

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Laboratoire B3OA & Laboratoire INEM

THÈSE présentée par :

Andy XAVIER

Soutenue le : 18 décembre 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **STAPS**

Analyse multi-échelle de l'effet de différentes modalités de course sur différents sites anatomiques osseux.

THÈSE dirigée par :

Madame MURA Catherine
Monsieur PALLU Stéphane
Monsieur PORTIER Hugues

Professeure des Universités, université d'Orléans
Professeure des Universités, université d'Orléans
Maître de conférence HDR, université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Madame JAFFRE Christelle

Monsieur BIANCHI Arnaud

Professeure des Universités, université Picardie Jules Verne
Ingénieure de recherche HDR, université de Lorraine

JURY :

Madame AMEDEC Joëlle

Madame JAFFRE Christelle

Monsieur BIANCHI Arnaud
Madame MURA Catherine
Monsieur PALLU Stéphane

Monsieur PORTIER Hugues

DR1 INSERM, Université de Bordeaux, laboratoire BioTis Inserm U1026
PR, laboratoire APERE UR-UPJV3300 Présidente de Jury
IR1 HDR, laboratoire IMoPA UMR CNRS 7365
PR, Directrice de thèse, Laboratoire INEM UMR 7355,
PR, Co-directeur de thèse, Laboratoire B3OA UMR CNRS 7052
MCF HDR Co-encadrant, Laboratoire B3OA UMR CNRS 7052

"La science n'a jamais résolu un problème sans en soulever dix autres."

George Bernard Shaw

"Le chemin qui mène à la vérité est jalonné d'erreurs."

René Descartes

"C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite."

Mahatma Gandhi

. Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser toute ma gratitude au Professeur Hervé PETITE pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour avoir financé l'intégralité de mes recherches et permis de finir ma thèse dans les meilleures conditions.

Mes seconds remerciements vont au Professeur Stéphane PALLU, mon directeur de thèse, de m'avoir proposé un sujet de thèse alors que j'étais en perdition. Comme vous me l'avez si bien dit lors d'un déjeuner à Orléans, pour paraphraser Aragorn, « il y a toujours de l'espoir ». Ces quelques mots m'ont permis de me relever et d'avancer. Un jour peut-être, j'aurais aussi mon tank à vapeur.

Je tiens à remercier énormément le Docteur Hugues PORTIER, pour m'avoir proposé au côté de Stéphane un sujet de thèse, de m'avoir éclairé et apporté de précieux conseils. A vous deux vous m'avez appris énormément de choses, vous avez aiguisé mon esprit scientifique et critique afin de toujours tout remettre en cause et de ne pas me reposer sur mes acquis. Je vous remercie tous les deux de m'avoir permis de découvrir un jouet scientifique à plusieurs milliard d'euro : le Synchrotron.

Je remercie Madame la professeur Christelle JAFFRE d'avoir accepté d'être présidente de mon jury et rapporteur.

Je remercie Monsieur l'ingénieur Arnaud BIANCHI d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie Madame la professeure Joelle AMEDEE d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à madame Catherine MURA et au laboratoire INEM pour m'avoir offert la possibilité démarrer un second sujet thèse.

Je remercie le Docteur Esther POTIER pour son soutien, son aide et ses précieux conseils scientifiques. Merci de m'avoir poussé dans mes retranchements et, aider à améliorer la qualité de mes présentations orales.

Je remercie le Docteur Morad BENSIDHOUM pour son aide sur la compréhension de la thèse de Céline BOURSAC et pour ses précieux conseils sur l'utilisation du micro scanner.

Je remercie également le Professeur Delphine LOGEART pour son aide scientifique.

Je tiens à remercier Benois DEMUYNCK alias « ingénieur Benois » pour m'avoir permis de progresser en expérimentation animale. Merci pour tous les bons moments passés ensemble au sein de la communauté des chercheurs dissidents du politiquement incorrecte avec le regretté Sacha KUZNIAK.

Je remercie Pauline WOSINSKI pour m'avoir fait partager le monde fascinant des recherches bancales, des coquilles scientifiques et des contresens dans la littérature scientifique. En bref, tu as un esprit critique comme on en voit peu, puisse tes hydrogels en fonction de l'orientation de la lune et de alignements des planètes te permettre de finir ta thèse.

Je remercie Hanane EL-HAFCI de m'avoir consacré énormément de temps pour me former et m'aider en histologie. Ton savoir-faire est une mine d'or pour le laboratoire. Un grand merci.

Je remercie Nathanael LAROCLETTE et Lionel QUENTIN pour m'avoir formé en microscopie et pour leurs aides.

Je remercie Morgane MARGOTIN pour avoir bien voulu partager son bureau et pour avoir supporté mon humour caustique. Merci au docteur William « de » BAKARI « prince héritier » de son royaume, pour son humour et les excellents repas passés tous ensemble. Je remercie l'ensemble des doctorants du laboratoire Léa ROUQUIER alias ma sorcière bien aimée du journal club, Samantha MAGNIN, Haondong, Gabi, Goyan, Ji, Li, Ying pour tous les échanges que nous avons pu avoir.

Je remercie le docteur Céline BOURZAC d'avoir répondu à mes questions, de m'avoir fait découvrir la plateforme de recherche de maison Alfort et pour son aide à l'élaboration des manuscrits.

Je remercie tous mes anciens stagiaires Aima JEBRAY, Margaux SOLOY, Achille GOEMAN, Enzo le QUINTREC et Doralicia MOREAU, vous avez fait progresser mes compétences en pédagogie. Vous faire partager ma thèse et mon quotidien a été un réel plaisir.

Je remercie Denis LEYRIT et tous les membres de l'équipe technique de l'université de Villemin, Manu, René et Maurice pour leur bonne humeur et les nombreux services rendus.

Je tiens à remercier mes anciens collègues de travail de l'université d'Orléans en particulier le docteur Annabelle CESARO qui m'a soutenu pendant les moments difficiles et aiguillé pour faire les bons choix. Un très grand merci à Eric DOLEANS pour son aide à l'élaboration du protocole d'expérimentation animale de ma première thèse et pour ses conseils de lecture. J'espère que ta retraite est de tout repos. Je remercie également le docteur Thomas JANVIER pour m'avoir appris à coder en python. Je remercie le docteur Edouard SECHE, pour sa bonne humeur et pour m'avoir toujours poussé à voir les points positifs. Je remercie également le docteur Eric LESPESSAILLES pour m'avoir permis d'obtenir un financement de thèse et pour m'avoir transmis son savoir.

Je remercie ma famille et surtout mes parents qui m'ont soutenue. Enfin mes remerciements les plus sincères vont à ma femme Flora pour son amour et sa patience inépuisable tout au long de cette aventure. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Tu as été un soutien inébranlable et tu as su trouver les mots justes et m'encourager dans les moments d'incertitudes Tu as toujours cru en moi et tu m'as permis de trouver la force pour achever cette thèse. Merci ne suffit pas pour exprimer toute ma gratitude et mon amour pour toi.

. Liste des publications et communications

Publications :

Xavier A, Bourzac C, Bensidhoum M, Mura C, Portier H, Pallu S. Effect of different running protocols on bone morphology and microarchitecture of the forelimbs in a male Wistar rat model. PLoS One. 2024 Nov 7;19(11):e0308974. doi: 10.1371/journal.pone.0308974. PMID: 39509380; PMCID: PMC11542884.

Xavier A, Cesaro A. Impact of Exercise Intensity on Calprotectin Levels in Healthy Volunteers and Patients with Inflammatory Rheumatic Diseases. Life (Basel). 2021 Apr 22;11(5):377. doi: 10.3390/life11050377. PMID: 33922149; PMCID: PMC8143494.

Xavier A, Toumi H, Lespessailles E. Animal Model for Glucocorticoid Induced Osteoporosis: A Systematic Review from 2011 to 2021. Int J Mol Sci. 2021 Dec 29;23(1):377. doi: 10.3390/ijms23010377. PMID: 35008803; PMCID: PMC8745049.

Communications :

Communication orale lors des journées scientifiques de l'Institut des Maladies OstéoArticulaires et **récompensé prix** de la meilleure présentation. «Multiscale analysis of the effect of different treadmill running modalities on wistar rat forelimbs. » le 28 mars 2024.

Communication affichée lors des 24 Journée Française de Biologie des tissus minéralisés organisée par la Société Française des tissus minéralisés, **primé** meilleur poster des jeunes chercheurs par la fondation Arthritis du 24 au 26 Avril 2024. (Annexe1)

. Sommaire

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	4
SOMMAIRE	5
TABLES DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	17
PARTIE I LE TISSU OSSEUX	22
I Les os	22
II Agencement spatiale et composition du tissu osseux.....	24
2.1. Microarchitecture.....	24
2.1.1. L'os trabéculaire	24
2.1.2. L'os cortical.....	25
2.2. Le réseau lacuno-canaliculaire ostéocytaire	26
2.1. Composition du tissu osseux	27
2.1.1. Les cellules osseuses.....	27
2.1.1.1. Les cellules bordantes	27
2.1.1.2. Les ostéoblastes	28
2.1.1.3. Les ostéocytes	30
2.1.1.4. Les ostéoclastes.....	32
2.1.2. La matrice extracellulaire	33
2.2. Définition et facteurs déterminants la qualité osseuse.....	38
2.2.1. Géométrie globale de l'os.....	39
2.2.2. Microarchitecture osseuse	40
2.2.3. Méthodes de mesure de la qualité osseuse	41
III Dynamique du tissu osseux.....	42
3.1. Formation et modelage du tissu osseux.....	42
3.2. Le remodelage osseux	45
3.3. La régulation du tissu osseux	47
3.3.1. Régulation locale du tissu osseux	48
3.3.2. Régulation systémique du tissu osseux	49
3.3.2.1. Les facteurs catabolisants :	49
3.3.2.2. Les facteurs anabolisants :	51
PARTIE II MECANISMES DE L'ADAPTATION OSSEUSE A LA CONTRAINTE MECANIQUE	53
I L'ostéocyte une cellule mécano-sensible	53
1.1. Comment se traduisent les contraintes mécaniques à l'échelle ostéocytaire ?.....	54
1.1.1. Propriétés piézoélectriques du tissu osseux, une théorie critiquée	54
1.1.2. Pression fluide et contrainte de cisaillement	56
1.2. Perception des contraintes mécaniques par les ostéocytes : les mécano-senseurs	56
1.2.1. Les adhésions focales et les intégrines	57
1.2.2. Les canaux ioniques et les récepteurs Piezo1 et 2.....	62
1.2.3. Les connexines et les jonctions GAP.....	63
1.2.4. Les récepteurs purinergiques	64
1.2.5. Les Cils primaires	65
1.3. Réponse moléculaire des ostéocytes à la contrainte mécanique.....	66
1.3.1. Réponse moléculaire à l'activation des mécano-senseurs	66
1.3.2. Réponse des ostéocytes aux myokines lors de l'activité physique.....	69
II Réponse ostéoblastique et ostéoclastique, puis tissulaire à la contrainte mécanique	70
2.1. Effet de la contrainte mécanique sur les ostéoblastes.....	70

2.2.	Effet de la contrainte mécanique sur les ostéoclastes	71
2.3.	Réponse tissulaire et adaptation osseuse à la contrainte mécanique	71
III	<i>Modalités d'exercice physique dans des modèles animaux</i>	73
3.1.	Les modèles d'exercice physique	74
3.2.	Hétérogénéité des protocoles d'exercice de course	76
3.3.	Hétérogénéité de la réponse osseuse à l'exercice de course selon les sites anatomiques	77
PARTIE III	MECANISME DE MORT CELLULAIRE ET D'AUTOPHAGIE OSTEOCYTAIRE	79
I	<i>Rôle de l'apoptose ostéocytaire dans l'homéostasie osseuse</i>	79
1.1.	Mécanismes cellulaires de l'apoptose	80
1.1.1.	Voie intrinsèque de l'apoptose	81
1.1.2.	Voie extrinsèque de l'apoptose	82
1.2.	Influence de l'apoptose ostéocytaire sur la santé osseuse	83
II	<i>Rôle de l'autophagie dans la régulation de l'homéostasie osseuse</i>	85
2.1.	Mécanismes cellulaires de l'autophagie	86
2.2.	Implications de l'autophagie dans le métabolisme osseux	90
III	<i>Études antérieures sur l'exercice, l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire</i>	92
3.1.	Effets de différents types d'exercices sur l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire	92
3.2.	Interactions potentielles entre exercice physique, l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire	93
.	MATERIEL ET METHODES	97
.....		97
I	<i>Protocole d'expérimentation animale</i>	97
1.1.	Protocole de course sur tapis roulant	97
II	<i>Microtomographie aux rayons X in vivo</i>	98
2.1.	Généralités	98
2.2.	Méthodes d'analyses et de mesure de la microarchitecture osseuse au μ CT	99
2.2.1.	Acquisitions des échantillons	99
2.2.2.	Reconstruction des images et analyse de la microarchitecture osseuse	100
2.2.3.	Mesures morphologiques des pièces osseuses	102
III	<i>Protocole d'histologie, d'immunohistochimie et d'analyse sanguine</i>	103
3.1.	Traitement des tissus	103
3.2.	Mesure du taux d'occupation lacunaire ostéocytaire	104
3.3.	Marquages immunohistochimiques sur les diaphyses	104
3.3.1.	Apoptose ostéocytaire, marquage à la Caspase 3 clivée	105
3.3.2.	Marquage de l'autophagie ostéocytaire par Beclin1	105
3.3.3.	Marquage de la mécanotransduction par l'intégrine α V β 3	105
3.3.4.	Evaluation de la différenciation des ostéocytes marqués au CD44	106
3.4.	Evaluation de l'activité ostéoclastique	106
3.5.	Evaluation de l'activité des ostéoblastes	106
3.6.	Dosages sériques des biomarqueurs osseux	107
IV	<i>Analyses statistiques</i>	107
.	RESULTATS	109
I	<i>Etude 1 : Effet de différents protocoles de course sur la morphologie osseuse et la microarchitecture des membres antérieurs chez un modèle de rat Wistar mâle adulte</i>	109
II	<i>Résultats complémentaire de l'étude 1 : effet des différents protocoles de course sur la biologie ostéocytaire et ostéoclastique de l'ulna et de l'humérus</i>	131
2.1.	Analyses histologique et immuno-histochimique de l'ulna	131
2.1.1.	Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire, apoptose et autophagie	131
2.1.2.	Analyse de la mécano-transduction et de la différenciation ostéocytaire	135
2.1.3.	Activité ostéoclastique	136
2.2.	Analyses histologique et immunohistochimique de l'humérus	136
2.2.1.	Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire et apoptose	136
2.2.1.	Activité ostéoclastique	138

III	<i>Etude 2 : Comparaison de 2 protocoles d'entraînement au membre inférieur : l'entraînement par intervalles (HIIT) améliore les propriétés tissulaires du tibia, retarde l'apoptose des ostéocytes, active les voies de l'autophagie par rapport à la course modérée continue chez les rats Wistar.</i>	139
3.1.	Analyse morphologique et microarchitecturales de la diaphyse tibiale.....	139
3.2.	Mesures de la microarchitecture trabéculaire par μ CT au niveau du tibia proximal.	141
3.3.	Analyses histologiques et immunohistologiques ostéocytaire à la diaphyse tibiale	142
IV	<i>Résultats supplémentaires.....</i>	146
4.1.	Analyse de la microarchitecture de la vertèbre L5, la mandibule et la calvaria	146
4.2.	Analyses de la microarchitecture du fémur.....	149
V	<i>Comparaison de la réponse tissulaire des membres antérieurs et postérieurs aux protocoles de courses HIIT et course continue.</i>	152
VI	<i>Synthèses des résultats</i>	153
.	DISCUSSIONS	156
I	<i>Les membres antérieurs.....</i>	156
II	<i>Les membres postérieurs</i>	158
III	<i>Les os non porteurs.....</i>	160
IV	<i>Perspectives</i>	161
.	CONCLUSION	163
.	BIBLIOGRAPHIE	164
.	ANNEXE	182

. Tables des figures

Figure 1: Représentation de la structure d'un os long, ici le fémur. Reproduit de « Anatomy&Physiology, OpenStaxCollege », http://cnx.org/content/col11496/1.6/	23
Figure 2: Représentation de l'organisation du tissu osseux trabéculaire; reproduit de « Anatomy & Physiology, OpenStaxCollege », http://cnx.org/content/col11496/1.6/	25
Figure 3: (a) Représentation d'une coupe d'os cortical illustrant le système Havers. (b) micrographie de l'ostéon, présentant les lamelles concentriques et les canaux centraux. (Microscope optique × 40). Reproduit de « Anatomy&Physiology, OpenStaxCollege », http://cnx.org/content/col11496/1.6/	26
Figure 4: Illustration du système lacuno-canaliculaire et des processus dendritiques ostéocytaires (issu de Tiede-Lewis <i>et al.</i> , en 2019 [48]).	27
Figure 5 : Schéma des principaux facteurs de différenciation conduisant les cellules souches mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique. Image issue des travaux de Ponzetti M, <i>et al.</i> en 2021 [52].	29
Figure 6 : Schéma illustrant les deux principales voies canoniques de la différenciation ostéogénique. Image issue des travaux de Ponzetti M, <i>et al.</i> en 2021 [52].	29
Figure 7: Image d'ostéocytes et de leur réseau lacuno-canaliculaire obtenue par imagerie Ptychographique sur la ligne de lumière C-SAXS de la Swiss Light Source, au Paul Scherrer Institute à partir de section corticale tibiale de rat Wistar mâle adulte. Image produite par les Docteurs Cameron Kewish et Stéphane Pallu.	30
Figure 8: Illustration des différents marqueurs exprimés au cours de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes matures. Issu des travaux de Bonewald en 2011 [62].	31
Figure 9: Schéma de la différenciation ostéoclastique à partir des monocytes sous l'action des facteurs pro- ostéoclastogènes. En fonction des stades de maturation, l'expression génique des ostéoclastes est modifiée. La stimulation par RANKL induit la fusion des précurseurs ostéoclastiques en pré-ostéoclastes, puis en ostéoclastes polarisés matures. Issu de Gambari <i>et al.</i> , en 2020 [66].	33
Figure 10: : Synthèse du collagène fibrillaire et des protéines COMP ; reproduit de Bateman et al 2009 [71].	35
Figure 11 : Organisation macromoléculaire de la MEC du tissu osseux; issue de Rho <i>et al.</i> , 1998 [81].	37
Figure 12: Illustration de la qualité osseuse définie par Fonseca <i>et al.</i> , en 2014 [5].	38
Figure 13: Illustration de l'influence de la géométrie sur la résistance structurelle des structures circulaires. Issu de Bouxsein en 2001 [88].	40
Figure 14: Illustration de résistance du tissu osseux. L'image de gauche représente l'organisation tridimensionnelle de la microarchitecture trabéculaire et la répartition des lignes	

de force. L'image centrale représente le schéma d'une grue Fairbairn. L'image de droite représente la répartition des charges de compression et traction le long du fémur [90]. 41

Figure 15 : Représentation de l'ossification endochondrale ; issu de Usami *et al.*, en 2016 [92]. 43

Figure 16 : (A) Représentation schématique de l'augmentation de résistance mécanique avec le diamètre, adapté du manuscrit de thèse de Doctorat de Nicolas Vilayphiou en 2010 à l'université de Lyon 1. (B) Représentation picturale de la différence d'apposition périostée, issue de Seeman en 2002 [95]. 45

Figure 17 : Représentation schématique de l'unité fonctionnelle de remodelage au cours des différentes étapes ; à noter la présence de macrophages pendant la phase d'inversion, et le recouvrement de la lacune par les cellules bordantes pendant tout le processus; issu de Raisz *et al.*, 2005 [99]. 46

Figure 18 : Représentation de l'adhésion des ostéoclastes sur la MEC par les intégrines et l'ostéopontine ; issu de Giachelli *et al.*, 2000 [100]. 47

Figure 19 : Représentation schématique du contrôle hormonal de la résorption osseuse et du mécanisme d'action des facteurs catabolisants et anabolisants ; issue de Boyle *et al.*, 2003 [103]. 49

Figure 20: Illustration de la mécano-transduction ostéocytaire implique un stimulus (mécano-stimulateur), un appareil récepteur (mécano-capteur), et une cascade de signalisation conséquente (mécano-voie). Issu de Rochefort *et al.* en 2010 [55]. 53

Figure 21: Illustration de l'effet théorique de la piézoélectricité du collagène sur la rigidité du tissu osseux. La compression du tissu osseux génère des charges de surface qui contribuent indirectement à une plus grande contrainte et donc à une plus grande rigidité de l'os. 1 : Déplacement, 2 : charges superficielles, 3 : Potentiel Zeta, 4 : Potentiel de diffusion, 5 : Electro-osmose, 6 : Perméabilité Hydraulique, 7 : Stresse. Issu de Ahn AC *et al.*, en 2009 [127]. 55

Figure 22: Illustration des ostéocytes et de leurs dendrites en interaction avec la matrice extra-cellulaire osseuse. Les adhésions focales (intégrines), les jonctions gap, les cils primaires, les canaux ioniques et les buttes collagéniques « collagen hillocks » participent à la mécano-sensibilité des ostéocytes aux contraintes mécaniques. Issu de Qin *et al.*, en 2020 [58]. 57

Figure 23: Illustration des intégrines chez les vertébrés, qui forment 24 hétéro-dimères répartis en quatre grandes familles de récepteurs. Issu de Barczyk *et al.*, en 2009 [136]. 58

Figure 24: Illustration de l'activation de l'intégrine par la Taline, à noter le changement de conformation courbée (inactive) à tendue (active à haute affinité) de l'intégrine. Issu de Lu *et al.*, en 2022 [145]. 59

Figure 25: Illustration de la structure hétérodimérique des intégrines (A). Représentation des 25 sous-types d'intégrines dont celles qui sont majoritairement actives dans le métabolisme osseux en orange (B). Issu de Mao *et al.*, en 2023 [154]. 61

Figure 26: Illustration de l'ouverture des canaux calciques par le flux de fluide dans l'espace interstitiel et la réponse physiologique chez les ostéoblastes. Issu de Scott *et al.*, en 2012 [159]. 62

Figure 27: (A) Illustration des jonctions GAP des ostéocytes en réponse à une stimulation mécanique. (B) Illustration des héli-canaux des ostéocytes en réponse à une stimulation mécanique. (C) Illustration de la voie de signalisation impliquées dans les héli-canaux à base de Cx43 au cours de la mécano-biologie des ostéocytes. Issu de Qin <i>et al.</i> , en 2020 [58].	64
Figure 28: Illustration de la structure des cils primaires de l'ostéocyte et de la réponse biologique lors de l'activation du cil par les contraintes de cisaillement fluidique.	65
Figure 29: Illustration de l'activation des mécano-senseurs par la contrainte mécanique et leurs effets sur les voies de signalisations PTGs2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), COX2, OPG, Wnt1, mTOR et SOST dans les ostéocytes. Issu de Li <i>et al.</i> , en 2021 [170].	67
Figure 30 : Illustration du mécanisme de détection et de réponse des CSMs à la stimulation mécanique. Issu de Sun <i>et al.</i> , en 2022 [183].	71
Figure 31: Illustration de la différence de structure du réseau lacuno-canaliculaire entre les côtés de compression et de tension de l'os cortical fémoral. Issu de Moriishi <i>et al.</i> , en 2022 [50].	73
Figure 32: Illustration des effets de la charge mécanique et de l'exercice physique sur la qualité osseuse. Issue de la thèse de Laura PEURIERE en 2021 sous la direction de Laurence VICO-POUGET [187].	74
Figure 33: Schéma des trois voies d'activation de l'apoptose et leur cascades d'activation cellulaire. Issu de Elmore en 2007 [208].	80
Figure 34: Illustration des voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. Issu de Marquez <i>et al.</i> en 2012 [211]. IAP : inhibitors of apoptosis proteins. Ub : Ubiquitine.	82
Figure 35: Illustration de la formation du phagophore autour de la cible à dégrader pour former l'autophagosome qui fusionnera avec le lysosome pour former l'autophagolysosome. Issu de Wu <i>et al.</i> en 2020 [221].	87
Figure 36: Illustrations des trois types d'autophagie: la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie à médiation chaperonne. Issu de Kaushik <i>et al.</i> en 2018 [222].	88
Figure 37: Illustration de la voie moléculaire de la macroautophagie initié par mTOR et AMPK. Issu de Kim <i>et al.</i> en 2018 [230].	90
Figure 38: Illustration de l'importance de l'autophagie au sein de l'ostéoblaste pour maintenir l'homéostasie osseuse et inhiber la résorption par les ostéoclastes en activant également le flux autophagique par la fixation du récepteur leurre TNFRSF11B. Issu de Wang <i>et al.</i> en 2023 [233].	91
Figure 39: Modèle de voie de signalisation intracellulaire possible de l'interaction entre l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire. Issu de de Ru <i>et al.</i> en 2020 [214].	95
Figure 40: Schéma de principe d'un micro scanner. Issu de Wils en 2020 [246].	99
Figure 41 : Illustration des segmentations osseuses réalisées sur l'ulna, la vertèbre L5, et la mandibule, avec le logiciel DragonFly. L'image A, représente l'analyse de l'os complet, en rouge, l'os trabéculaire et en bleu, l'os cortical. L'image B représente la sélection de 200 coupes	

sur les épiphyses proximale et distale. L'image C représente la segmentation de la vertèbre L5. L'image D représente la segmentation de l'os alvéolaire à la mandibule..... 101

Figure 42 : Mesure moyenne de l'os sous-chondral de l'ulna distal (Articulatio mediocarpalis) réalisée avec le logiciel DragonFly. La zone colorée en bleu correspond à l'os cortical sélectionné selon le niveau de gris. Une seule mesure de cette zone a été réalisée au milieu des condyles..... 103

Figure 43: Répartition des régions d'intérêt ROI sur les sections corticales analysées. 104

Figure 44: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse ulnaire. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100, et **C** : l'autophagie des ostéocytes a été marquée avec une concentration d'anticorps anti-Beclin 1 de 1/500. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. ** : Valeur P <0,01 ; *** : Valeur P <0,001 (test U-Mann Whitney). **D** : Les images ont été obtenues un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle est de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée. 133

Figure 45: Résultats des tests de corrélation de Spearman entre l'apoptose et l'autophagie des trois groupes de course analysés à la diaphyse ulnaire. **A** : Corrélation modérée non significative ; **B** : Corrélation faible non significative ; **C** : Absence de corrélation..... 134

Figure 46: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse ulnaire. **A** : Le taux d'ostéocytes positifs à l'intégrine α V β 3 a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-intégrine α V β 3 au 1/200, **B** : le taux d'ostéocytes positifs CD44 a été marqué avec une concentration d'anticorps anti CD44 au 1/200. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur P <0,05 ; ** : P valeur <0,01 ; *** : P valeur <0,001 (test U-Mann Whitney). **C** : Les images ont été obtenues un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle est de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée. 135

Figure 47: Résultats des analyses histochimiques de l'activité des ostéoclastes marquées à la TRAP. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée. 136

Figure 48: Résultats des analyses immunohistochimiques à la diaphyse humérale. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur P <0,05 (test U-Mann Whitney). **C** : Les images ont été obtenus un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée..... 137

Figure 49: Résultats des analyses histochimiques de l'activité des ostéoclastes marqués à la TRAP. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT

: groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée. 138

Figure 50: Mesures morphologiques du diamètre et de l'épaisseur du tibia à mi-diaphyse en fonction de la modalité de course. Les mesures ont été effectuées sur des images 3D provenant d'acquisitions de microtomographies à rayons X à une résolution de 4,91µm. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD en mm. * : Valeur P <0,05, ** : P valeur <0,01 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue..... 140

Figure 51: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse proximale du tibia réalisées par microtomographie aux rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.* : Valeur P <0,05 ; ** : P valeur <0,01 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm-1) ; **C** : Tb.Sp : Séparation trabéculaire (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm). 142

Figure 52: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse tibiale. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100, et **C** : l'autophagie des ostéocytes a été marquée avec une concentration d'anticorps anti-Beclin 1 de 1/500. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. ** : Valeur P <0,01 ; *** : Valeur P <0,001 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée. 143

Figure 53: Résultats des tests de corrélation de Spearman entre l'apoptose et l'autophagie des deux groupes de course à la diaphyse tibiale. **A** : Absence de corrélation ; **B** : Corrélation modéré significative. HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue 144

Figure 54: Résultats des analyses immunohistologiques, **A** : le taux d'ostéocytes positifs intégrine α V β 3 a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-Alfa V beta 3 1 1/200 ; **B** : le taux d'ostéocytes positifs CD44 a été marqué avec une concentration d'anticorps anti CD44 1/200, Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.* : Valeur P <0,05 ; ** : P valeur <0,01 ; *** : P valeur <0,001 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue..... 144

Figure 55: Résultats des analyses histochimiques, Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD. ** : P valeur <0,01 ; *** : P valeur <0,001 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue..... 145

Figure 56: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de la vertèbre L5 réalisées par micro-tomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée. **A** :

BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm-1) ; **C** : Tb.Sp : Séparation trabéculaire (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm)..... 147

Figure 57: Mesures de la microarchitecture trabéculaire sur l'os alvéolaire de la mandibule gauche réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne ± l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm-1) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm). 148

Figure 58: Mesures de l'épaisseur de la calvaria effectuée au milieu de l'os pariétal réalisées à partir des images de microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne ± l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée. 149

Figure 59: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse distale fémorale réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne ± l'écart type. * : Valeur P <0,05 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm-1) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : épaisseur trabéculaire (mm). 150

Figure 60: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse proximale fémorale réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne ± l'écart type. * : Valeur P <0,05 ; ** : P valeur <0,01 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm-1) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm)..... 151

