, the placental growth factor (PlGF, a VEGF homologue), which acts through the VEGF receptor, also appears to play a significant role in fracture



healing [93]. VEGF stimulates the regrowth of blood vessels into the injury site, so that oxygen and nutrient levels return to normal values [88]. The general pattern for bone healing consists in a recruitment of osteoclasts in the early hypoxic phase, while revascularization progressively favors osteoblast function (proliferation, differentiation, and bone formation). Osteoblast precursors could also move into fractured bones concomitant with the invasion of the blood vessels [83]. Additionally, osteoblasts accumulate HIF-1 $\alpha$ , leading to VEGF-A production, which further enhances angiogenic BMP production [84,89,94–96]. As for embryonic bone development, fibroblast growth factors (FGFs) are also required for bone repair. In Behr et al.'s study (2011), mice with heterozygous FGF9 loss, neovascularization, and cortical repair were reduced, in part due to reduced VEGF-A, and after a combined administration of FGF9 and VEGF-A the defect was significantly reduced [97]. Further, Kigami et al. (2013) showed that FGF-2 enhanced angiogenesis in rat calvarial critical-sized bone defects [68]. Even if knowledge has yet to be widely developed, other molecular processes are also involved. For example, some works highlight the central roles of Notch signaling in bone endothelium and its regulation by blood flow, which is relevant for age-related bone loss and, potentially, for therapeutic approaches aiming at the maintenance or restoration of bone mass. Notch pathway genes are highly expressed in arterial ECs, which are exposed to high flow rates and shear stress [17,34]. Based on the principle that active blood supply is essential for callus formation during fracture healing and repair [86], methods to artificially increase blood flow during early steps of repair are used as treatment [84]. However, the relationship between angiogenesis and bone repair may be more nuanced. This suggests a more complex balance or interplay between pro- and anti-angiogenic factors in the healing process.

Recently, it has been shown that preventive moderate continuous running-exercise conditioning could improve the healing of non-critical-sized bone defects in male Wistar rats [98]. In another study, mice were put in cages that were supplied with running wheels after a cranial bone window. Spontaneous physical activity promoted angiogenesis during bone repair in this model over a time period of 21 days [99].

## 5. Conclusions

In conclusion, it is now well established in the literature the importance of good bone vasculature for the preservation of bone integrity. Furthermore, different physical exercise modalities have been identified by their angiogenic and osteogenic improvements in humans and animals. However, the mechanisms coupling angiogenesis and osteogenesis in response to an exercise modality are still poorly understood. This provides an opportunity for new descriptive but also analytical scientific studies to shed light.

Finally, a deeper knowledge of the mechanisms involving physical exercise used in preventive or curative mode in the revascularization of bone could open new fields of use and investigation both in the repair of fractures and as a complement in the use of bio-materials for defects of critical size.

**Author Contributions:** Conceptualization: R.W., S.P., H.P. and C.J.; writing—original draft preparation: R.W., S.P., C.B., H.P. and C.J.; writing—review and editing: R.W., S.P., H.P. and C.J.; visualization: R.W., S.P., C.B., H.P. and C.J.; supervision: S.P., H.P., S.A. and C.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

## References

1. Pinheiro, M.B.; Oliveira, J.; Bauman, A.; Fairhall, N.; Kwok, W.; Sherrington, C. Evidence on physical activity and osteoporosis prevention for people aged 65+ years: A systematic review to inform the WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2020**, *17*, 1–53. [[CrossRef](#)]
2. Hofmann, C.; Girschick, H.; Lapa, C.; Semler, O.; Jakob, F. Frakturen und Knochendichte im Kindesalter. *Z. Rheumatol.* **2019**, *78*, 636–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sung, D.J.; Singh, H.; Oh, S.-B.; Kim, S. Bone-Loading Physical Activity and Alcohol Intake but not BMI Affect Areal Bone Mineral Density in Young College-Aged Korean Women: A Cross-Sectional Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 5063. [[CrossRef](#)]
4. Sañudo, B.; de Hoyo, M.; del Pozo-Cruz, J.; Carrasco, L.; Cruz, B.D.P.; Tejero, S.; Firth, E. A systematic review of the exercise effect on bone health: The importance of assessing mechanical loading in perimenopausal and postmenopausal women. *Menopause* **2017**, *24*, 1208–1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Troy, K.L.; Mancuso, M.E.; Butler, T.A.; Johnson, J.E. 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](#)]
6. Goolsby, M.A.; Boniquit, N. Bone Health in Athletes. *Sports Health* **2017**, *9*, 108–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Tong, X.; Chen, X.; Zhang, S.; Huang, M.; Shen, X.; Xu, J.; Zou, J. The Effect of Exercise on the Prevention of Osteoporosis and Bone Angiogenesis. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Dibben, G.; Dalal, H.M.; Taylor, R.S.; Doherty, P.; Tang, L.; Hillsdon, M. Cardiac rehabilitation and physical activity: Systematic review and meta-analysis. *Heart* **2018**, *104*, 1394–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hallal, P.C.; Victora, C.; Azevedo, M.R.; Wells, J. Adolescent physical activity and health. *Sports Med.* **2006**, *36*, 1019–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Wewege, M.; Berg, R.V.D.; Ward, R.E.; Keech, A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2017**, *18*, 635–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ojeda, A.H.; Maliqueo, S.G.; Guerra, M.C.; Barahona-Fuentes, G.D.F.; Villanueva, T.R.; Serrano, P.C. Efectos de un entrenamiento intervalado de alta intensidad en la capacidad aeróbica de adolescentes. *Rev. Méd. Chile* **2017**, *145*, 972–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Neto, J.R.; Lira, F.S.; Oyama, L.M.; Zanchi, N.; Yamashita, A.S.; Batista, M.L.; Nascimento, C.M.O.D.; Seelaender, M. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Graefe Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2009**, *106*, 697–704. [[CrossRef](#)]
13. Portier, H.; Benaitreau, D.; Pallu, S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life* **2020**, *10*, 217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fonseca, H.; Gonçalves, D.; Coriolano, H.-J.A.; Duarte, J.A. Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility. *Sports Med.* **2014**, *44*, 37–53. [[CrossRef](#)]
15. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1116*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* **2008**, *42*, 606–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sivan, U.; De Angelis, J.; Kusumbe, A.P. Role of angiocrine signals in bone development, homeostasis and disease. *Open Biol.* **2019**, *9*, 190144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kusumbe, A.P.; Ramasamy, S.; Adams, R.H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *507*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ramasamy, S.; Kusumbe, A.P.; Wang, L.; Adams, R.H. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *507*, 376–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Stabley, J.N.; Moninka, N.C.; Behnke, B.J.; Delp, M.D. Exercise Training Augments Regional Bone and Marrow Blood Flow during Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2014**, *46*, 2107–2112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Dominguez, J.M.; Prisby, R.D.; Muller-Delp, J.; Allen, M.R.; Delp, M.D. Increased nitric oxide-mediated vasodilation of bone resistance arteries is associated with increased trabecular bone volume after endurance training in rats. *Bone* **2010**, *46*, 813–819. [[CrossRef](#)]
22. Viboolvorakul, S.; Niimi, H.; Wongeak-In, N.; Eksakulka, S.; Patumraj, S. Increased capillary vascularity in the femur of aged rats by exercise training. *Microvasc. Res.* **2009**, *78*, 459–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Park, J.; Omi, N. The effects of different exercise modes for preventing endothelial dysfunction of arteries and bone loss in ovariectomized rats. *J. Exerc. Nutr. Biochem.* **2014**, *18*, 133–139. [[CrossRef](#)]
24. Kiiskinen, A.; Suominen, H. Blood circulation of long bones in trained growing rats and mice. *Graefe Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1975**, *34*, 303–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, W.; Zhang, Y.; Xu, X.; Wang, K.; Ding, W. Relationship between osteogenesis and angiogenesis in ovariectomized osteoporotic rats after exercise training. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2017**, *10*, 11438–11449. [[PubMed](#)]
26. Yao, Z.; Lafage-Proust, M.-H.; Plouët, J.; Bloomfield, S.; Alexandre, C.; Vico, L. Increase of Both Angiogenesis and Bone Mass in Response to Exercise Depends on VEGF. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 1471–1480. [[CrossRef](#)]
27. Grundnes, O.; Reikerås, O. Effect of physical activity on muscle and bone blood flow after fracture: Exercise and tenotomy studied in rats. *Acta Orthop. Scand.* **1991**, *62*, 67–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Laufs, U.; Werner, N.; Link, A.; Endres, M.; Wassmann, S.; Jürgens, K.; Miche, E.; Böhm, M.; Miche, E.; Nickenig, G. Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation* **2004**, *109*, 220–226. [[CrossRef](#)]
29. Matsuzaki, H.; Wohl, G.; Novack, D.; Lynch, J.A.; Silva, M.J. Damaging Fatigue Loading Stimulates Increases in Periosteal Vascularity at Sites of Bone Formation in the Rat Ulna. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, *80*, 391–399. [[CrossRef](#)]
30. Spodaryk, K.; Dabrowski, Z. Blood flow in different regions of bone marrow after short-term exercise. *Acta Physiol. Hung.* **1991**, *77*, 13–17.
31. Giannattasio, C.; Failla, M.; Grappiolo, A.; Bigoni, M.; Carugo, S.; Denti, M.; Mancina, G. Effects of Prolonged Immobilization of the Limb on Radial Artery Mechanical Properties. *Hypertension* **1998**, *32*, 584–587. [[CrossRef](#)]
32. Prisby, R.D. Mechanical, hormonal and metabolic influences on blood vessels, blood flow and bone. *J. Endocrinol.* **2017**, *235*, R77–R100. [[CrossRef](#)]
33. Adams, V.; Lenk, K.; Linke, A.; Lenz, D.; Erbs, S.; Sandri, M.; Tarnok, A.; Gielen, S.; Emmrich, F.; Schuler, G.; et al. Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease After Exercise-Induced Ischemia. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 684–690. [[CrossRef](#)]
34. Laufs, U.; Urhausen, A.; Werner, N.; Scharhag, J.; Heitz, A.; Kissner, G.; Böhm, M.; Kindermann, W.; Nickenig, G. Running exercise of different duration and intensity: Effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2005**, *12*, 407–414. [[CrossRef](#)]
35. Rehman, J.; Li, J.; Parvathaneni, L.; Karlsson, G.; Panchal, V.R.; Temm, C.J.; Mahenthiran, J.; March, K.L. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *43*, 2314–2318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sandri, M.; Adams, V.; Gielen, S.; Linke, A.; Lenk, K.; Kraenkel, N.; Lenz, D.; Erbs, S.; Scheinert, D.; Mohr, F.W.; et al. Effects of Exercise and Ischemia on Mobilization and Functional Activation of Blood-Derived Progenitor Cells in Patients with Ischemic Syndromes. *Circulation* **2005**, *111*, 3391–3399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Miller-Kasprzak, E.; Jagodzinski, P. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2007**, *55*, 247–259. [[CrossRef](#)]
38. Hendriks, M.; Ramasamy, S.K. Blood Vessels and Vascular Niches in Bone Development and Physiological Remodeling. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 602278. [[CrossRef](#)]
39. Saran, U.; Piperni, S.G.; Chatterjee, S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561*, 109–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ramasamy, S.K.; Kusumbe, A.P.; Schiller, M.; Zeuschner, D.; Bixel, M.G.; Milia, C.; Gamrekashvili, J.; Limbourg, A.; Medvinsky, A.; Santoro, M.M.; et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Villars, F.; Guillotin, B.; Amédée, T.; Dutoya, S.; Bordenave, L.; Bareille, R.; Amédée, J. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2002**, *282*, C775–C785. [[CrossRef](#)]
42. Guillotin, B.; Bareille, R.; Bourget, C.; Bordenave, L.; Amédée, J. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone* **2008**, *42*, 1080–1091. [[CrossRef](#)]
43. Kular, J.; Tickner, J.; Chim, S.M.; Xu, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 863–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhu, S.; Yao, F.; Qiu, H.; Zhang, G.; Xu, H.; Xu, J. Coupling factors and exosomal packaging microRNAs involved in the regulation of bone remodelling. *Biol. Rev.* **2018**, *93*, 469–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669–676. [[CrossRef](#)]
46. Gerber, H.-P.; Vu, T.H.; Ryan, A.M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 623–628. [[CrossRef](#)]
47. Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction—A brief update. *Vasc. Pharmacol.* **2016**, *86*, 14–17. [[CrossRef](#)]
48. Hu, K.; Olsen, B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* **2016**, *91*, 30–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Egginton, S. Invited review: Activity-induced angiogenesis. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.* **2009**, *457*, 963–977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Luttrell, M.J.; Mardis, B.R.; Bock, J.M.; Iwamoto, E.; Hanada, S.; Ueda, K.; Feider, A.J.; Temperly, K.; Casey, D. Effect of Age and Acute Exercise on Circulating Angioregulatory Factors. *J. Aging Phys. Act.* **2021**, *29*, 423–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Morland, C.; Andersson, K.A.; Haugen, Ø.P.; Hadzic, A.; Kleppa, L.; Gille, A.; Rinholm, J.E.; Palibrk, V.; Diget, E.H.; Kennedy, L.H.; et al. Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15557. [[CrossRef](#)]
52. Olver, T.D.; Ferguson, B.S.; Laughlin, M.H. Molecular Mechanisms for Exercise Training-Induced Changes in Vascular Structure and Function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2015**, *135*, 227–257. [[CrossRef](#)]
53. Liu, C.; Zhang, X.; Wu, M.; You, L. Mechanical loading up-regulates early remodeling signals from osteocytes subjected to physical damage. *J. Biomech.* **2015**, *48*, 4221–4228. [[CrossRef](#)]
54. Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 677–684. [[CrossRef](#)]