Figure 61: Comparaison des variations de microarchitecture entre le tibia et l'ulna selon les protocoles de courses HIIT et CR. Les mesures de la microarchitecture trabéculaire ont été réalisées au niveau des épiphyses proximales réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures de variations par rapport au groupe sédentaire sont exprimées en moyenne ± l'écart type. * : Valeur P <0,05 ; ** : P valeur <0,01 ; *** : P valeur <0,001 (Multiple T-test). HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; Tb.N : Nombre de travées (mm-1); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm). 152

Figure 62: Comparaison des variations de microarchitecture entre le fémur et l'humérus selon les protocoles de courses HIIT et CR. Les mesures de la microarchitecture trabéculaire ont été réalisées au niveau des épiphyses proximales réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 µm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version

2022.2 Build 1399). Les mesures de variation par rapport au groupe sédentaire sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur $P < 0,05$ (Multiple T-test). HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; Tb.N : Nombre de travées (mm^{-1}); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm). 153

. Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des marqueurs moléculaires impliqués dans la différenciation des ostéocytes. Issu de Rochefort <i>et al.</i> , en 2010 [55].	32
Tableau 2: Présentation des principales protéines non collagéniques formant la phase organique de la MEC du tissu osseux avec leurs fonctions. Tableau adapté partiellement à partir de la thèse de Céline Bourzac soutenue en 2020 selon les travaux de Gentili <i>et al.</i> , en 2009 [75], Malaval <i>et al.</i> , en 2009 [76] et de Charoenlarp <i>et al.</i> , en 2017 [77].....	36
Tableau 3: Référencement des intégrines selon le type cellulaire impliqué avec la voie de signalisation impliqué et les effets régulateur sur le métabolisme. CSM : Cellules souche mésenchymateuse. Tableau reproduit et traduit librement de l'article de Mao <i>et al.</i> en 2023 [151]. BSP: Bone sialoprotein; MMP : matrix metalloproteinase; NCAM : Neural cell adhesion molecule; WISP1 : Wnt-induced secreted protein 1; CCN : Cellular communication network factor ; ERK : extracellular signal-regulated kinase; PTH1R: parathyroid hormone receptor-1; EDI1: Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I-like domain 3 VNP: Vitronectin-derived peptide; FAK: focal adhesion kinase; DICAM: Dual immunoglobulin domain-containing cell adhesion molecule; IL: Interleukine	68
Tableau 4: Rôles potentiels des facteurs pathologiques sur le tissu osseux et expression en conséquence des facteurs pro- ou anti- apoptotiques. Reproduit et traduit librement des travaux de Ru <i>et al.</i> , en 2020 [214]. BAX : B-cell lymphoma associated X protein ; ROS : reactive oxygen species; NOX1-2: NADPH oxidase 1-2; AMPK: AMP-activated protein kinase; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Atg7: Autophagy related 7; BNIP3: BCL2 Interacting Protein 3; HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha; BAD: BCL2-associated death promoter; FAK: Focal adhesion kinase; NO: nitric oxide; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ORP150: Oxygen-regulated protein 150; PGE2: prostaglandine E2; FGF7: fibroblast growth factor; CCN2: cellular communication network factor 2; PIP3: phosphoinositide 3-kinase; RSK2: ribosomal S2 kinase; Pyk2: Protein tyrosine kinase 2 beta; JNK: c-Jun N-terminal kinases; DMP-1: Dentin matrix acidic phosphoprotein 1; CTSK: Cathepsin K; HMGB1: high mobility group box 1; CREB: cAMP Response Element-Binding Protein; STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3; NAFT: Nuclear factor of activated T-cells.	84
Tableau 5: Paramètres d'acquisitions au micro-scanner à rayons X en fonction de la résolution, et de la région anatomique osseuse considérée.	100
Tableau 6 : Présentation des analyses qui ont été réalisées pour chaque pièces osseuses.	108
Tableau 7: Porosité corticale tibiale à mi-diaphyse analysée par μ CT du tibia en fonction des modalités de courses.....	140
Tableau 8 : Présentation des paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale, de morphologie significativement différent du groupe sédentaire selon la pièce osseuse considérée. -↗ : augmentation significative par rapport au groupe sédentaire ; ↘ : diminution significative par rapport au groupe sédentaire, p-value<0,05. (test Mann-Withney). Ct.Po : Porosité corticale (%) ; Po.N : Nombre de pores (mm-1) ; Po.Sp :Espace des pores (mm) ; Po.Dm : Diamètre des pores (mm).; Ct.Ar/Tt.Ar: fraction de l'air corticale; SB.Th: Epaisseur de l'os sous chondrale; BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; Tb.N : Nombre de travées (mm-1); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).	154

Tableau 9: Présentation des résultats des analyses histologique, immunohistologique et histochimique significativement différent du groupe sédentaire selon la pièce osseuse considéré. Les analyses ont été réalisé à mi diaphyse de chaque os. ↗ : augmentation significative par rapport au groupe sédentaire ; ↘ : diminution significative par rapport au groupe sédentaire, p-value<0,05. (test Mann-Withney)..... 155

. Introduction

Le tissu osseux est un organe dynamique qui répond à plusieurs fonctions biologiques dont la principale est le soutien mécanique du corps. Pour assurer cette fonction, le tissu osseux doit adapter ses propriétés tissulaires pour répondre aux stimuli de son environnement [1]. La résistance mécanique osseuse est principalement caractérisée en médecine clinique par la simple mesure de la densité minérale osseuse (DMO). En effet, cette mesure sur un site spécifique (rachis lombaire, col du fémur) reflète globalement l'état de santé et de résistance du squelette ce qui en clinique permet de poser un diagnostic fiable, rapide et reproductible [2]. Cependant, l'augmentation de la DMO ou de la teneur en calcium n'est pas nécessairement associée à une amélioration des propriétés biomécaniques du tissu osseux [3]. En effet, il est désormais bien établi que la qualité osseuse dépend de plusieurs facteurs organisés à plusieurs échelles [4]. De la macro-échelle à la nano-échelle, ces déterminants de la qualité osseuse comprennent : (i) la géométrie de l'os dans son ensemble (c'est-à-dire la taille de l'os, l'épaisseur corticale par exemple), (ii) la microarchitecture de l'os, correspondant à l'organisation du tissu osseux, à la forme et à la connectivité trabéculaires, et à la porosité corticale, et (iii) les propriétés du tissu osseux, qui dépendent de la composition globale du tissu et des propriétés biophysiques de ces composants (en particulier, le degré et le type de réticulation du collagène, les protéines non collagéniques, la densité cellulaire et le réseau d'ostéocytes, le degré de minéralisation, la cristallinité, ainsi que l'hydratation) [5].

Ces propriétés tissulaires du tissu osseux s'adaptent d'une part, à l'environnement (gravité) et d'autre part aux contraintes mécaniques appliquées au tissu (exemple : alitement vs exercice physique). Il est admis que l'exercice physique induit des bénéfices sur la santé du squelette et le métabolisme osseux qui ne sont plus à démontrer [6,7]. Par exemple, la masse osseuse en l'absence d'exercice physique, n'atteindrait que 30 à 50 % de son potentiel [8]. L'exercice physique, par les impacts au sol et les tractions ou torsions qu'il génère au niveau des insertions tendineuses [9] affecte le métabolisme osseux par un phénomène de mécano-transduction [6,10,11], modifiant l'architecture interne et la morphologie externe de l'os [2]. Bien qu'il soit bien connu que la charge mécanique est d'une grande importance pour le maintien de l'intégrité osseuse, les paramètres d'exercice les plus efficaces, c'est-à-dire le type, l'intensité et la durée font encore l'objet d'un débat quant à leurs effets. Il a toutefois été établi que la contrainte est plus importante que la durée [12]. Parmi les activités physiques, la course à pied est accessible à tous et ne nécessite pas d'équipement spécifique. Dans la littérature scientifique, la course sur

tapis roulant est l'un des protocoles les plus utilisés pour étudier les effets de l'exercice sur les os chez le rat, un modèle expérimental validé pour les études relatives au tissu osseux [13].

Malheureusement, à ce jour, il est difficile de parvenir à un consensus sur les effets de la course sur tapis roulant sur la qualité des os, en raison de la grande hétérogénéité des modalités de course, de la durée du protocole, de l'intensité, mais aussi des caractéristiques des sujets (c'est-à-dire le fond génétique, l'âge et le sexe) [14]. La course continue consiste en des exercices d'intensité modérée à constante, effectués sur une période prolongée sans interruption, d'une durée de 30 minutes à plusieurs heures dont l'intensité correspond à environ 50 à 80 % de la vitesse maximale aérobie (VO₂max) [15–17]. La plupart des études expérimentales ont examinées les effets des séances de course à une intensité constante et modérée, rapportant que les effets sur l'augmentation de la masse et de la force osseuses de la course sur tapis roulant à intensité modérée sont meilleurs que ceux de la course sur tapis roulant à faible ou à forte intensité [18–22].

En revanche, bien qu'il ait été prouvé que la course par intervalles à haute intensité (également appelée HIIT : « High Intensity Interval Training ») est plus bénéfique que la course continue pour la prévention des maladies cardio-métaboliques [23], la littérature relative à ses effets sur le tissu osseux est limitée [24]. Le HIIT consiste à alterner des périodes d'exercice à haute intensité et de récupération (active ou de repos). Les séances sont généralement courtes et durent souvent entre 20 et 30 minutes. Le HIIT a une intensité très élevée pendant les périodes d'effort, qui peuvent atteindre la VO₂max (90 % à 110 % de la VO₂max) [15–17]. Les effets bénéfiques rapportés du HIIT sur le tissu osseux comprennent l'amélioration de la DMO [25,26] et l'augmentation de la surface des lacunes ostéocytaires et de leur taux d'occupation dans l'os sous-chondral [27]. A notre connaissance seule trois études chez le rat ont comparé directement les effets de la course continue et par intervalles sur la qualité osseuse. La première rapportée par Boudenot *et al.*, en 2015 [28] a comparé les effets sur la DMO de ces deux protocoles de course. **Le protocole HIIT a entraîné une augmentation de 20 % de la DMO corps entier comparé au groupe course continue.** La seconde étude réalisée sur le fémur par Wazzani *et al.* en 2023 [29] a révélé que **le HIIT améliorait également le paramètre « trabecular bone mineral density » (Tb.BMD) ainsi que d'autres paramètres de la microarchitecture trabéculaire telle que l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) au fémur proximal.** Nos derniers travaux ont montré que **le HIIT diminuait la fraction volumique (BV/TV) à l'ulna distal,** c'est-à-dire la fraction osseuse directement impliquée dans la cinétique de course, recevant le

plus d'impacts [30]. Ainsi il semblerait au vu des résultats de la littérature que selon le site de mesure anatomique, les effets du protocole de course HIIT ou de course continue divergent.

Il existe une troisième modalité de course, qui combine la course continue et la course par intervalles sur plusieurs séances d'entraînement. La course combinée est pratiquée par les athlètes de haut niveau pendant leur entraînement depuis le 20^{ième} siècle [31]. Cependant, les effets de cette modalité sur le tissu osseux ont fait l'objet de peu de recherches. L'étude de Wazzani *et al.*, 2023 [29] **a mis en lumière les effets respectifs de ces trois modalités de course sur les propriétés fémorales**. Dans le groupe d'exercice combiné, le paramètre « Tb.Th » (épaisseur trabéculaire) du fémur proximal était plus élevé que dans les autres groupes d'exercice (intervalles et continu) ainsi que dans la condition sédentaire de contrôle ($p < 0,001$). En outre, **la DMO trabéculaire au col anatomique fémoral** mesurée par microtomographie à rayons X (μ CT) **dans le groupe d'exercice par intervalles était plus élevée que les résultats respectifs de tous les autres groupes expérimentaux**.

A ce jour, aucune étude n'a proposé de comparer ces trois protocoles de course sur différents sites anatomiques impliqués dans la locomotion quadrupède chez un modèle de rat.

La compréhension des mécanismes adaptatifs du tissu osseux à l'exercice nécessite l'étude des ostéocytes, chef d'orchestre de l'homéostasie osseuse [32]. La réponse des ostéocytes aux contraintes mécaniques est dépendante de leur faculté à percevoir les stimulations mécaniques. La fonction mécano-sensible des ostéocytes n'est pas encore clairement établie mais cette mécano-sensibilité serait le fruit de plusieurs protéines membranaires (les adhérences focales, les intégrines, les connexines, les polycystines, piezos), de récepteurs (récepteurs purinergiques) et de mécanismes de signalisation cellulaire (signalisation Wnt et sclérostine) [33]. Plus particulièrement, l'intégrine, $\alpha 5$ joue un rôle important dans la régulation de la réponse anabolisante des os en augmentant l'activité des ostéoblastes lors de contrainte mécanique en compression axiale sur le tibia [33]. Il semble également que l'intégrine $\alpha 5$ inhibe l'apoptose des ostéocytes [34]. Cependant, selon le type d'exercice physique (roue d'activité ou position bipède), il a été démontré par une analyse du transcriptome de l'os cortical fémoral (chez le rat Sprague-Dawley) que la transcription de plusieurs gènes au sein des voies de signalisation de la kinase liée à l'intégrine (ILK) était soit inhibée soit stimulée [35]. Les ostéocytes pourraient donc moduler leur mécano-sensibilité puis leur réponse ostéogénique à la force mécanique grâce à la régulation fine de la voie Wnt et sa boucle de rétroaction, la

sclérostine [36], par les intégrines [37]. L'adaptation de la mécano-sensibilité des ostéocytes à la charge pourrait également conduire à la modulation de leur apoptose pour influencer le remodelage osseux. Ainsi à des plages physiologiques la mise en charge réduirait l'apoptose ostéocytaire alors qu'une surcharge augmenterait l'apoptose ostéocytaire [38].

Par conséquent, la charge mécanique conduit à une adaptation du métabolisme ostéocytaire qui selon son ampleur est soit anabolisant, soit catabolisant. Ainsi, l'autophagie qui est un processus de protection, de recyclage cellulaire et de survie, pourrait selon le type de contrainte mécanique soit améliorer l'homéostasie cellulaire, soit conduire à la mort cellulaire [39]. En effet, en condition physiologique normale, l'autophagie est impliquée dans la survie et la différenciation des ostéoblastes et des ostéocytes [40,41]. Zhou *et al.*, en 2018 [42] ont montré que l'autophagie ostéocytaire était impliquée dans les voies de mécano-transduction induites par stimulation mécanique. Il a été également montré que la voie de signalisation ostéogénique Wnt β -caténine était associée à l'autophagie [43]. Néanmoins, en condition de stress, la voie Wnt est associée négativement à l'autophagie ce qui pourrait conduire à une suppression de l'activité autophagique et augmenter l'apoptose des ostéoblastes [44]. Ainsi, selon le type d'activité physique la réponse autophagique des ostéocytes pourrait varier considérablement. Une étude sur le muscle squelettique a montré que selon le type de course (HIIT ou continue) la réponse autophagique était différente à la fois selon le type de tissu étudié et selon le sexe [45]. Selon cette étude, le HIIT induit un stress suffisant pour augmenter le flux autophagique dans le muscle squelettique.

En conséquence, **les objectifs de la thèse sont les suivants :**

- ✓ Étudier les effets de la course dans des conditions quadrupèdes chez un modèle de rat.
- ✓ Déterminer et comparer les effets de la course sur les membres antérieurs et les membres postérieurs. Comparer les effets de trois protocoles de course (HIIT, continu, combiné) sur ces sites osseux, et définir quel protocole de course améliore la qualité osseuse et ce à plusieurs échelles (géométrie, microarchitecture et propriété tissulaire).
- ✓ Comparer les effets des trois protocoles de course sur la biologie ostéocytaire, ostéoblastique et ostéoclastique.

Introduction

- ✓ ✓ Commencer à appréhender la mécano-transduction ostéocytaire en fonction des protocoles de course. Déterminer si un ou plusieurs protocoles de course contribuent à protéger les ostéocytes de l'apoptose et à améliorer le flux autophagique.
- ✓ Evaluer les effets des 3 protocoles de course sur les os non porteurs (vertèbre lombaire L5, calvaria, os alvéolaire).

Les hypothèses sont multiples :

La première hypothèse est que la course sur tapis roulant améliore la qualité osseuse des membres supérieurs de façon comparable à celle sur des membres inférieurs.

Le squelette des rats devrait présenter des améliorations de la qualité osseuse uniquement près des points d'impact au sol.

Selon le niveau de contrainte généré par les protocoles de course, les niveaux de flux autophagique devraient être augmentés et réduire le nombre d'ostéocytes apoptotiques.

L'induction de stress mécanique selon la modalité de course devrait induire une expression des mécano-senseurs en fonction de la contrainte induite.

Enfin, les protocoles de course pourraient retarder la différenciation terminale des ostéocytes.

. Etat de l'art

Préambule :

L'os est un tissu unique qui semble au premier abord immuable en raison de sa structure minérale solide. En réalité, il s'agit d'un tissu dynamique qui assure plusieurs fonctions et qui doit être modelé, façonné pour s'adapter d'une part à l'organisme en croissance, et d'autre part, aux contraintes mécaniques que le corps fait subir au tissu osseux. Ce modelage est finement régulé à minima et réalisé par deux lignées cellulaires que sont les ostéoblastes et les ostéoclastes.

La première partie de l'état de l'art sera consacrée aux caractéristiques du tissu osseux et de ses cellules, puis la seconde partie aux processus d'adaptations aux contraintes mécaniques et notamment lors de l'exercice physique. L'état de l'art sera clôturé par les mécanismes de mort cellulaire et les effets de l'exercice physique sur la modulation de la mort cellulaire osseuse.

Partie I Le Tissu osseux

I Les os

L'organisation structurelle, tissulaire et cellulaire du tissu osseux squelettique assure trois fonctions dans l'organisme :

- Une fonction mécanique assurant le soutien et la protection de l'organisme,
- Une fonction métabolique régulant l'homéostasie phospho-calcique sérique en électrolytes : l'os constitue chez l'homme 99 % des réserves de calcium et 90 % des réserves de phosphore de l'organisme [46],
- Une fonction hématopoïétique abritant les cellules souches de la moelle osseuse.

L'homme adulte possède 206 pièces osseuses, réparties selon deux classifications. La première classification est fondée sur la localisation anatomique de l'os : axiale ou appendiculaire. Le squelette appendiculaire comporte 126 os formant les quatre membres ainsi que leurs insertions sur le squelette axial. Le squelette appendiculaire englobe également les os de la ceinture

scapulaire (clavicule, scapula) et de la ceinture pelvienne. Les 80 os du squelette axial regroupent les os du tronc et de la tête.

La seconde classification se fonde sur la géométrie de l'os considéré. Ainsi les os peuvent être regroupés sous trois formes : les os longs, les os plats et les os sésamoïdes. Les os sésamoïdes sont des petits os ronds situés aux interfaces articulaires comme la patella, les os du carpe et du métacarpe. Les os longs sont le plus souvent des os porteurs engagés dans la mobilité du corps. Ils ont la particularité d'avoir une architecture commune symétrique; à savoir, trois parties : l'épiphyse, la métaphyse et la diaphyse, (symétriques selon l'axe proximal/distal, au niveau de la diaphyse (Figure 1)). L'épiphyse est recouverte de tissu cartilagineux formant l'articulation avec un second os. La métaphyse est la zone intermédiaire entre la diaphyse et l'épiphyse. La métaphyse est le siège de la croissance osseuse. La diaphyse forme le corps principal de l'os long.

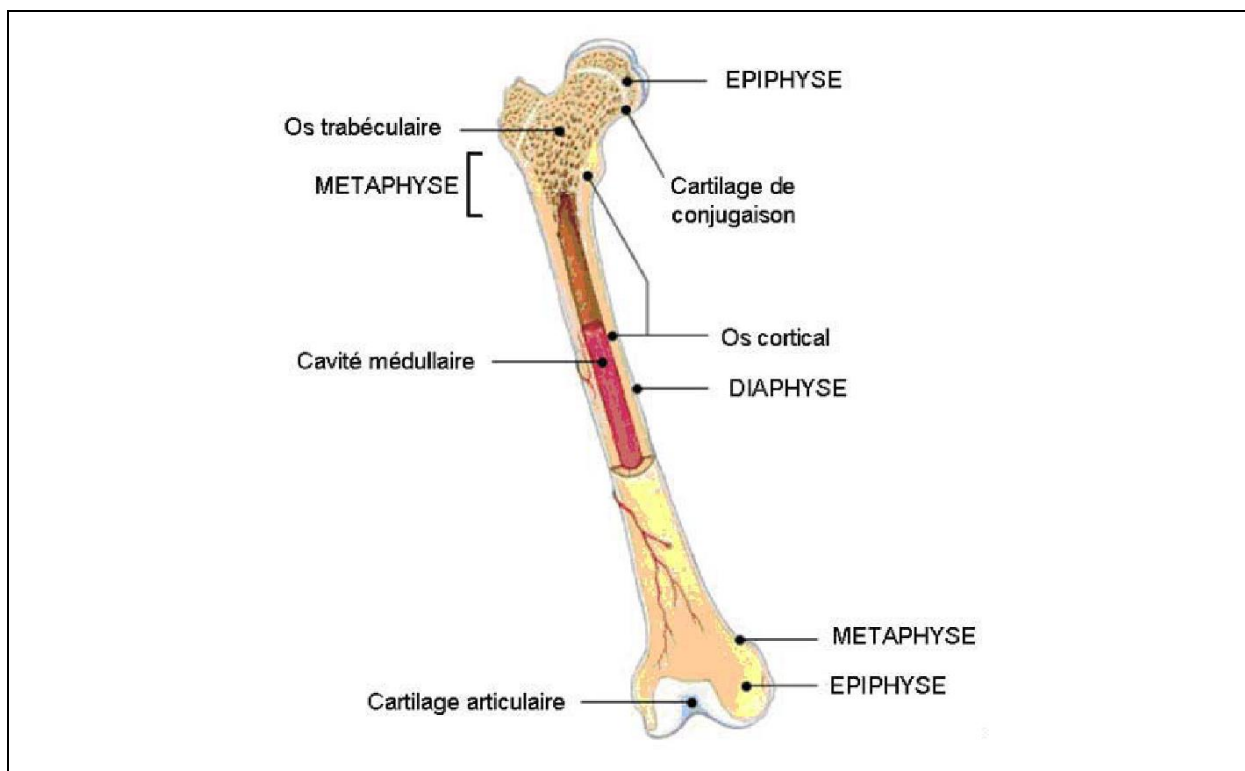


Figure 1: Représentation de la structure d'un os long, ici le fémur. Reproduit de « Anatomy&Physiology, OpenStaxCollege », <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

Sur le plan anatomique, les os longs sont formés de deux structures ou tissus ayant la même composition, mais avec un agencement différent : le tissu osseux cortical et le tissu osseux trabéculaire.

Le tissu osseux cortical recouvre en périphérie l'intégralité de l'os, il est majoritairement présent sur la diaphyse formant le canal médullaire, réservoir de la moelle osseuse jaune. Au niveau de la diaphyse, le tissu osseux cortical se comporte comme un tube ou cylindre creux ayant des propriétés mécaniques de résistance aux compressions et aux torsions.

Le tissu osseux trabéculaire a une structure qualifiée de spongieuse, localisée au niveau des épiphyses des os longs. Ce tissu forme la totalité de la surface interne des os plats et sésamoïdes, le tissu cortical venant recouvrir la périphérie sur une faible épaisseur.

II Agencement spatiale et composition du tissu osseux

2.1. Microarchitecture

2.1.1. L'os trabéculaire

Le tissu osseux trabéculaire se présente sous la forme d'un maillage tridimensionnel formé de travées d'environ 50 µm d'épaisseur en moyenne. Ce réseau est assimilé à des plaques reliées entre elles par des poutres. Le mot trabécule vient du latin « *trabes* » qui signifie poutre. Chaque travée présente une organisation lamellaire semblable au tissu osseux cortical, mais sans le système de Havers (Figure 2). Le tissu trabéculaire de par sa géométrie offre une surface d'échange importante, justifiant le haut niveau de remodelage osseux dans cette zone. Cette configuration illustre la loi de Wolff qui décrit la plasticité du tissu osseux, modelant sa microarchitecture en fonction des contraintes qu'il subit (cf. Partie II).

Cette structure offre une résistance mécanique (limite élastique) légèrement plus faible (15%) à celle de l'os cortical pour une masse équivalente à 25% de la masse de l'os cortical [47]. Ces propriétés mécaniques sont importantes car le tissu osseux trabéculaire est la principale structure porteuse sur les corps vertébraux mais également lors des transferts de charge au niveau des articulations. La résistance mécanique de l'os trabéculaire dépend du site anatomique et de la direction exercée par la charge. Ainsi Day *et al.*, en 2001, [48] ont observé une augmentation du volume osseux trabéculaire sous chondral lors d'une lésion du cartilage pour compenser la perte de résistance des tissus cartilagineux.

Dans la majorité des os, le réseau trabéculaire est le tissu de soutien de la moelle osseuse rouge, lieu de l'hématopoïèse.

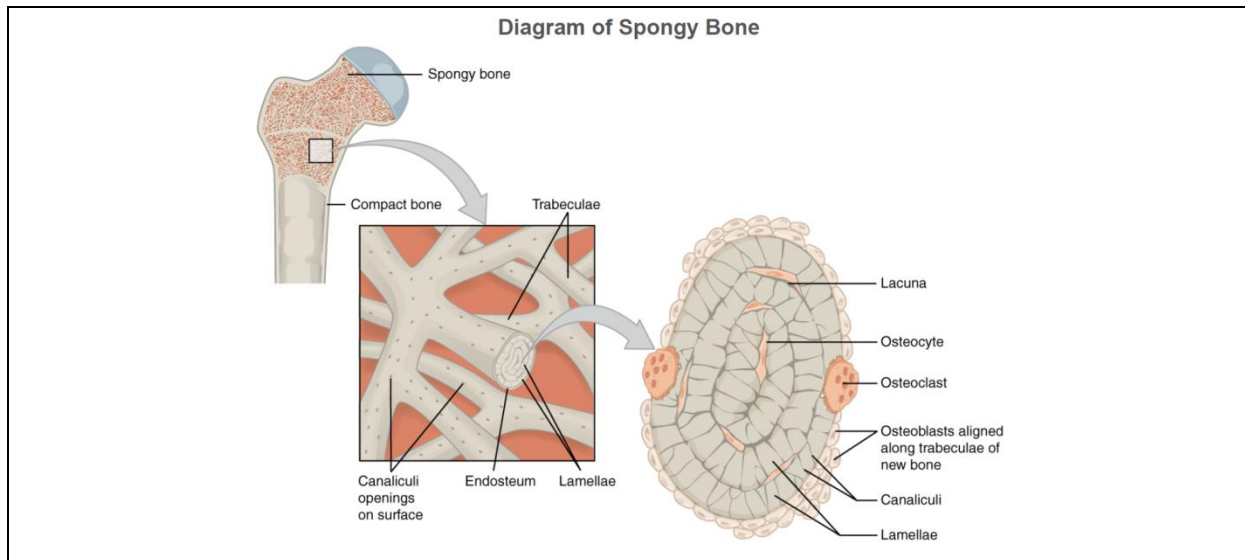


Figure 2: Représentation de l'organisation du tissu osseux trabéculaire; reproduit de « Anatomy & Physiology, OpenStaxCollege », <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

2.1.2. L'os cortical

La portion corticale est l'association de plusieurs unités fonctionnelles appelées ostéons. Sur une coupe transversale d'os, les ostéons se présentent comme une succession de petits cylindres. Chaque ostéon s'organise par la superposition de lamelles osseuses concentriques, délimitant en son centre le canal de Havers.

La taille des unités lamellaires est d'environ 3 à 5 μm d'épaisseur [49]. L'ostéon forme un cylindre creux perforé perpendiculairement par les canaux de Volkmann reliant transversalement les ostéons les uns aux autres. Les canaux de Havers et de Volkmann accueillent en leur sein les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et l'innervation (Figure 3). La limite extérieure des ostéons est marquée par la ligne de ciment, avoisinant l'os interstitiel (entre les ostéons), fruit des anciens ostéons remodelés. La partie corticale est délimitée respectivement sur la surface externe par le périoste et sur la surface interne par l'endoste. Ces deux couches forment des feuillets de tissus conjonctifs de soutien. Le périoste reçoit les enthèses venant s'insérer sur l'os.