55. Hannah, S.S.; McFadden, S.; McNeilly, A.; McClean, C. "Take My Bone Away?" Hypoxia and bone: A narrative review. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 721–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wenger, R.H.; Stiehl, D.; Camenisch, G. Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE. *Sci. Signal.* **2005**, *2005*, re12. [[CrossRef](#)]
57. Riddle, R.C.; Leslie, J.M.; Gross, T.S.; Clemens, T.L. Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Protein Negatively Regulates Load-induced Bone Formation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 44449–44456. [[CrossRef](#)]
58. Riddle, R.C.; Khatri, R.; Schipani, E.; Clemens, T.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in angiogenic–osteogenic coupling. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 583–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wan, C.; Shao, J.; Gilbert, S.R.; Riddle, R.C.; Long, F.; Johnson, R.; Schipani, E.; Clemens, T.L. Role of HIF-1 $\alpha$  in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1192*, 322–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lindholm, M.E.; Rundqvist, H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Exp. Physiol.* **2015**, *101*, 28–32. [[CrossRef](#)]
61. Ribeiro, F.; Ribeiro, I.; Gonçalves, A.C.; Alves, A.; Melo, E.; Fernandes, R.; Costa, R.; Ribeiro, A.B.S.; Duarte, J.A.; Carreira, I.M.; et al. Effects of resistance exercise on endothelial progenitor cell mobilization in women. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Tomlinson, R.E.; Silva, M.J. HIF-1 $\alpha$  regulates bone formation after osteogenic mechanical loading. *Bone* **2015**, *73*, 98–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hof, R.J.V.; Ralston, S.H. Nitric oxide and bone. *Immunology* **2001**, *103*, 255–261. [[CrossRef](#)]
64. Couto, G.K.; Paula, S.M.; Gomes-Santos, I.L.; Negrão, C.E.; Rossoni, L.V. Exercise training induces eNOS coupling and restores relaxation in coronary arteries of heart failure rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H878–H887. [[CrossRef](#)]
65. Kojda, G.; Cheng, Y.C.; Burchfield, J.; Harrison, D.G. Dysfunctional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Response to Exercise in Mice Lacking One eNOS Gene. *Circulation* **2001**, *103*, 2839–2844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Takei, Y.; Minamizaki, T.; Yoshiko, Y. Functional Diversity of Fibroblast Growth Factors in Bone Formation. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, *2015*, 729352. [[CrossRef](#)]
67. Nakamae, A.; Sunagawa, T.; Ishida, O.; Suzuki, O.; Yasunaga, Y.; Hachisuka, H.; Ochi, M. Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 509–513. [[CrossRef](#)]
68. Kigami, R.; Sato, S.; Tsuchiya, N.; Yoshimakai, T.; Arai, Y.; Ito, K. FGF-2 Angiogenesis in Bone Regeneration Within Critical-Sized Bone Defects in Rat Calvaria. *Implant. Dent.* **2013**, *22*, 422–427. [[CrossRef](#)]
69. Kim, J.-S.; Yoon, D.H.; Kim, H.-J.; Choi, M.-J.; Song, W. Resistance exercise reduced the expression of fibroblast growth factor-2 in skeletal muscle of aged mice. *Integr. Med. Res.* **2016**, *5*, 230–235. [[CrossRef](#)]
70. Tagliaferri, C.; Witttrant, Y.; Davicco, M.-J.; Walrand, S.; Coxam, V. Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res. Rev.* **2015**, *21*, 55–70. [[CrossRef](#)]
71. Lowery, J.W.; Rosen, V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 2431–2452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Roelen, B.A.; Dijke, P.T. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF $\beta$  family members. *J. Orthop. Sci.* **2003**, *8*, 740–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bautch, V.L. Bone Morphogenetic Protein and Blood Vessels. *Curr. Opin. Hematol.* **2019**, *26*, 154–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rocha-Rodrigues, S.; Rodríguez, A.; Gouveia, A.; Gonçalves, I.O.; Becerril, S.; Ramírez, B.; Beleza, J.; Frühbeck, G.; Ascensao, A.; Magalhães, J. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* **2016**, *165*, 100–108. [[CrossRef](#)]
75. Siamwala, J.; Rajendran, S.; Chatterjee, S. Strategies of Manipulating BMP Signaling in Microgravity to Prevent Bone Loss. *Vitam. Horm.* **2015**, *99*, 249–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Varghese, S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: An overview of regulation and functions. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 2949–2966. [[CrossRef](#)]
77. Paiva, K.B.; Granjeiro, J. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *148*, 203–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Paiva, K.B.S.; Granjeiro, J. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561*, 74–87. [[CrossRef](#)]
79. Nichols, R.A.; Niagro, F.D.; Borke, J.L.; Cuenin, M.F.; Nichols, J.R.A. Mechanical Stretching of Mouse Calvarial Osteoblasts In Vitro Models Changes in MMP-2 and MMP-9 Expression at the Bone-Implant Interface. *J. Oral Implant.* **2016**, *42*, 138–144. [[CrossRef](#)]
80. Xia, W.; Zhang, L.-L.; Mo, J.; Zhang, W.; Li, H.-T.; Luo, Z.-P.; Yang, H.-L. Effect of Static Compression Loads on Intervertebral Disc: An In Vivo Bent Rat Tail Model. *Orthop. Surg.* **2018**, *10*, 134–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Watson, E.; Adams, R.H. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *8*, a031559. [[CrossRef](#)]
83. Gerstenfeld, L.C.; Cullinane, D.M.; Barnes, G.L.; Graves, D.T.; Einhorn, T. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 873–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. Bahney, C.S.; Hu, D.P.; Emiclau, T.; Marcucio, R. The Multifaceted Role of the Vasculature in Endochondral Fracture Repair. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Filipowska, J.; Tomaszewski, K.; Niedźwiedzki, Ł.; Walocha, J.A.; Niedźwiedzki, T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis* **2017**, *20*, 291–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Trueta, J. Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1974**, *105*, 11–26. [[CrossRef](#)]
87. Trueta, J. The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1997**, *334*, 6–14. [[CrossRef](#)]
88. Marenzana, M.; Arnett, T.R. The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res.* **2013**, *1*, 203–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Hankenson, K.; Gagne, K.; Shaughnessy, M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *94*, 3–12. [[CrossRef](#)]
90. Wan, C.; Gilbert, S.R.; Wang, Y.; Cao, X.; Shen, X.; Ramaswamy, G.; Jacobsen, K.A.; Alaql, Z.S.; Eberhardt, A.W.; Gerstenfeld, L.C.; et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 686–691. [[CrossRef](#)]
91. Sathy, B.N.; Mony, U.; Menon, D.; Baskaran, V.; Mikos, A.G.; Nair, S. Bone Tissue Engineering with Multilayered Scaffolds—Part I: An Approach for Vascularizing Engineered Constructs In Vivo. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 2480–2494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Caliaperoumal, G.; Souyet, M.; Bensidhoum, M.; Petite, H.; Anagnostou, F. Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats. *Bone* **2018**, *112*, 161–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Maes, C.; Carmeliet, G.; Schipani, E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wang, Y.; Wan, C.; Deng, L.; Liu, X.; Cao, X.; Gilbert, S.R.; Bouxsein, M.L.; Faugere, M.-C.; Guldberg, R.E.; Gerstenfeld, L.C.; et al. The hypoxia-inducible factor  $\alpha$  pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1616–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Brandi, M.L.; Collin-Osdoby, P. Vascular Biology and the Skeleton. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 183–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Maes, C.; Kobayashi, T.; Selig, M.K.; Torrekens, S.; Roth, S.I.; Mackem, S.; Carmeliet, G.; Kronenberg, H.M. Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 329–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Behr, B.; Sorkin, M.; Manu, A.; Lehnhardt, M.; Longaker, M.T.; Quarto, N. Fgf-18 Is Required for Osteogenesis But Not Angiogenesis During Long Bone Repair. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 2061–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using  $\mu$ CT. *Life* **2020**, *10*, 308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Holstein, J.H.; Becker, S.C.; Fiedler, M.; Scheuer, C.; Garcia, P.; Histing, T.; Klein, M.; Pohlemann, T.; Menger, M.D. Exercise Enhances Angiogenesis during Bone Defect Healing in Mice. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 1086–1092. [[CrossRef](#)]

## **Annexe 2**

## Article

# Prediction of Cortical Bone Thickness Variations in the Tibial Diaphysis of Running Rats

Daniel George <sup>1,\*</sup>, Stéphane Pallu <sup>2,3</sup>, Céline Bourzac <sup>2,4</sup>, Rkia Wazzani <sup>2,5</sup>, Rachele Allena <sup>6</sup>, Yves Rémond <sup>1</sup> and Hugues Portier <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ICUBE Laboratory, CNRS, University of Strasbourg, 2 Rue Boussingault, 67000 Strasbourg, France; remond@unistra.fr

<sup>2</sup> B3OA Laboratory, CNRS, INSERM, University of Paris, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris, France; stephane.pallu@univ-orleans.fr (S.P.); celine.bourzac@vet-alfort.fr (C.B.); rkia.wazzani@etud.u-picardie.fr (R.W.); hugues.portier@univ-orleans.fr (H.P.)

<sup>3</sup> UFR Science and Technology, University of Orléans, 1 Rue de Chartres, 45100 Orléans, France

<sup>4</sup> DEPEC, Ecole Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

<sup>5</sup> APERE Laboratory, Université de Picardie Jules Verne, CEDEX, 80000 Amiens, France

<sup>6</sup> Laboratory Mathematics & Interactions J. A. Dieudonné, CNRS, University Côte d'Azur, 06108 Nice, France; rachele.allena@unice.fr

\* Correspondence: george@unistra.fr

**Abstract:** A cell-mechanobiological model is used for the prediction of bone density variation in rat tibiae under medium and high mechanical loads. The proposed theoretical-numerical model has only four parameters that need to be identified experimentally. It was used on three groups of male Wistar rats under sedentary, moderate intermittent and continuous running scenarios over an eight week period. The theoretical numerical model was able to predict an increase in bone density under intermittent running (medium intensity mechanical load) and a decrease of bone density under continuous running (higher intensity mechanical load). The numerical predictions were well correlated with the experimental observations of cortical bone thickness variations, and the experimental results of cell activity enabled us to validate the numerical results predictions. The proposed model shows a good capacity to predict bone density variation through medium and high mechanical loads. The mechanobiological balance between osteoblast and osteoclast activity seems to be validated and a foreseen prediction of bone density is made available.

**Keywords:** bone density; cell activity; mechanical modeling; experimental validation; rat; treadmill running

**Citation:** George, D.; Pallu, S.; Bourzac, C.; Wazzani, R.; Allena, R.; Rémond, Y.; Portier, H. Prediction of Cortical Bone Thickness Variations in the Tibial Diaphysis of Running Rats. *Life* **2022**, *12*, 233.

<https://doi.org/10.3390/life12020233>

Academic Editor: Nicola Smania

Received: 22 December 2021

Accepted: 1 February 2022

Published: 3 February 2022

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



**Copyright:** © 2022 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/>).

## 1. Introduction

Bone remodeling has been at the heart of many osteoarticular problems, such as ageing, osteoporosis, fracture, and bone disease, since long before the well-known Wolff's Law (reprinted many times and recently updated [1]) was stated. Medical doctors and scientists have tried for many years to understand the basic principles of bone remodeling in order to accurately predict its evolution as a function of time based on mechanical and biological aspects, to evaluate the prognosis for adequate repair. As such, one of the first main parameters identified for bone remodeling was the externally applied mechanical load [1–3]. It is predominant in the way that bone structure must be fit to support the body weight and overall body functioning. Hence, changing the body weight or internal body functioning, impacts the bone density distribution. In order to predict bone remodeling as a function of an externally applied mechanical load, many models have been developed. Some of the known ones were developed by Beaupré, Ruimermann, or Pivonka [4–6], up to the well-known bone mechanostat developed by Frost [7,8]. However, most of these models are based on approaches where the bone mi-

crostructure evolution is dependent on a given “stimulus” being solely mechanically driven, usually under the form of strain energy. Yet, as a living material, bone will evolve not only from the mechanical point of view but also from the biological one, since organs and bones are dependent on living cell activities. For this reason, numerous works trying to link bone biology, bone mechanics, and the main biological factors of bone remodeling were published [9–14]. The difficulty in integrating cell activity with bone remodeling is mainly due to the fact that bone density is a macroscopic parameter (at the continuous scale of the bone), whereas cell biology occurs at a local scale, such as tens of microns. For this reason, some models have tried to bridge the different scales of bone remodeling (see, e.g., [15–18]). However, the limited knowledge of bone mechanobiological functioning remains a gap difficult to bridge to validate these models on human patients, particularly when accounting for patient dependency [19–21]. It is possible, at the macroscopic scale, to integrate more complex mechanical behavior in order to try accessing the local microstructure distribution that influences the bone density variation, either with or without an implant [22–27]. However, most of these models remain mechanically driven without accounting for the independent cell activity intensity that drives the bone remodeling.

In order to more precisely address this bone remodeling process from the simulation prediction point of view, one must account for both the mechanics (external forces applied to the structure) and the independent cell activity that are at play within the bone structure. A non-exhaustive list of the main influencing parameters for bone remodeling includes cell migration and differentiation, together with their interplay with their mechanical environment [28–32]. In addition, the mechanics should be coupled with the biology into a common bone “stimulus” leading the bone remodeling [33,34]. Although these effects are visible at the macroscopic scale of the bone, they are also dependent on local biophysics, such as cell functioning and differentiation, fluid flow, and biological transformations at the microscopic scale [35–40]. These aspects are difficult to integrate in a fully coupled model. Nevertheless, all these works support the conclusion that bone remodeling, both at macroscopic and microscopic scale, is dependent on a mechanical load imposed on the structure, either by gravity or by the muscles (even without gravity) that will drive a biological response through bone cell activity. These two steps are compulsory and independent and cannot be merged, as their fusion may lead to identical results with different couplings. Hence, any theoretical numerical model, even phenomenologically driven, that aims to represent bone remodeling should be based on this principle.

As such, assuming that the biological parameters (different cell activity) driving the bone remodeling can be identified experimentally, either under normal earth gravity or hypogravity [41–45] conditions. It could be possible to study/predict bone density variations (bone remodeling) as a function of time for different load conditions when providing an adequate coupling between the bone mechanical response and the cell reaction to drive the bone remodeling. In this work, we evaluate, from experimental data, a continuous theoretical numerical model based on George et al. [46] to study bone density variations under medium or high mechanical loads and compare these numerical results with experimental ones obtained from running rats. We show that the bone density either increases or decreases, depending on the running exercise intensity and that cell activity is directly related to this evolution. The first part of the paper is dedicated to the experiments and data extraction, and the second part is dedicated to the theoretical numerical simulations to validate the proposed numerical model. The results and discussion follow for the validation of the proposed predictive model.

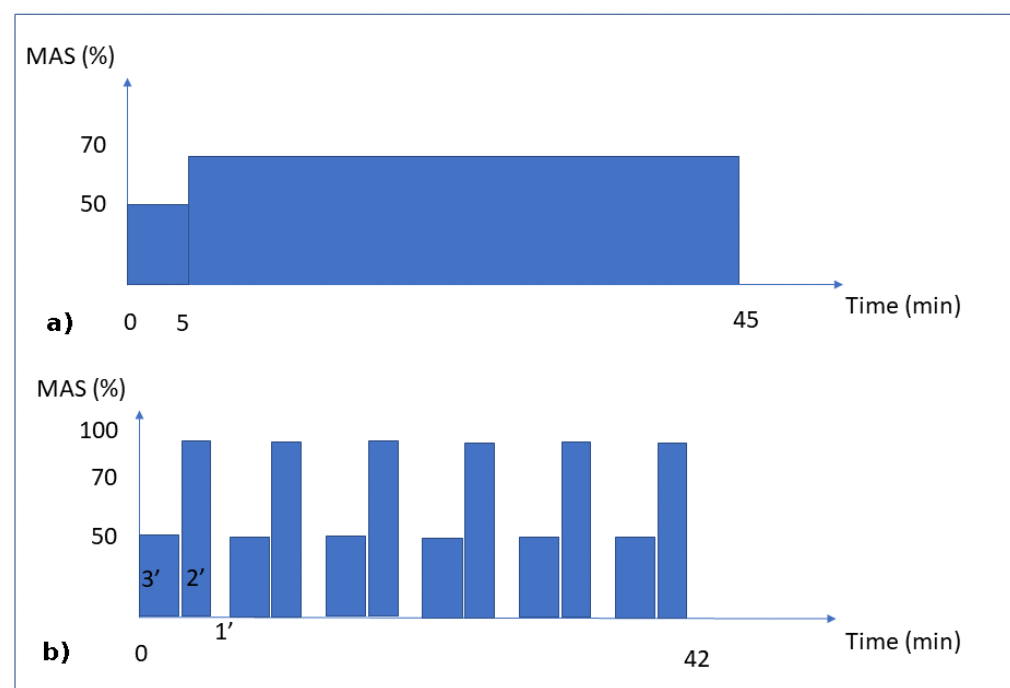
## 2. Experiments

Experiments were carried out on 3 groups of 7 initially 5-week-old male Wistar rats. 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, reference number APAFIS # 9505). All rats were housed in controlled facilities (3 rats per standard cage, maintained on a 12-h light/dark cycle, at a constant temperature of  $21 \pm 2$  °C). A commercial standard diet (Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided ad libitum to all animals. No significant variations were observed between the rats regarding their weight and sizes during housing. After one week of acclimatization, one week of treadmill running training was carried out (25 min per day to level off each rat) for the homogenization and practice scenario. The physical characteristics of the rats were then measured for each group (specifically, length and body weight). The rats were then submitted to one of the following scenarios:

1. Sedentary control group: the rats were  $26.7 (\pm 1.1)$  cm long and weighed  $492.1 (\pm 34.6)$  g. They were left to their everyday activity (eating and walking), without any specific running activity, for 8 weeks. At the end of this program, the mean cortical bone thickness of the tibial diaphysis was  $957 (\pm 110)$   $\mu\text{m}$ . This value was normalized to 1 to facilitate comparisons between groups. The mechanical load (body weight) for the bone remodeling was assumed to be constant over time.
2. Continuous running group: the rats were  $26.4 (\pm 0.7)$  cm long and weighed  $486.4 (\pm 31.8)$  g. This group was subjected to 8 weeks of running for 45 min per day at an intensity of 70% of the maximal aerobic speed (MAS) (Figure 1a). At the end of the exercise program, the mean cortical bone thickness of the tibial diaphysis was  $708 \mu\text{m} (\pm 65 \mu\text{m})$ .
3. Intermittent running group: the rats were  $26.5 (\pm 0.6)$  cm long and weighed  $475.1 (\pm 30.3)$  g. This group was subjected to an interval-training running activity for 42 min per day for 8 weeks. This protocol consisted in 7 repetitions of blocks of 3 min at 50% of the MAS, followed by 2 min at 100% of the MAS and 1 min of passive rest (Figure 1b). At the end of the exercise program, the mean cortical bone thickness of the tibial diaphysis was  $1024 (\pm 112)$   $\mu\text{m}$ .



**Figure 1.** Training Protocols. Moderate Continuous running (a) and Interval running (b). MAS corresponds to the maximal aerobic speed.

Before and after the 8 week program, a progressive running test was used to determine the MAS for each rat [47]. Briefly, the test started with a 5 min warm-up (13 m/min) at a  $10^\circ$  inclination. Then, the speed was first increased to 17 m/min for 2 min and then by

4 m/min every 1min 30s. The test was conducted until fatigue occurred. Fatigue was defined as when the rats could no longer keep pace with the treadmill speed despite two consecutive stimulations with compressed air sprays. The test was then stopped, and the last fully sustained increment speed was defined as the MAS for the rat.

For the mechanical load conditions, the three groups were subjected to their own body weight. Since the body weight load conditions (whether running or not) lasted only a few seconds or less, while the bone remodeling process lasted days or weeks, we assumed that the intensity of the mechanical load remained at a constant body weight, disregarding the intermittent and inertial effects due to the impact of the legs on the ground while walking or running. The mechanical load (exercise intensity) on the bones was assumed to be directly dependent on the MAS intensity (linked to the aerobic capacity through oxygen uptake) for each group (Figure 1). Hence, we assumed that the continuous running group had a 70% level of exercise intensity, the intermittent running group (by intervals) had a maximum level of 100% exercise intensity, and the sedentary group had a 10% level of exercise intensity, corresponding to the average concentration of oxygen in the blood at rest classically described in the literature.

Since the final goal of this work was the numerical prediction of cortical bone thickness through the bone density variation as a function of physical exercise intensity, we wanted to be able to validate the numerical results with experimental data. We assumed that all rats were identical and that their normal bone growth was similar, as a function of time (ageing). Hence, there was no need to measure the variation in bone density at different times and compare them. We only needed to compare the sedentary control group (no exercise) with the two others (with exercise) to validate the variation in bone density as a function of exercise intensity.

Regarding the experimental part, a number of tests were carried out at the end of the eight week running scenarios. Post-mortem micro-computed tomography ( $\mu$ CT) was performed to determine the cortical porosity (a parameter for bone density) and variations in the bone microstructure as a function of time. Bone histology was performed in order to precisely evaluate the variation in cortical bone thickness after the 8 week-scenarios. Finally, the occupancy rate of osteocyte lacunae and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemistry were undertaken to quantify the capacity of bone degradation as a function of time and to correlate it with numerical cell kinetics.

### 2.1. Post-Mortem Micro-Computed Tomography ( $\mu$ CT) and Computation

The left proximal tibia of each rat was imaged using a high-resolution  $\mu$ CT (Skyscan 1172, Bruker, Belgium). For the microarchitectural parameters and bone mineral density, the  $\mu$ CT images were acquired at the following settings: source voltage 80 kV, source current 100  $\mu$ A, matrix 1000  $\times$  668, exposure time 175 ms, rotation step 0.3 degrees, frame averaging 10, filter aluminum 0.5 mm thick, and pixel size 9.81  $\mu$ m. For the cortical porosity parameters, the  $\mu$ CT images were acquired at the following settings: source voltage 80 kV, source current 100  $\mu$ A, matrix 2000  $\times$  1336, exposure time 345 ms, rotation step 0.3 degrees, frame averaging 10, filter aluminum 0.5 mm thick, pixel size 5.00  $\mu$ m. Images were reconstructed using NRecon software, 16 bits (v1.7.0.4, Skyscan). They were then segmented into binary images using simple global thresholding methods because of the low noise and good resolution of the data sets.

For the trabecular microarchitecture and the trabecular and cortical BMD, 200 slices were selected from the images immediately after the distal growth plate of the tibia. The bone mineral density was computed from their respective region of interest (ROI) for the trabecular and cortical bone using hydroxyapatite phantoms for calibration with CTAn software (v1.16.4.1, Skyscan) [48]. For the cortical porosity parameters, the  $\mu$ CT images were acquired at the following settings: source voltage 80 kV, source current 100  $\mu$ A, matrix 2000  $\times$  1336, exposure time 345 ms, rotation step 0.3 degrees, frame averaging 10, filter aluminum 0.5 mm thick, pixel size 5.00  $\mu$ m [49]. These data were later transferred into the numerical model where the bone geometry was idealized (as each rat bone is

different) and the bone density was averaged over all rats in each group and for the trabecular and cortical regions.

### 2.2. Bone Histology

The left tibiae were sectioned in 2 halves after fixation, and the proximal halves were dehydrated with a graded series of alcohols, embedded into polymethylmetacrylate (PMMA) resin, and transversally cut to a thickness of 200  $\mu\text{m}$  with a diamond saw. The slides were then polished to a thickness of 100  $\mu\text{m}$  using an alumina polishing solution and, finally, were stained by Stevenel's blue (VWR Chemicals–PanReac Applichem) and van Gieson's picrofuchsin (VWR Chemicals–RAL Diagnostics). The thickness of the cortical diaphysis was evaluated by a histomorphometric analysis. The images were obtained using a digital microscope (Keyence, VHX-2000) at 10 $\times$  magnification. Using the dedicated Keyence toolbox, the cortical thickness was measured at eight different locations on three sections. The results obtained were averaged to obtain a mean cortical thickness per rat for the anterior, posterior, lateral, and medial locations and compared them with the numerical results obtained after the simulations.

### 2.3. Occupation Rate of Osteocyte Lacunae

To assess the occupation rate of osteocyte lacunae (ORL), pictures were obtained from the same slides using another microscope (Nikon, digital camera DXM 1200-F) at 40 $\times$  magnification. Using Image J (National Institute of Health, 1987), the number of empty lacunae and lacunae containing an osteocyte (full lacunae) were determined in one randomly chosen 100  $\times$  100  $\mu\text{m}^2$  area, on the same 3 slides used for histomorphometry, for each location (anterior, posterior, lateral, and medial). The osteocyte lacunar density was expressed in osteocyte lacunae/mm<sup>2</sup> and the ORL (%) was calculated as: the number of lacunae with an osteocyte / (the number of lacunae with an osteocyte + the number of empty osteocyte lacunae)  $\times$  100. The results (see Section 4.4) obtained from each location were added and then averaged from the three slides to obtain a mean ORL per rat.

### 2.4. TRAP Histochemistry

The distal tibial halves were decalcified with EDTA 177 g/L, pH 7.0–7.3 (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 4 weeks, embedded in paraffin, and cut to a thickness of 4–5  $\mu\text{m}$  with a microtome. To assess bone resorption, slides were stained with tartrate-resistant acid phosphatases (TRAP, Acid Phosphatase kit, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and counterstained with hematoxylin after paraffin removal. For each rat, 4 transversal slides were randomly chosen and, for each of these slides, 3 pictures were randomly obtained, 1 for each of the following regions (trabecular bone, intermediate cortical-trabecular area, and cortical bone) at 500 $\times$  magnification. A polygonal region of interest was manually drawn (TRAP activity is stained in red) and the surface of osteoclastic resorption (see Section 4.4) was automatically retrieved using VHX software (KEYENCE) [50]. The results obtained from each location and each slide were added to obtain a global surface of osteoclastic resorption for each rat.

### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed on the experimental results using a commercially available software (StatView, Version 5.0.; SAS Institute Inc). The descriptive statistics were reported as means  $\pm$  standard deviations of the mean (SD) or medians (with 25th and 75th percentiles), according to the normality of the data distribution (Shapiro–Wilk test). The differences between the sedentary control, moderate continuous running, and intermittent running groups were then assessed using a Kruskal–Wallis test, then a Mann–Whitney U test, when applicable. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . The obtained results were then compared to the numerical predictions to check, qualitatively,

on the comparative tendencies and evolution trends for bone remodeling (see Section 4.4).

### 3. Theoretical Model

#### 3.1. Theory

The model proposed here is based on the work by George et al. [46]. It is developed at a continuous scale to predict the equivalent bone density, either in the cortical or in the trabecular regions. Bone density variations evolve as a function of the identified cell activity developed within the bone structure under an applied mechanical load (here the body weight of the rats in the different running scenarios). The variation in mechanical loads leads to a variation in the biological responses of the bone cells within the bone, hence leading to a variation in bone density adjusting to the new mechanical load conditions through bone remodeling. We assume that cell activity is linearly dependent on the intensity of the elastic mechanical energy.

The combined cell activity leading the bone remodeling is the sum of the osteoblastic and osteoclastic cell activities within a given bone volume or representative volume element (RVE, assumed large enough for both activities to exist at the same time), as proposed by Delaisse et al. [51]. At homeostatic equilibrium, no bone remodeling occurs. This corresponds to everyday life activity. For medium mechanical energy (energy that is bigger than homeostasis but not overloading the structure), the sum is positive, leading to positive bone remodeling (through bone formation) and an increase in the equivalent bone density. This corresponds to an alternate running activity at a moderate intensity (moderate running two or three times a week for a healthy human). For higher mechanical energy (an overload of the bone structure is developed due to excessive exercise), the sum is negative, leading to a negative bone remodeling (or bone resorption). This corresponds to overtraining in humans. The bone is overloaded with intensive sport activity, and this leads to a degradation of the bone, as it is not able to biologically sustain such a load scenario over long periods of time.

The cell activity is assumed to be linearly dependent on the applied mechanical load up to a maximum level. For a given mechanical energy above the homeostasis equilibrium, both osteoblast and osteoclast activities representing a quantity of bone formed or resorbed during a given time frame are given in  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$  (this unit will need to be translated into biological unit at a later stage with enlarged experimental data available) as they start increasing to reach a maximum value that is dependent on the cell density at a given position within the bone. Using this approach, a four parameter model can be proposed as follows:

$$\begin{aligned} A_{ob} &= k_1 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} & \text{for } W < W_1 & ; & A_{oc} = -k_2 \cdot W + \rho_{bone}^{ini} & \text{for } W < W_3 \\ A_{ob}^{max} &= A_1 + \rho_{bone}^{ini} & \text{for } W > W_1 & ; & A_{oc}^{max} = -A_2 + \rho_{bone}^{ini} & \text{for } W > W_3 \end{aligned} \quad (1)$$

where  $A_{ob}$  and  $A_{ob}^{max}$  are the osteoblast and maximum osteoblast activities, and  $A_{oc}$  and  $A_{oc}^{max}$  are the osteoclast and maximum osteoclast activities. The four parameters  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $A_1$ , and  $A_2$  are the cell activity parameters leading the kinetics of bone density change of formed/degraded bone.  $\rho_{bone}^{ini}$  is the initial bone density in the homeostasis condition.  $W$  represents the elastic mechanical energy developed within the structure  $W_1$  and  $W_3$  represents the two energy thresholds for which: (i) under  $W_1$ , the structure is not overloaded, (ii) above  $W_3$ , the structure is mechanically overloaded, and (iii) in between  $W_1$  and  $W_3$ , uncertain conditions are present where we define  $W_2$  to be the value for which the sum of osteoblastic and osteoclastic cells is zero, with an unstable equilibrium. Once the cell activities (four parameters) identified from the experiments and the theoretical model are defined, the bone density can be calculated, together with its corresponding Young's modulus. It is a well-known fact that the determination of the Young's modulus of bone from experimental data is well scattered through patients (animals, humans, type of bones, age, etc.). Therefore, we used a known relation,  $E = E_0 \cdot \rho_{bone}^2$  (Figures 1 and 2

from [52]), that can be used to fit the experimental data available in the literature, where  $E_0$  is the cortical bone Young's modulus. This can be adapted at a later stage with more precise experimental data.

The above proposed model is valid within any given small region of the bone structure, defined within a given RVE where the bone density variation is small (within the RVE) but needs to be validated over the entire bone geometry (where bone density can vary importantly). Although it is well known that bone remodeling or bone density variations originate from osteoblast and osteoclast cell activities, driven by the mechano-sensitive osteocytes, assuming a direct link between the mechanical energy developed and the corresponding cell activity over an entire bone is not adequate. If one assumes a constant bone density distribution through a medium, then this relationship is somewhat direct, as the bone density variation can also be assumed constant throughout. However, the current work focuses on a rat tibia. Hence, there is an initial bone density distribution through the medium that varies from near zero in the center part to near 100% in the outer cortical region. Assuming an exclusively energy-based approach would define a maximum cell activity in the cortical region and a minimum cell activity in the trabecular region, which is incorrect, as most cell activity is in the center part of the bone (bone marrow) where all cells and biology are located. The energy-based model does not account for these cells' locations, as it is based only on a mechanical energy density that is bone-density-dependent. We observe that the bone density variation occurs mainly around the interface between the cortical and trabecular bone. If we assume that a minimum bone stiffness is required to develop the mechanical energy and build new bone, this means that although the cell activity is maximal at the central part of the bone, its bone construction effect remains limited (as bone density in the center part is small). It will increase where stiffness increases to reach a minimum level for the mechanical energy to lead the cell activation process. It is, therefore, necessary to introduce an extension of the initially proposed theoretical model to account for this effect.

From the previous argument, we may assume an optimum stiffness to cell activity ratio at the cortical-trabecular interface, and since it is not possible to modify the developed mechanical energy, as it is based on the material continuum mechanics, we may assume that this effect originates from the cell activities themselves. This argument is based on the idea that a variable intensity in cell activity exists as a function of bone region (due to a variation of bone stiffness or bone density). In our case, this variation is dependent on three zones as a function of the bone radius:

- In the trabecular bone (center part), cells are located in the bone marrow and are ready to be biologically activated. However, they are not very active, as they are far away from the cortical-trabecular interface and the mechanical support of the bone.
- Around the cortical-trabecular interface (on each side) is where the cell activity is at its maximum for the bone remodeling to occur.
- In the cortical bone, mainly osteocytes are present to sense the mechanical load, without osteoblasts and with a minority of osteoclasts; hence almost no bone remodeling occurs.