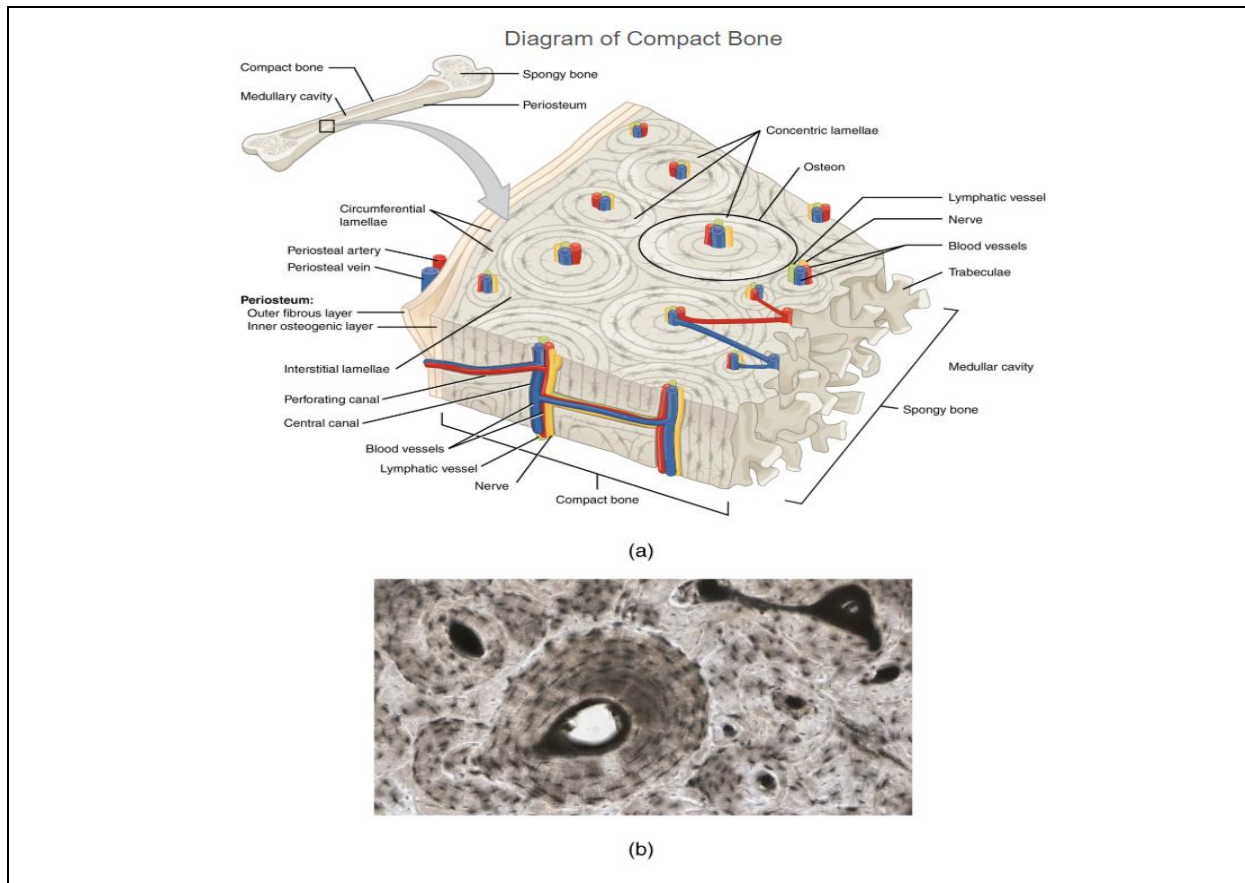


Figure 3: (a) Représentation d'une coupe d'os cortical illustrant le système Havers. (b) micrographie de l'ostéon, présentant les lamelles concentriques et les canaux centraux. (Microscope optique $\times 40$). Reproduit de « Anatomy&Physiology, OpenStaxCollege », <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.

2.2. Le réseau lacuno-canaliculaire ostéocytaire

Le réseau lacuno-canaliculaire est la plus petite structure osseuse qui accueille en son sein les ostéocytes reliés entre eux et aux autres cellules par leurs dendrites. Ce réseau permet la circulation du liquide interstitiel dans l'espace lacuno-canaliculaire qui transporte les nutriments, l'oxygène et les facteurs qui seront impliqués dans la signalisation depuis et vers les ostéocytes, via la circulation. Ce réseau permet l'interconnection de tous les compartiments constitutifs de l'os (Figure 4). Ce réseau permet aux ostéocytes de communiquer avec toutes les cellules (osseuses, endothéliales, nerveuses, souches mésenchymateuses) et de percevoir les contraintes mécaniques ce qui permet aux ostéocytes d'assurer la fonction de cellule mécanosensorielle, fonction essentielle pour le maintien de l'homéostasie osseuse [50,51]. Les détails de la transduction du signal des contraintes mécaniques et de leur perception par les ostéocytes pour adapter le tissu osseux sont détaillés dans la .Partie II 1.1

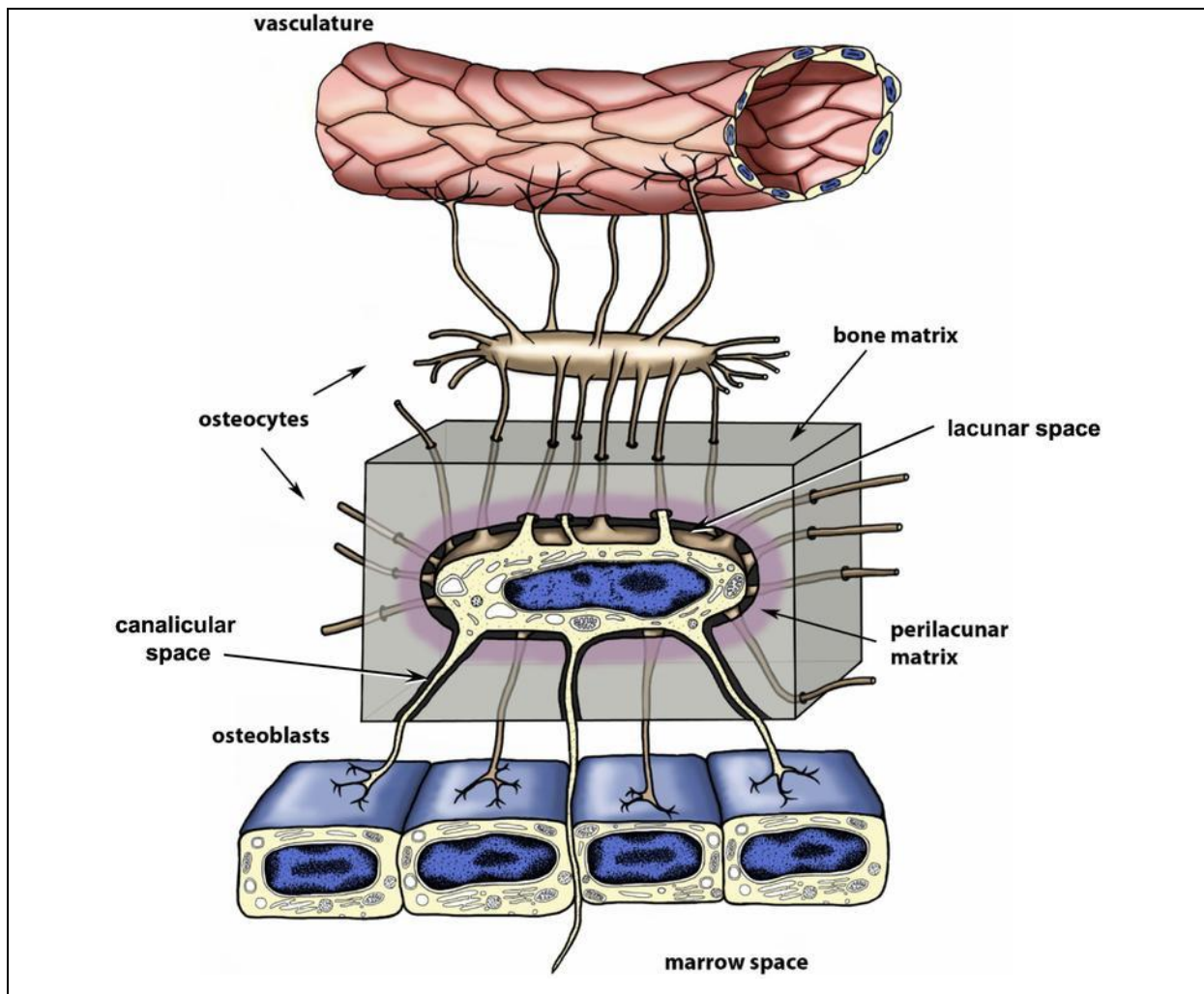


Figure 4: Illustration du système lacuno-canaliculaire et des processus dendritiques ostéocytaires (issu de Tiede-Lewis *et al.*, en 2019 [48]).

2.1. Composition du tissu osseux

2.1.1. Les cellules osseuses

Le tissu osseux est modelé grâce à l'implication de quatre types cellulaires (ostéocyte, ostéoblaste, ostéoclaste, cellule bordante) ayant des origines embryonnaires différentes. Les cellules osseuses sont soit incluses dans la matrice extracellulaire (MEC), soit au bord de la moelle osseuse. La MEC du tissu osseux étant solide, les cellules piégées au sein de cette matrice (ostéocytes) se nourrissent et communiquent au travers de canalicules où circule le liquide interstitiel.

2.1.1.1. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes localisées au niveau du périoste et de l'endoste, recouvrent la MEC. Ce sont de jeunes ostéoblastes quiescents. Les cellules bordantes empêchent les ostéoclastes de

résorber l'os. Le cas échéant, ils sont susceptibles d'être réactivés par les ostéocytes lors d'un cycle de remodelage (voir .Partie I 3.2).

2.1.1.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices de 20 à 30 μm de diamètre, de forme cubiques ou polygonales, arborant un cytoplasme riche en organites (appareil de Golgi volumineux, réticulum endoplasmique granulaire abondant). Les ostéoblastes jouent un rôle prépondérant dans la création et le maintien du tissu osseux. Ils sont responsables du dépôt de la matrice osseuse et indirectement contribuent à la régulation du fonctionnement des ostéoclastes. Les ostéoblastes dérivent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sous l'influence de facteurs présents dans le microenvironnement de la moelle osseuse (Figure 5). La différenciation des CSM vers la lignée ostoblastique est étroitement régulée par deux voies canoniques qui sont la voie des BMP (« Bone Morphogenetic Proteins ») et la voie Wnt (Figure 6) [52]. Elle est également régulée par d'autres voies communes à d'autres lignées cellulaires comme les voies du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et de Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B). La fixation des BMPs sur les récepteurs membranaires RI ou RII de type sérine thréonine kinase, conduit à leur phosphorylation, transmettant le signal par l'intermédiaire de la voie des protéines Smad 1, 5 et 8 phosphorylées (Figure 5). Les Smads activés forment un complexe avec Smad 4 qui migre dans le noyau et active des facteurs de transcription et des co-activateurs transcriptionnels ostéoblastiques tels que Dlx5 (distal-less homeobox 5), Runx 2 (Runt-related transcription factor 2) et Osx (Osterix) [52]. Les cellules ostéoprogénitrices qui ont été activées et engagées par les principaux facteurs de transcription ostéogéniques maîtres de la différenciation (Runx2, Osx, Dlx5), se différencient en pré-ostéoblastes, suite à la transcription des gènes ostéogéniques précoces. Ces gènes regroupent la phosphatase alcaline (ALP), le collagène 1 α 1 (COL1A1), l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse II (BSP II) [52]. Ces gènes seront conservés et exprimés tout au long de la vie des ostéoblastes matures (Figure 5) avec l'arrivée de marqueur tardif tel que l'ostéocalcine (OCN). Les ostéoblastes synthétisent les protéines de la MEC et participent à la calcification via les enzymes sécrétées comme l'ostéocalcine (Cf. .Partie I 2.1.2). La durée de vie moyenne des ostéoblastes humains est estimée à 3 mois [53]. Les ostéoblastes matures dérivent soit en ostéocytes, soit en cellules bordantes, ou meurent par apoptose.

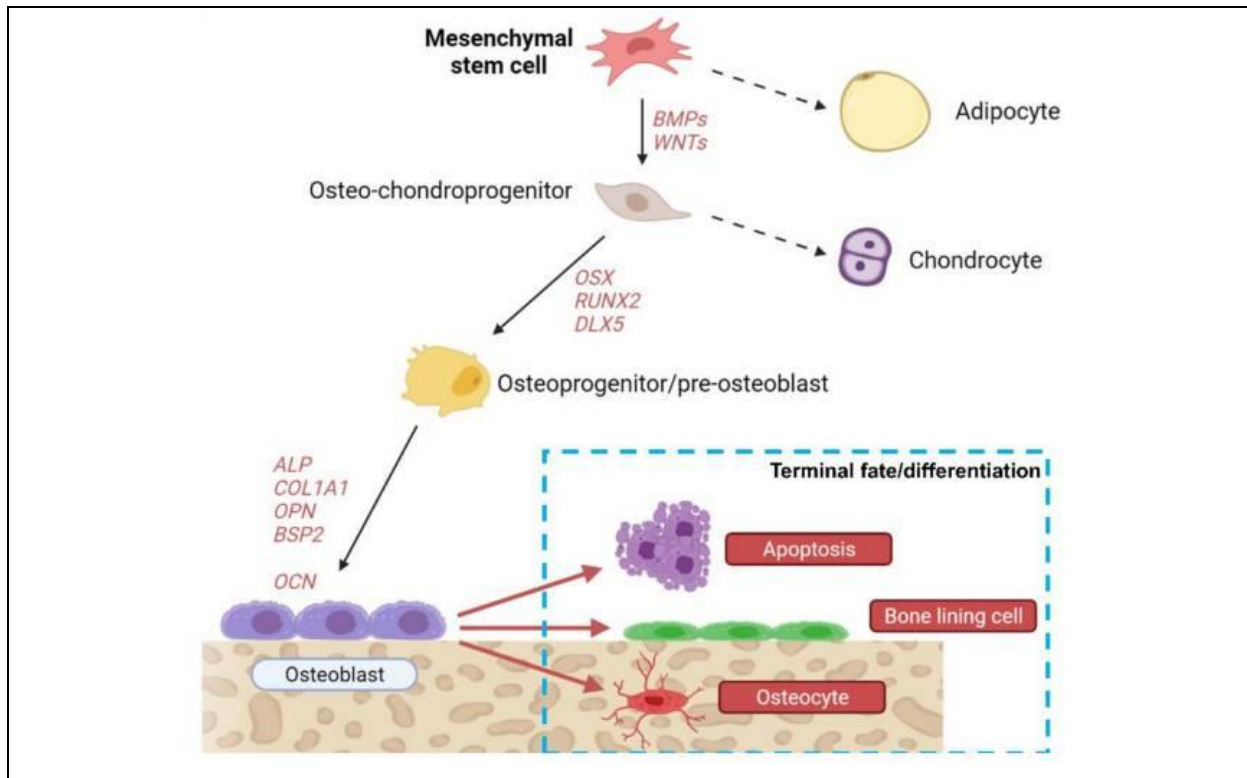


Figure 5 : Schéma des principaux facteurs de différenciation conduisant les cellules souches mésenchymateuses vers la voie ostéoblastique. Image issue des travaux de Ponzetti M, *et al.* en 2021 [52].

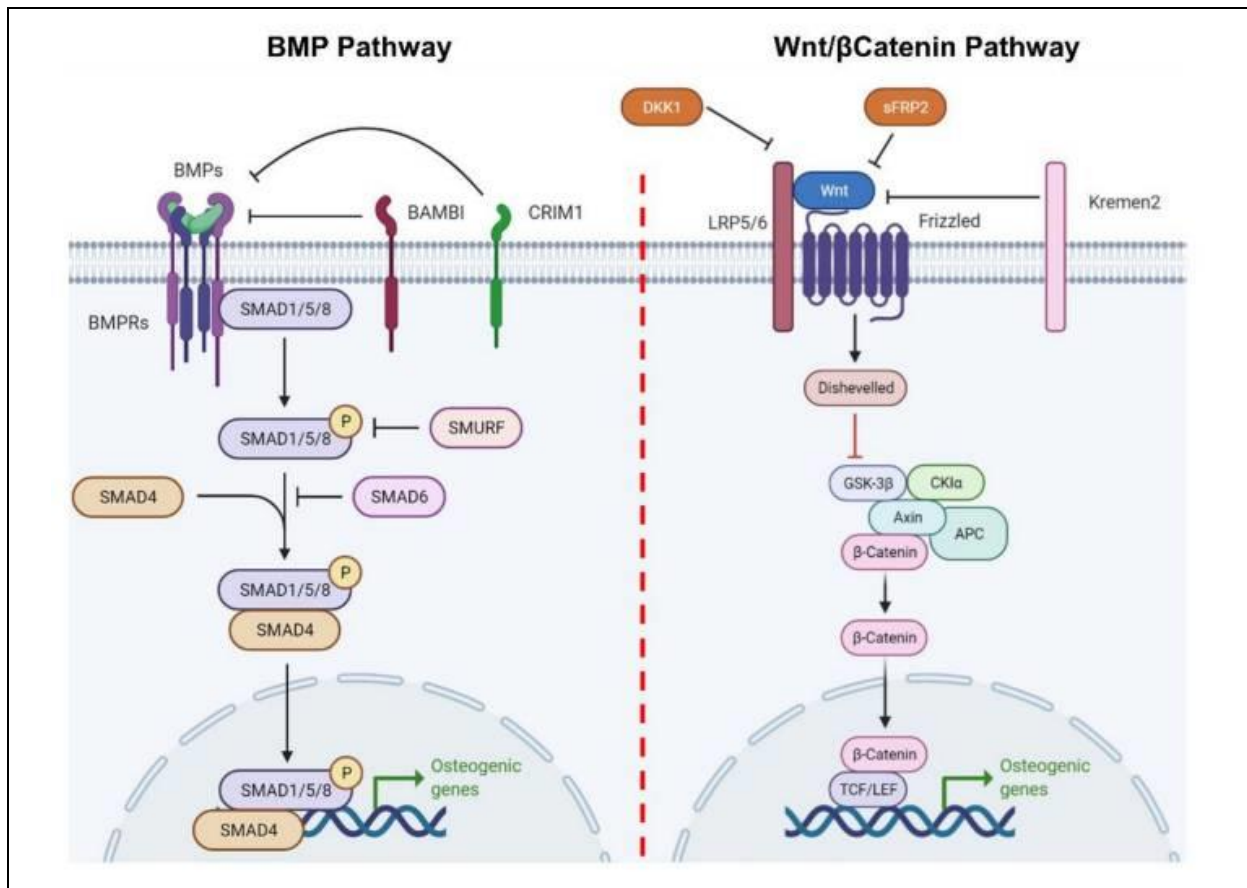


Figure 6 : Schéma illustrant les deux principales voies canoniques de la différenciation ostéogénique. Image issue des travaux de Ponzetti M, *et al.* en 2021 [52].

2.1.1.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont de vieux ostéoblastes différenciés et inclus dans la MEC, et qui ont une durée de vie estimée à environ 25 ans [54]. Ils sont plus petits que les ostéoblastes, présentent un cytoplasme avec de nombreuses dendrites (Figure 7). Les ostéocytes sont les chefs d'orchestre du remodelage osseux [32]. Au niveau de l'os cortical, la population d'ostéocytes représente 95% des cellules osseuses [55]. Les ostéocytes sont estimés à environ 20 000 à 80 000 cellules par millimètre cube de tissu osseux [56]. Les ostéocytes siègent dans des cavités appelées ostéoplastes (ou lacunes) reliées les unes aux autres par des canalicules où résident les dendrites [57]. Les ostéocytes communiquent entre eux et avec les ostéoblastes via les dendrites grâce à des jonctions communicantes et les intégrines [58,59]. Ces cellules, dites sentinelles sont mécano-sensibles au travers des canalicules.

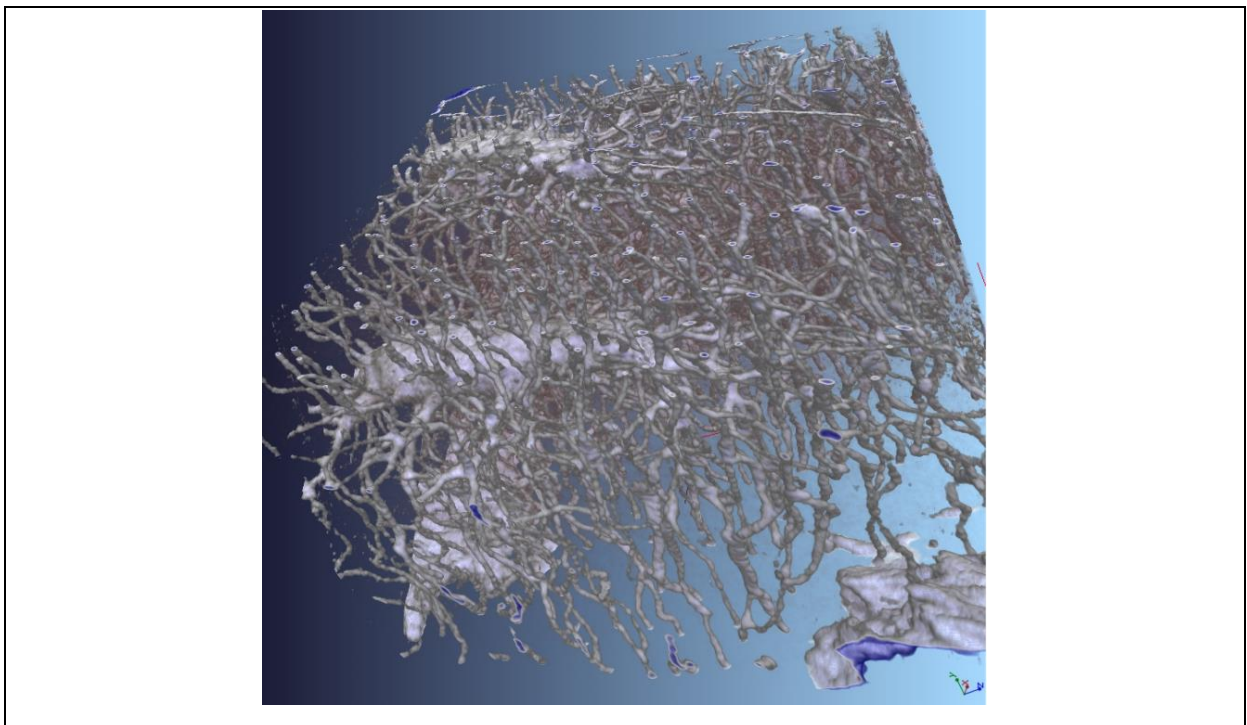


Figure 7: Image d'ostéocytes et de leur réseau lacuno-canaliculaire obtenue par imagerie Ptychographique sur la ligne de lumière C-SAXS de la Swiss Light Source, au Paul Scherrer Institute à partir de section corticale tibiale de rat Wistar mâle adulte. Image produite par les Docteurs Cameron Kewish et Stéphane Pallu.

La membrane cytoplasmique des ostéocytes présentent des intégrines (cf .Partie II 1.2.1). Ce sont des protéines transmembranaires connectant le cytosquelette à la MEC. Les forces mécaniques générées sur le tissu osseux créent à l'échelle microscopique des flux de liquide

interstitiel au sein des canalicules (et de la lacune) induisant de fortes contraintes membranaires. Les intégrines, ainsi stimulées, activeraient les voies de mécano-transduction et de signalisation ostéocytaires [60]. Les jonctions communicantes des prolongements dendritiques atteignent en plus des cellules osseuses, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins osseux formant un syncytium fonctionnel qui permet la transduction des signaux.

Pendant sa maturation et sa différenciation au sein de la matrice osseuse, l'ostéocyte subit des modifications morphologiques. Il adopte un appareil de Golgi étendu, un grand nombre de ribosomes et un réticulum endoplasmique très développé. Ces changements sont accompagnés par une modification de l'expression des marqueurs membranaires, cytoplasmiques et nucléaires [61]. Par exemple, les expressions de la phosphatase alcaline, de l'ostéocalcine, du collagène de type I et de Runx2 diminuent, tandis que celle de l'ostéopontine reste stable et celle de podoplanine augmente considérablement. De nouveaux marqueurs, comme le CD44 DMP-1 et la MEPE, puis la sclérostine, font leur apparition [55,62] (Figure 8) et (Tableau 1).

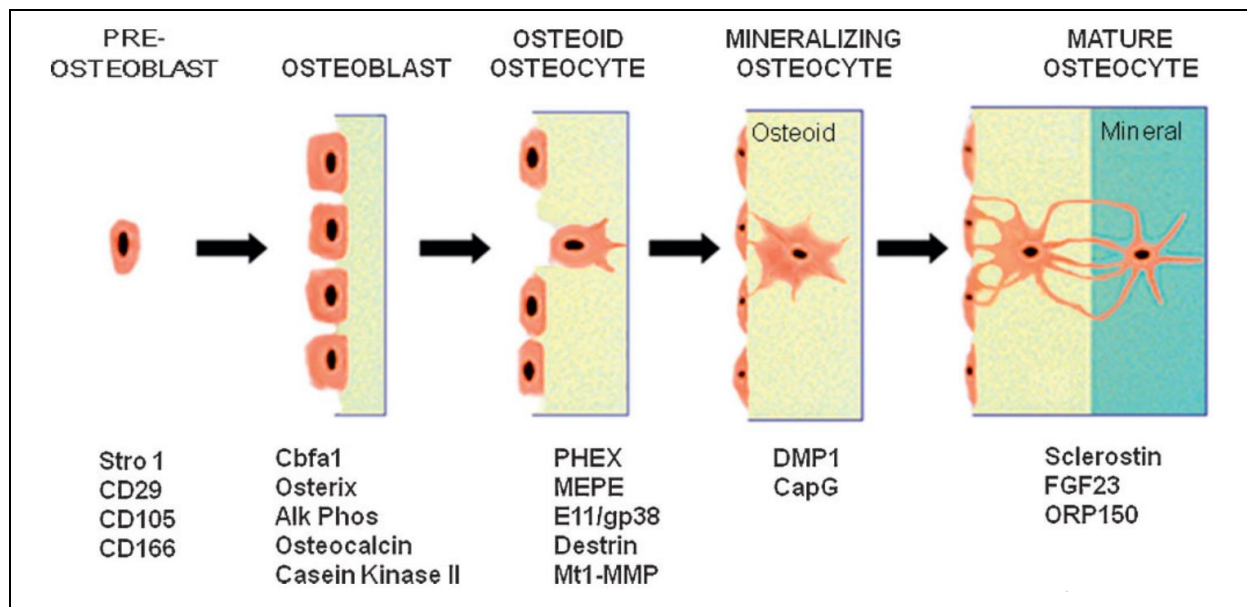


Figure 8: Illustration des différents marqueurs exprimés au cours de la différenciation des ostéoblastes en ostéocytes matures. Issu des travaux de Bonewald en 2011 [62].

Tableau 1: Liste des marqueurs moléculaires impliqués dans la différenciation des ostéocytes. Issu de Rochefort *et al.*, en 2010 [55].

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

2.1.1.4. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont de grosses cellules mobiles plurinucléées de 20 à 100 μm de diamètre, possédant un cytoplasme riche en appareils de Golgi, en mitochondries et en lysosomes [63,64]. Les ostéoclastes sont des cellules ostéo-résorbantes. Ces cellules ont la particularité d'être issues de cellules souches hématopoïétiques, appartenant à la lignée myéloïde. La production locale par les ostéoblastes de cytokines pro-ostéoclastogènes (M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor et NF κ B : Nuclear Factor-kappa B) induit la différenciation des monocytes vers la lignée des ostéoclastes [65,66]. Ce processus de différenciation conduit à la fusion de plusieurs pro-ostéoclastes entre eux pour former un polycaryon géant (Figure 9). Le pré-ostéoclaste ainsi formé est activé par le RANKL produit par les ostéoblastes ce qui induit la modification des caractéristiques morphologiques et une maturation des ostéoclastes. La fixation de RANKL sur son récepteur conduit à l'expression de gènes cibles notamment la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) et la cathepsine K [67]. Les ostéoclastes activés présentent une polarisation délimitant deux domaines actifs : un domaine présentant une bordure en brosse à l'intérieur de la zone de scellement, lieu de la résorption osseuse et un domaine sécrétoire fonctionnel du côté opposé de l'os [68] (Figure 9). Ces domaines sont séparés par un anneau périphérique de scellement, étanche, délimitant la lacune d'Howship. Cet anneau est formé de podosomes assurant la jonction de la membrane cellulaire à la MEC. La zone de scellement formant la chambre de digestion est essentielle à la fonction de résorption

efficace des ostéoclastes en attachant la cellule à la surface osseuse sous-jacente et en scellant la fosse de résorption, dans laquelle les ostéoclastes sécrètent activement par les lysosomes au travers de la bordure en brosse des enzymes protéolytiques et des acides qui érodent progressivement la surface osseuse. Les produits de digestion sont évacués par le domaine sécrétoire fonctionnel [68]. Les ostéoclastes ne sont pas simplement des cellules de résorption osseuse, ces cellules ont également des fonctions importantes dans la régulation des ostéoblastes et des cellules immunitaires dans les états pathologiques [69,70].

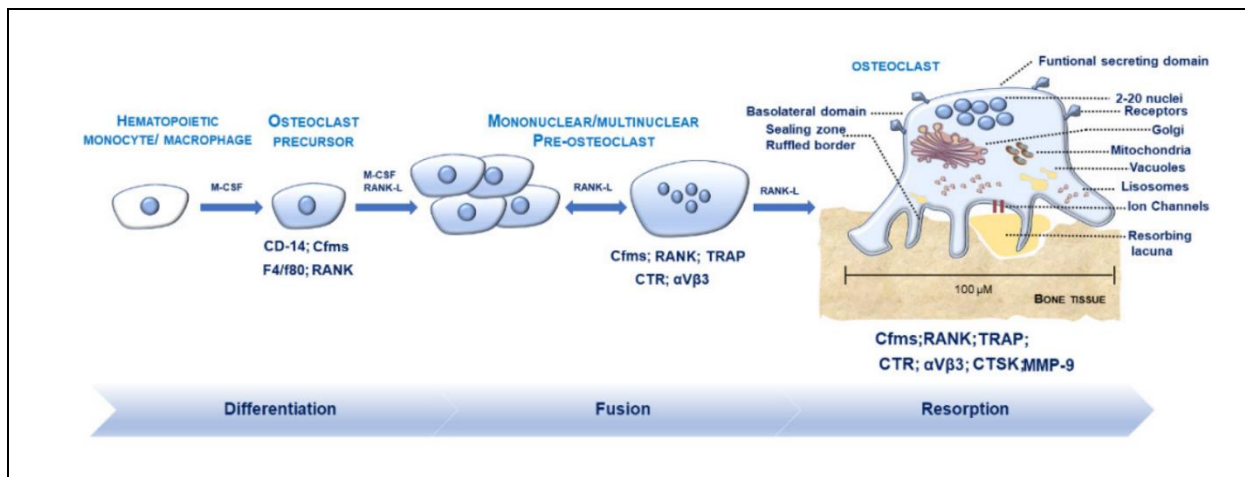


Figure 9: Schéma de la différenciation ostéoclastique à partir des monocytes sous l'action des facteurs pro-ostéoclastogènes. En fonction des stades de maturation, l'expression génique des ostéoclastes est modifiée. La stimulation par RANKL induit la fusion des précurseurs ostéoclastiques en pré-ostéoclastes, puis en ostéoclastes polarisés matures. Issu de Gambari *et al.*, en 2020 [66].