We will assume, on a first approximation, that cell activity is dependent on the cell density only with a predefined scenario that is dependent on bone density. To represent this through the cortical-trabecular interface, we hypothesized that the intensity of the cell activity could be defined with a non-linear evolution as:

$$(\alpha - \rho_{bone})^n \cdot Cell\_activity \quad (2)$$

where  $(\alpha - \rho_{bone})^n$  transcripts the intensity variation in cell activity on each side of the cortical-trabecular interface as a function of the bone radius. Here, on the contrary to a cell activity that is directly dependent on the bone density, we obtain an opposite scenario where the cell activity is inversely proportional to the bone density through the cortical-trabecular interface. This is opposite to what is seen with the classical ener-

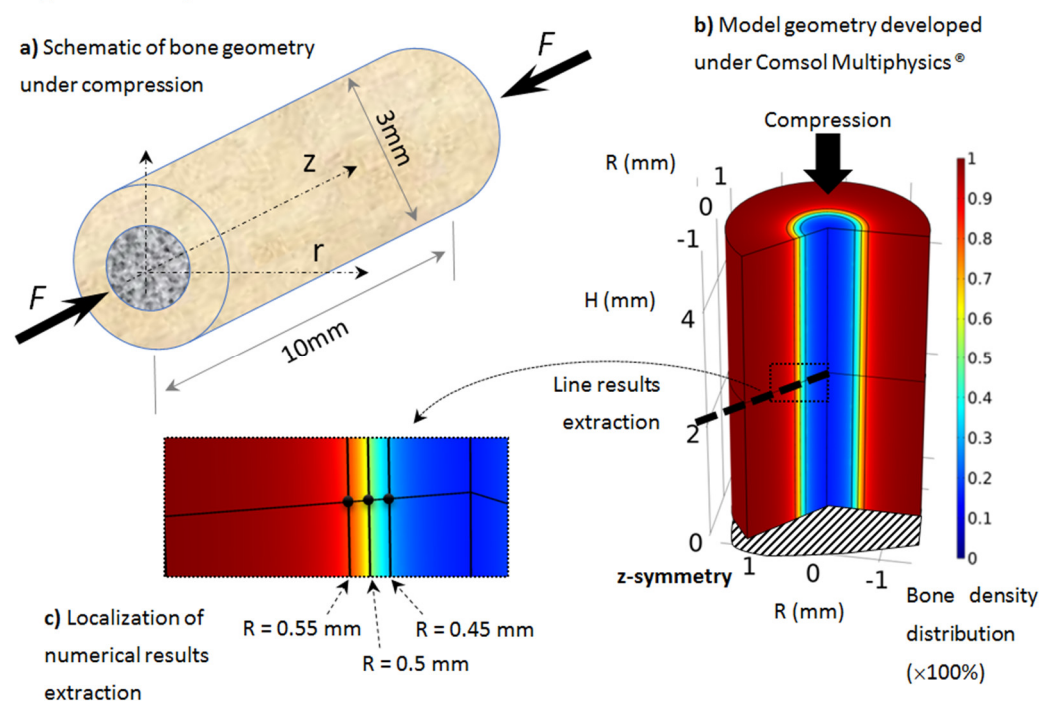
gy-based model, but cells are located in the trabecular region and not in the cortical one. Hence, the maximum cell activity cannot be located where the maximum bone density is. The value  $\alpha$  is close to 1. The maximum value of this function is observed on the trabecular side (with  $\alpha$  close to 1 and  $\rho_{bone}$  close to zero). Oppositely, when  $\rho_{bone}$  is close to 1 (cortical region), the cell activity is close to zero. The maximum cell activity (due to the combined effects of Equation 2 and bone density distribution) occurs in the region around the cortical-trabecular interface.

In addition, as cell biology differs between the intermittent and the moderate continuous running scenarios (with respects to the bone formation vs. bone degradation kinetics with two different mechanical energy levels), it may also be assumed that this cell activation curve (Equation 2) through the interface is different between both scenarios. This was accounted for using the power  $n$  coefficient in Equation 2. Different  $n$ -values were identified for different energy levels, showing a strong influence of this parameter, which was validated experimentally (see the Results Section).

The proposed model can be used for a standard load scenario, together with increased loads being either biologically “healthy” or over-load cases. It could be extended further to under-load conditions, such as hypogravity, but accounting for different cell activity conditions. This will be achieved at a later stage.

### 3.2. Application

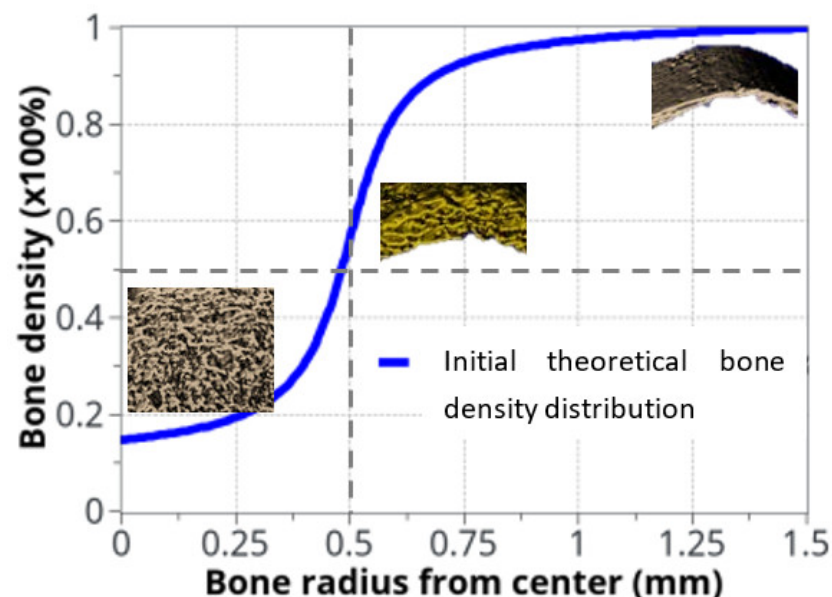
As presented in Section 2, the proposed model was applied on rat tibiae (assumed similar for all rats but with different material parameters and load conditions). Although most long bones sustain a complex load scenario (tension, compression, and bending), as rat tibia is mainly vertical, we assume that most of the mechanical load is applied in the compression length of the bone, due to the body weight. The geometry was idealized from real bone with similar dimensions and assumed to be cylindrical and under simple compression (Figure 2).



**Figure 2.** Developed axisymmetric model of bone, assumed to be cylindrical and under simple compression: (a) schematic of the model, (b) geometry, boundary conditions, and initial bone density distribution (going from cortical bone in red to trabecular bone in blue), (c) localization of numerical results extraction along a mid-height radius line and three points through the cortical-trabecular interface with same color bone density distribution.

The geometry was 10 mm long, with a 3 mm external diameter and a 1 mm cortical bone thickness (Figure 2a). We focused on the tibia diaphysis, where the cortical bone density and thickness were observed to vary in each scanned experimental sample as a function of the exercise intensity. The geometry was modeled using the Comsol Multiphysics® software with a half-length 2D axisymmetric model (Figure 2b). The boundary conditions of the model (mechanical load and material parameters) were changed on the same model geometry and bone density evolution was then extracted.

The variation in bone density was observed experimentally, mainly at the cortical-trabecular interface, slowly varying in time. Due to the sharp variation in bone density through this interface, an arbitrary nonlinear distribution, in the form of arctan function, was chosen in the continuous model for the bone density distribution as a function of radius (Figure 3). The form of the arctan function was chosen to be close to the experimentally observed bone density distribution. Other physical mechanical parameters were defined by the Young's modulus of cortical bone:  $E_0 = 20.3$  GPa and Poisson ratio  $\nu = 0.3$  [53]. The applied mechanical load was provided by the rats' body weight (350 g on average) and bone density was assumed with an idealized distribution (Figure 3) through the cortical-trabecular interface. It was also assumed to be a closed system with no external input.



**Figure 3.** Idealized bone density distribution as a function of radius within the bone. The  $\mu$ CT measurements extracted from rats are also displayed. To keep continuity and transition between cortical and trabecular bone, the bone density variation as a function of radius was approximated with:  $\rho_{bone}(R) = \left( \left( \text{atan}(12000 * (R - 0.0005)) \right) / 3.4 \right) + 0.56$ .

When the elastic mechanical energy developed within the structure varies (as a function of the exercise intensity in the different running scenarios), bone density also changes (as a result of bone remodeling), mainly at the cortical-trabecular interface, due to the presence of osteoblast and osteoclast cells at this site. In the cortical region, osteocytes sense the applied mechanical load and transfer the mechano-sensing signal to the cortical-trabecular interface, where active cells are present. The numerical results will, therefore, be mainly extracted from this interface region (Figure 2c) at three different radii:  $R = 0.45$  mm (trabecular zone),  $R = 0.5$  mm (defined by the inflection point of the arctan function, or the mid-density of bone between the cortical and trabecular zones), and  $R = 0.55$  mm (cortical region).

### 3.3. Parameter Identification

For the theoretical numerical model to run, it was necessary to identify two sets of parameters from experimental data: the different energy levels at which the cell activities change and the cell activities themselves (Equation 1). The energy levels can be identified easily from the physics (rat body weight, femur geometry, etc.). They were identified in the following order:

- $W_0$ : Homeostasis, where no bone density variation occurs within the sedentary control group. It was evaluated directly from the rat body weight and bone geometry at the beginning of the experiments using the standard mechanics of elasticity.
- $W_1$ : Energy for the maximum mineral bone density increase, assumed to correspond to the bone density increase after 8 weeks of exercise in the intermittent running group. It was evaluated from the experimental data. This energy was extrapolated from the maximum cortical bone thickness observed experimentally in the intermittent running scenario.
- $W_3$ : The energy level corresponding to the maximum resorption rate (depending on cell availability), whatever the extra-increase in the mechanical energy. It was assumed to be the maximum degradation rate observed in the continuous running group after 8 weeks of running with the minimum cortical bone thickness.
- $W_2$ : The threshold energy level at which bone density will start to decrease if the energy level increases. It corresponds to the linear interpolation between  $W_1$  and  $W_3$ , where osteoblast and osteoclast activity are considered to be equal.

Once the energy levels were identified, the cell activities needed to be identified using the experimental data. We started by considering the weight of the cortical bone [54], assuming an average value of  $1 \text{ g.cm}^{-3}$ . As it was easy to extract experimentally the average volume of bone being formed or degraded in the two running scenarios. It was, therefore, easy to extract their corresponding weights. Hence, as the cell activity unit is defined in  $\text{mg.mJ}^{-1}.\text{mm}^{-3}.\text{d}^{-1}$  for  $k_i$  and  $\text{mg.mm}^{-3}.\text{d}^{-1}$  for  $A_i$ , it is therefore straightforward to define what will be the corresponding cell activities for each energy level and time in the model from the mechanical energy (mJ) and exercise duration (56 days).

The results obtained for the different energy levels and model parameters are presented in the Results Section.

## 4. Results and Discussion

The body's mechanical equilibrium depends on bone strength through bone mineral density and cortical bone thickness. The practice of a regular physical exercise is, therefore, healthy for the cardiovascular system as well as bone structure and stiffness reinforcement. However, overtraining may alter health conditions, as previously described [55–58]. The experimental results obtained in the current work confirm this observation. The averaged data obtained from the different running scenarios in rats provided evidence that cortical bone thickness decreases in the moderate continuous running group (bone resorption), while it increases in the intermittent running group (bone formation) (Table 1).



**Table 1.** Experimental results obtained from the rat tests regarding the variations of the cortical tibial bone thickness measured in the first proximal half of the diaphysis, for the three groups.

	Sedentary Control	Continuous Running	Intermittent Running
Cortical tibial thickness ( $\mu\text{m}$ )	957 ( $\pm 110$ ) Normalized = 1	708 ( $\pm 65$ ) Normalized = 0.74	1024 ( $\pm 112$ ) Normalized = 1.07
Loading type	Constant load (body weight)	1 week for 25 min/day, 8 weeks for 45 min/day, Oxygen = 70% MAS	1 week for 25 min/day continuous, 8 weeks intermittent for 42 min/day, Oxygen = 50%, 100% MAS, and rest

We observed an opposite relationship between the intensity of the developed averaged mechanical energy and the cortical bone thickness. However, the measure of the mineral bone density (Table 2) from the concentration of hydroxyapatite did not exactly follow this trend. Both the continuous and intermittent running groups showed a decrease in the hydroxyapatite concentration over time. The bone mineral density (BMD) in the two running groups decreased compared to the respective results in the sedentary group. Hence, no tendency conclusion can be drawn between the two exercise groups, since the BMD results are within the standard deviation.

**Table 2.** Experimental measure of the bone mineral density per the concentration of hydroxyapatite in the bone structure for the different experimental conditions (at the tibial proximal diaphysis).

	Sedentary Control	Continuous Running	Intermittent Running
BMD (g HA/cm <sup>3</sup> )	113.11 ( $\pm 4.12$ )	109.16 ( $\pm 4.31$ ) *	106.13 ( $\pm 4.22$ ) *

\*  $p < 0,01$  vs. Sedentary control; BMD: Bone mineral density; HA: hydroxyapatite.

A possible interpretation is that hydroxyapatite formation, a main determinant for bone strength, occurs at a different step of bone formation than bone density variation [12]. Both are linked but not at the same time. Hence, we may assume that a first step in bone remodeling could be a variation in the porosity within the bone structure, corresponding to a variation in bone density. Once this process is achieved, hydroxyapatite formation may develop to reinforce bone stiffness and bone mineral density. For the sake of simplicity, all the following data and particularly the numerical data will be interpreted as bone density changes as a function of porosity rather than hydroxyapatite concentration.

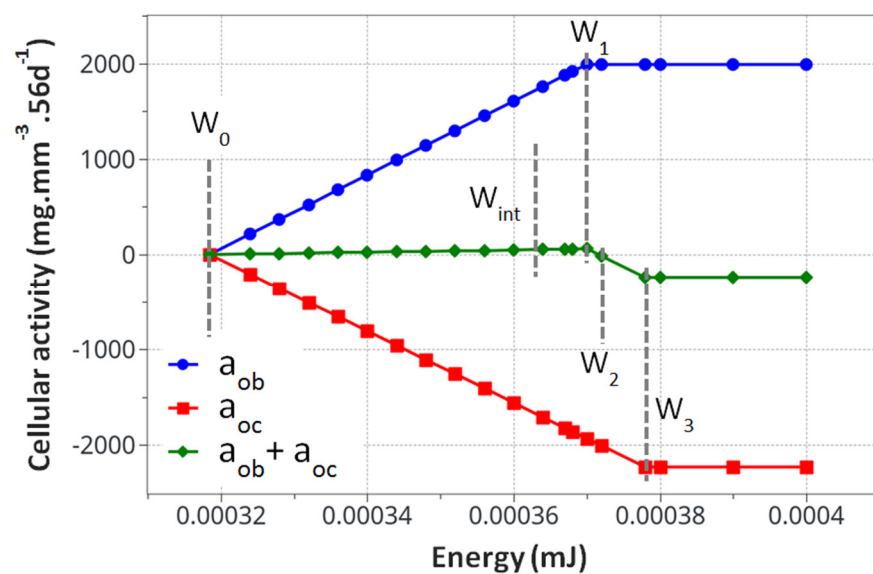
#### 4.1. Numerical Model Parameter Identification

The two sets of parameters (Section 3.3) were identified (Table 3) from the experimental data (Table 1). It was assumed that the variation in cortical bone thickness (change in porosity) provided, over longer periods of time, the corresponding variation in bone density (change in stiffness) per unit volume. Hence, for a given body weight (load case) and bone geometry, it is possible to directly calculate the elastic mechanical energy developed within the bone and the model parameters.

**Table 3.** Parameters for the proposed theoretical model. Energies were determined from only the experimental data (rat weight, size of bone, test conditions, etc.). The  $k_i$  and  $A_i$  parameters were calculated from the experimental data after the completion of the running tests.

Parameters Determined from Experimental Data ( $\times 10^{-4}$ mJ)				Parameters Calculated ( $k_i = \text{mg}\cdot\text{mJ}^{-1}\cdot\text{mm}^{-3}\cdot 56\text{d}^{-1}$ ; $A_i = \text{mg}\cdot\text{mm}^{-3}\cdot 56\text{d}^{-1}$ )			
$W_0$	$W_1$	$W_2$	$W_3$	$k_1$	$k_2$	$A_1$	$A_2$
3.1847	3.7	3.72	3.78	$386.64 \times 10^5$	$-375 \times 10^5$	1992.36	-2232.38

The model kinematics (based on the Table 1 parameters) are summarized in Figure 4 with the knowledge that they correspond to the specific experimental case studied here without accounting for the initial osteoclast/osteoblast activation threshold.



**Figure 4.** Calculated cell activity driving the bone density change. The evaluated parameters for the proposed mode  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $A_1$ , and  $A_2$ , are presented in Table 3.