2.1.2. La matrice extracellulaire

Le tissu osseux appartient à la famille des tissus conjonctifs. Ce sont des tissus de soutien qui permettent d'assurer la liaison entre les organes et les tissus. Les tissus conjonctifs sont constitués de cellules spécialisées qui se différencient en fonction de la nature de ce dernier. Les cellules du compartiment stromal de la moelle osseuse sont issues de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules « baignent » dans la matrice extracellulaire (MEC) qui est constituée par des fibres associées à une substance fondamentale. Les caractéristiques de la MEC varient selon le tissu considéré. La MEC du tissu osseux est formée d'une phase minérale et d'une phase organique. L'agencement de ces deux phases fabrique un matériau à la fois rigide et élastique, ce qui permet au tissu osseux de résister aux contraintes mécaniques de déformation.

La phase organique est majoritairement composée de protéines collagéniques (collagène de type I) présente à hauteur de 90 à 95% du tissu, et de protéines non collagéniques en faible quantité. Les protéines non collagéniques telles que les protéoglycanes, l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine forment 10% de la phase organique [71].

Le collagène fibrillaire de type I est une glycoprotéine de 300 kDa formée de trois brins (2 chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$) agencés en triple hélice à pas droit d'une longueur de 3000 Å et de 50 Å de diamètre. Les chaînes sont codées par le gène COL1A1 situé sur le chromosome 17 et le gène COL1A2 situé sur le chromosome 7. Les gènes sont traduits sous forme de pro-peptides et transloqués dans le réticulum endoplasmique où ils vont subir des hydroxylations et des glycosylations. Les monomères se présentent sous la forme d'hélices à pas gauche, précurseurs du pro-collagène. Ils vont être clivés dans l'appareil de Golgi et agencés pour former la triple hélice à pas droit du pro-collagène [72]. La formation et la stabilisation de la triple hélice est appuyée par une protéine chaperonne Hsp47 (Heat shock protein 47) [73]. Les pro-collagènes vont être exportés dans la matrice extracellulaire où les pro-peptides N et C terminaux seront clivés pour former le tropocollagène. Chaque molécule immature de tropocollagène s'assemblera avec les autres par co-réticulation pour former les fibrilles. Les fibrilles vont être stabilisées par des protéines COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) (thrombospondine-5) afin de former le réseau de fibres de collagène mature (Figure 10) [74].

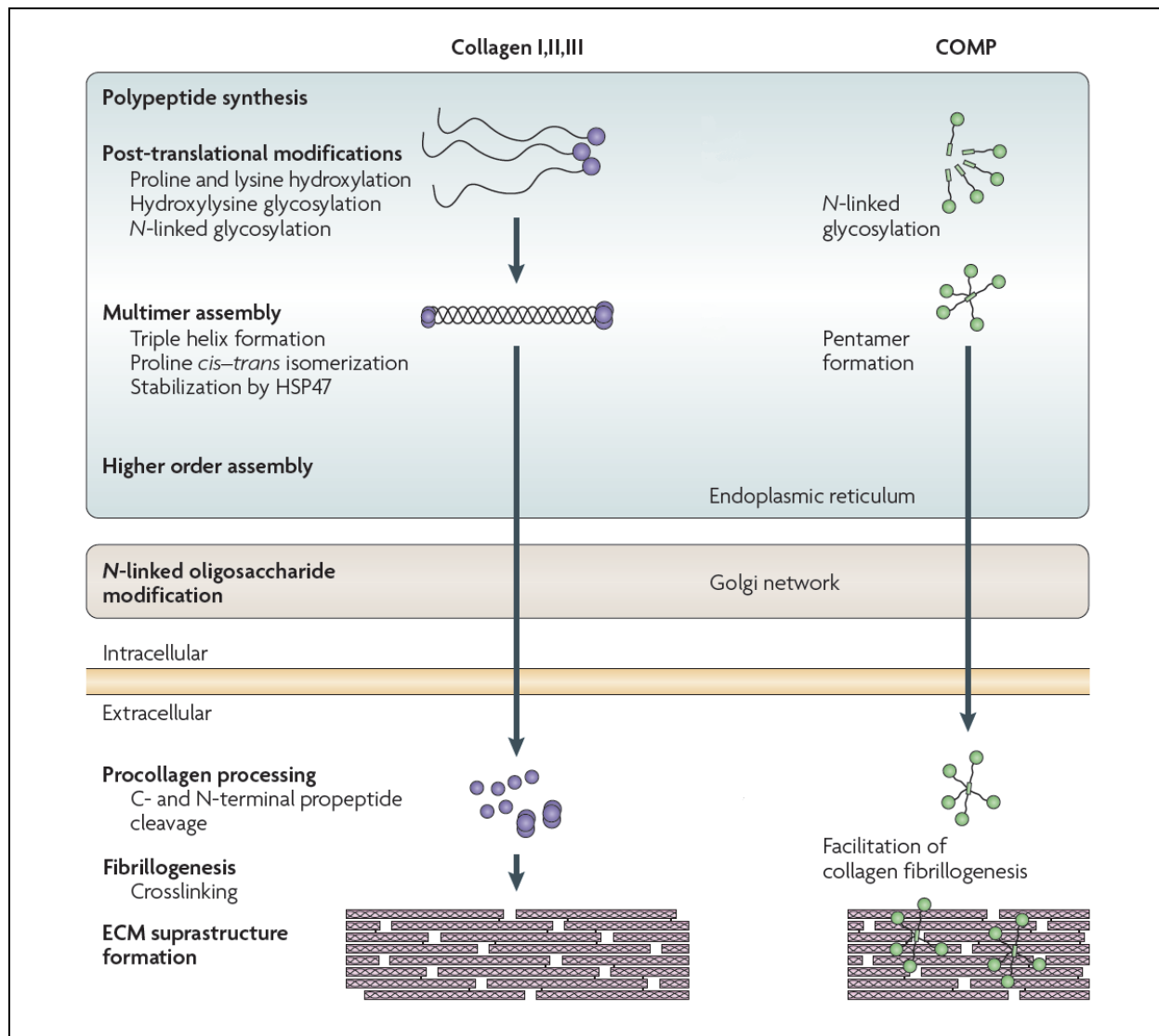


Figure 10: : Synthèse du collagène fibrillaire et des protéines COMP ; reproduit de Bateman et al 2009 [71].

Les protéines non collagéniques assurent plusieurs fonctions comme la liaison des cellules avec la MEC, la régulation du métabolisme osseux et la différenciation cellulaire (facteurs de croissance) (Tableau 2).

Tableau 2: Présentation des principales protéines non collagéniques formant la phase organique de la MEC du tissu osseux avec leurs fonctions. Tableau adapté partiellement à partir de la thèse de Céline Bourzac soutenue en 2020 selon les travaux de Gentili *et al.*, en 2009 [75], Malaval *et al.*, en 2009 [76] et de Charoenlarp *et al.*, en 2017 [77].

Composants	Fonctions
Protéines carboxylées sur les résidus acide glutamique :	
Gla-protéine matricielle	Inhibition de la minéralisation
Ostéocalcine	Régulation des ostéoclastes, inhibition de la minéralisation
Vitronectine	Attachement cellulaire
Protéines SIBLINGS (small integrin binding ligand N-linked glycoprotein)	
Ostéopontine	Inhibition de la minéralisation et du remodelage
BoneSialoprotéine osseuse (BSP)	Initiation de la minéralisation
MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein)	Régulation du métabolisme du phosphate
Protéines non SIBLINGS	
Ostéonectine	Régulation du diamètre/arrangement des fibrilles de collagène
Thrombospondine	Protéine d'adhérence
Fibronectine	Protéine d'adhérence
Glycosaminoglycanes/Protéoglycanes	
	Opposition aux forces de compression, régulation des facteurs de croissance, cytokines, organisation de la matrice
Décorine	Régulation du diamètre des fibrilles de collagène, liaison au TGF- β
Biglycane	Liaison au collagène, TGF- β , déterminant génétique du pic de masse osseuse
Versicane	Définition de la zone destinée à devenir du tissu osseux
Hyaluronane	Association au Versicane pour définition de la zone destinée à devenir de l'os
Aggrécane	Organisation de la matrice, rétention Ca, P

La phase minérale est composée de cristaux d'hydroxyapatite et de faibles quantités de carbonates, de magnésium, de phosphates, de strontium, de sodium et de fluor ; le tout formant les lamelles. Les fibres de collagène forment un échafaudage où s'organisent les cristaux d'hydroxyapatite en forme de plaque de 2 à 5 nm d'épaisseur, de 15 à 55 nm de longueur et de 5 à 25 nm de largeur (Figure 11) [78]. La nucléation ou minéralisation des cristaux d'hydroxyapatite sur les fibres de collagène nécessiterait des sites de pré-nucléations organisés en grappes ou « clusters » de phosphates de calcium amorphes qui amorceraient la formation

des agrégats de calcium [79]. La nucléation des minéraux sur les fibrilles de collagène se produirait sur des sites spécifiques à charge nette positive (extrémité C terminale) induisant la formation et l'orientation des agrégats [78]. Les acides aminés chargés tels que la lysine et l'arginine présents en nombre dans l'extrémité C terminale du collagène seraient fortement impliqués dans la nucléation. Cependant, ces domaines sur les fibres de collagène ne permettraient pas à eux seuls la formation des cristaux. Les fibres de collagène seraient appuyées par le concours des protéines non collagéniques phosphorylées chargées négativement présentes dans la MEC. Ces protéines chargées telles que l'ostéopontine, la « bone sialoprotein », attireraient les ions calcium et phosphates via leurs domaines d'acides aminés chargés comme l'acide aspartique, l'acide glutamique et la phosphosérine [80]. Elles augmenteraient la concentration locale en hydroxyapatite, à un niveau suffisant pour former des noyaux de taille critique pouvant initier la nucléation. Cependant, la nucléation de l'hydroxyapatite se produirait dans des zones spécifiques (« trou »: « hole zone », Figure 11) du collagène portant des acides aminés chargés positivement et négativement afin d'initier la nucléation intrafibrillaire. Ce processus est appuyé par des enzymes comme la phosphatase alcaline qui augmentent localement les concentrations en phosphates.

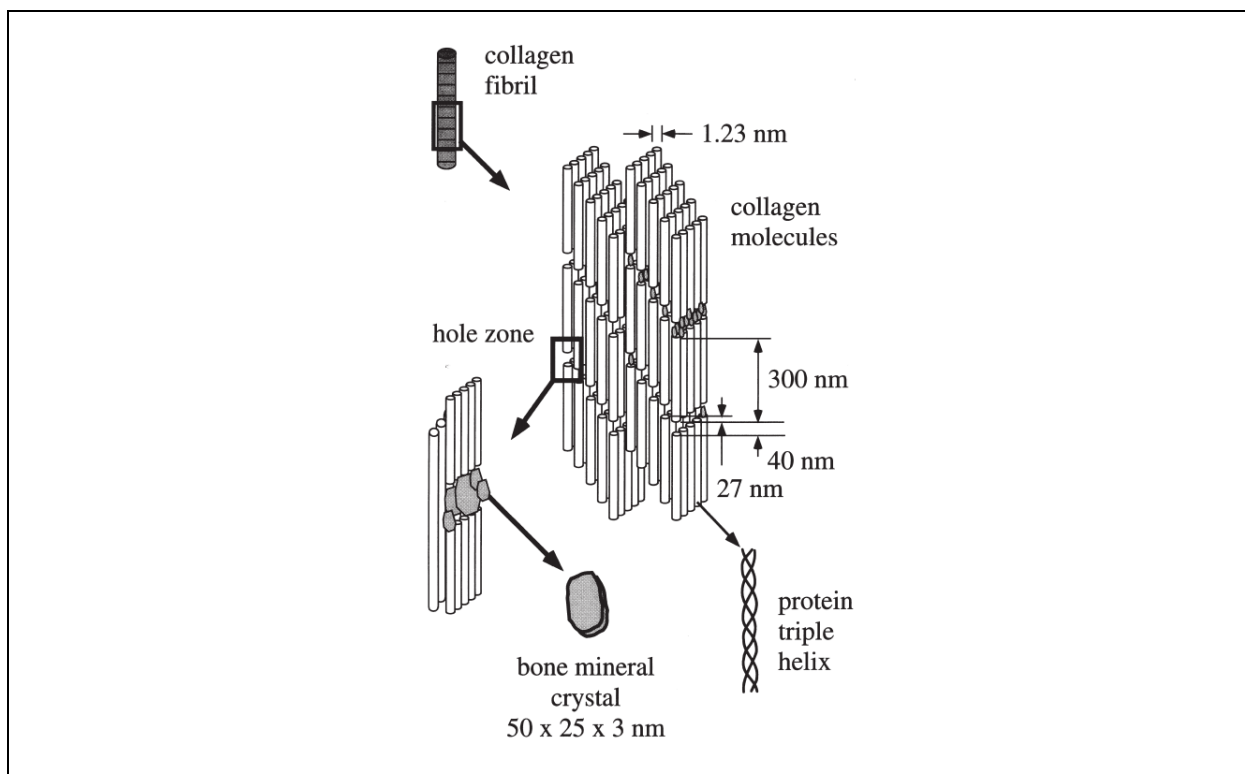


Figure 11 : Organisation macromoléculaire de la MEC du tissu osseux; issue de Rho *et al.*, 1998 [81].

2.2. Définition et facteurs déterminants la qualité osseuse

Le tissu osseux est un organe dynamique qui répond à plusieurs fonctions biologiques dont la principale est, le soutien du corps. Pour assurer cette fonction le tissu osseux doit adapter ses propriétés tissulaires pour répondre aux stimuli de son environnement [1]. La qualité osseuse est définie comme l'ensemble des propriétés structurales et tissulaires donnant au tissu osseux sa solidité. La qualité osseuse est l'association de nombreux facteurs, organisés de manière hiérarchique à différentes échelles et interconnectés. Ainsi, la résistance du tissu osseux est définie selon Fonseca *et al.* en 2014 [5] à trois échelles:

- ✓ la géométrie globale de l'os,
- ✓ la microarchitecture de l'os,
- ✓ les propriétés cellulaires et tissulaires (Figure 12) .

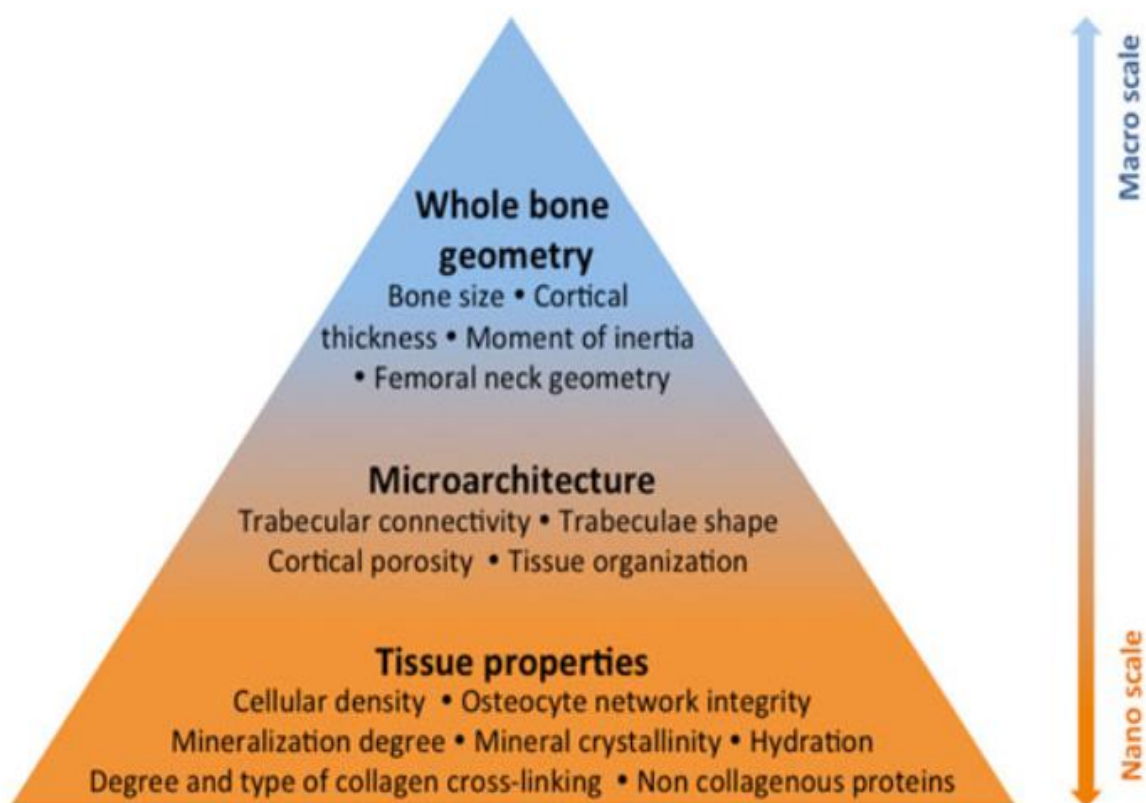


Figure 12: Illustration de la qualité osseuse définie par Fonseca *et al.*, en 2014 [5].

L'interconnexion de ces trois échelles confère au tissu osseux des propriétés anisotropiques c'est-à-dire, des propriétés mécaniques dépendantes de l'orientation des forces auxquels l'os est soumis [82,83]. Ainsi l'os est en capacité de répondre à des contraintes de flexion, de compression et de torsion [84]. En pratique clinique, l'évaluation de la qualité osseuse et donc de sa solidité repose sur la mesure de la densité minérale osseuse par absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA). Cette mesure fournit des informations uniquement sur la quantité de minéraux dans l'os. Une mesure au col du fémur ou au rachis lombaire reflète l'état de santé globale de l'ensemble du squelette. Cependant, la mesure de la densité minérale osseuse à elle seule ne permet pas réellement de définir la résistance du matériau osseux à la contrainte [85]. La moitié des fractures de la hanche liées à l'âge chez les femmes surviennent chez des personnes ayant une masse osseuse cliniquement normale ce qui implique un déficit de qualité osseuse [86].

2.2.1. Géométrie globale de l'os

La morphologie osseuse comprend la taille, la forme, le diamètre associé à sa surface en section transversale, le moment d'inertie (répartition des masses au sein d'un matériaux soumis à des mouvements de rotation ou de translation). La morphologie osseuse est étroitement associée à la notion de force osseuse et résistance à la fracture. Les os longs tels que le fémur ou le tibia sont assimilés à un cylindre creux. La résistance d'un cylindre soumis à une flexion, dépend du moment d'inertie, de la section transversale du cylindre, qui est lui-même fonction du diamètre (Loi de la flexion, formule d'Euler-Bernoulli). Ainsi, la section de la partie corticale et donc de son diamètre est cruciale pour la résistance osseuse. Une augmentation du diamètre osseux se traduit par une augmentation de la résistance à la flexion ou à la torsion de façon exponentielle, sans augmentation de la masse osseuse [87] (Figure 13).

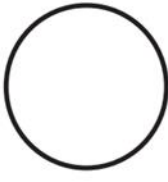
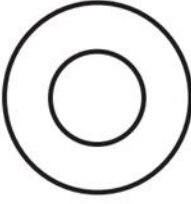
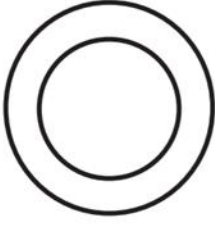
	A	B	C
			
Area	1	1	0.87
Resistance to tensile and compressive loads	100%	100%	87%
Resistance to bending and torsional loads	100%	164%	208%

Figure 13: Illustration de l'influence de la géométrie sur la résistance structurelle des structures circulaires. Issu de Buxsein en 2001 [88].

Ainsi, une section transversale diaphysaire cylindrique présente une rigidité en flexion et en torsion plus faible qu'une section transversale comportant la même quantité de tissu osseux mais, dont les diamètres interne et externe sont plus grands.

La forme du segment osseux définit également sa résistance selon l'angle de rotation (bras de levier). L'angle du col du fémur est un facteur de risque de fracture. Il a été montré que même pour une densité minérale osseuse inférieure, un col fémoral plus court et un angle plus faible est associé à une résistance osseuse supérieure comparés à des cols fémoraux plus longs [89].

2.2.2. Microarchitecture osseuse

Le tissu osseux est composé de deux structures complémentaires : la microarchitecture trabéculaire et la microarchitecture corticale. La microarchitecture trabéculaire est une organisation tridimensionnelle de travées et de poutres qui s'ordonnent pour résister aux contraintes de flexion et de torsion. Cette organisation selon des lignes de force a été observé en 1866. Herman von Meyer présentait une coupe de l'extrémité supérieure du fémur lors d'une conférence. Culmann, ingénieur et mathématicien reconnu dans la disposition trabéculaire ordonnée de l'os, une structure semblable à une grue Fairbairn, où les lignes de contraintes

maximales étaient déjà établies et correspondaient aux travées osseuses (Figure 14). Culmann proposa une loi aux biologistes, affirmant que le squelette est conçu pour supporter un maximum de charge avec un minimum de matériel. Cette idée fut validée, et en 1870, Wolff énonça sa célèbre loi stipulant que l'os se forme en réponse aux contraintes mécaniques qu'il subit [90].

Le tissu osseux cortical est semblable à un matériau plein, pouvant résister à des charges de compressions de traction et de cisaillement. L'association de ces deux structures permet une répartition des forces de contraintes ce qui donne aux os ses propriétés viscoélastiques. Par exemple en position unipodal le corps soumet le col fémoral à une charge de 300 kg. Cette résistance à la mise en charge, est dû à la répartition des forces de compression et de traction (Figure 14).

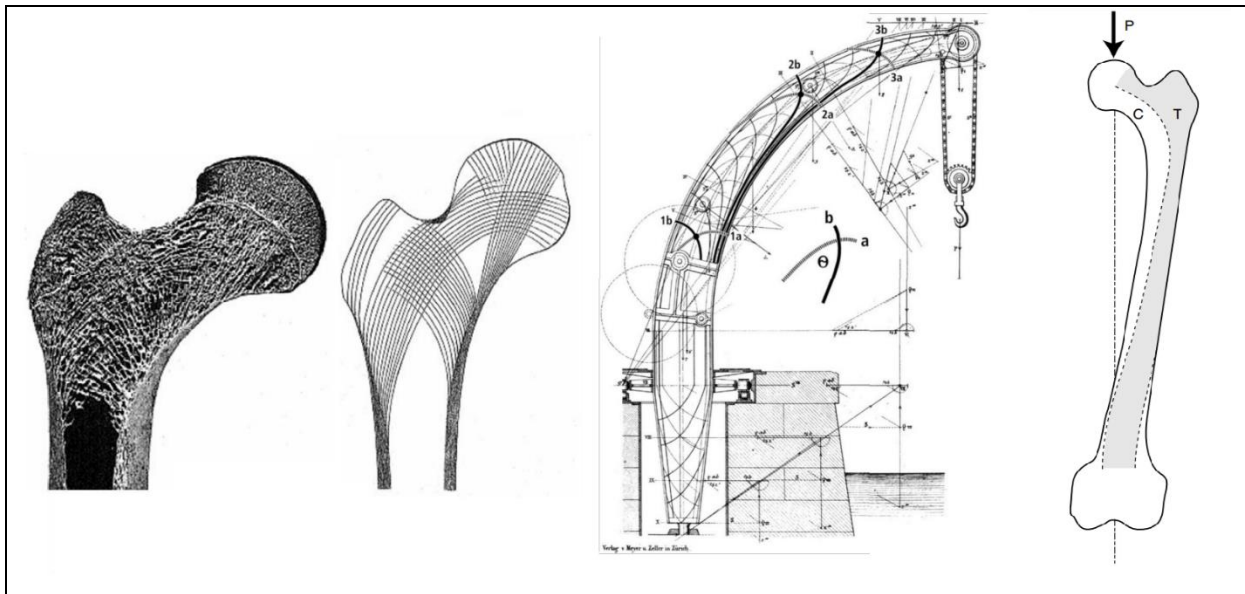


Figure 14: Illustration de résistance du tissu osseux. L'image de gauche représente l'organisation tridimensionnelle de la microarchitecture trabéculaire et la répartition des lignes de force. L'image centrale représente le schéma d'une grue Fairbairn. L'image de droite représente la répartition des charges de compression et de traction le long du fémur [90].

2.2.3. Méthodes de mesure de la qualité osseuse

En fonction de l'échelle, l'évaluation de la qualité osseuse repose d'une part, sur des méthodes physique (microarchitecture) et d'autre part, sur des méthodes histologiques (propriétés tissulaires). Les exemples de techniques énoncés ci-après sont non exhaustifs.

La méthode historique de référence pour mesurer la microarchitecture est l'histomorphométrie qui consiste suite à des coupes histologiques, à venir mesurer en deux dimensions la taille des travées et l'espace entre les travées. L'avènement des méthodes informatiques ont permis d'automatiser et de standardiser ces mesures. Cependant, cette méthode ne permettait pas d'évaluer la microarchitecture en trois dimensions. Les micro-tomographes à rayons X permettent d'acquérir des coupes de tissu osseux à des résolutions inférieures à 5 µm et de reconstruire un volume osseux en trois dimensions et de calculer automatiquement les paramètres morphométriques en trois dimensions. Le rayonnement X des très grands instruments tels que les Synchrotrons utilise un faisceau parallèle monochromatique qui permet des mesures nanométriques susceptible d'être utilisé pour caractériser le réseau lacuno-canaliculaire ostéocytaire.

L'évaluation des propriétés tissulaires repose sur les techniques d'histologie, d'immunohistochimie. Pour les ostéocytes, des sections transversales de la partie corticale permettent de connaître la densité cellulaire, la présence ou l'absence des ostéocytes dans leur lacune et l'éventuelle mort cellulaire par apoptose (immunomarquage à la caspase 3 clivée). L'activité des ostéoclastes est principalement évaluée par la coloration TRAP (« Tartrate Resistant Acide Phosphatase »). Cette coloration repose sur l'activité enzymatique des ostéoclastes. L'activité des ostéoblastes est évaluée par la mesure des fronts de minéralisation par la coloration Von Kossa. La qualité du collagène peut être évaluée par des méthodes de spectroscopie infrarouge ou Raman.

III Dynamique du tissu osseux

3.1. Formation et modelage du tissu osseux

L'ossification est le processus de formation des os, ponctuée par trois phases au cours de la vie :

- L'ossification *princeps in utero*,
- La croissance pendant l'enfance, puis de la puberté à la taille adulte,
- Le maintien du capital osseux à la sénescence.

Au premier stade de la vie embryonnaire, le squelette n'est qu'une ébauche de tissus fibreux et de cartilage hyalin. Le tissu osseux se développe depuis le mésoderme au cours de la sixième

semaine de vie embryonnaire à partir des somites. La différenciation des somites de la superficie vers la profondeur conduit à la formation du dermomyotome, du myotome et du sclérotome. L'ostéogénèse suit deux voies, l'ossification endochondrale et l'ossification intra-membraneuse. Quelle que soit la voie, le tissu osseux se développe à partir d'une matrice cartilagineuse synthétisée par les chondrocytes, définissant un cadre de formation osseuse.

Au cours de l'ossification intra-membraneuse, le tissu se développe à partir d'un amas de CSM indifférenciées. Cet amas engage la différenciation cellulaire pour former des cellules spécialisées qui synthétiseront les tissus vasculaires et osseux. Il conduira à l'emprisonnement des cellules dans une matrice ostéoïde (matrice osseuse non minéralisée), se modelant autour des capillaires formant le tissu trabéculaire [91]. Les ostéoblastes entourés de MEC deviendront des ostéocytes. Ce processus forme les os plats (os du crâne), il débute pendant le développement du fœtus et se poursuit jusqu'à l'adolescence.

L'ossification endochondrale forme la majorité des os du corps. Le cartilage sert de foyer de croissance où l'os se développe en remplaçant progressivement le cartilage hyalin en formation. A mesure que le cartilage croît, ce dernier est progressivement vascularisé créant le centre principal d'ossification vers le troisième mois de vie embryonnaire (Figure 15) [92]. Le périchondre est progressivement remplacé en périoste. Les chondrocytes et le cartilage continuent de croître aux extrémités de l'os formant les futures épiphyses et contribuant à l'augmentation de taille de l'os avec le remplacement du cartilage par le tissu osseux dans les diaphyses.