From the cell activity curve (Figure 4) obtained from the identified model parameters, two observations can be made. First, the individual cell activity intensities (osteoblasts and osteoclasts) are large compared to their combined intensity driving the bone remodeling. However, since they are close to each other in terms of maximum intensity, their combined effects remain reasonably small. This can lead to several conclusions. Even with a potentially high cell activity, the bone remodeling phenomenon remains small, both in intensity and duration. For the bone density variation to become visible, either through exercise or medical effects, a long period of time will be necessary. Yet, as a subtle equilibrium is necessary for healthy bone functioning, any biological disequilibrium (variation in the two intensities between osteoblasts and osteoclasts) will lead to a quick disequilibrium in the bone remodeling kinetics. Hence, the variation of these parameters, either from ageing, diseases, or sport activity, may have a strong impact on the bone density.

The second observation is related to the form of the curve in Figure 4. It was assumed that the cell activities linearly depended on the mechanical energy (as classically assumed in the literature). This was, however, never validated experimentally, as the quantification of the intensity of bone cell activity as a function of mechanical load within an in vivo environment remains challenging. Hence, the linear dependency, even by validating the experimental observations (Figure 4), could be non-linear. This would, in

essence, change the kinematics of bone remodeling as a function of time and should be investigated at a later stage.

4.2. Theoretical Model Results

For an optimum convergence of the numerical model, the parameters  $\alpha$  and  $n$  required fine tuning for each of the different analysis cases. Table 4 shows the obtained results for the two energies,  $W_1$  and  $W_3$ , of the intermittent and continuous running groups.

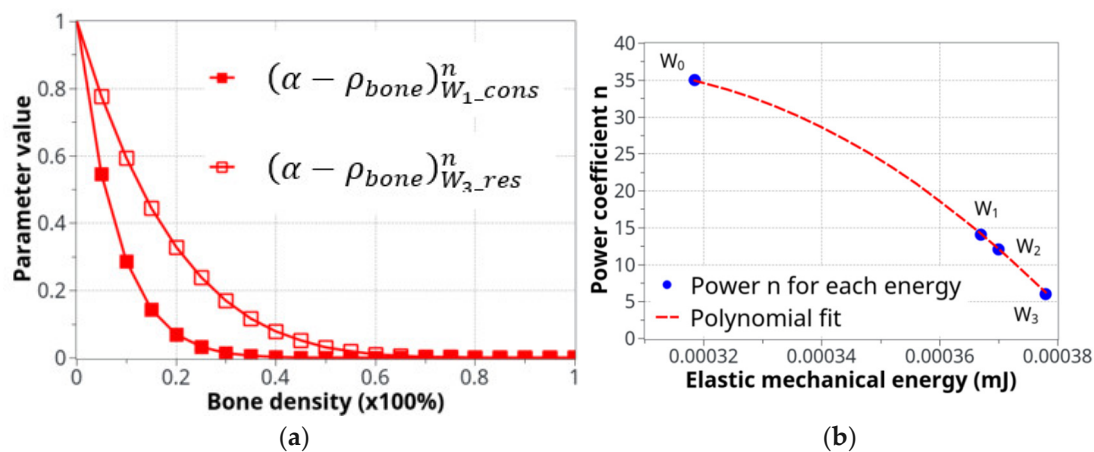
**Table 4.** Tuned  $\alpha$  and  $n$  parameters of the relation  $(\alpha - \rho_{bone})^n$  for the optimum reconstruction / degradation rate of bone density, as compared to the experimental results.

Osteoblast Acti- vity Coefficient at $W_1$	Osteoclast Acti- vity Coefficient at $W_1$	Osteoblast Acti- vity Coefficient at $W_3$	Osteoclast Acti- vity Coefficient at $W_3$	Cellular Ac- tivity Power at $W_1$	Cellular Ac- tivity Power at $W_3$
$\alpha = 1.0009$	$\alpha = 1.0$	$\alpha = 1.0007$	$\alpha = 1.0$	$n = 13.6$	$n = 5$

In the proposed relation  $(\alpha - \rho_{bone})^n$ , the theoretical estimate of the  $\alpha$  value should always be 1, since when bone density decreases towards 0, the cell activity is maximal (on the trabecular side of the interface); while when bone density is close to 1 (on the cortical side of the interface), minimal cell activity occurs. However, a numerical analysis showed that choosing 1 for all  $\alpha$  did not lead to adequate results, or at least it did not provide results that correlated with the experiments. Hence, fine tuning of the different parameters was performed. This fine tuning needs to be investigated in future works. Since there is a strong sensibility of  $\alpha$ , not only in its role in the cell activity intensity, but also in the long-term effect of the bone density evolution, a subtle variation in  $\alpha$  can strongly affect the tendency to observe bone formation or bone resorption as a function of time at a given point of the bone structure. Hence, a careful adjustment is required in order to adequately fit with the experimental results. This is also due to the simplifying assumption of the continuous model.

The power coefficient,  $n$ , also plays an important role in the capacity of the bone to form or resorb. For example, using a high coefficient,  $n$ , for bone resorption ( $W_4$ ) leads to incorrect results. Hence, the curvilinear form of the cell activity as a function of bone density is highly important for bone remodeling kinetics. In other words, the intensity of the cell activity not only depends on the cell density at a given place and time but also on the mechanical environment (either through mechanical load or their structural base-ment) for the biological response. This is a well-known fact for cell activity response in the literature [59,60].

The two curves in Figure 5a show the evolution of Equation 2 as a function of bone density (high for low density and low for high density) and the specific difference in cell activity between the two energy levels of  $W_1$  and  $W_3$ . In Figure 5b, the polynomial interpolation between the  $n$  parameters is presented for different levels of the developed elastic mechanical energy. Both Figure 5a and Figure 5b present a simplified cell response as a function of bone density and mechanical energy. Of course, the real biological behavior is expected to be more complex, but this simplified approach provides adequate results compared to the experimental results and seems to be in agreement with the known cell behaviors involved in bone remodeling.



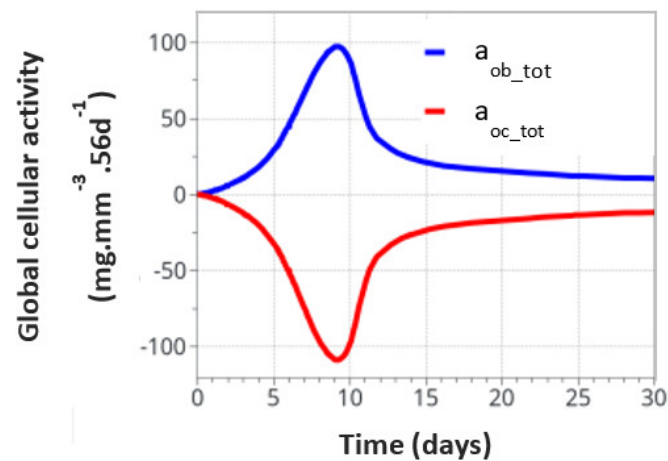
**Figure 5.** Parameters used for the definition of the cell activity intensity: (a) the coefficient of cell intensity as a function of the bone density for the construction and resorption phases at the two levels of energy,  $W_1$  and  $W_3$ , and (b) the power  $n$  coefficient of  $(\alpha - \rho_{bone})^n$  that defines the construction-resorption rates in the different running scenarios.

#### 4.3. Bone Density Prediction

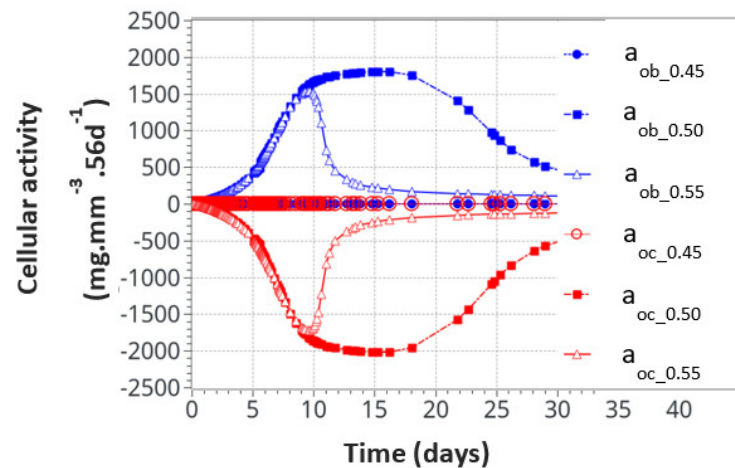
All parameters evaluated and integrated within the proposed mechano-regulatory model analyses were run for the different load cases (homeostasis, intermittent, and continuous running groups). In order to avoid overload of the Results Section, only the results for the two running scenarios (intermittent first and moderate continuous next) are presented here, for both the cell activity and bone density variations. Although the entire experimental time was 8 weeks, most of the bone remodeling (the biggest variation) occurred within the first 30 days, due to the model parameter identification (see lower down the interpretation of the cell activation delay). Only slow evolution, albeit non-zero, was observed for the rest. Hence, all results presented below will focus on the first 30 days of evolution.

##### 4.3.1. Intermittent Running Scenario

For the intermittent running scenario, both osteoblast and osteoclast activities increased at the same time, as a function of the applied mechanical load with a peak of activity around 10 days (Figure 6). Then, this activity slowly decreased towards equilibrium, as bone density had evolved to sustain the applied mechanical load. The global osteoclast activity seemed more important (around  $-110 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}\cdot 56\text{d}^{-1}$ ) than the osteoblast formation (around  $+100 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}\cdot 56\text{d}^{-1}$ ). The mistake to avoid here is to link this directly to the average bone density resorption. It only means that the maximum cell activity, which depends on both the geometrical location (hence the intensity of cell activity, as defined in Figure 5a) and the bone density, does not necessarily occur at the place where the bone density variation is at its kinetic maximum. Therefore, the average bone density variation may have different kinetics than the average cell activity. In Figure 7, we show the same running scenario and cell activities but at the three geometrical points located around the cortical-trabecular interface, as defined in Figure 2c. For the radius 0.45 mm, located in the trabecular zone, near-zero cell activity was found. However, maximum cell activity was observed at the mid-radius of 0.5 mm and decreased towards the cortical zone at 0.55 mm.



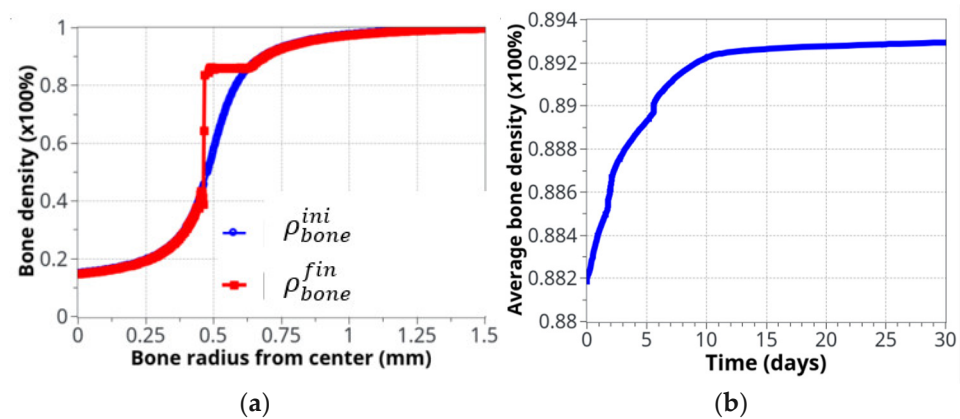
**Figure 6.** Global osteoblast and osteoclast activities over the entire model for the intermittent running scenario.



**Figure 7.** Osteoblast and osteoclast activities at the three locations through the cortical-trabecular interface. Measurements of the radii were 0.45mm, 0.50mm, and 0.55mm.

We also found that the cell activity time was much longer for the radius of 0.5 mm than for the radius of 0.55 mm. Thus, not only was the intensity of the cell activity higher at the mid-point location but also its time duration. With the highest cell activity located at the mid-point of the cortical-trabecular interface, it is then anticipated that bone density will evolve mostly around it.

Figure 8 shows the bone density evolution as a function of the bone radius (Figure 8a) and as a function of time (Figure 8b). As described above, the main evolution was located around the cortical-trabecular interface, as expected. Further away from this interface, the bone density was almost unchanged. This was due to the two following effects: (i) on the trabecular side, although cells are present and potentially active, the bone density is too weak (from the elastic mechanical energy point of view) to initiate this remodeling and (ii) on the other cortical side, although a high bone density may generate a high mechanical energy, the bone cells are almost inactive, due to their weak density. Hence, the highest combination is only located in the central part, where both effects are combined. The main difficulty here lies in the fact that bone cells are very sensitive to the mechanical load and bone density must be exactly located within the range that will activate the biological reaction (“activation zone”), otherwise bone remodeling does not initiate. A thin equilibrium is required to contribute to the bone formation.

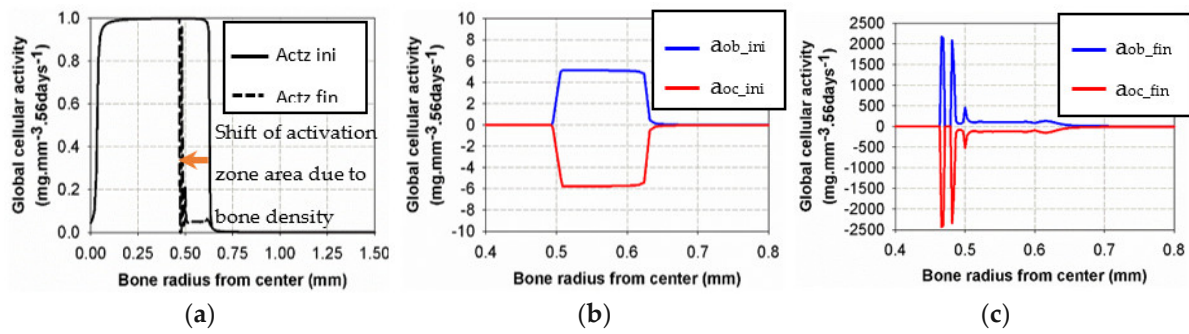


**Figure 8.** Bone density evolution: (a) initial (blue) and final (red), after 8 weeks running, distributions, as a function of radius; (b) The global evolution of bone density over the entire volume as a function of time.

If it is assumed that the initial cortical-trabecular interface is located at the inflexion point of the curve (radius = 0.5mm), the final state after bone remodeling places this interface around a radius of 0.45 mm. This can be achieved due to the identified model parameters (adjusted for this experimental case), the form of the cell activation curve (Figure 5), and the fact that the bone density far away from this interface leads to no variation (see above).

We can see the averaged (over the entire volume) bone density evolution as a function of time (Figure 8b). As expected from the cell activity (Figures 6 and 7), the main variation occurred in the first 10 days, then, a slow evolution was observed. This 10 day period was too short compared to real experimental bone remodeling. This point is discussed further down as a function of cell activation time. Overall, the increase in bone density was about 1.5% compared to a theoretically calculated net change of 1.27%. The corresponding net weight change for a total volume of bone diaphysis of 125.6 mm<sup>3</sup> is around 3 g.

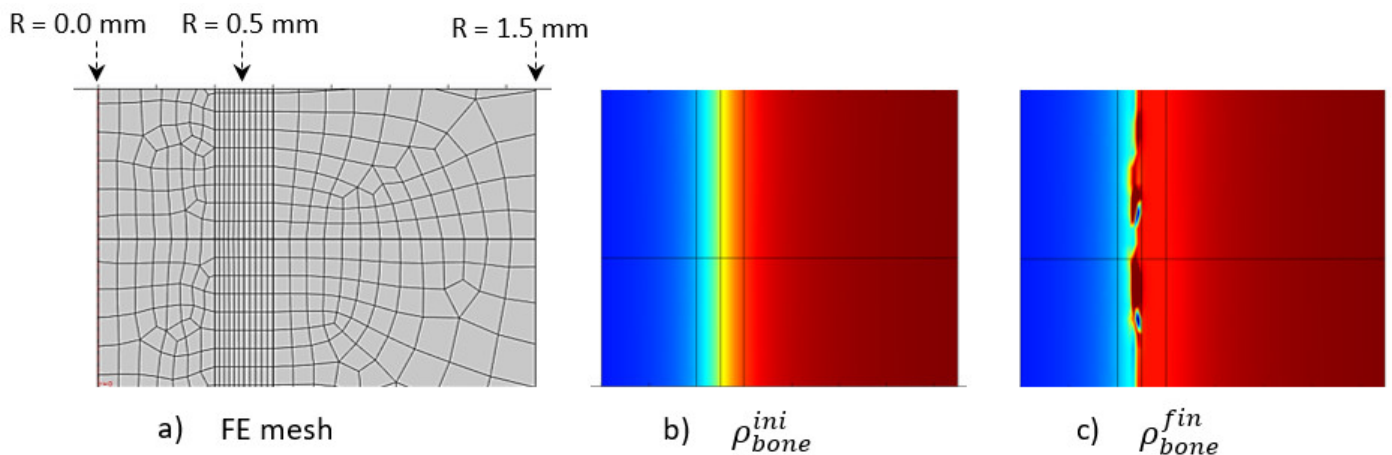
Figure 9 shows the initial and final states of cell activities inside the bone, as a function of radius, together with the activation zone that corresponds to the area under which the cells can be active. At the beginning of the analysis, the “activation zone” (Figure 9a) covered the entire range of the trabecular and interface areas, down to zero in the cortical region (due to the assumed presence of only osteocytes in cortical bone). The initial osteoblast and osteoclast activities (Figure 9b) were of low intensity, centered over the cortical-trabecular interface. At the end of the analysis (Figure 9c), after bone reconstruction, intense osteoblast activity had shifted towards the trabecular zone, together with the “activation zone”, providing higher bone reconstruction on the trabecular side (low bone density) than on the cortical side (high bone density). We have particularly observed that the cell activities and bone reconstruction appear as localized events, meaning that they occurred within small zones (peaks), not continuously distributed over the entire bone structure. This means that not only the cell activity is localized but that changes in bone density are not necessarily constant throughout the height of the sample (see results below).



**Figure 9.** Evolution of osteoblast and osteoclast activities at the beginning (b) and the end (c) of the analysis for the intermittent running scenario compared to the initial and final “activation zone” (a).

Although the final cell activities in the cortical side of the interface were higher at the end of the analyses than at the beginning, this did not generate more variations in bone density as the “activation zone” had moved towards the trabecular side of the interface with a low intensity in the initial area. This observation has a double meaning: (i) the intensity of the cell activity had a very low impact (Figure 5a) compared to the existing bone density that had increased at this time of analysis and (ii) this leads to a shift of the activation zone towards a lower bone density (trabecular side) where bone remodeling is still active.

The initially applied mechanical load was constant over the entire structure in the main longitudinal axis of the bone (diaphysis, vertical in Figure 10). A homogeneous mesh was defined around the entire cortical-trabecular interface (Figure 10a) to avoid any mesh dependency variations in the results. A convergence to a constant solution was achieved by running a mesh sensitivity analysis.



**Figure 10.** Initial (b) and final (c) (after 56 days running) bone density distributions with a corresponding finite element mesh (a) in the case of the intermittent running scenario.

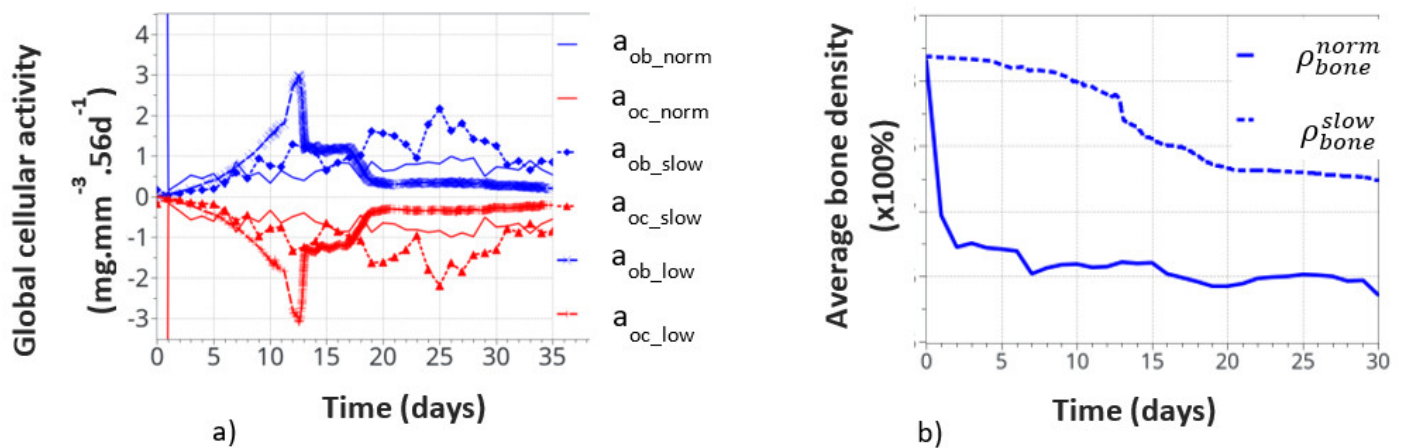
At the end of analysis after 56 days (8 weeks), an increase in global bone density was observed, with an average shift of the cortical-trabecular interface, as well as an increase in cortical bone thickness. This shift, however, was not constant over the entire bone length. Thus, it seems that, although the applied mechanical load was constant, the cell activity effect was not. Since the cell activity is geographically localized (Figure 9) and the cell sensitivity is very high, bone density may not evolve in a constant manner. A discrete local variation in stress impacts directly the bone density variation. Hence, a difference exists in the cortical bone thickness along the diaphysis length. An average variation in

cortical bone thickness could be observed and showed good agreement with the experimental results (see below).

Another effect can be observed in the numerical results. Although the cortical bone thickness increased, it did not seem to grow over a maximum value (Figure 10c). There are several reasons for this. The first is the assumptions made for the proposed theoretical numerical model. For the bone remodeling to occur, it is needed for the cell activity to be in the range of activation energy, as defined in Figure 5a, and also for the adequate bone density in this area for the “activation zone” to be active at this particular point. Secondly, the maximum thickness limit is not only related to the modeling assumptions, as it is also correlated with the bone biology. Osteoprogenitor cells, which are present in the bone marrow, should be activated to differentiate in the osteoblast/osteocyte lineage and grow, but the cortical bone thickness (that is biologically made to support a given mechanical load scenario, based on earth’s gravity) cannot grow to a full cortical bone. Healthy biology prevents such a scenario to occur. Hence, although we developed a simplified model with coarse hypotheses, it appears to fulfill the basic biological requirements that need to be evaluated at a later stage.

#### 4.3.2. Continuous Running Scenario

Contrary to the intermittent running, where the cortical bone formed, continuous running degraded the cortical bone, due to the overload physiological context. Nevertheless, similar relationships develop within the structure between the applied mechanical forces and cellular activity, although opposite to what was observed in the intermittent running scenario. In addition, similar to the intermittent running scenario, cells are active only locally (from point to point of the structure, even with the continuous model scenario) and not in a homogeneous way. This effect is even more significant in the continuous running scenario. Hence, it is not possible to present a continuous cell activation curve through the thickness (as a function of radius) of the bone. We will then concentrate on the macroscopic results first. They are presented in Figure 11.



**Figure 11.** Global cell activity (a) and the corresponding bone density variation (b) for the continuous running scenario at different cell activity scenarios. The osteoblast ( $a_{ob\_norm}$ ) and osteoclast ( $a_{oc\_norm}$ ) activities correspond to the one defined in the above initial theoretical model.

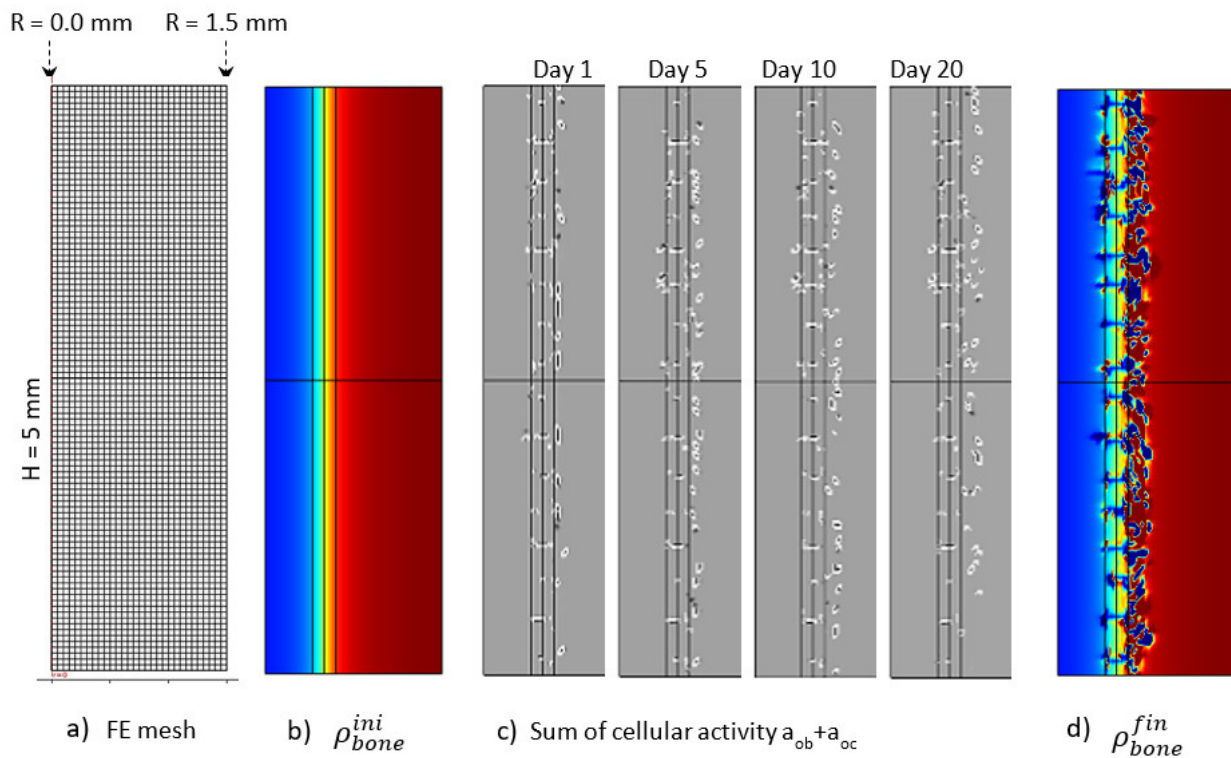
Figure 11a shows the variation of bone cell activity as a function of time, and Figure 11b shows the corresponding bone densities. We call the “normal” condition (norm), for which the model parameters were initially identified above. The bone cellular activity ( $a_{x\_norm}$ ) responded instantaneously to the applied mechanical load. It increased quickly, as a function of time, up to about 10 to 15 days and then decreased slowly after bone remodeling occurred. For the continuous running scenario, this lead to a very quick bone density variation in a few days (see  $\rho_{bone}^{norm}$  on Figure 11b).



This, of course, is not a realistic behavior, as bone density cannot change that quickly over such a short period of time. It is, therefore, concluded that immediate cell activation is probably not the best answer to represent bone remodeling. Hence, we assumed a time delay for the cell activity to develop due to the biological response to mechanical solicitations. This argument is supported by the fact that experimentally observed bone remodeling takes more time to be macroscopically visible. We delayed the bone cell response by adding a delay coefficient for this specific activity. To test this hypothesis, we defined two delay coefficients: (i) based on a time delay response, set to  $1e-5$  ("slow" variation), and (ii) based on a cell intensity response delay and time, set to  $1e-8$  ("low" variation). With these two coefficients, the corresponding cellular responses are showed all together in Figure 11a. The cellular responses were defined with the osteoblasts  $a_{ob\_slow}$  and  $a_{ob\_low}$ , and osteoclasts with  $a_{oc\_slow}$  and  $a_{oc\_low}$ . The time response and intensity of the cell activity were delayed in time, the and sensitivity of the biological response (peaks in the curves) also seemed lower. We also note that the time delay not only slows down the cellular response but it also slightly changes the evolution of the curve as a function of time. This is due to the fact that bone remodeling occurs locally as a function of the mechanical strain energy field, which is inhomogeneous within the structure. Hence, it impacts the cell activity scenario, although in a small amount, but it is still visible, which inevitably impacts the bone remodeling scenario over long periods of time.

The corresponding bone densities for the normal and slow cell activations are also presented in Figure 11b. Slower bone density kinetics were observed when bone cell activation was delayed, which seems to correspond better to real bone evolution. Bone density decreased by about 1% over 30 days, compared to over 1.5% for 7 days without a delay coefficient. These results support the idea of a time delay for the bone cell response. However, the final bone density distribution was similar for each of the normal, slow, and low resorption rates. Of course, this model is a simplified view of the real bone mechanobiology, and more work is required to argue on this effect. Nevertheless, the observed bone density kinematics seem similar when compared to the experiments. Assuming a time delay response of the cell activity also means that it is partially active for the intermittent running scenario but without knowing exactly its intensity. Hence, the resulting interpretation in the intermittent scenario remains partial for the time being.

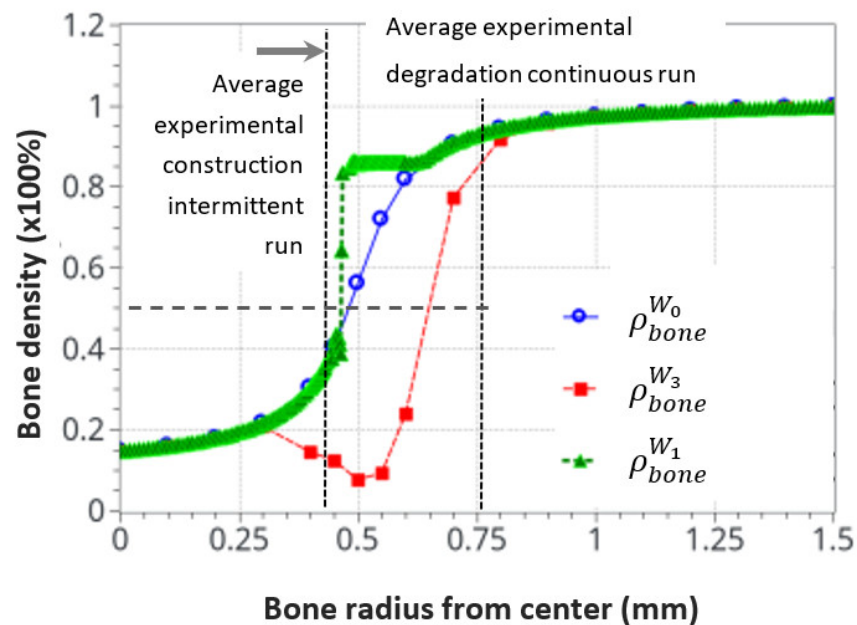
The Figure 12 presents the macroscopic bone density distribution and cell activity, together with a finite element mesh. Since the cell activity was highly heterogeneous, a homogeneous mesh was defined through the entire geometry. Similarly, a mesh sensitivity analysis was carried out and the mesh size was decreased to a minimum level for which the bone resorption heterogeneity was not impacted by it. This led to a mesh element size around  $100\ \mu\text{m}$ . Osteoblast and osteoclast activity was highly heterogeneous, depending on the local mechanical stress at a specific point and time. This heterogeneity varied as a function of time (Figure 12c). The overall depth at which cell activity was observed increased towards the cortical side as a function of time. This was the main driving parameter of the bone resorption mechanism leading to the bone density distribution presented in Figure 12d. Of course, since it is a simplified continuous model, there is no representation of the bone microstructure evolution as a function of time. However, the bone density was not observed to degrade in a homogeneous manner. It can be argued that the heterogeneity of the bone density evolution is linked to the fact that the bone cell activity is directly related to the elastic strain energy at each point of the mesh and that a possible future development of the model would be to use some kind of averaging for the energy instead, as in [61,62], since the cells behave more like a network than a single entity. However, from the mesh sensitivity analysis, it occurred that even by decreasing the mesh size (smaller elements assuming a closer cell network), the size of the bone density resorption did not decrease anymore. Hence, this effect seems not to be at the origin (or it at least has a minimum effect) of the heterogeneous degradation.