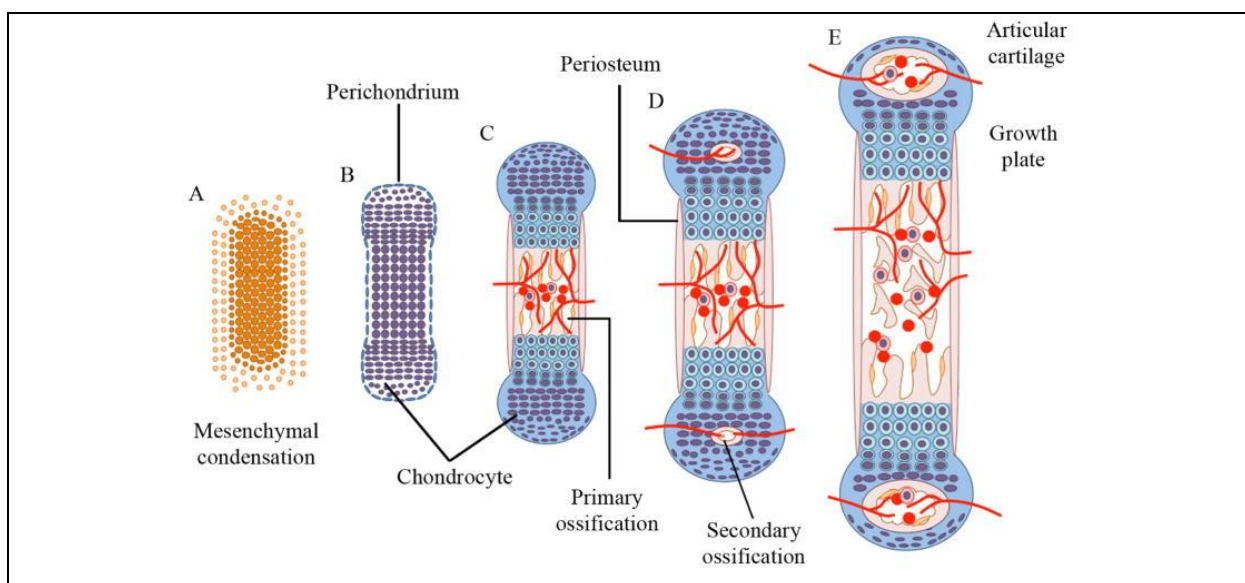


Figure 15 : Représentation de l'ossification endochondrale ; issu de Usami *et al.*, en 2016 [92].

A la naissance et pendant la puberté, les os croissent à partir des épiphyses de croissance formées de cartilage plus ou moins calcifié sous l'influence des hormones et des facteurs systémiques et locaux [93,94]. Ces facteurs comprennent :

- Les hormones de croissance, sexuelles, et thyroïdiennes, la protéine liée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP),
- la vitamine D3,
- les facteurs de croissance de type: IGF (Insulin Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TGF β (Transforming Growth Factor β), BMP (Bone Morphogenic Protein),
- IHH (Indian Hedgehog Homolog) et la voie des Wnts.

La croissance des os se stabilise à la fin de la puberté et le pic de masse osseuse est atteint vers l'âge de 20 ans avec quelques nuances entre les sexes. Pendant la vie adulte, les os continuent de se remodeler par la résorption de l'endoste et par apposition périostée. Il en résulte une augmentation de diamètre des os, tout en conservant la densité minérale osseuse (DMO) quasiment identique. L'accroissement global du diamètre de l'os conduit à une augmentation de la résistance mécanique (Figure 16 (A)). L'augmentation de diamètre n'est pas la même entre les femmes et les hommes (Figure 16(B)). Les femmes présentent une résorption de l'endoste plus importante que chez les hommes. L'épaisseur (différence entre le diamètre externe et le diamètre interne) de l'os se trouve amincie [95]. Cette différence de diamètre explique en partie la différence de fragilité osseuse entre les hommes et les femmes âgés. La sénescence du corps humain entraîne une accélération de la résorption de l'endoste supérieure à la formation du périoste, l'os se retrouve de plus en plus aminci et fragile. Chez la femme, la ménopause conduit à une accélération de ce phénomène qui conduit avec la résorption de l'os trabéculaire à une fragilité osseuse accrue aboutissant aux fractures ostéoporotiques.

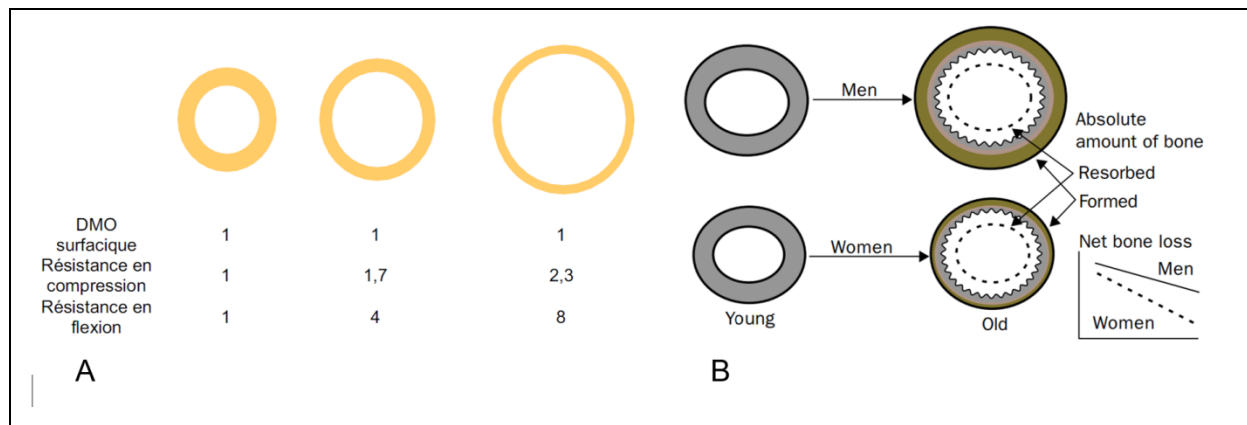


Figure 16 : (A) Représentation schématique de l'augmentation de résistance mécanique avec le diamètre, adapté du manuscrit de thèse de Doctorat de Nicolas Vilayphiou en 2010 à l'université de Lyon 1. (B) Représentation picturale de la différence d'apposition périostée, issue de Seeman en 2002 [95].

3.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est l'équilibre dynamique entre la résorption et la formation du tissu osseux. Il est le siège de l'activation successive de deux populations cellulaires antagonistes et complémentaires : les ostéoclastes et les ostéoblastes, formant les unités fonctionnelles de remodelage. Ces unités fonctionnent sous forme d'un cycle où l'activité de ces cellules est modulée dans l'espace et dans le temps (Figure 17). L'activité de ces millions d'unités fonctionnelles est la réponse du tissu osseux à plusieurs exigences externes : à savoir, répondre au besoin en calcium de l'organisme, renouveler le tissu vieillissant, adapter le tissu à l'environnement et aux contraintes mécaniques et enfin cicatrifier les fractures. Le remodelage osseux est orchestré par les ostéocytes en quatre temps de durée différente : l'activation, la résorption, l'inversion et la phase de formation [32]. La résorption complète d'un site est finalisée en deux semaines. La phase d'inversion dure de quatre à cinq semaines, tandis que la formation d'une nouvelle matrice osseuse complète peut durer quatre mois [96,97].

- Phase d'activation :

Suite à une stimulation mécanique ou hormonale, les ostéocytes induisent la rétraction des cellules bordantes exposant ainsi la MEC aux ostéoclastes [98]. Les ostéoblastes activés sécrètent des cytokines comme le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) sous la régulation de facteurs ostéo-résorbants (vitamine D3, PTH : parathormone). Les monocytes sous l'action du M-CSF se différencient en pré-ostéoclastes qui fusionnent en ostéoclastes. L'afflux d'ostéoclastes stimule l'arrivée des précurseurs médullaires qui entretient la

différenciation cellulaire. Cette dernière est sous la dépendance de trois facteurs locaux : l'ostéoprotégérine (OPG), le RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B) et le RANK L (RANK Ligand = Osteoclast Differentiating Factor (ODF)) (cf. section 3.3.1).

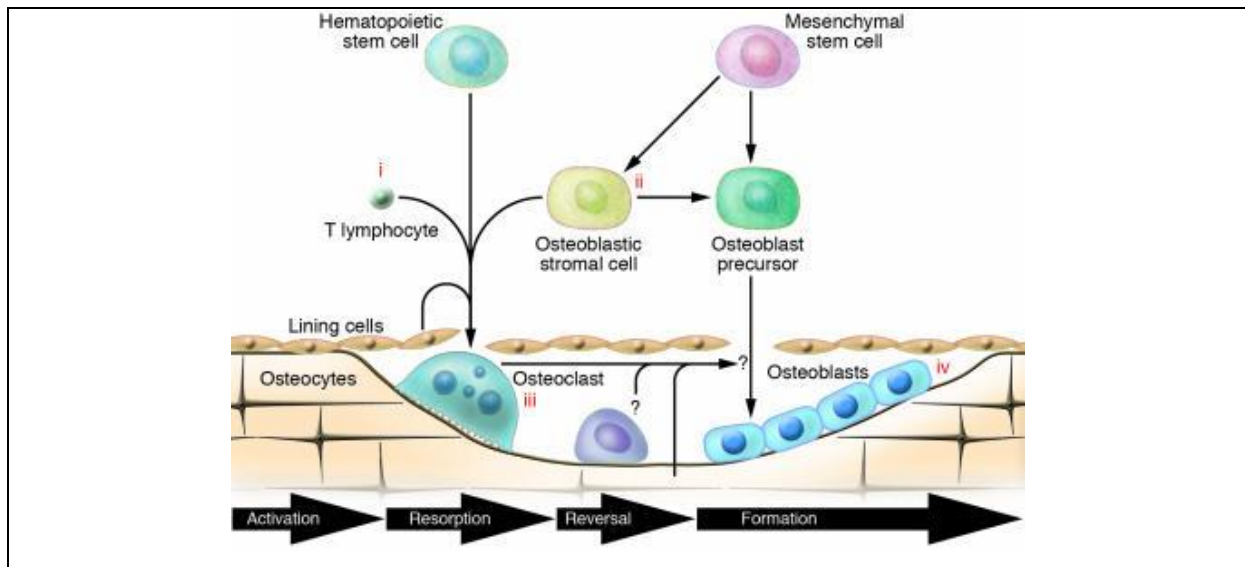


Figure 17 : Représentation schématique de l'unité fonctionnelle de remodelage au cours des différentes étapes ; à noter la présence de macrophages pendant la phase d'inversion, et le recouvrement de la lacune par les cellules bordantes pendant tout le processus; issu de Raisz *et al.*, 2005 [99].

- Phase de résorption :

Les ostéoclastes actifs se lient à la MEC par des jonctions ponctuelles pour former l'anneau de scellement délimitant la lacune d'Howship. Les podosomes sont formés de l'union des protéines membranaires (intégrine, ostéopontine, BSP) et des protéines de la MEC (Thrombospondine, collagène de type I) (Figure 18) [100]. La digestion du tissu osseux se déroule en deux étapes : la dégradation de la phase minérale et la lyse de la phase organique.

La dissolution de la phase minérale est réalisée, par les pompes à protons alimentées par l'anhydrase carbonique II qui libèrent des acides au niveau de la bordure en brosse (Figure 18). Par la suite, les lysosomes excrètent leurs contenus enzymatiques (métalloprotéinases, collagénases, hydrolases acides) pour digérer la matrice organique. Pendant toute la phase de résorption, les lacunes de Howship et les ostéoclastes sont recouverts de cellules bordantes, les isolant du reste du tissu.

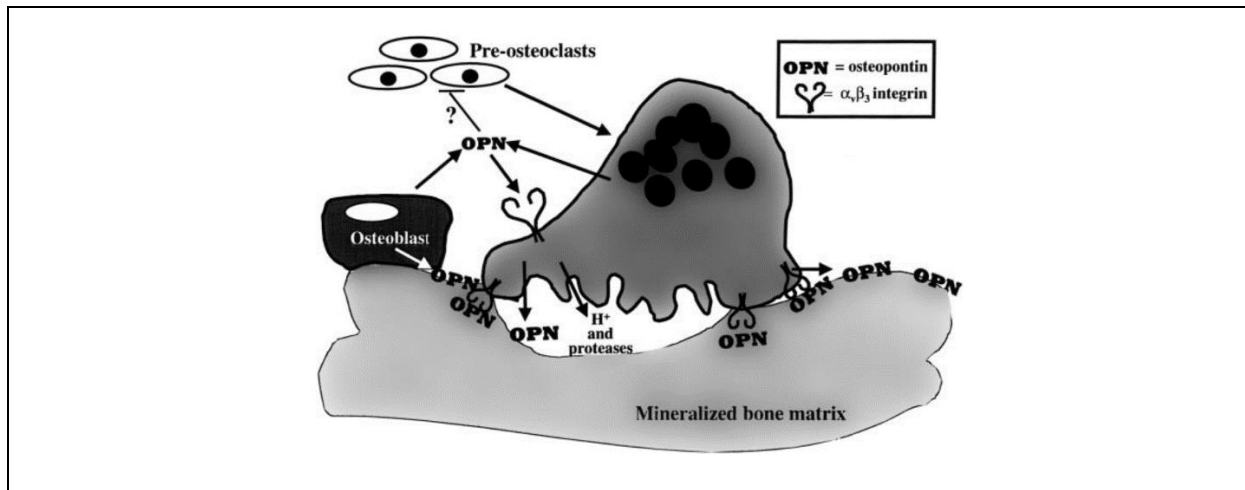


Figure 18 : Représentation de l'adhésion des ostéoclastes sur la MEC par les intégrines et l'ostéopontine ; issu de Giachelli *et al.*, 2000 [100].

- Phase d'inversion :

Une fois le travail achevé, les ostéoclastes meurent par apoptose. Des macrophages interviennent pour lisser la lacune et éliminer les déchets cellulaires (Figure 17). Le fond de la lacune forme la ligne de ciment.

- Phase de formation :

La formation d'une nouvelle matrice osseuse débute par l'élaboration d'un échafaudage protéique où les minéraux seront ensuite cristallisés. Les ostéoblastes assurent la synthèse du collagène de type I et des protéines de la MEC puis catalysent la nucléation de l'hydroxyapatite avec le concours d'enzymes (phosphatase alcaline) et de protéines non collagéniques (cf. section 2.1.2).

3.3. La régulation du tissu osseux

La formation, la prolifération, la différenciation et l'activité de ces cellules osseuses sont régulées par des facteurs locaux et systémiques qui ont des activités catabolisantes et anabolisantes (Figure 19). Les facteurs locaux comprennent des molécules autocrines et paracrines telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des prostaglandines produites par les cellules osseuses. Les facteurs systémiques importants pour le maintien de l'homéostasie

osseuse comprennent l'hormone parathyroïdienne (PTH), la calcitonine, la 1,25-dihydroxyvitamine D 3 (calcitriol), les glucocorticoïdes, les androgènes et les œstrogènes.

3.3.1. Régulation locale du tissu osseux

La dynamique du remodelage osseux repose sur la communication étroite entre les cellules osseuses par une signalisation cellulaire para- et autocrine via le système RANKL-RANK-OPG. Il joue un rôle crucial dans la régulation de la formation des ostéoclastes et de la résorption osseuse. Ce système est composé d'un ligand, le RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand) et de ses deux récepteurs, le RANK et l'ostéoprotégérine (OPG) (antagoniste naturel, leurre) dérivés du « Tumor Necrosis Factor » (TNF). Le RANKL et l'OPG sont exprimés par les cellules stromales, les ostéoblastes et les ostéocytes [101]. RANK est un récepteur de la famille des récepteurs TNF. RANK est fortement exprimé sur la membrane des progéniteurs ostéoclastiques, des ostéoclastes matures, et des cellules dendritiques [69]. L'activation de ce récepteur par le RANKL (produit par les ostéoblastes) induit la maturation de la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes et engage la voie de la résorption osseuse (Figure 19). L'OPG est un ligand soluble sécrété par les ostéoblastes, il fonctionne comme un récepteur leurre qui, en venant se fixer à RANKL, bloque l'interaction de RANKL avec RANK. Finalement, l'activation des ostéoclastes est dépendante des concentrations *in situ* de RANKL, modulées par la libération d'OPG [102]. Les facteurs systémiques régulant le tissu osseux moduleront le système RANKL-RANK-OPG.

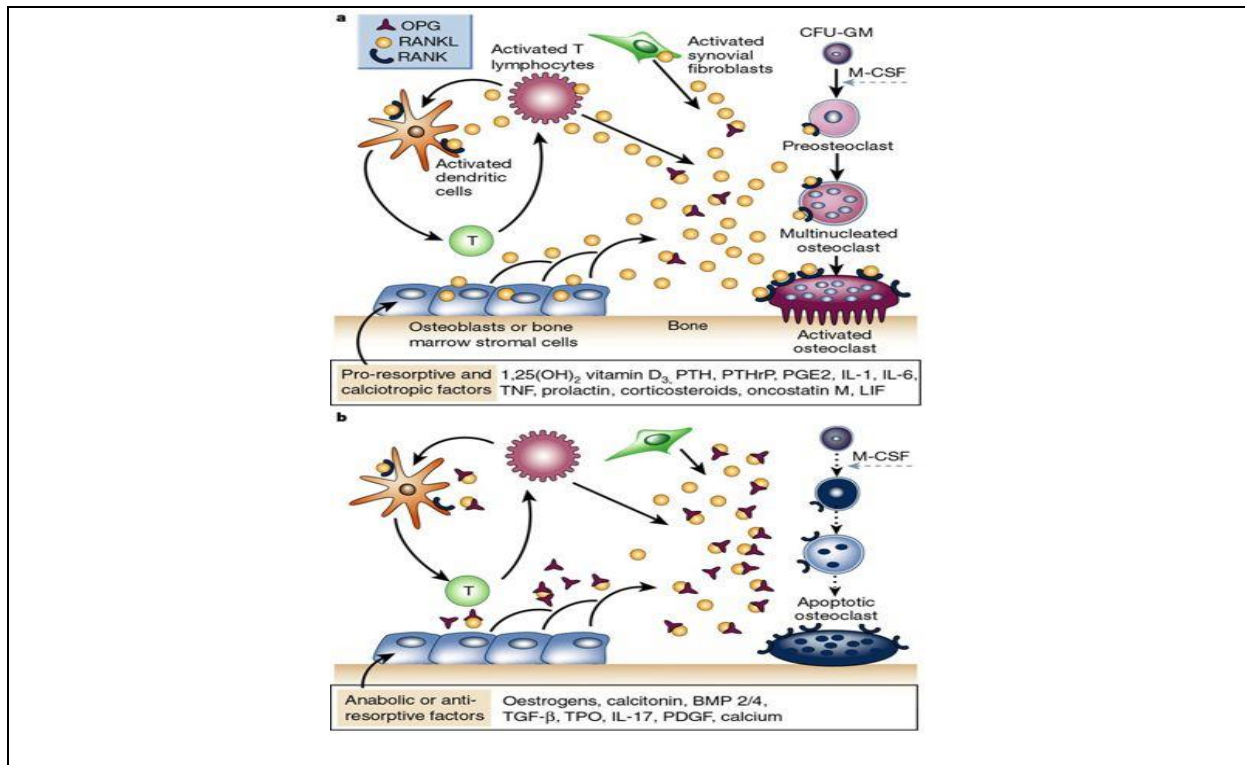


Figure 19 : Représentation schématique du contrôle hormonal de la résorption osseuse et du mécanisme d'action des facteurs catabolisants et anabolisants ; issue de Boyle *et al.*, 2003 [103].

3.3.2. Régulation systémique du tissu osseux

3.3.2.1. Les facteurs catabolisants :

La PTH est la principale hormone ostéo-résorbante agissant de concert avec la forme active de la vitamine D (1,25-dihydroxycholecalciférol). Elle est synthétisée par les glandes parathyroïdiennes. Elle régule le métabolisme phosphocalcique avec un effet hypercalcémiant et hypophosphatémiant. La sécrétion de PTH est dépendante de la concentration sérique en calcium. Une diminution de la calcémie entraîne une libération de PTH qui influencera le métabolisme osseux, rénal et duodéal. Au niveau du rein, elle induit une activation des précurseurs de la vitamine D, la réabsorption rénale du calcium et l'inhibition de la réabsorption de phosphate. Son activité sur l'épithélium intestinal est indirectement liée à l'action de la vitamine D qui augmente l'absorption intestinale du calcium.

Les cellules du tissu osseux disposent de récepteur à la PTH. Sur les ostéoblastes et ses progéniteurs, la PTH maintient l'activation des cellules bordantes en ostéoblastes et stimule l'expression de facteurs de croissances (IGF 1, TGF, FGF) par les ostéoblastes. L'activation par la PTH des ostéoblastes stimule la prolifération et l'engagement des cellules souches

hématopoïétiques dans la voie de la différenciation cellulaire en ostéoclaste et retarde l'apoptose de ces derniers [104].

Les effets de la PTH sur les ostéocytes sont beaucoup plus contrastés. L'élévation sérique de la PTH peut générer des effets à la fois cataboliques et anaboliques sur le tissu osseux en fonction du profil temporel. Une concentration élevée chronique comme par exemple lors d'une hyperparathyroïdie augmente la résorption osseuse. *A contrario*, une augmentation intermittente sérique de PTH liée à des injections sous cutanées lors de traitement à un effet anabolisant entraînant un gain de masse osseuse [105,106].

Les ostéocytes possèdent un récepteur membranaire à la PTH et à son peptide précurseur (PTH-related Peptide Receptor), le PPR. Dans le cas simple d'une augmentation chronique, la PTH active l'expression de SOST via la voie de signalisation de l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) [107]. La transcription du gène SOST, produit une glycoprotéine de 213 acides aminés, la sclérostine, à activité régulatrice paracrine du métabolisme osseux. Elle est sécrétée principalement par les ostéocytes matures [108]. La sclérostine se fixe sur les récepteurs de la famille LRP (Low density Lipoprotein Receptor-related Protein, (4-5-6)) inhibiteurs de la voie des Wnt et des protéines morphogénétiques osseuses (BMP : Bone Morphogenetic Proteins). La voie Wnt/ β caténine régule la production d'OPG. Les ostéocytes sécrèteraient également RANKL et M-CSF. Ainsi l'activité des ostéocytes régulerait directement et indirectement la fonction et la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes [109].

Par ailleurs, Ramp et Neuman ont été à l'origine du concept d'ostéolyse péri-ostéocytaire [110]. Cette hypothèse de l'ostéolyse ostéocytaire a été confirmée par des études expérimentales chez les rongeurs [111,112].

En outre, les prostaglandines, métabolites de l'acide arachidonique synthétisées sous l'influence d'hormones et de facteurs de croissance (FGF, IFG et PDGF) régulent aussi l'homéostasie osseuse. La Prostaglandine E2 (PGE2) intervient dans la réponse aux traumatismes (microlésions). Elle module la réponse inflammatoire et la guérison notamment en activant les précurseurs ostéoclastiques via l'expression de RANKL et de M-CSF ainsi que les ostéocytes [62,113].

Par ailleurs, les glucocorticoïdes ont des effets multiples, complexes et néfastes sur le tissu osseux, ils induisent la surexpression de RANKL, l'inhibition de la production d'OPG et

stimulent l'apoptose des ostéoblastes. L'ostéoporose cortico-induite est la forme la plus commune d'ostéoporose secondaire [114].

Enfin, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 ou le TNF α favorisent la perte de masse osseuse en modifiant le fonctionnement de la voie RANKL/ RANK/ OPG augmentant l'activité ostéoclastique [115].

3.3.2.2. Les facteurs anabolisants :

La forme active de la vitamine D à deux origines. La vitamine D3 (cholécalférol) est synthétisée par les cellules profondes du derme à partir du 7-déhydrocholestérol, dérivé du cholestérol sous l'effet du rayonnement ultraviolet. La vitamine D2 (ergocalciférol) issue de l'alimentation, est produite par les végétaux. Ces deux formes sont métabolisées par le foie et les reins en 1,25-dihydroxycholécalférol. La vitamine D se fixe sur un récepteur nucléaire (VDR : « Vitamin D Receptor »). Elle stimule l'absorption intestinale de calcium et de phosphate. A un taux sérique recommandé (80 ng/ml), la vitamine D est anabolisante, via la différenciation et la maturation des ostéoblastes. Cependant, à des doses importantes la vitamine D est catabolisante. A forte dose, la vitamine D est convertie de manière accrue en métabolite actif, le calcitriol. L'augmentation accrue de calcitriol peut stimuler la synthèse locale (autocrine) du calcitriol dans l'environnement des cellules osseuses. Le calcitriol agit directement sur les cellules osseuses via le récepteur de la vitamine D. Ces fortes doses stimulent les ostéoblastes qui induisent le recrutement des précurseurs des ostéoclastes et l'activation des ostéoclastes [116].

La calcitonine est une hormone peptidique produite par la thyroïde à action hypocalcémiante, inhibitrice de l'activité des ostéoclastes et inductrice de la prolifération des ostéoblastes favorisant la formation osseuse[117].

Les BMPs appartiennent à la famille des polypeptides TGF β , facteurs de croissances qui interagissent avec le facteur de transcription RUNX2 via la voie de signalisation des protéines phosphorylées Smads (Smad1) [118] essentielles à la différenciation ostéoblastique à partir des CSM.

Les œstrogènes inhibent le remodelage osseux en stimulant la prolifération et la survie des lignées ostéoblastiques et favorisent directement l'apoptose des ostéoclastes [119]. Les effets des œstrogènes sur le tissu osseux sont assurés par l'intermédiaire de deux récepteurs nucléaires ER α et ER β (ERs). Les ERs agissent selon deux voies, la voie génomique où les ERs fonctionnent comme des facteurs de transcription et la voie non génomique qui module les voies de signalisation intracellulaire et l'expression génique d'autres gènes. Le fonctionnement des ERs sur les cellules osseuses et sur le tissu osseux a été étudié par délétion totale ou partielle de ces derniers. Khosla *et al.*, en 2018 [120] ont synthétisé les données de la littérature et ont dressé un portrait global des actions des ERs. Une délétion totale de ER α induit une diminution de la DMO trabéculaire et corticale. Une délétion sur les lignées ostéoblastiques induit une diminution de la DMO corticale et trabéculaire. La suppression d'ER α sur les lignées myéloïdes et ostéoclastiques provoque une diminution de la DMO trabéculaire chez les sujets féminins. Chez les sujets masculins, il n'y a pas de variation de la DMO trabéculaire et corticale. Les effets de la délétion d'ER β sur le tissu osseux ont été seulement observés chez les sujets de sexe féminin. Une délétion totale provoque une augmentation de la DMO trabéculaire. Ce résultat se retrouve avec une délétion spécifique sur les lignées ostéoblastiques. En résumé, ER α a des effets directs positifs sur le tissu osseux. Enfin, les œstrogènes régulent l'expression des cytokines. Une baisse des œstrogènes sériques induit une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α), ce qui favorise l'ostéoclastogénèse [121].

Cette première partie a présenté les caractéristiques morphologique, tissulaire et cellulaire de l'os. Les ostéocytes régulent finement l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes pour répondre d'une part au besoin de l'organisme en minéraux, et d'autre part pour adapter le tissu osseux aux contraintes qu'il subit. Cette adaptation est à la fois contrôlée par les hormones ou les facteurs locaux mais également par les stimulations mécaniques perçues par les ostéocytes. La qualité du tissu osseux est dépendante de l'activité des ostéocytes et de leur capacité à percevoir les contraintes mécaniques. La seconde partie sera consacrée aux ostéocytes comme cellules mécano-sensibles, puis aux effets de la contrainte mécanique sur les cellules osseuses et le tissu osseux. Enfin, la seconde partie sera clôturée par les différents types de protocoles d'exercice chez des modèles animaux et leur effet respectif sur le tissu osseux.

Partie II Mécanismes de l'adaptation osseuse à la contrainte mécanique

L'objectif de cette partie est de comprendre comment les charges mécaniques sont transmises et interprétées par les ostéocytes pour qu'ils puissent réguler en conséquence le tissu osseux. La régulation du tissu osseux à l'exercice est définie par la loi de Wolff.

I L'ostéocyte une cellule mécano-sensible

Les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses et les plus vieilles de la lignée ostéoblastique. En 2007, Lynda Bonewald introduit le concept de chef d'orchestre du remodelage osseux pour qualifier les ostéocytes [32]. Pour assurer cette fonction, les ostéocytes sont interconnectés les uns aux autres via leurs prolongements cytoplasmiques (dendrites) dans les canalicules. Les ostéoblastes bordant le tissu osseux sont en communication avec les ostéocytes via les dendrites et les jonctions communicantes GAP mais aussi via la sécrétion intra-canaliculaire des facteurs de remodelage osseux. Cependant, pour adapter le tissu osseux les ostéocytes doivent d'une part percevoir les contraintes, et d'autre part, induire une réponse adaptée (Figure 20).

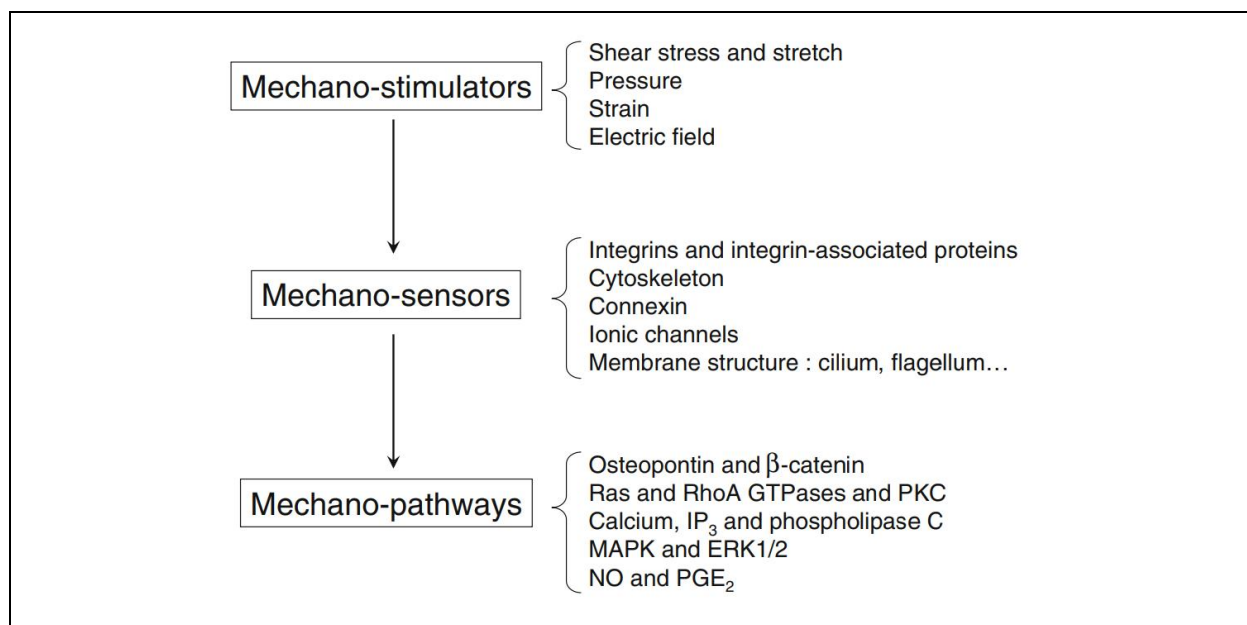


Figure 20: Illustration de la mécano-transduction ostéocytaire implique un stimulus (mécano-stimulateur), un appareil récepteur (mécano-capteur), et une cascade de signalisation consécutive (mécano-voie). Issu de Rochefort *et al.* en 2010 [55].

1.1. Comment se traduisent les contraintes mécaniques à l'échelle ostéocytaire ?

La gravité terrestre soumet le corps à une contrainte permanente. A l'échelle de l'os, cette contrainte soumet le col du fémur à une charge de 300 kgs en position unipodale. Cette charge est multipliée par 7,6 fois le poids du corps lors d'une accélération forte [90]. L'os est donc constamment soumis à une charge qui est ressentie par les ostéocytes. En l'absence de pesanteur terrestre, il a été montré une perte de 5,43% de la densité osseuse trabéculaire mesurée au tibia après 6 mois de vol [122]. Une preuve directe de la fonction mécano-sensible des ostéocytes a été confirmée dans une étude montrant que des souris transgéniques avec ablation inducible des ostéocytes ne répondaient pas à la perte osseuse induite par la décharge [123]. Ces résultats indiquent clairement que les ostéocytes captent les variations locales de contraintes mécaniques telle que la décharge et jouent un rôle dans la transmission de signaux pro-ostéoclastogènes pour stimuler la résorption osseuse en réponse à la décharge mécanique. Autrement dit, les ostéocytes doivent être constamment soumis à une contrainte pour maintenir la masse osseuse.

La transmission de la contrainte mécanique au sein de l'os jusqu'au ostéocytes n'est possible que par le biais du réseau lacuno-canaliculaire extrêmement spécialisé. C'est à travers ce réseau que les ostéocytes sont capables de transformer les stimuli mécaniques en signaux intercellulaires. La mécano-transduction du signal repose sur les propriétés intrinsèques de l'os (piézoélectriques), et des canalicules (pression fluidique et contrainte de cisaillement).

1.1.1. Propriétés piézoélectriques du tissu osseux, une théorie critiquée

Jusque dans les années 1960, la capacité de l'os à s'adapter aux contraintes mécaniques et, plus particulièrement, la perception des forces par les cellules osseuses (ostéocytes, ostéoblastes) restait un mystère. Une théorie avancée est la piézoélectricité du collagène qui serait utilisée par les ostéocytes pour détecter les zones de plus grande contrainte. La piézoélectricité est la propriété que possèdent certains matériaux à se polariser électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique. Friedenber *et al.*, en 1966 [124] ont découvert que le tissu osseux répondait à cette définition via la tension mécanique exercée spécifiquement sur l'os compact. Ce dernier présentait des différences de potentiel électrique le long des axes latéraux et longitudinaux. Une des hypothèse avancée est que le tissu osseux est chargé d'ions (Calcium, Phosphate), selon cette théorie, la contrainte appliquée générerait des gradients de potentiel

locaux le long des fibres de collagène et ces potentiels seraient détectés par les ostéocytes [125,126]. Cependant, les résultats expérimentaux sur os sec et sur os humide étaient contrastés, deux mécanismes principaux ont donc été avancés : la piézoélectricité et le potentiel de diffusion [127].

Le potentiel de diffusion est le mécanisme qui a majoritairement été adopté, de par la saturation de l'os en liquide chargé en ions [128]. Le potentiel de diffusion utiliserait comme vecteur le réseau lacuno-canaliculaire qui forme un réseau complexe à l'image du système nerveux [129]. Pour intégrer le mécanisme de potentiel de diffusion et l'effet piézoélectrique avec la mécano-transduction osseuse, une des hypothèses émises serait que la compression tissulaire, augmenterait la densité de charge fixe au niveau de la matrice osseuse, ce qui générerait un potentiel électrocinétique plus élevé, un potentiel de diffusion accru, une augmentation de l'électroosmose, une diminution de la perméabilité hydraulique et donc une rigidité dynamique accrue du tissu. Cela engendrerait des différences dans la charge mécanique détectée par le système canaliculaire et donc dans l'écoulement du fluide interstitiel autour des dendrites (Figure 21) [127].

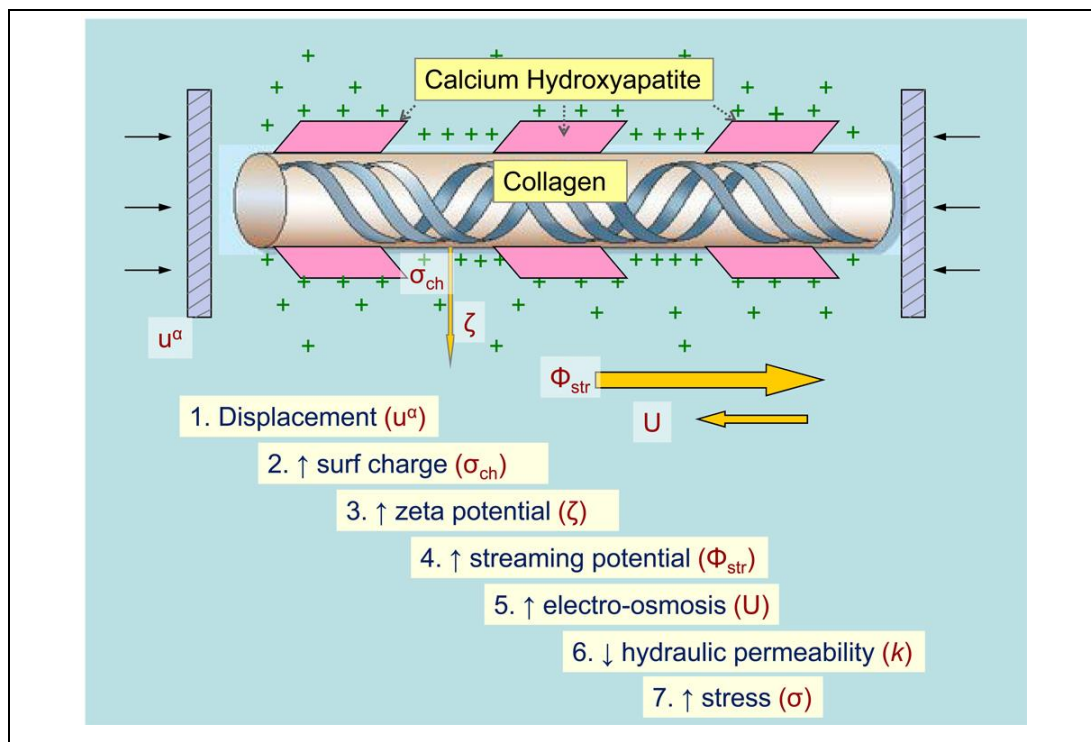


Figure 21: Illustration de l'effet théorique de la piézoélectricité du collagène sur la rigidité du tissu osseux. La compression du tissu osseux génère des charges de surface qui contribuent indirectement à une plus grande contrainte et donc à une plus grande rigidité de l'os. 1 : Déplacement, 2 : charges superficielles, 3 : Potentiel Zeta, 4 : Potentiel de diffusion, 5 : Electro-osmose, 6 : Perméabilité Hydraulique, 7 : Stresse. Issu de Ahn AC *et al.*, en 2009 [127].

1.1.2. Pression fluidique et contrainte de cisaillement

Le mécanisme de transduction des contraintes mécaniques en signaux biologiques des ostéocytes utilise le réseau lacuno-canaliculaire à l'instar d'une éponge qui sous la contrainte déplace l'eau qu'elle renferme. Les contraintes mécaniques et la contraction musculaire modifient la pression vasculaire et donc également le flux du liquide interstitiel osseux. Ces différences de pression sont directement ressenties par les ostéocytes [130]. La contrainte mécanique entraîne une flexion des os et une déformation de la matrice. Par exemple, dans le cas du fémur, une contrainte de compression est générée sur la partie médiale de l'os et une contrainte de traction sur la partie latérale (revoir Figure 14 Partie I 2.2.2). Cette différence de charge qui en résulte conduit à un gradient de pression dans le liquide ischémique et pousse le fluide interstitiel des zones de compression vers les zones de tension. L'écoulement du fluide sous pression au sein des canalicules crée des contraintes de cisaillement élevées sur la paroi des canalicules [131]. Weinbaum *et al.*, en 1994 ont calculé que la contrainte de cisaillement induite par la charge mécanique détectée par les dendrites était de 0,8 à 3 Pa [132]. L'écoulement du fluide le long des parois des canalicules et les pressions sont captées par des récepteurs le long des processus dendritiques des ostéocytes.

1.2. Perception des contraintes mécaniques par les ostéocytes : les mécano-senseurs

Au travers du réseau lacuno-canaliculaire la perception des contraintes mécaniques est assurée par des récepteurs membranaires de l'ostéocyte (Figure 22).

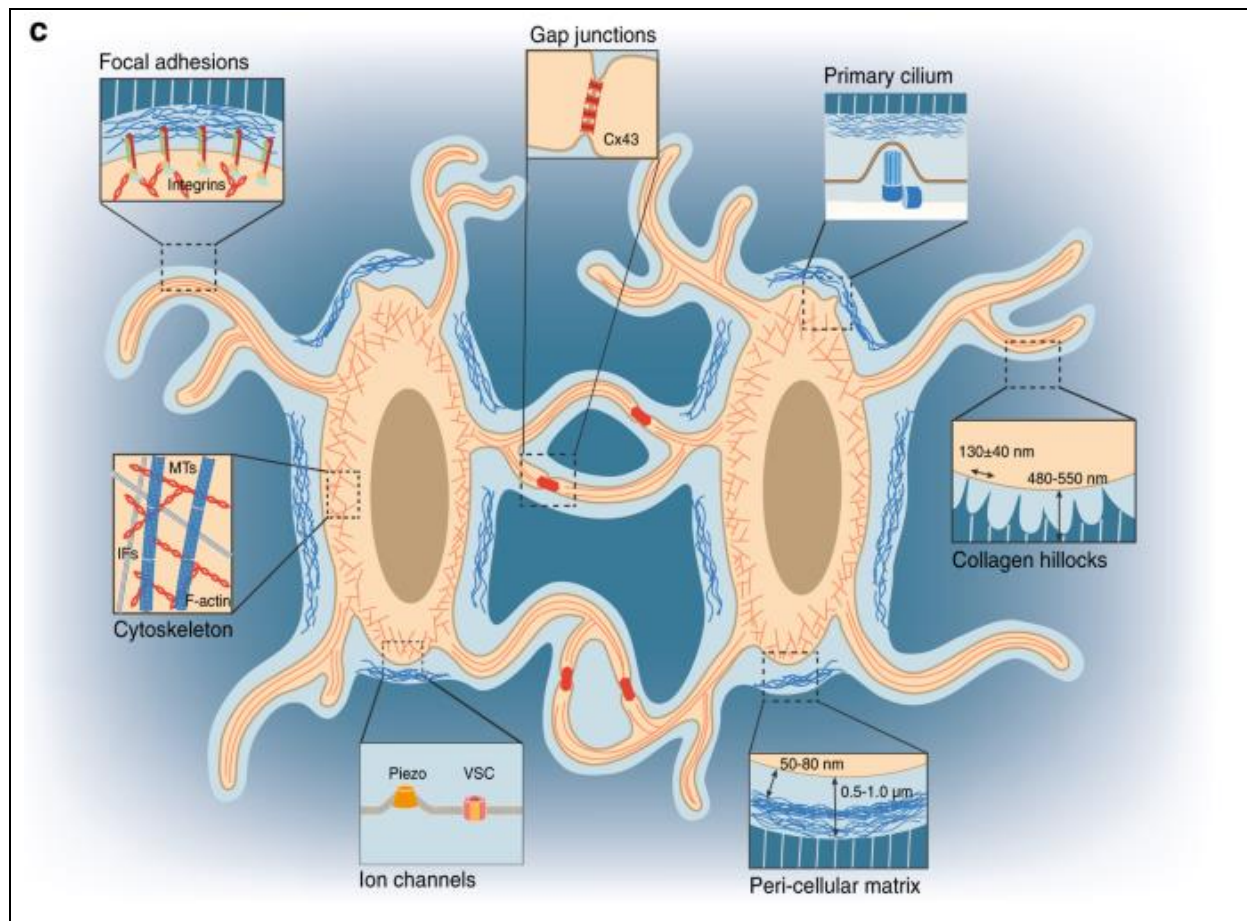


Figure 22: Illustration des ostéocytes et de leurs dendrites en interaction avec la matrice extra-cellulaire osseuse. Les adhésions focales (intégrines), les jonctions gap, les cils primaires, les canaux ioniques et les buttes collagéniques « collagen hillocks » participent à la mécano-sensibilité des ostéocytes aux contraintes mécaniques. Issu de Qin *et al.*, en 2020 [58].

1.2.1. Les adhésions focales et les intégrines

Les adhésions focales également appelées adhésions cellule-matrice sont des assemblages dynamiques et multiprotéiques localisés dans la membrane plasmique et contenant des protéines d'échafaudage, des phosphatases, des kinases et des protéines transmembranaires de liaison actives tel que les intégrines qui forment des liens mécaniques entre les filaments d'actine intracellulaires et la matrice extracellulaire [133]. Ce sont de grands assemblages macromoléculaires par lesquels la force mécanique est transmise entre la matrice extracellulaire et l'actine du cytosquelette agissant comme des centres de signalisation centraux au sein des ostéoblastes et ostéocytes [134]. Cette interface protéique interactive est capable de détecter les microenvironnements externes (stress mécanique, composition et rigidité de la matrice extracellulaire) ce qui permet aux ostéocytes d'orchestrer le remodelage.

Les intégrines sont le principal vecteur qui transforme les contraintes de cisaillement en information via une cascade de messagers moléculaires cytoplasmiques. En plus de fournir des connexions structurales, les intégrines jouent un rôle dans la transmission de signaux qui peuvent affecter la survie ou la différenciation cellulaire en modifiant l'expression des gènes [135]. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques de type I composés d'une liaison non covalente des sous-unités α et β (Figure 25 A). Chez les vertébrés, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , qui sont combinées en 24 intégrines différentes, présentant divers profils d'expression et reconnaissant divers ligands [136]. Selon leur ligand (protéines extracellulaires) les intégrines sont classées en quatre groupes (Figure 23):

- Les récepteurs RGD sont des récepteurs qui fixent des motifs peptidiques (tripeptide constitué d'arginine, de glycine et d'acide aspartique) présents sur la fibronectine, la thrombospondine ou la vitronectine [137],
- les récepteurs au collagène qui reconnaissent des motifs spécifiques au sein des fibres de collagène tel que le motif GFOGER à haute affinité reconnue par $\alpha2\beta1$ [138],
- les récepteurs à la laminine. La laminine est un composant majeur de la membrane basale, c'est une protéine membranaire extracellulaire responsable de l'adhésion cellulaire [139];
- et les récepteurs spécifiques aux leucocytes. Ce sont des récepteurs essentiels aux réponses immunitaires innées et adaptatives [140].

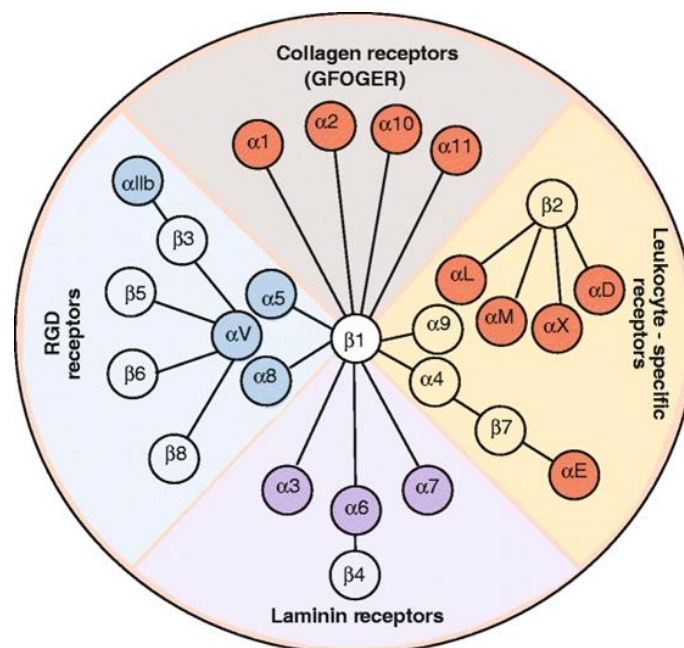


Figure 23: Illustration des intégrines chez les vertébrés, qui forment 24 hétéro-dimères répartis en quatre grandes familles de récepteurs. Issu de Barczyk *et al.*, en 2009 [136].

Les intégrines perçoivent les stimuli extérieurs à la fois physiquement et chimiquement et les traduisent en signaux intracellulaires [141]. Les intégrines permettent la réception et la transmission de signaux de manière bidirectionnelle. Les intégrines adoptent deux conformations, une courbée (inactive) et une conformation étendue (active). L'équilibre entre les états inactifs et actifs détermine la fonction des intégrines [142]. Cet équilibre est orchestré par des protéines régulatrices cytoplasmiques. La transition entre deux conformations, peut être déclenchée par un processus distinct appelé signalisation de l'intégrine de l'intérieur vers l'extérieur, où la stimulation cellulaire déclenche un ou plusieurs signaux intracellulaires pour perturber la face cytoplasmique de l'intégrine, induisant un changement de conformation global du récepteur et sa liaison ultérieure à haute affinité au ligand de la MEC. Ces signaux comprennent des protéines intracellulaires régulatrices (taline (protéine du cytosquelette) et kindline, protéine d'adhésion focale) et des protéines promotrices du signal qui une fois activées se lient à la queue cytoplasmique de la sous-unité β de l'intégrine induisant son changement de conformation [143] (Figure 24). L'activation d'une intégrine favorise le recrutement et l'activation d'intégrine voisine formant des « clusters ». Le « cluster » d'intégrine déclenche par la suite des signaux de l'extérieur vers l'intérieur en recrutant un grand nombre de complexes protéiques contenant des protéases, des échafaudages protéiques et des adaptateurs protéiques [144].

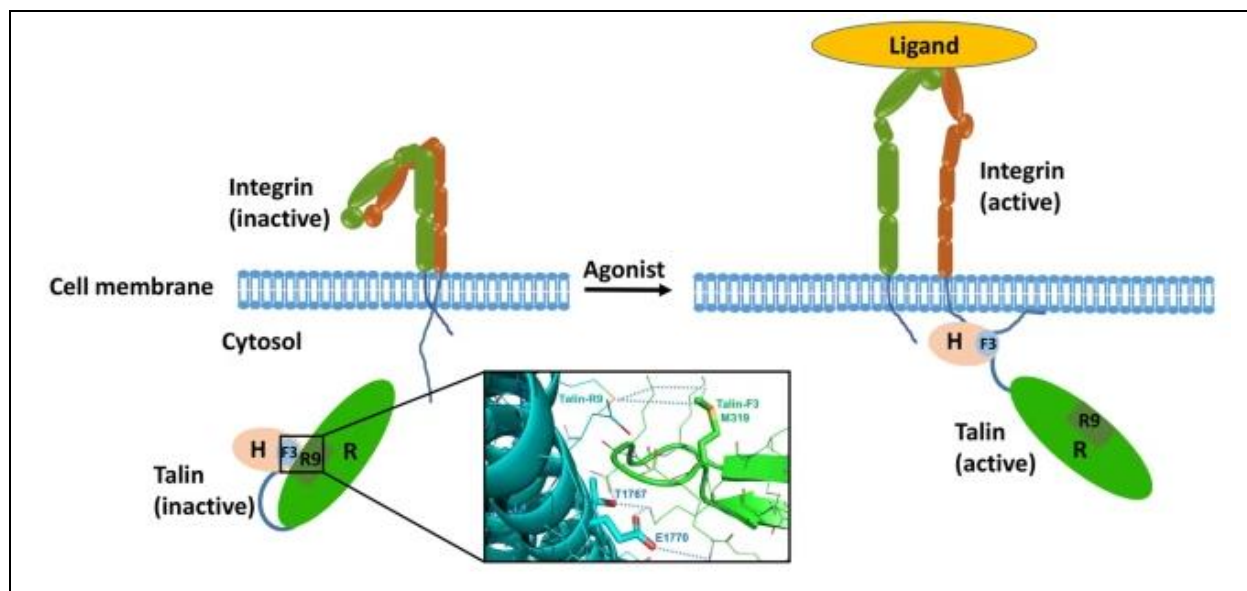


Figure 24: Illustration de l'activation de l'intégrine par la Taline, à noter le changement de conformation courbée (inactive) à tendue (active à haute affinité) de l'intégrine. Issu de Lu *et al.*, en 2022 [145].

Les intégrines sont omniprésentes dans les os mais, seulement les récepteurs au collagène et les récepteurs RGD sont principalement exprimés (Figure 25 B) [146]. Le rôle principal des intégrines est l'adhésion à la MEC et la mécano-transduction. Lors de la résorption osseuse, il a été montré que les ostéoclastes se fixent à la vitronectine de la matrice osseuse au moyen des intégrines $\alpha\text{v}\beta 3$ et des intégrines $\alpha\text{v}\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (collagène) [147]. L'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ est fortement liée à l'ostéoclastogenèse et à l'activité de résorption ostéoclastique, car l' $\alpha\text{v}\beta 3$ participe à la formation de la zone de scellement de la lacune de Howship [148]. Ainsi, Engleman *et al.*, en 1997 ont montré qu'un antagoniste de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ inhibe la résorption osseuse ostéoclastique *in vitro* et *in vivo* chez des rates ovariectomisées [149].

Les ostéoblastes et les ostéocytes expriment les sous-unités $\beta 1$ en association avec les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de l'intégrine [150]. La sous unité $\beta 3$ est associée à l' αv et exprimée dans les ostéoblastes et les ostéocytes. Au sein des processus dendritiques dans le réseau lacuno-canaliculaire, il a été démontré que l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ est primordiale dans la mécano-détection et la mécano-transduction ostéocytaire [60,151,152]. L'activation de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ conduit à une cascade de signalisation intracellulaire et à l'ouverture des canaux calciques [153].

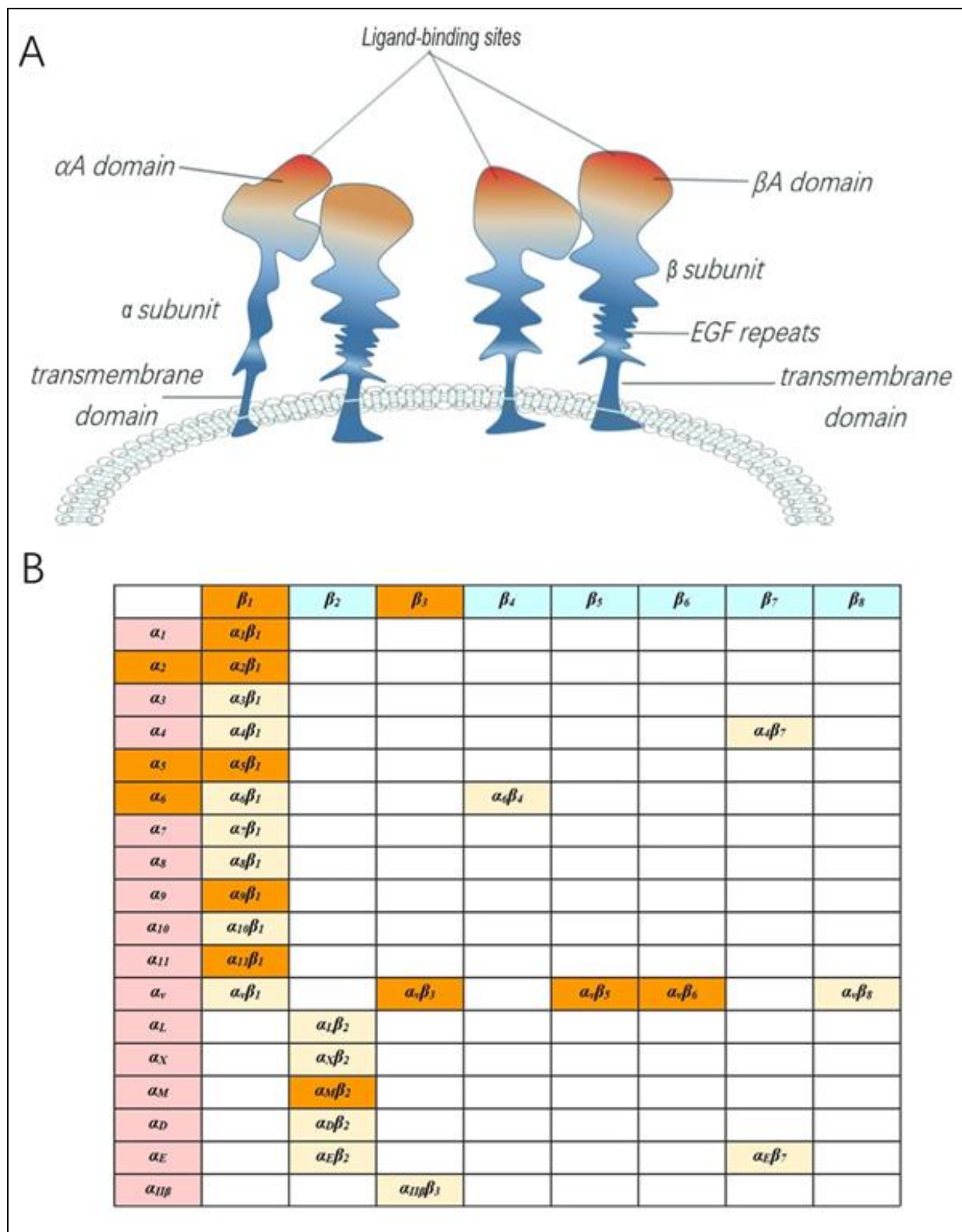


Figure 25: Illustration de la structure hétérodimérique des intégrines (A). Représentation des 25 sous-types d'intégrines dont celles qui sont majoritairement actives dans le métabolisme osseux en orange (B). Issu de Mao *et al.*, en 2023 [154].

1.2.2. Les canaux ioniques et les récepteurs Piezo1 et 2

Lors de la mécano-activation des ostéocytes, il a été observé en premier des changements du flux de calcium intracellulaire [155]. Ces changements de flux ionique seraient la conséquence de l'étirement des membranes par les contraintes de cisaillement. Les travaux de Davidson *et al.*, dans les années 1990 sur des ostéoblastes humains, ont montré l'existence de plusieurs classes de canaux dont le principal canal activé par l'étirement était un canal potassique. La probabilité d'ouverture de ce canal était proportionnelle à l'étirement de la membrane [156,157]. Par la suite, McDonald *et al.*, en 1996 [158] ont montré que la mobilisation du calcium intracellulaire était indépendante des courants potassiques. Ils ont supposé que la stimulation mécanique, peut-être transmise par une intégrine associée à une protéine G, ce qui conduit à l'ouverture d'un canal calcique médiée par la protéine G. L'afflux de calcium qui en résulte active la phospholipase (PLC) puis les MAP kinases, l'ATP et la prostaglandine E₂ (molécules de mécano-signalisation) [155,159] (Figure 26). Finalement, ces canaux ioniques sensibles à l'étirement des membranes ont été identifiés comme issus du gène Fam38A et nommé Piezo1, du grec « πίεση » (píesi) signifiant pression par l'équipe de Patapoutian (prix nobel de médecine en 2021) [160]. Les canaux piézoélectriques (Piezo1 et Piezo2), sont des canaux ioniques mécano-sensibles situés dans la membrane cellulaire et fonctionnant comme des mécano-transducteurs cellulaires clefs pour convertir les stimuli mécaniques en signaux électrochimiques. Sous l'effet de stimuli mécaniques, ces canaux s'ouvrent pour permettre aux cations de traverser la membrane, ce qui favorise la mécano-transduction cellulaire pour s'adapter au microenvironnement.

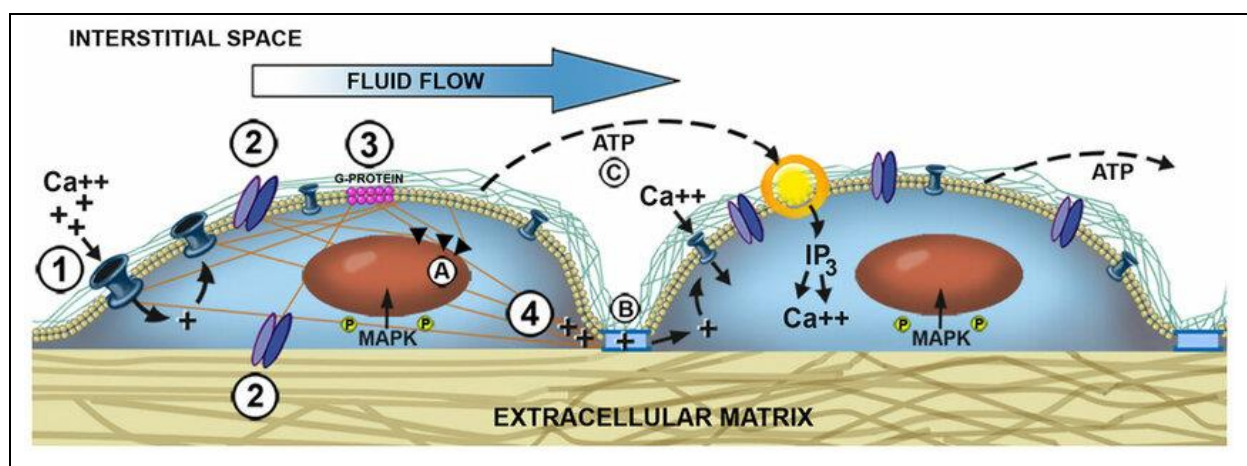


Figure 26: Illustration de l'ouverture des canaux calciques par le flux de fluide dans l'espace interstitiel et la réponse physiologique chez les ostéoblastes. Issu de Scott *et al.*, en 2012 [159].