**Figure 12.** Initial (b) and final (d) (after 56 days running) bone density distributions, (c) cell activity  $a_{ob} + a_{oc}$  at 1, 5, 10, and 20 days of running, with the corresponding finite element mesh (a) in the case of the continuous running scenario.

Overall, over the entire length of the sample, bone resorption and a decrease in the cortical bone thickness were observed, according to experimental data. In addition, and similar to the intermittent running scenario, a ‘maximum’ resorption was observed, indicating that the assumed simplified model hypotheses seem to be validated by the result. A good overall correlation was observed between the numerical and experimental results. More work is, however, required to assess the influence of the different parameters.

Finally, Figure 13 shows the average bone density distribution as a function of the bone radius at the end (56 days) of the intermittent and continuous running scenarios compared to the initial distribution. The green average construction front located around the radius of  $r = 0.45 \text{ mm}$  was compared with the dashed black line of the average experimental construction, located at  $r = 0.43 \text{ mm}$ . Similarly, the red average resorption front located (at a mid-bone density, visualized by the bold dash line) around  $r = 0.65 \text{ mm}$  was compared with the average experimental degradation front located at  $r = 0.76 \text{ mm}$ .



**Figure 13.** Initial and final average bone density distribution as a function of the radius through the bone. A comparison of the numerical predictions with the experimental results for the intermittent and continuous running scenarios. The dotted cross on the degradation curve corresponds to the median value of the considered cortical bone thickness after resorption.

Since the bone remodeling model proposed in this work is based on a continuous approach with simplified assumptions (idealized bone density distribution and simplified mechanobiological relationships), it could be expected that exact accurate comparisons between numerical and experimental results cannot be reached, as the bone microstructure and the influence of local biology were not accounted for. Nevertheless, a good correlation was observed between the numerical predictions and the experimental results. Both the formation and resorption effects were predicted as a function of the intensity of the mechanical energy applied and the cortical bone thickness variation. Even a complementary effect, highlighted by the heterogeneous bone density construction and resorption, was observed in the numerical results and was not initially anticipated in the continuous approach. This is consistent with a high influence of the bone microstructure distribution on the kinetics of bone remodeling rates.

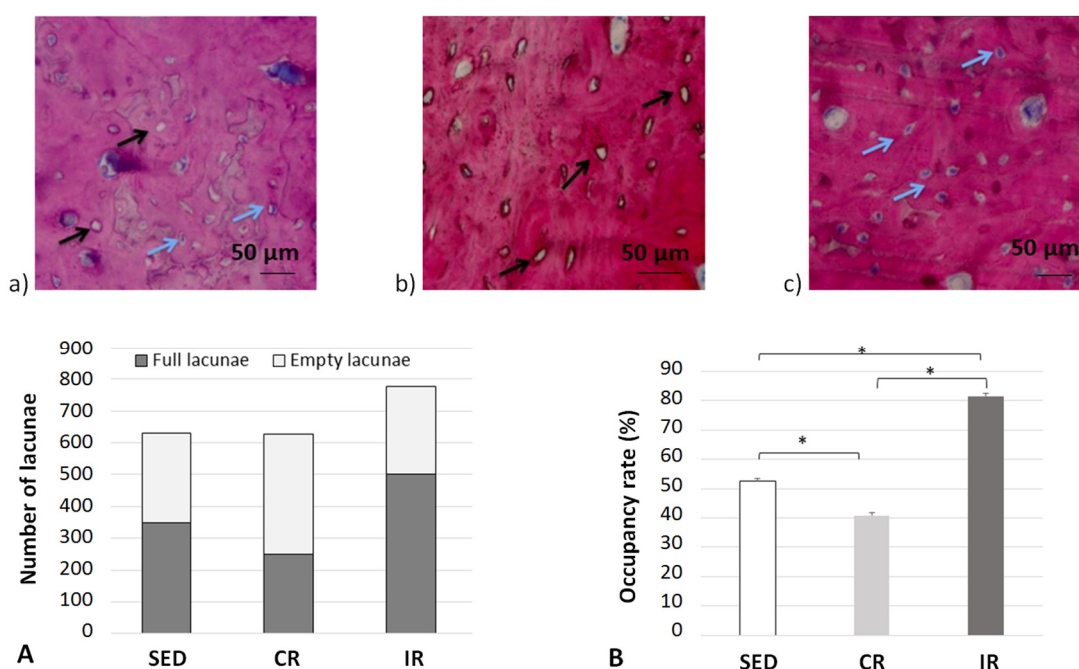
It was also observed that both the new bone formation and resorption ranges were bounded by the modeling assumptions and available physics. These were the “activation zone”, the function of cell activity intensity, together with power coefficient, the bone density available at a given point and time, and the continuity (or discontinuity) of the bone density. In addition, only the bone cell activities, together with the elastic mechanical behavior, were accounted for. The intermittent running scenario showed a lower range of bone density variation (about 0.3–0.85), whereas the continuous running scenario showed a bone density resorption range (from 0.9 to about 0.1). This may be due to the simplified cell activation function defined in Figure 5.

Conclusions that can be drawn are numerous. The main driving parameters of bone remodeling could be obtained with a simplified mechanobiological approach, linking bone cell activity to elastic mechanical behavior. Of course, it does not mean these are the sole parameters, as bone mechanobiology is much more complex. However, the idea of a positive-negative interaction between the osteoblasts and osteoclasts seems validated for the maintenance of a bone remodeling equilibrium under a simplified mechano-regulatory behavior. The range of activity and intensity seems to be correlated with the experimental results. The change of the remodeling rate was highlighted as a function of cell activation time, and the range of bone density (in terms of depth and percentage

between the trabecular and cortical compartments) discussed with the model assumptions. More work is required to fine tune these first predictive results by adding the influence of bone microstructure distribution and adjusting the model parameters and assumptions for better predictions.

#### 4.4. Correlation between Cell Scale Experimental Results and Bone Scale Numerical Results

It is now generally accepted in the literature that bone remodeling is the consequence of both osteoblast and osteoclast activities [51] through the signaling pathways developed between the mechano-sensing orchestrator osteocytes in the cortical bone matrix and transmitted to both the remodeling target cells. Hence, in order to evaluate the possible influence of this mechano-sensibility in our different running scenarios, the occupancy rate of osteocyte lacunae was measured experimentally at the end of the 8 week running scenario (Figure 14).

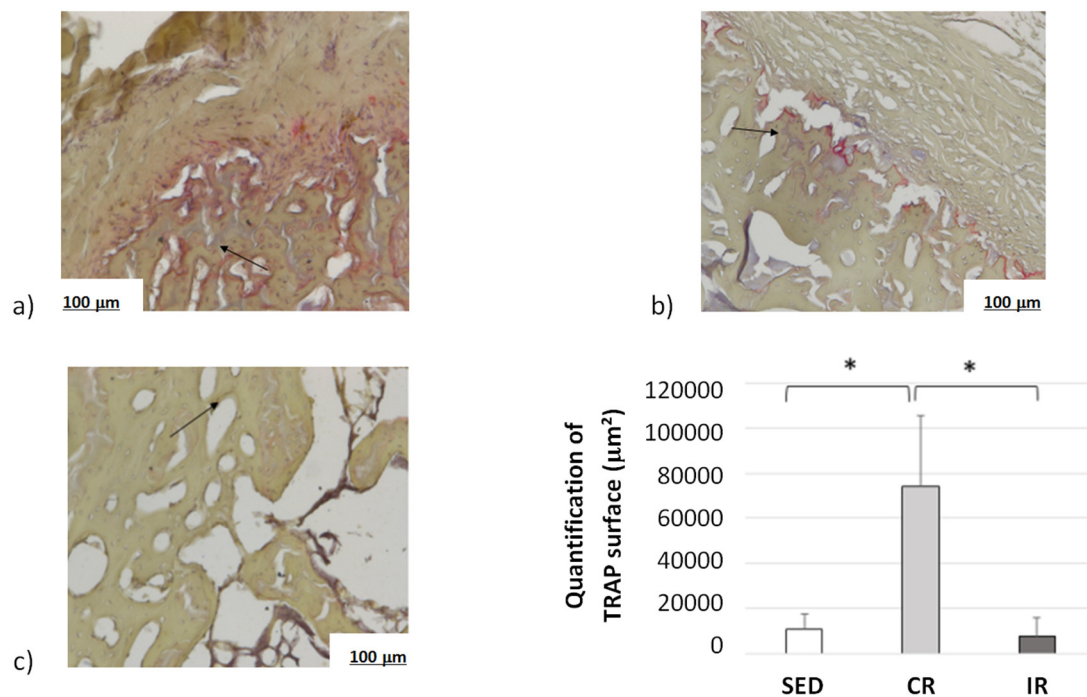


**Figure 14.** Occupation rate of osteocyte lacunae after 8 weeks of running in the cortical part of tibia. Figure 14a–c show examples of cortical bone sections for the three groups with blue arrows for full osteocyte lacunae and black arrows for empty osteocyte lacunae. Figure 14A,B generalize the results over all data sets. Sed: Sedentary control group, CR: continuous running group, IR: intermittent running group. Top panels (a) Sed; (b) CR, (c) IR. The blue arrows show a full lacuna (which contains an osteocyte), the black arrows show an empty lacuna. Bottom panel: (A) summarizes the number of full and empty lacunae in the three groups, and (B) includes the occupancy rate of the lacunae (%). Values are expressed as means of full and empty lacunae for (A) and as means  $\pm$  SD for (B). \*:  $p < 0.05$ .

For the sedentary group, the quantity of empty osteocyte lacunae was significantly higher compared to both the intermittent and continuous running groups. In contrast, the full lacunae number was statistically higher in both running groups ( $p < 0.05$ ). The lacunae occupancy rate significantly increased in the intermittent running group compared to the respective results in the two other groups and was 50% greater than the one observed in the continuous running group ( $p < 0.05$ ). We may assume (see below) that, compared to the sedentary group, “overloading” the structure has led to a degradation by favoring a communication discrepancy between osteocytes and osteoblasts/osteoclasts, due to an increase (that needs to be defined) in osteoclast activity and, thus, bone resorption. On the contrary, the increased number of osteocyte-filled lacunae in the intermittent running

group seem to favor communication with osteoblasts, hence favoring bone formation. One may wonder of the possible link existing between osteocytes and their connection types with current osteoblasts and osteoclasts.

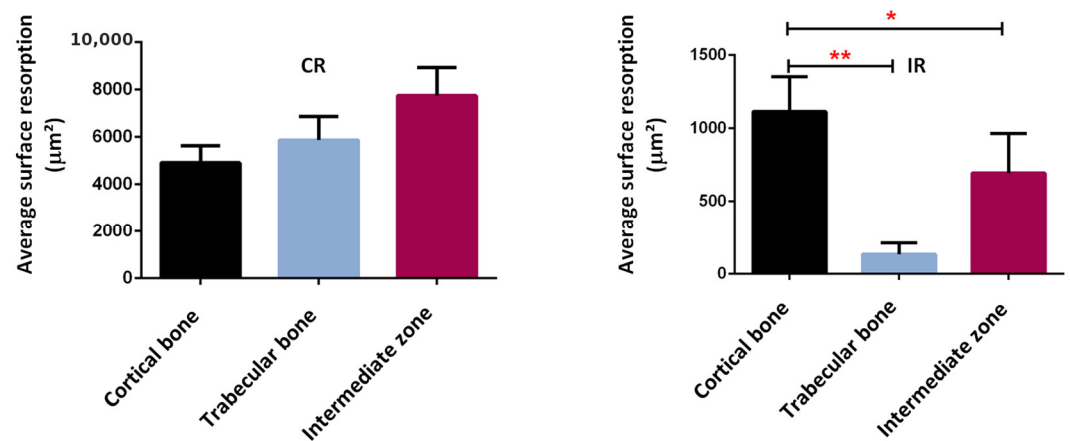
Complementary information was found when measuring the osteoclast activity through TRAP analyses (Figure 15). Examples of surface of bone resorption are presented on Figure 15a–c for the sedentary, continuous, and intermittent running groups, respectively. The black arrows show in red the surface resorption area around empty spaces.



**Figure 15.** Osteoclast activity after 8 weeks of running in the cortical part of tibia. Sed: Sedentary control group, CR: continuous running group, IR: intermittent running group. Top panel (a) Sed; (b) CR, (c) IR. The black arrows show the osteoclast TRAP activity (revealed in red). The results of the total resorption surface are given as means  $\pm$  SD (in  $\mu\text{m}^2$ ). \*:  $p < 0.05$ .

Averaged data over the entire surface of the cutting section for the three groups are presented in Figure 15d. The TRAP surface area (and thus the osteoclastic activity) in the continuous running group was much higher than in the two other groups. In addition, the areas of TRAP activity in the intermittent running group were lower than in the sedentary group. Here, again, the cell experimental results tend to confirm the corresponding activity for which a higher mechanical load intensity favored osteoclast activity, driving bone resorption, and a medium load intensity favored bone formation.

Confirming these results, a bone resorption surface between  $5000 \mu\text{m}^2$  and  $8000 \mu\text{m}^2$  was observed in the continuous running group, while this surface represented between  $200 \mu\text{m}^2$  and  $1200 \mu\text{m}^2$  in the intermittent running group (Figure 16). Although some bone resorption occurred in the intermittent group, it was less pronounced than in the continuous running group and probably not high enough to compensate for the bone formation. In addition, when looking at the distribution of the areas of resorption activity, the maximum resorption in the continuous running group occurred in the intermediate zone (between the cortical and trabecular regions), followed by trabecular bone, and, lastly, the cortical bone. In the intermittent running group, the maximum resorption occurred in the cortical region (still much lower than in the continuous group), followed by intermediate zone, and, finally, the trabecular zone, which was close to zero.



**Figure 16.** Average surface resorption in the different bone regions. \*:  $p < 0.003$ , \*\*:  $p < 0.0001$ .

These results tend to confirm two facts. Firstly, the assumption made for the theoretical model parameters, as presented in Figure 5, and the activation zone, as presented in Figure 9, seem relevant. The cell activity does not directly depend on the intensity of the developed elastic mechanical energy (bone density directed by the strain energy density (SED) function), but rather on a given distribution of cell density, itself depending on bone type and biology at a given place and time and whatever the bone stiffness is at this point and time. Secondly, although bone resorption was observed in both the continuous and intermittent running groups, it appeared that the corresponding bone formation intensity was also dependent on the local biology for each case. Hence, in the continuous running group, bone resorption occurred, as osteoclast activity was higher than osteoblast activity, while in the intermittent group, it was the opposite.

Overall, from the results and interpretations made from Figures 14–16, we may assess that the comparisons between the experimental and numerical results in Figure 13 are similar. The optimal cell activity to stiffness ratio seems to be located within the cortical-trabecular interface, as defined by Figures 5 and 9, and does not depend only on bone stiffness through strain energy density function, as classically presented in the literature. In addition, bone formation/resorption seems to occur as per a ratio of cell activity that is both dependent and independent of the elastic mechanical energy developed and leads to an intercellular communication driving the specific bone remodeling at a given space and time. In this study, we observed that cortical bone thickness increases at a medium load intensity and decreases for a higher load intensity (Figure 13).