1.2.3. Les connexines et les jonctions GAP

Les connexines sont une famille de protéines transmembranaires qui jouent un rôle crucial dans la formation des jonctions GAP (ou jonctions communicantes). Chaque connexine possède quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle cytoplasmique et des extrémités N- et C-terminales situées dans le cytoplasme. Six molécules de connexines, s'assemblent pour former des hexamères appelés connexons ou hémi-canaux. Deux connexons forment une jonction communicante à la surface de 2 ostéocytes adjacents. Lorsque les connexons ne se trouvent que d'un côté d'une cellule, ils forment des hémi-canaux. Les hémi-canaux et les jonctions communicantes sont nécessaires à l'échange de messagers d'une cellule à l'autre. Il existe plusieurs types de connexines (par exemple : Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 et Cx46), chacune codée par un gène distinct. La diversité des connexines permet la formation de jonctions GAP avec des propriétés différentes en fonction des tissus et des besoins physiologiques spécifiques. Les jonctions GAP sont des canaux intercellulaires formés par l'alignement et la connexion de deux connexons (un de chaque cellule adjacente). Elles permettent le transfert de métabolites, d'ions comme le Ca^{2+} , et de second messagers comme l'AMPC, facilitant ainsi la coordination des activités cellulaires. La perméabilité des jonctions GAP peut être régulée par divers facteurs, y compris le pH, le calcium intracellulaire, et les modifications post-traductionnelles des connexines (par exemple, la phosphorylation) (Figure 27).

La connexine Cx 43 est fortement exprimée par les ostéoblastes et les ostéocytes et intervient dans le mécanisme de contrôle de la masse osseuse [161]. Les hémi-canaux Cx43 forment un syncytium en trois dimensions fonctionnel qui relie les ostéocytes entre eux et assure la liaison entre les ostéoblastes et les cellules endothéliales [162]. Les hémi-canaux sont ouverts par le flux de fluide et ce syncytium orchestre la formation et le renouvellement de l'os dans des conditions physiologiques et pathologiques [58]. La connexine Cx 43 est essentielle au métabolisme osseux car une mutation du gène de la protéine de jonction lacunaire alpha 1 (GJA1), codant pour la connexine 43 (Cx43) cause la dysplasie oculodentodigitale [163]. De plus, il a également été montré que la connexine Cx43 était impliquée dans la perte osseuse liée au vieillissement dans un modèle de souris âgées (C57BL/6 de 24 mois). Les souris ont montré une expression réduite de la connexine dans l'os, qui était associée à une apoptose des ostéocytes et une augmentation de l'ostéoclastogenèse [164].

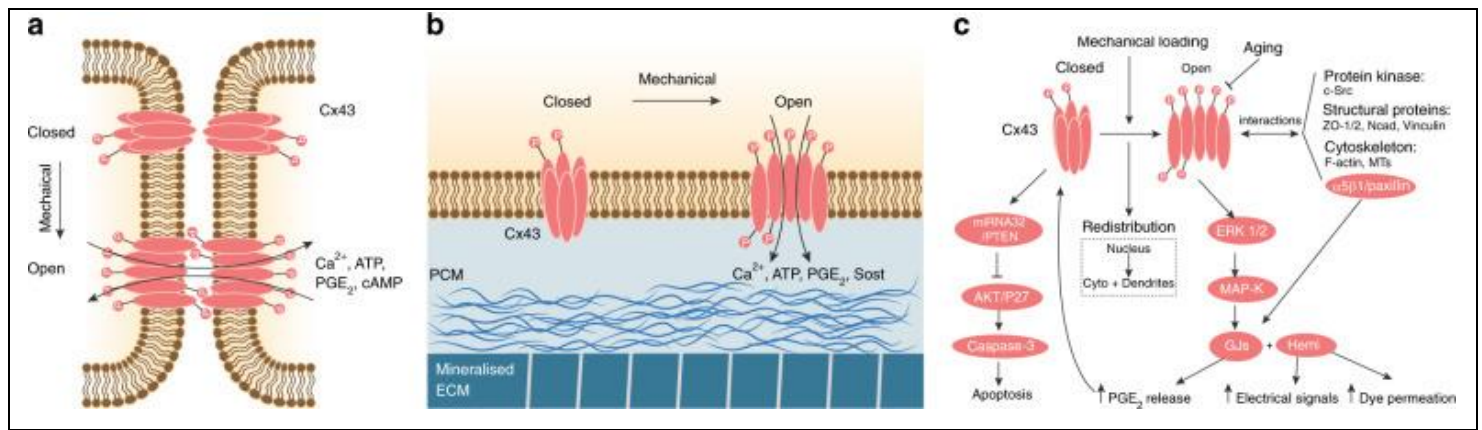


Figure 27: (A) Illustration des jonctions GAP des ostéocytes en réponse à une stimulation mécanique. (B) Illustration des hémicanaux des ostéocytes en réponse à une stimulation mécanique. (C) Illustration de la voie de signalisation impliquées dans les hémicanaux à base de Cx43 au cours de la mécano-biologie des ostéocytes. Issu de Qin *et al.*, en 2020 [58].

1.2.4. Les récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont une famille de récepteurs de surface cellulaire qui sont activés par les nucléotides et nucléosides purinergiques tels que l'ATP (adénosine triphosphate). Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, y compris la communication cellulaire, la régulation de l'inflammation, la perception de la douleur, et le métabolisme osseux. Les récepteurs purinergiques sont classés en deux grandes familles :

- Les récepteurs P1 (récepteurs de l'adénosine) dont il existe quatre sous-types principaux (A1, A2A, A2B, et A3) qui sont activés par l'adénosine. A1 et A3 sont couplés à la protéine G inhibitrice (G_i), ils inhibent l'adénylate cyclase, réduisant ainsi les niveaux d'AMPc intracellulaire. A2A et A2B sont couplés à la protéine G stimulatrice (G_s), ils activent l'adénylate cyclase, augmentant les niveaux d'AMPc intracellulaire.
- Les récepteurs P2 sont activés par les nucléotides tels que l'ATP, l'ADP, l'UTP, et l'UDP. Ils sont subdivisés en deux sous-types. Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropes qui sont des canaux ioniques ligand-dépendants. Il existe sept sous-types. P2Y est un récepteur métabotrope couplé aux protéines G. Il existe huit sous-types.

Les récepteurs purinergiques participent à la régulation de l'homéostasie osseuse par l'exercice (activé par l'ATP et l'ADP). Il a été montré que la libération vésiculaire d'ATP est un médiateur aigüe des signaux mécaniques selon l'ampleur de la charge (contrainte de cisaillement) et que

l'activation de ces récepteurs conduit à la libération de calcium intracellulaire [165,166]. Les récepteurs purinergiques sont essentiels à la mécano-sensibilité car il a été montré chez des souris knock-out pour P2X7R que cette mécano-sensibilité était réduite jusqu'à 73 % [166]. Les contraintes de cisaillement activent le récepteur P2X7, ce qui augmente la minéralisation assurée par les ostéoblastes et favorise la formation osseuse [167].

1.2.5. Les Cils primaires

Les cils primaires sont des organites cellulaires essentiels qui jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire et la détection des signaux environnementaux. Contrairement aux cils motiles, les cils primaires ne sont pas impliqués dans le mouvement cellulaire mais agissent comme des antennes cellulaires. Les cils primaires sont composés de microtubules arrangés en un motif appelé "9+0", c'est-à-dire neuf doublets de microtubules sans paire centrale. La structure de base du cil primaire (axonème), est ancrée dans le corps basal de la cellule (Figure 26). Les cils primaires possèdent divers récepteurs tels que les récepteurs purinergiques et les canaux ioniques. Ces canaux sont les polycystines qui forment avec le cil un complexe récepteur-canal mécano-sensible [168]. La perturbation de la structure des cils primaires dans une culture d'ostéocytes (MLO-Y4) a réduit l'expression de l'ARNm d'OPG, les taux extracellulaires de PGE 2, et le rapport ARNm OPG/RANKL lors de stimulation des cellules par un flux de liquide [169].

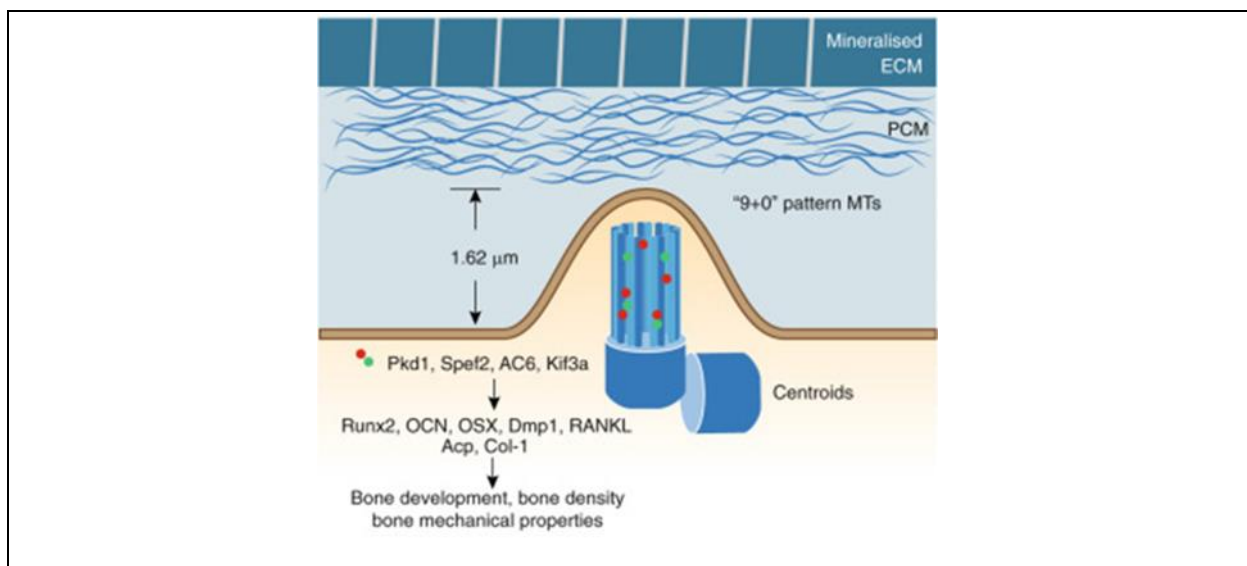


Figure 28: Illustration de la structure des cils primaires de l'ostéocyte et de la réponse biologique lors de l'activation du cil par les contraintes de cisaillement fluide.

1.3. Réponse moléculaire des ostéocytes à la contrainte mécanique

La réponse moléculaire à la contrainte mécanique est dépendante de l'activation des mécano-senseurs (intégrines, canaux ioniques, connexines, récepteurs purinergiques et cil primaire) soit par la contrainte de cisaillement du fluide présent entre les dendrites et les parois du réseau lacuno-canaliculaire, soit par des messagers (cytokines, myokines).

1.3.1. Réponse moléculaire à l'activation des mécano-senseurs

La contrainte mécanique se répartit sur l'ensemble de la pièce osseuse et crée des gradients de pression qui au sein du réseau lacuno-canaliculaire conduisent au déplacement du fluide entraînant des contraintes de cisaillement à la surface des membranes cytoplasmiques des ostéocytes. Cette contrainte provoque une déformation de la paroi cytoplasmique où siègent les mécano-senseurs qui se retrouvent activés et induisent une réponse métabolique.

Les intégrines, protéines clef de la capacité des ostéoblastes et des ostéocytes à percevoir les contraintes, relient le cytosquelette à la MEC. L'activation des intégrines a été étudiée *in vitro* pour chaque cellule du tissu osseux. Chaque intégrine active une voie de signalisation particulière, référencé par Mao *et al.* en 2023 [154] et répertorié dans le Tableau 3. Les intégrines, une fois activées, ont la capacité d'activer d'autres familles d'intégrines et activent aussi les autres mécano-senseurs telle que la connexine 43. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ majoritaire au sein des ostéocytes pourrait activer la connexine 43, ainsi que les intégrines $\alpha_5\beta_1$ puis $\alpha_v\beta_1$ ce qui déclencherait la voie de signalisation ERK, PI3K/Akt [152,154]. Les études sont toujours en cours pour comprendre précisément les voies de mécano-signalisation des intégrines au sein des ostéocytes, mais il est sûr que tous les mécano-senseurs travaillent de concert et que leur activation par la stimulation mécanique active les voies COX-2, OPG, Wnt, mTOR et inhibe la voie SOST [170] (Figure 29).

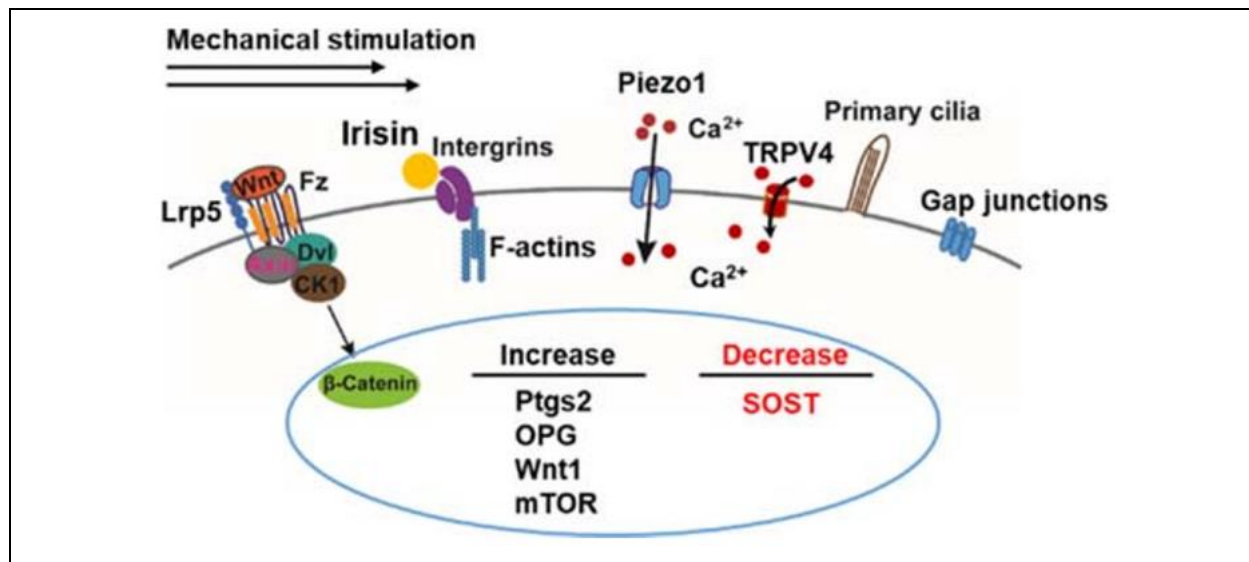


Figure 29: Illustration de l'activation des mécano-senseurs par la contrainte mécanique et leurs effets sur les voies de signalisations PTgs2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), COX2, OPG, Wnt1, mTOR et SOST dans les ostéocytes. Issu de Li *et al.*, en 2021 [170].

Tableau 3: Référencement des intégrines selon le type cellulaire impliqué avec la voie de signalisation impliqué et les effets régulateur sur le métabolisme. CSM : Cellules souche mésenchymateuse. Tableau reproduit et traduit librement de l'article de Mao *et al.* en 2023 [151]. BSP: Bone sialoprotein; MMP : matrix metalloproteinase; NCAM : Neural cell adhesion molecule; WISP1 : Wnt-induced secreted protein 1; CCN : Cellular communication network factor ; ERK : extracellular signal-regulated kinase; PTH1R: parathyroid hormone receptor-1; EDIil: Epidermal growth factor-like repeats and discoidin I-like domain 3 VNP: Vitronectin-derived peptide; FAK: focal adhesion kinase; DICAM: Dual immunoglobulin domain-containing cell adhesion molecule; Il: Interleukine

Intégrines	Types cellulaires	Voies potentielles ou protéines de liaisons	Effets régulateurs
$\alpha_v\beta_3$	CSM de la moelle osseuse	BSP/MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$	Favorise la migration cellulaire
β_1		NCAM/ β_1 /cofilin	Régule la migration et promouvoit la prolifération
$\alpha_5\beta_1$		WISP-1/ $\alpha_5\beta_1$ /BMP-2	Améliore l'adhésion, la survie et la migration des cellules
$\alpha_2\beta_1$		Col II/ $\alpha_2\beta_1$ /FAK-JNK	Augmentation de la formation osseuse et de la cicatrisation des défauts
α_5	Cellules souches dérivées du tissu adipeux	circRNA-VGLI3/microRNA-326-5p/ α_5	Favorise la différenciation ostéogénique
	Cellules souches du ligament parodontal humain	microRNA-152-3p/ α_5	Favorise la survie et la différenciation ostéogénique
$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$	Ostéoblaste	CCN3/ $\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_5$ /BMP-4	Favorise la maturation cellulaire, l'adhésion et la minéralisation de la matrice
$\alpha_v\beta_1$		$\alpha_v\beta_1$ /CCN2/FAK/ERK	Améliore l'adhésion et la différenciation des ostéoblastes
$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$		CCN1/ $\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$ / PTH1R	Favorise l'anabolisme osseux par l'activation de la signalisation de la PTH
$\alpha_2\beta_1$		Col I/ $\alpha_2\beta_1, \alpha_2\beta_1$ /ERK	Régule la différenciation cellulaire
$\alpha_{11}\beta_1$		Col XIII/ $\alpha_{11}\beta_1, \alpha_{11}\beta_1$ /osteolectin/Wnt	Favorise l'adhésion et la différenciation cellulaires
β_1		β_1 /Smad/BMP2	Régule la différenciation ostéogénique
$\alpha_5\beta_1$		EDIil3/ $\alpha_5\beta_1$ /ERK	Régulation à hausse des facteurs ostéogéniques
$\alpha_4\beta_1, \beta_3$		Fibronectin/ $\alpha_4\beta_1, \beta_3$	Favorise la minéralisation et la différenciation des cellules
$\beta_1, \alpha_v\beta_3$		VNP-16/ β_1 / FAK, VNP-16/ $\alpha_v\beta_3$	Favorise la différenciation et la survie des ostéoblastes. Inhibe l'expression des protéines liées à la maturation des ostéoclastes.
$\alpha_v\beta_3$	Ostéoclaste	$\alpha_v\beta_3$ /c-Fms/ERK/c-Fos	Régule l'adhésion, la différenciation et la prolifération cellulaires
		DICAM/ $\alpha_v\beta_3$	Inhibe l'ostéoclastogénèse
		Phloretin, Tetraspanin 7/ $\alpha_v\beta_3$	Inhibe l'activité des ostéoclastes en perturbant le cytosquelette d'actine
		CS-E/ $\alpha_v\beta_3$, osteoactivin	Inhibe la différenciation des ostéoclastes
			Favorise l'ostéoclastogénèse
		$\alpha_2\beta_1$ /Ameloblastin	Inhibe la différenciation des ostéoclastes
		$\alpha_2\beta_1$ / IL-7/IL-17	Inhibe la différenciation et la prolifération des ostéoclastes
		$\alpha_1\beta_1$ / IL-7R	Détermine la perte osseuse médiée par les lymphocytes T
			Favorise la résorption osseuse
		$\alpha_v\beta_5$ /Irisin	Inhibe l'ostéoclastogénèse

1.3.2. Réponse des ostéocytes aux myokines lors de l'activité physique

Lors de l'exercice physique, les contraintes sont dues d'une part, aux impacts au sol et à la gravité, d'autre part, aux contractions musculaires qui induisent des forces de tension, de compression, de flexion, de cisaillement, de torsion, de charge, et d'une combinatoire torsion-compression. Cependant, le muscle est un organe sécrétoire endocrinien. Les myokines comprennent deux types, dont les effets sur la masse osseuse sont antagonistes. Les cytokines positives pour la masse osseuse comprennent l'Irisine, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), la Décorine, le BAIBA (Beta-AminoIsoButyric Acid) et le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Les cytokines négatives comprennent la Myostatine, le FGF21, l'IL7 (interleukine) et l'IL8 [171].

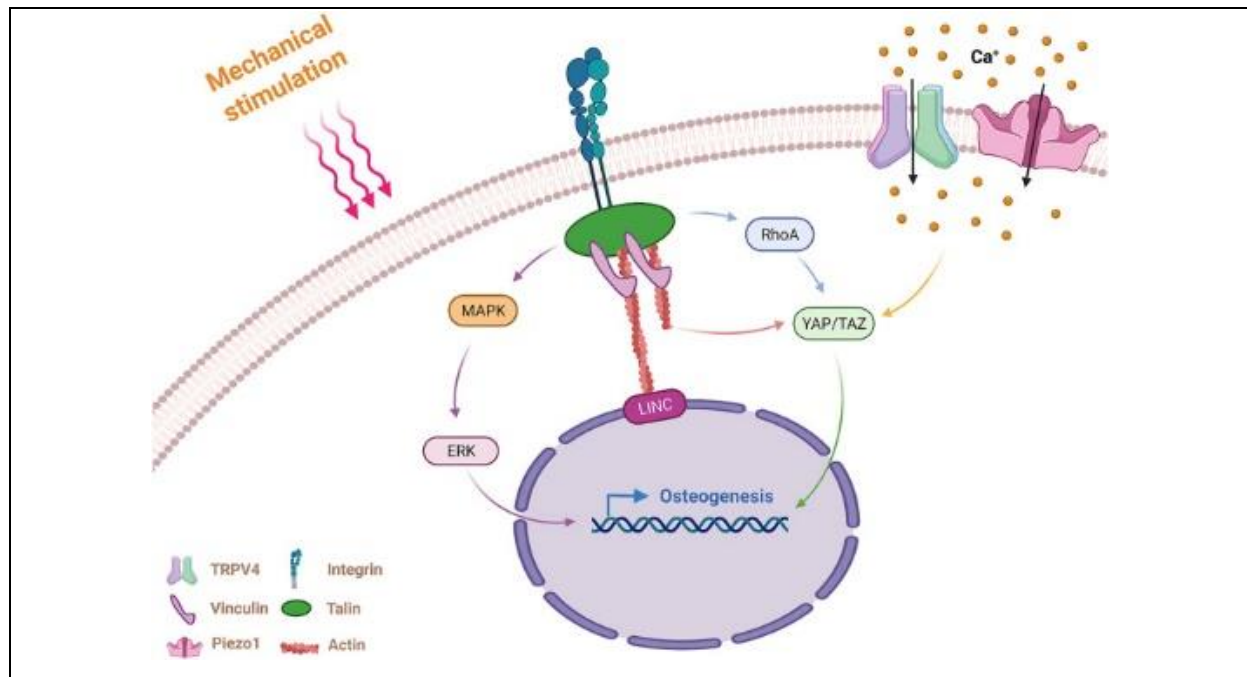
L'Irisine est produite par le muscle lors de contraction musculaire et libérée dans la circulation. Elle a des effets anabolisant en augmentant la formation osseuse et en diminuant les activités des ostéoclastes [171]. Chez les ostéocytes, l'Irisine augmente leur survie en activant les voies de signalisation des MAP kinases ERK1 et ERK2, ce qui augmente l'expression du facteur de transcription activant le facteur de transcription 4 (ATF4) et inhibe l'apoptose ostéocytaire [172]. L'Irisine agit sur les ostéocytes par l'intermédiaire des intégrines [173] et notamment via l'activation de l'intégrine $\alpha\beta5$ par la protéine de choc thermique extracellulaire 90 α (eHsp90 α) ce qui augmente l'affinité du récepteur $\alpha\beta5$ sur le domaine RGD de l'Irisine [174].

De plus, il a été montré que l'Irisine améliore la différenciation, la prolifération, la minéralisation des ostéoblastes et régule à la hausse l'expression des régulateurs de transcription, tels que les facteurs de transcription Runx2 et Osterix [175]. Zhang *et al.*, en 2017 [176] ont montré que deux semaines de course volontaire (roue d'activité) chez la souris et des injections d'Irisine ont entraîné une augmentation de l'épaisseur de l'os trabéculaire et cortical, du nombre d'ostéoblastes et contribuent à inhiber l'ostéoclastogenèse.

II Réponse ostéoblastique et ostéoclastique, puis tissulaire à la contrainte mécanique

2.1. Effet de la contrainte mécanique sur les ostéoblastes

Les ostéoblastes, dérivés des cellules souches mésenchymateuses sont les cellules qui synthétisent la matrice osseuse minéralisée. Les ostéoblastes se différencient soit en ostéocytes, et sont donc inclus dans la matrice minéralisée, soit meurent par apoptose. En l'absence de dendrites, les ostéoblastes ont également la capacité à percevoir les stimulations mécaniques via les récepteurs mécano-sensibles tels que PIEZO1, les récepteurs purinergiques et les cils primaires [177,178]. Lors de contraintes mécaniques, la moelle osseuse et les ostéoblastes « endostéaux » subissent les forces de pression générées dans la cavité médullaire ce qui conduit à la déformation de la membrane cytoplasmique des ostéoblastes et à l'ouverture de leur canaux ioniques [179]. En effet, il a été montré que les ostéoblastes répondent aux contraintes de la matrice et aux contraintes de cisaillement, par une augmentation de la production de PGE2 *in vitro* [180]. Ils répondent *in vivo* aux contraintes de cisaillement à l'interface os-moelle osseuse, ce qui fournit un signal mécanique aux cellules de la moelle osseuse conduisant à l'anabolisme osseux [181]. Une étude récente prouve que la stimulation mécanique externe régule les CSM de la moelle osseuse vers la lignée ostéogénique, indépendamment de la régulation des ostéocytes [182]. Les CSM détectent les contraintes mécaniques au sein du canal médullaire grâce aux intégrines et aux canaux ioniques mécano-sensibles et assurent la transduction du signal. Les intégrines activent les voies ERK et la voie YAP/TAZ via la voie RhoA favorisant l'ostéogenèse. Les canaux ioniques mécano-sensibles (Piezo1) génèrent un afflux intracellulaire de calcium qui renforce la voie YAP/TAZ [183] (Figure 30).



2.2. Effet de la contrainte mécanique sur les ostéoclastes

Les ostéoclastes et leurs précurseurs résident dans la moelle osseuse et ont la capacité de percevoir les contraintes mécaniques. Wang *et al.*, en 2020 [184] ont montré que Piezo1 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie osseuse en régulant la diaphonie entre les ostéoblastes et les ostéoclastes dans des conditions de stimulation mécanique. Piezo1 module la différenciation des ostéoclastes en régulant la voie AKT/SOST, YAP/TAZ/Wnt et l'expression du collagène de type II et de type IV [58,184]. En réponse à l'absence de pesanteur, les ostéocytes transmettent des signaux pro-ostéoclastogènes pour stimuler la résorption osseuse [123]. Sous contrainte mécanique, les ostéocytes inhibent la prolifération des ostéoclastes en diminuant l'expression du gène RANKL/OPG [185].

2.3. Réponse tissulaire et adaptation osseuse à la contrainte mécanique

Selon la loi de Wolff, l'os se forme et se reforme en fonction des contraintes qu'il subit. En position debout, le corps doit constamment soutenir son propre poids face à la gravité terrestre. En plus de cette charge mécanique quotidienne, le squelette est constamment soumis à une large

gamme de stress mécaniques, avec des amplitudes et des fréquences variées. Pour maintenir une structure squelettique stable, l'os a la nécessité d'adapter sa masse et sa microarchitecture, et assurer la maintenance du tissu vieillissant. Le remodelage osseux est dépendant de la magnitude et du taux de contrainte mécanique. En l'absence d'exercice physique, la masse osseuse, n'atteindrait que 30 à 50 % de son potentiel [8].

Lorsqu'une contrainte mécanique provoque une déformation tissulaire suffisante pour dépasser un certain seuil, les ostéoblastes produisent davantage d'os pour augmenter la masse et la résistance osseuse, réduisant ainsi le risque de fractures. En revanche, lorsque la contrainte mécanique est trop faible pour induire une déformation tissulaire, les ostéoclastes résorbent l'os qui devient alors superflu pour l'équilibre du squelette [58]. Ainsi, la masse, l'architecture et la résistance osseuses sont continuellement optimisées en fonction des contraintes mécaniques subies par le squelette. Après une phase de formation ou de résorption due à une augmentation ou une diminution des contraintes mécaniques sur le squelette, le tissu osseux retrouve un état stable où la plage de déformation tissulaire est équilibrée. Dans cet état, le remodelage osseux intervient uniquement de manière physiologique pour entretenir le tissu, sans ajout ni réduction de la masse osseuse. Cette état est défini par le « mechanostat » Frost qui fonctionne donc comme un système de rétrocontrôle, ajustant continuellement le niveau d'équilibre du tissu osseux en réponse à un nouvel environnement mécanique [186]. Les adaptations spécifiques en fonction d'une contrainte ou exercice physique sont développées dans le paragraphe III de cette partie.

L'adaptation osseuse aux contraintes mécaniques n'est pas uniforme sur toute la pièce osseuse. La pièce osseuse sous contrainte répartit la charge selon une zone de compression et une zone de traction (cf. Partie I 2.2.2 Figure 14). Il en résulte une différence de l'organisation tissulaire se traduisant par une orientation des fibres de collagène uniforme et parallèle pour la zone de compression contrairement à la zone de traction qui présente une organisation plus lâche de fibres entremêlées. Le réseau lacuno-canaliculaire se retrouve également désorganisé dans la zone de tension [50] (Figure 31).