## 5. Conclusions

We developed a theoretical numerical model for the prediction of cortical bone density variations in rat tibiae under intermittent and moderate mechanical loads. The model parameters were evaluated from experimental data, and the numerical results were well correlated to them. The experimental and numerical models showed that bone density variation does not directly depend on bone stiffness, as still commonly used in the literature for the numerical prediction of bone density. Rather, a clever bone mechanobiology is developed within the structure through specific cellular activity driving the bone density change. The proposed simplified model addressed in some simplified ways these intercellular communications in order to predict the corresponding macroscopic bone density evolution from the local cell activity variations. Although this model was developed at a continuous scale, it enables a good understanding of the mechanobiological phenomena and drives the way for better and more detailed predictive models. The next step is to integrate the influence of the local bone microstructure distribution in this analysis to improve patient-dependent predictions.

**Author Contributions:** Conceptualization: D.G., R.A., and Y.R.; methodology: S.P., H.P., and D.G.; software: D.G.; validation: S.P., H.P., and D.G.; formal analysis: S.P., C.B., H.P., and D.G.; investigation: R.W., S.P., C.B., and H.P.; data curation: R.W., C.B., S.P., and H.P.; writing—original draft preparation: D.G.; writing—review and editing: S.P., C.B., H.P., and D.G.; visualization: S.P., C.B., H.P., and D.G.; Supervision: H.P. and Y.R.; Project Administration: H.P.; Funding acquisition: H.P. and D.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors would like to thank the French CNRS for its financial support, through the DEFI CNRS “Mécanobiology”, to carry out the experiments at the origin of this work.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee on Animal Research of Lari-boisiere/Villemin (Paris, France) and from the French Ministry of Agriculture (Paris, France), under the reference number APAFIS # 9505.

**Acknowledgments:** We thank Hanane El-Hafci for technical support.

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

## References

1. Wolff, J. *The Law of Bone Remodelling*; Springer Science: Berlin, Germany, 2012; 126p; ISBN 364271031X.
2. Carter, D.R. Mechanical loading histories and cortical bone remodeling. *Cal. Tissue Int.* **1984**, *36*, S19–S24.
3. Carter, D.R.; Van der Meulen, M.C.H.; Beaupré, G.S. Mechanical factors in bone growth and development. *Bone* **1996**, *18*, S5–S10.
4. Beaupré, G.S.; Orr, T.E.; Carter, D.R. An approach for time-dependent bone modeling and remodeling—Application: A preliminary remodeling simulation. *J. Orth. Res.* **1990**, *8*, 662–670.
5. Ruimerman, R.; Hilbers, P.; van Rietbergen, B.; Huiskes, R. A theoretical framework for strain-related trabecular bone maintenance and adaptation. *J. Biomech.* **2005**, *38*, 931–941.
6. Pivonka, P.; Zimak, J.; Smith, D.W.; Gardiner, B.S.; Dunstan, C.R.; Sims, N.A. Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. *Bone* **2008**, *43*, 249–263.
7. Frost, H.M. Bone mass and the mechanostat: A proposal. *The Anat. Rec.* **1987**, *219*, 1–9.
8. Frost, H.M. Bone’s mechanostat: A 2003 update. *The Anat. Rec.* **2003**, *275*, 1081–1101.
9. Pivonka, P.; Komarova, S.V. Mathematical modeling in bone biology: From intracellular signaling to tissue mechanics. *Bone* **2010**, *47*, 181–189.
10. Klein-Nulend, J.; Baker, A.D.; Bacabac, R.G.; Vatsa, A.; Weinbaum, S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* **2013**, *54*, 182–190.
11. Stoltz, J.; Magdalou, J.; George, D.; Li, Y.; de Isla, N.; He, X.; Rémond, Y. Influence of mechanical forces on bone: Introduction to mechanobiology and mechanical adaptation concept. *J. Cell. Immunother.* **2018**, *4*, 10–12.
12. Burr, D.B.; Allen, M.R. Bone Growth, Modeling and Remodeling. In *Basic and Applied Bone Biology*, 2nd ed.; Burr, D.B., Allen, M.R., Eds.; Elsevier Academic Press: 2019; pp. 85–100.
13. Stoltz, J.; Chen, Y.; Magdalou, J.; George, D.; Huselstein, C.; de Isla, N.; Zhang, L.; Mainard, D.; Li, Y.; Rémond, Y. Response of bone cells to mechanical stimulations: An overview. *Biomed. Health Res.* **2019**, *79*, 71–76; ISSN 0929-6.
14. Stoltz, J.F.; Rémond, Y.; George, D.; Magdalou, J.; Li, Y.P.; Han, Z.C.; Zhang, L.; de Isla, N.; Chen, Y. The Mechanoadaptation Concept of Cells. In *Stem Cells and Regenerative Medicine*; D. George, Jacques Magdalou and Jean François Stoltz, Eds.; IOS Press, Amsterdam: 2021; pp. 47–59; ISBN 978-1-64368-027-9.
15. Lemaire, T.; Capiez-Lernout, E.; Kaiser, J.; Naili, S.; Sansalone, V. What is the importance of multiphysical phenomena in bone remodelling signals expression? A multiscale perspective. *J. Mech. Behav. Biom. Mat.* **2011**, *4*, 909–920.
16. Lemaire, T.; Kaiser, J.; Naili, S.; Sansalone, V. Three-scale multiphysics modeling of transport phenomena within cortical bone. *Math. Prob. Eng.* **2015**, *2015*, 398970.
17. Spingarn, C.; Wagner, D.; Rémond, Y.; George, D. Multiphysics of bone remodeling: A 2D mesoscale activation simulation. *Bio-Med. Mat. Eng.* **2017**, *28*, S153–S158.
18. Pastrama, M.-I.; Scheiner, S.; Pivonka, P.; Hellmich, C. A mathematical multiscale model of bone remodeling, accounting for pore space-specific mechanosensation. *Bone* **2018**, *107*, 208–221.
19. Sheidaei, A.; Kazempour, M.; Hasanabadi, A.; Nosouhi, F.; Pithioux, M.; Baniassadi, M.; Rémond, Y.; George, D. Influence of bone microstructure distribution on developed mechanical energy for bone remodeling using a statistical reconstruction method. *Math. Mech. Solids* **2019**, *24*, 3027–3041.
20. Bagherian, A.; Famouri, S.; Baghani, M.; George, D.; Sheidaei, A.; Baniassadi, M. A new statistical descriptor for the physical characterization and 3D reconstruction of heterogeneous materials. *Trans. Por. Med.* **2021**, *in press*. <https://doi.org/10.1007/s11242-021-01660-9>

21. Famouri, S.; Bagherian, A.; Shahmohammadi, A.; George, D.; Baghani, M.; Baniassadi, M. Refining anticipation of degraded bone microstructures during osteoporosis based on statistical homogenized reconstruction method via quality of connection function. *Int. J. Comp. Mat. Sc. Eng.* **2020**, *9*, 2050023.
22. Lekszycki, T.; Dell'Isola, F. A mixture model with evolving mass densities for describing synthesis and resorption phenomena in bones reconstructed with bio-resorbable materials. *ZAMM* **2012**, *92*, 426–444.
23. Madeo, A.; George, D.; Lekszycki, T.; Nierenberger, M.; Rémond, Y. A second gradient continuum model accounting for some effects of micro-structure on reconstructed bone remodeling. *C. R. Mécanique* **2012**, *340*, 575–589.
24. Andreaus, U.; Giorgio, I.; Lekszycki, T. 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* **2014**, *94*, 978–1000.
25. Scala, I.; Spingarn, C.; Rémond, Y.; Madeo, A.; George, D. Mechanically-driven bone remodeling simulations: Applications to LIPUS treated rat calvarial defects. *Math. Mech. Solids* **2016**, *22*, 1976–1988.
26. Giorgio, I.; Andreaus, U.; Scerrato, D.; Dell'Isola, F. A visco-poroelastic model of functional adaptation in bones reconstructed with bio-resorbable materials. *Biomech. Model Mechanobiol.* **2016**, *15*, 1325–1343.
27. Giorgio, I.; Andreaus, U.; Dell'Isola, F.; Lekszycki, T. Viscous second gradient porous materials for bones reconstructed with bio-resorbable grafts, *Ext. Mech. Let.* **2017**, *13*, 141–147.
28. Allena, R.; Maini, P.K. Reaction-diffusion finite element model of lateral line primordium migration to explore cell leadership. *B. Math. Biol.* **2014**, *76*, 3028–3050.
29. Schmitt, M.; Allena, R.; Schouman, T.; Frasca, S.; Collombet, J.M.; Holy, X.; Rouch, P. Diffusion model to describe osteogenesis within a porous titanium scaffold. *Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **2015**, *19*, 171–179.
30. Frame, J.; Rohan, P.Y.; Corté, L.; Allena, R. A mechano-biological model of multi-tissue evolution in bone. *Cont. Mech. Thermo.* **2017**, *31*, 1–31.
31. Frame, J.; Rohan, P.Y.; Corté, L.; Allena, R. Optimal bone structure is dependent on the interplay between mechanics and cellular activities. *Mech. Res. Com.* **2018**, *92*, 43–48.
32. George, D.; Allena, R.; Rémond, Y. Cell nutrients and motility for mechanobiological bone remodeling in the context of orthodontic periodontal ligament deformation. *J. Cell. Immuno.* **2018**, *4*, 26–29.
33. George, D.; Allena, R.; Rémond, Y. A multiphysics stimulus for continuum mechanics bone remodeling. *Math. Mech. Comp. Syst.* **2018**, *6*, 307–319.
34. George, D.; Allena, R.; Rémond, Y. Integrating molecular and cellular kinetics into a coupled continuum mechanobiological stimulus for bone reconstruction. *Cont. Mech. Thermod.* **2019**, *31*, 725–740.
35. Ehrlich, P.J.; Lanyon, L.E. Mechanical strain and bone cell function: A review. *Osteop. Int.* **2002**, *13*, 688–700.
36. Ignatius, A.; Blessig, H.; Liedert, A.; Schmidt, C.; Neidlinger-Wilke, C.; Kaspar, D.; Friemert, B.; Clase, L. Tissue engineering of bone: Effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* **2005**, *26*, 311–318.
37. Lemaire, T.; Naili, S.; Sansalone, V. Multiphysical modelling of fluid transport through osteo-articular media. *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2010**, *82*, 127–144.
38. Hojo, H.; Ohba, S. Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation. *Bone* **2020**, *137*, 115458.
39. Yu, J.; Canalis, E. Notch and the regulation of osteoclast differentiation and function. *Bone* **2020**, *138*, 115474.
40. Ganesh, T.; Laughrey, L.E.; Niroobakhsh, M.; Lara-Castillo, N. Multiscale finite element modeling of mechanical strains and fluid flow in osteocyte lacunocanalicular system. *Bone* **2020**, *137*, 115328.
41. Sibonga, J.; Matsumoto, T.; Jones, J.; Shapiro, J.; Lang, T.; Shackelford, L.; Smith, S.M.; Young, M.; Keyak, J.; Kohri, K.; et al. Resistive exercise in astronauts on prolonged spaceflights provides partial protection against spaceflight-induced bone loss. *Bone* **2019**, *128*, 112037.
42. Bagherian, A.; Baghani, M.; George, D.; Rémond, Y.; Chappard, C.; Patlazhan, S.; Baniassadi, M. A novel numerical model for the prediction of patient dependent bone density loss in microgravity based on micro-CT images. *Cont. Mech. Thermod.* **2020**, *32*, 927–943.
43. Singhal, V.; Sanchita, S.; Malhotra, S.; Bose, A.; Flores, L.P.T.; Valera, R.; Stanford, F.C.; Slattery, M.; Rosenblum, J.; Goldstein, M.A.; et al. Suboptimal bone microarchitecture in adolescent girls with obesity compared to normal-weight controls and girls with anorexia nervosa. *Bone* **2019**, *122*, 246–253.
44. Marin-Puyalto, J.; Mäestu, J.; Gómez-Cabello, A.; Lätt, E.; Rimmel, L.; Purge, P.; Vicente-Rodríguez, G.; Jürimäe, J. Frequency and duration of vigorous physical activity bouts are associated with adolescent boys' bone mineral status: A cross-sectional study. *Bone* **2019**, *120*, 141–147.
45. O'Leary, T.J.; Izard, R.M.; Walsh, N.P.; Tang, J.C.Y.; Fraser, W.D.; Greeves, J.P. Skeletal macro-and microstructure adaptations in men undergoing arduous military training. *Bone* **2019**, *125*, 54–60.
46. George, D.; Allena, R.; Bourzac, C.; Pallu, S.; Bensidhoum, M.; Portier, H.; Rémond, Y. A new comprehensive approach for bone remodeling under medium and high mechanical load based on cellular activity. *Math. Mech. Complex Syst.* **2021**, *8*, 287–306.
47. Bourzac, C.; Bensidhoum, M.; Manassero, M.; Chappard, C.; Michoux, N.; Pallu, S.; Portier, H. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using  $\mu$ CT. *Life* **2020**, *10*, 308.
48. 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 Min. Res.* **2010**, *25*, 1468–1486.



49. Zeitoun, D.; Caliaperoumal, G.; Bensidhoum, M.; Constans, J.M.; Anagostou, F.; Bousson, V. Microcomputed tomography of the femur of diabetic rats: Alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature—a feasibility study. *Eur. Radiol. Exp.* **2019**, *3*, 17.
50. Ballanti, P.; Minisola, S.; Pacitti, M.T.; Scarnecchia, L.; Mazzuoli, G.F.; Bonucci, E. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: Sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos. Int.* **1997**, *7*, 39–43.
51. Delaisse, J.-M.; Andersen, T.L.; Kristensen, H.B.; Jensen, P.R.; Andreasen, C.M.; Soe, K. Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone* **2020**, *141*, 115628.
52. Rho, J.Y.; Ho Ba Tho, M.C.; Ashman, R.B. Relations of mechanical properties to density and CT numbers in human bone. *Med. Eng. Phys.* **1995**, *17*, 347–355.
53. Bernard, S.; Grimal, Q.; Laugier, P. Accurate measurement of cortical bone elasticity tensor with resonant ultrasound spectroscopy. *J. Mech. Beh. Bio. Mat.* **2013**, *18*, 12–19.
54. Mow, V.C.; Huiskes, R. *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*, 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005; pp. 140.
55. Forwood, M.R.; Parker, A.W. Microdamage in response to repetitive torsional loading in the rat tibia. *Calcif. Tissue Int.* **1989**, *45*, 47–53.
56. Grimston, S.K.; Engsborg, J.R.; Kloiber, R. Bone mass, external loads, and stress fracture in female runners. *Int. J. Sports Biomech.* **1991**, *7*, 293–302.
57. Herman, B.C.; Cardoso, L.; Majeska, R.J.; Jepsen, K.J.; Schaffler, M.B. Activation of bone remodeling after fatigue: Differential response to linear microcracks and diffuse damage. *NIH Pub. Access* **2010**, *47*, 766–772.
58. Hao, L.; Rui-Xin, L.; Bin, Z.; Bao-Hui, H.; Ying-Jie, L.; Xi-Zheng, Z. Effects of athletic fatigue damage and the associated bone targeted remodeling in the rat ulan. *BioMed. Eng. Online* **2017**, *16*, 99.
59. 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.
60. Ebata, H.; Moriyama, K.; Kuboki, T.; Kidoaki, S. General cellular durotaxis induced with cell-scale heterogeneity of matrix-elasticity. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119647.
61. Scerrato, D.; Bersani, A.M.; Giorgio, I. Bio-inspired design of a porous resorbable scaffold for bone reconstruction: A preliminary study. *Biomimetics* **2021**, *6*, 18.
62. Giorgio, I.; Spagnuolo, M.; Andreaus, U.; Scerrato, D.; Bersani, A.M. In-depth gaze at the astonishing mechanical behavior of bone: A review for designing bio-inspired hierarchical metamaterials. *Math. Mech. Sol.* **2021**, *26*, 1074–1103.