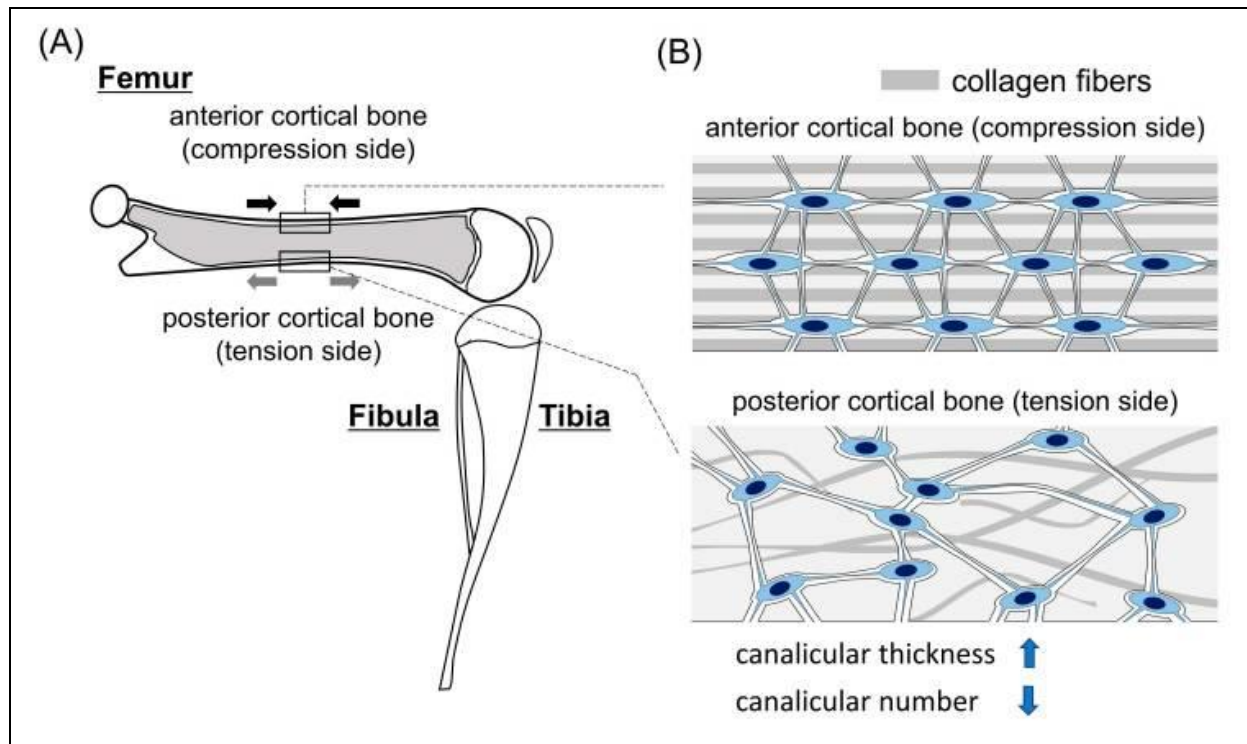


Figure 31: Illustration de la différence de structure du réseau lacuno-canaliculaire entre les côtés de compression et de tension de l'os cortical fémoral. Issu de Moriishi *et al.*, en 2022 [50].

III Modalités d'exercice physique dans des modèles animaux.

L'os est un tissu dynamique qui de par ses propriétés structurales et tissulaires est en capacité de résister à des contraintes mécaniques. Selon la théorie du « mechanostat » de Frost [182] les effets ostéogéniques de l'exercice physique sont dépendants d'une intensité liminaire et d'une fréquence de stress mécanique qui reste à définir. Cette intensité est hautement dépendante du type d'activité (activité en charge (course à pied, saut), en décharge partielle (vélo), ou décharge totale (natation)). Ainsi, la mécano-régulation du tissu osseux dépend de la fréquence de chargement. Pour des fréquences inférieures à un certain seuil, les effets sur le tissu osseux seront cataboliques tandis que pour des fréquences supérieures, les effets seront anabolisants (Figure 32). Ainsi, la compréhension de ces mécanismes d'adaptation tissulaire nécessite des modèles d'exercice physique applicables sur les animaux de laboratoire.

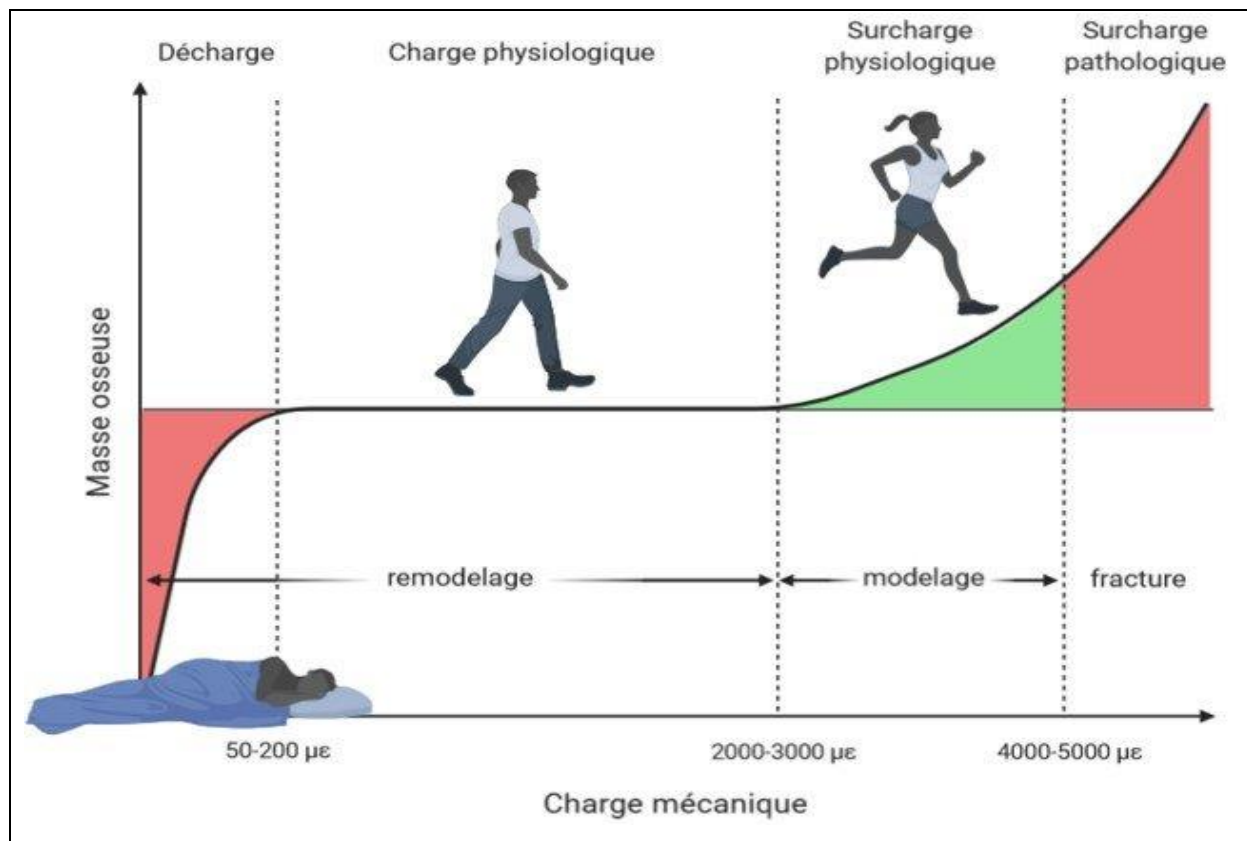


Figure 32: Illustration des effets de la charge mécanique et de l'exercice physique sur la qualité osseuse. Issue de la thèse de Laura PEURIERE en 2021 sous la direction de Laurence VICO-POUGET [187].

3.1. Les modèles d'exercice physique

Les principaux modèles d'exercice physique dans les études sur le tissu osseux chez les rongeurs, comprennent :

- La course sur tapis roulant : Les animaux courent sur un tapis roulant motorisé à des vitesses et des durées contrôlées. Cette modalité permet un contrôle précis de l'intensité (faible, modérée, élevée) et de la durée de l'exercice.
- La course dans une roue d'activité : Les animaux ont accès à une roue dans laquelle ils peuvent courir spontanément. Cette course est volontaire, ce qui réduit le stress des animaux et permet de mesurer l'activité physique spontanée si la roue est reliée à un capteur. Cependant, cette modalité ne permet pas de planifier un entraînement ni de contrôler l'intensité ou la durée de l'exercice.

- La natation : Les animaux nagent dans un bassin à une température contrôlée. L'intensité est ajustée en fonction du protocole. Cette modalité a l'avantage d'engendrer un faible risque de blessures articulaires.
- L'entraînement en résistance comprend plusieurs exercices comme l'escalade de tours, des sauts répétés, des tractions sur une barre. L'intensité du protocole peut être augmentée par l'ajout de poids. Cette modalité est principalement utilisée pour étudier les effets de l'exercice de haute intensité sur la qualité osseuse.
- Les vibrations sur plateforme utilisent les vibrations à des fréquences et des amplitudes spécifiques pour générer des réponses osseuses.

Portier *et al.*, en 2020 [14] ont analysé ces cinq modèles d'exercice physique présents dans la littérature chez des modèles de rats dans 177 articles. Ils ont recensé les effets de chaque modalité d'exercice selon le sexe des rats ou s'ils avaient subi une ovariectomie pour induire une perte osseuse (ostéopénie). Leur étude a mis en évidence que dans 65% des cas, l'exercice physique a globalement un effet positif sur la qualité osseuse. Aussi, les exercices de résistance, comme les sauts et l'escalade, sont les plus efficaces pour améliorer la qualité osseuse dans 87,2% des études. Pour autant, la course sur tapis roulant est la méthode la plus utilisée et présente des effets ostéogéniques notables dans 67,7% des études. *A contrario*, les vibrations sur plateforme, sont les moins efficaces. Selon le genre des rats, la réponse osseuse est différente pour les exercices de natation ou de course dans une roue d'activité. En effet, chez les femelles, la réponse osseuse à la natation est controversée. Au niveau cellulaire, il a été rapporté que les exercices à impact élevé et de résistance augmentent davantage la formation osseuse comparés aux exercices d'endurance ou les exercices aérobies. Bien que l'exercice physique ait des effets positifs selon le contexte, il peut tout de même présenter des effets délétères sur le tissu osseux ; tout comme c'est le cas pour la course dans une roue d'activité pour les mâles âgés [188], la course sur tapis roulant à haute intensité pour les rates âgées [189–192], et certains protocoles de natation [193,194]. En somme, bien que l'exercice physique soit généralement bénéfique pour la qualité osseuse, les effets varient considérablement selon le type d'exercice, le sexe des sujets et les conditions spécifiques du modèle animal utilisé.

Le modèle de course sur tapis roulant est le modèle d'exercice qui offre une multitude de déclinaisons de protocole. La vitesse, l'inclinaison du tapis et la durée de la course permettent de reproduire tous les types de contraintes générées par la locomotion et de tester

spécifiquement chaque type d'entraînement (concentrique excentrique, haute intensité, basse intensité, modéré continu, intermittent).

3.2. Hétérogénéité des protocoles d'exercice de course

La course sur tapis roulant est la modalité d'exercice la plus simple et la plus reproductible à mettre en place pour étudier la réponse osseuse à l'exercice. La course sur tapis permet de moduler la durée, l'intensité et le types d'entraînement en fonction de l'inclinaison du tapis. Cette modalité est transposable chez l'homme et fait d'elle un modèle de choix pour notre étude. Dans la littérature, deux principales modalités de course sont définies : la course modérée continue et la course intermittente à haute intensité également appelée HIIT. La course continue consiste en un entraînement à intensité modérée et constante, effectuée sur une période prolongée sans interruption, d'une durée de 30 minutes à plusieurs heures. L'intensité correspond à environ 50 à 80 % de l'absorption maximale d'oxygène (VO_{2max}). Le HIIT est un entraînement qui alterne des périodes d'exercice à haute intensité et des périodes de récupération (active ou au repos). Les séances sont généralement courtes et durent souvent entre 20 et 30 minutes. Le HIIT induit des intensités très élevées pendant les périodes d'effort. Elles peuvent atteindre entre 90 à 110 % de la VO_{2max} [15–17]. Cette méthode d'entraînement a vu le jour dans les années 1910 mais n'a été popularisée que dans les années 1940. Les effets du HIIT sur les maladies métaboliques et dégénératives sont bien documentés dans la littérature, mais son utilisation dans le domaine osseux est très récente [14]. Les premières études sur les effets de l'entraînement à haute intensité sur le tissu osseux remontent aux années 1990 [195,196]. Cependant, les premiers essais contrôlés randomisés sur des sujets ostéoporotiques ont débuté dans les années 2000 [197].

Historiquement, la course continue modérée a été la modalité la plus utilisée dans les études sur le tissu osseux en raison de sa facilité d'application [198–201]. Dans des conditions d'ostéopénie, la course continue a montré des effets ostéoprotecteurs par rapport aux populations sédentaire [198–201]. Très peu d'études expérimentales ont comparé les effets de la course continue modérée et du HIIT sur le statut osseux [202–204]. La première étude menée par Boudenot *et al.*, en 2015 a montré chez le rat Wistar que le HIIT induisait un gain de densité minérale osseuse du corps entier et du fémur supérieurs de plus de 20 % par rapport au groupe de course modérée continue, en utilisant une période d'entraînement 30 % plus courte [28]. De

plus, une étude récente sur un groupe de jeunes femmes sédentaires (23 ans) a montré que 8 semaines d'entraînement HIIT produisaient des bénéfices supérieurs sur le métabolisme osseux (DMO, vitamine D) par rapport à un entraînement modéré continu [205].

Le modèle HIIT semble avoir un meilleur effet ostéogénique ou ostéoprotecteur. Néanmoins, chez l'homme comme chez l'animal, la course à pied de haute intensité ne peut pas être pratiquée quotidiennement car elle entraîne un épuisement de l'organisme. En effet, Polisel *et al.*, 2021 [206], ont montré que le HIIT (entraînement par intervalles de haute intensité) chez des souris (C57BL/6J mâles) saines âgées de 26 semaines à la fin du protocole), entraînées pendant 30 minutes cinq fois par semaine, pendant 10 semaines, induisait une diminution de la solidité osseuse (ténacité (c'est l'aire totale sous la courbe d'une courbe typique de charge par rapport au déplacement de l'os lors de test de flexion trois points)).

Une troisième modalité de course pour les modèles animaux a été développée au laboratoire B3OA de l'université de Paris. Cette modalité combine, sur tapis roulant la course continue et la course HIIT espacées sur différents jours de la semaine. Cette modalité a l'avantage de se rapprocher des programmes d'entraînement des athlètes, à savoir varier les méthodes d'entraînement au cours de la semaine. Les travaux de Wazzani *et al.* en 2023 ont montré que la course combinée améliore l'épaisseur trabéculaire au col fémoral comparée aux deux autres modalités de course [29]. Cette étude conclut que chez le rat, le fémur n'est pas forcément le meilleur site de mesure pour observer des changements osseux lors de protocoles de course.

3.3. Hétérogénéité de la réponse osseuse à l'exercice de course selon les sites anatomiques

Les adaptations tissulaires osseuse à la contrainte se réalisent à la fois sur la microarchitecture trabéculaire et sur la microarchitecture corticale. Les principaux sites de mesures osseuses par microtomographie à rayons x chez les animaux sont communs à l'homme et aux animaux de laboratoire et sont dépendants de l'appareillage. Ces sites comprennent principalement, le rachis lombaire, le col du fémur. L'évaluation de la microarchitecture corticale est réalisée aux diaphyses des os longs comme le tibia ou le fémur. Les analyses histologiques des ostéocytes sont principalement réalisées sur les diaphyses. Les résultats contradictoires que l'on peut retrouver dans certaines études peuvent être expliqués par l'hétérogénéité des protocoles de course mais aussi par l'hétérogénéité des sites de mesures. Bonnet *et al.* en 2007 ont montré

que la course continue augmentait la densité minérale osseuse au fémur et au tibia avec une augmentation de la fraction volumique osseuse (BV/TV) uniquement au tibia et non au fémur [198]. Cette augmentation de la fraction volumique osseuse au tibia a également été rapportée par Kirsten *et al.* en 2016 [207]. Elle est associée à une augmentation du nombre de travées osseuses. L'étude de Kirsten *et al.* a également montré que la course en endurance n'a pas d'effet systémique puisque les résultats mesurés au tibia n'ont pas été retrouvés aux vertèbres et à la mandibule. Finalement il semblerait que seuls les os porteurs et locomoteurs soient affectés par l'activité physique ce qui est en accord avec la loi de Wolff [1].

Cette seconde partie a présenté comment le tissu osseux était capable de s'adapter aux contraintes mécaniques et à son environnement grâce à un processus de mécano-transduction. Les cellules osseuses ont la capacité de percevoir les contraintes et les déformations de leur environnement. Seuls les ostéocytes au sein du réseau lacuno-canaliculaire sont en capacité de percevoir la contrainte à l'échelle osseuse. La capacité des ostéocytes à percevoir les contraintes dépend de ses mécano-senseurs. Il en résulte une réponse métabolique soit pro-ostéoclaste soit pro-ostéoblaste, adaptant ainsi la microarchitecture osseuse. En l'absence de contrainte mécanique le tissu osseux est résorbé et les ostéocytes meurent par apoptose nécessitant son remodelage. La course sur tapis roulant est la modalité d'exercice physique et donc de modèle de contrainte la plus facile à mettre en place chez des modèles animaux. Pour terminer cet état de l'art, la troisième partie explorera les mécanismes de mort cellulaire et de recyclage cellulaire ostéocytaire et les effets de l'activité physique sur ces mécanismes.

Partie III Mécanisme de mort cellulaire et d'autophagie ostéocytaire

L'ostéocyte est la seule cellule osseuse ayant la plus grande durée de vie et qui est prisonnière de la matrice minéralisée qui l'a vue naître. Avec le vieillissement et l'absence de stimulation mécanique, les ostéocytes meurent par apoptose. Pour pérenniser le plus longtemps sa vie, l'ostéocyte prisonnier peut recourir à un mécanisme de recyclage des déchets cellulaires appelé autophagie. L'objectif de cette partie est de présenter ce qu'est l'apoptose et ses effets sur l'homéostasie osseuse puis de présenter l'autophagie ostéocytaire. Enfin, cette partie abordera les effets de l'exercice physique sur ces deux mécanismes.

Préambule :

Il existe trois différents types de mort cellulaire l'apoptose, l'autophagie et la nécrose, chacun ayant des mécanismes, des causes et des conséquences spécifiques. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, orchestré et régulé par des signaux intracellulaires spécifiques. L'autophagie est un processus catabolique où les cellules dégradent et recyclent leurs propres composants, particulièrement lors de situations de stress ou de carence en nutriments. La nécrose est une forme de mort cellulaire accidentelle et souvent pathologique résultant de dommages aigus, tels que des traumatismes physiques ou chimiques. Cette dernière ne sera pas traitée car l'objectif de la thèse est de montrer les effets de l'activité physique sur des animaux sains.

I Rôle de l'apoptose ostéocytaire dans l'homéostasie osseuse

L'apoptose, également connue sous le nom de mort cellulaire programmée, est un processus biologique essentiel par lequel les cellules indésirables ou endommagées sont éliminées de manière contrôlée. Contrairement à la nécrose, qui est une forme de mort cellulaire pathologique résultant de dommages aigus et souvent accompagnée d'inflammation, l'apoptose est un processus ordonné et propre. L'apoptose joue un rôle crucial dans le développement et le maintien de l'homéostasie des organismes multicellulaires en éliminant les cellules vieilles et endommagées. Il existe principalement deux voies majeures par lesquelles l'apoptose peut être induite (intrinsèque et extrinsèque) et une voie indirecte médiée par la cytotoxicité des lymphocytes T via les perforines et les granzymes [208]. La voie intrinsèque (mitochondriale) est activée par des signaux internes à la cellule, souvent en réponse à des dommages à l'ADN,

à un stress oxydatif ou à d'autres perturbations internes. La voie extrinsèque (récepteurs de la mort) est initiée par des signaux externes lorsqu'un ligand se lie à un récepteur de mort sur la surface cellulaire, tel que le récepteur du TNF (« Tumor Necrosis Factor »). Le détail moléculaire de chaque voie de l'apoptose est présenté dans les parties suivantes.

1.1. Mécanismes cellulaires de l'apoptose

Le processus de mort cellulaire programmée est dépendant de l'activation d'une série de protéases à cystéine-acide aspartique appelées caspases. L'activation des caspases est médiée par la voie intrinsèque, la voie extrinsèque ou la voie des granzymes (Figure 33). Il existe deux catégories de caspases, les caspases initiatrices et les caspases exécutrices [208]. Une fois les dommages cellulaires détectés, les caspases initiatrices (caspases 8 et 9) sont activées à partir de pro-caspases (caspases inactives) et activent les caspases exécutrices (caspases 3, 6 et 7). L'activation des caspases exécutrices déclenche l'activation d'endonucléases et de protéases nucléaires ce qui entraîne la fragmentation de l'ADN, la destruction du cytosquelette, l'expression de ligands pour les cellules phagocytaires et la formation de corps apoptotiques [209]. Les phagocytes identifient les cellules apoptotiques parmi les cellules saines viables en se basant sur une combinaison de signaux à la surface des cellules apoptotiques telle que la phosphatidylsérine lipidique qui fonctionne comme un signal clé pour déclencher la phagocytose [210].

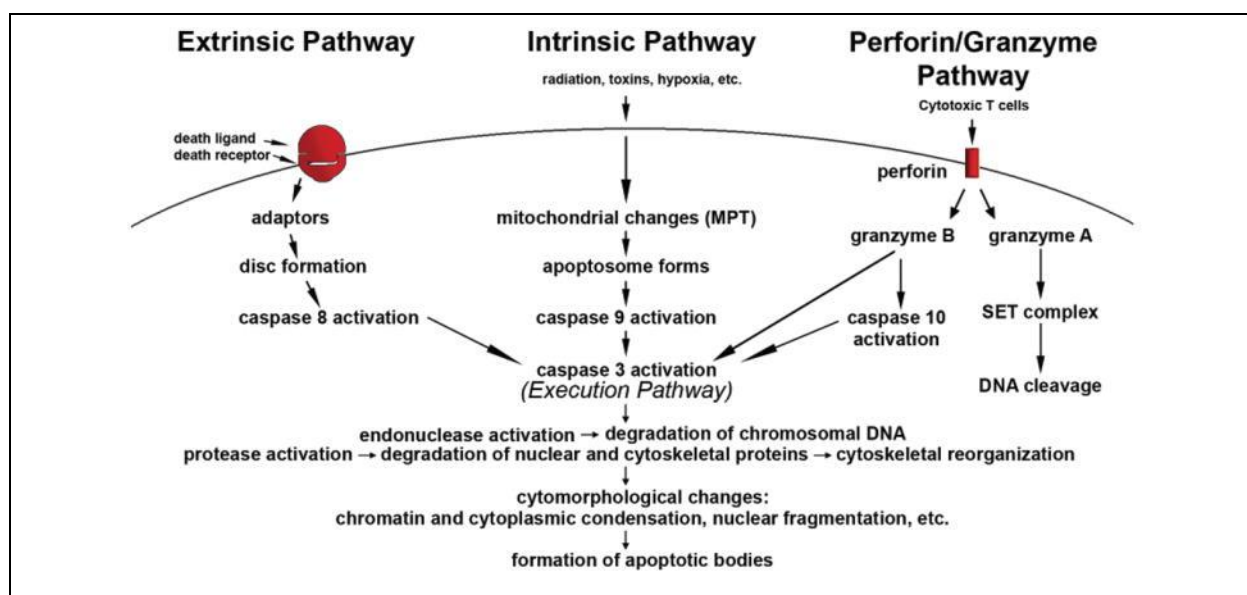
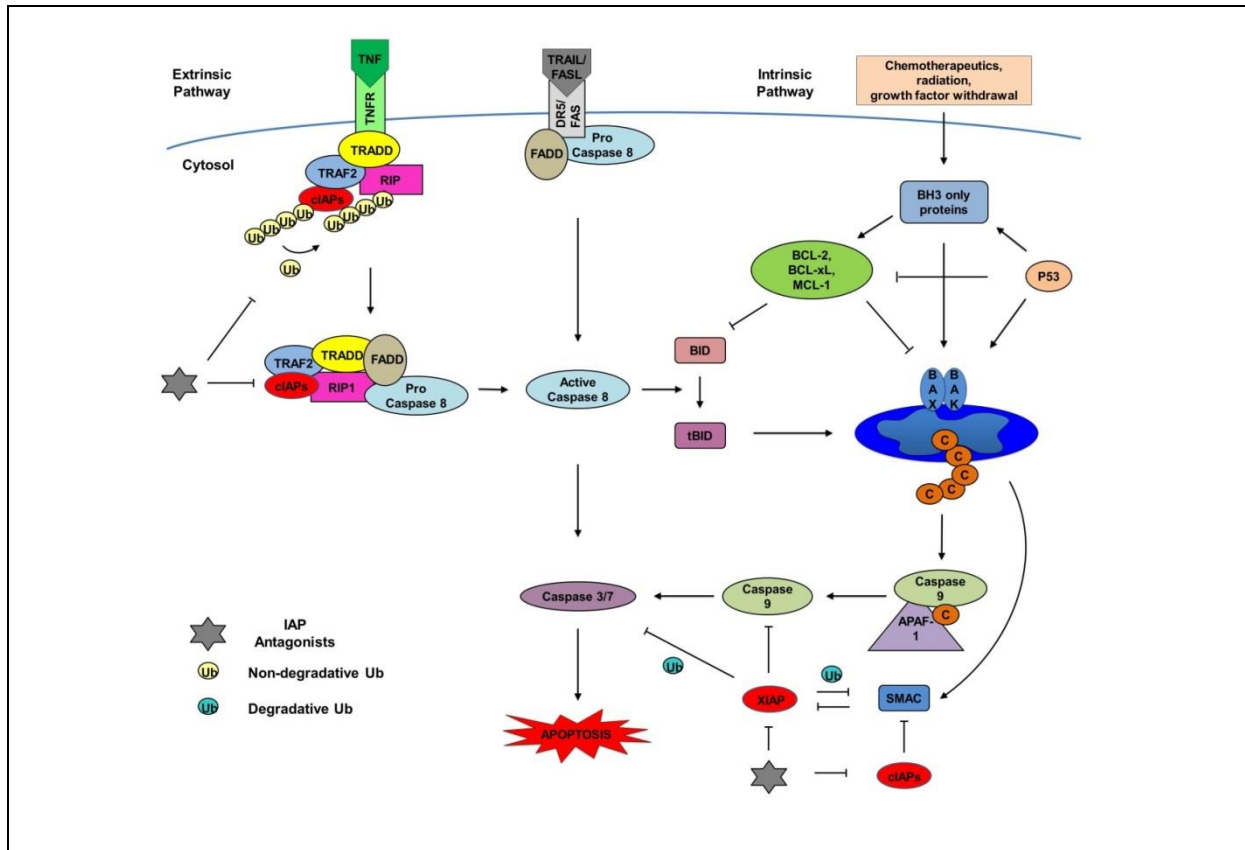


Figure 33: Schéma des trois voies d'activation de l'apoptose et leur cascades d'activation cellulaire. Issu de Elmore en 2007 [208].

1.1.1. Voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose est dépendante de facteurs libérés par les mitochondries. L'apoptose est initiée soit par une voie positive, soit par une voie négative. La voie positive comprend l'exposition de la cellule à l'hypoxie, aux toxines, aux radiations, aux espèces réactives de l'oxygène et aux virus [208]. Les signaux négatifs résultent de l'absence de cytokines, d'hormones et de facteurs de croissance dans l'environnement immédiat de la cellule. En l'absence de ces signaux de survie cellulaire, les molécules pro-apoptotiques présentes dans la cellule, qui sont normalement inhibées, deviennent actives et déclenchent l'apoptose.

Sous l'effet des signaux de stress, des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (comme Bax et Bak) s'activent et s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe. Cela induit une ouverture des pores mitochondriaux, une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération de protéines pro-apoptotiques normalement séquestrées de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Les protéines Bcl-2 sont sous la régulation de la protéine P53 suppressive de tumeur. La formation de ces pores mitochondriaux permet la libération du cytochrome C et de SMAC (second activateur des caspases dérivé des mitochondries (DIABLO)) dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome C se lie à Apaf-1 (« apoptotic protease activating factor-1 »). Cette liaison entraîne un changement de conformation de l'Apaf-1, qui expose son domaine CARD (« Caspase Recruitment Domain »). L'Apaf-1 lié au cytochrome s'assemble en un complexe heptamérique appelé apoptosome et recrute la pro-caspase 9. La caspase-9 activée, clive et active ensuite la pro-caspase 3 et 7. Ces caspases 3 et 7 effectrices clivent plusieurs substrats cellulaires, dont des protéines structurales et des régulateurs, conduisant à la désintégration contrôlée de la cellule [208,211] (Figure 34).



1.1.2. Voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque est activée par des signaux externes via l'activation de récepteurs de mort à la surface de la cellule. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des gènes récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF) dont les principaux membres sont :

- Fas (CD95/Apo-1) : Activé par la liaison du ligand FasL (Fas Ligand).
- TNF-R1 : Activé par le TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha).
- TRAIL-R1/R2 (DR4/DR5) : Activés par le TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

Ces récepteurs comprennent des domaines extracellulaires riches en cystéine et un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé « domaine de mort ». La liaison du ligand à

son récepteur induit la trimérisation du récepteur, provoquant un changement conformationnel qui expose le domaine de mort dans la partie intracellulaire du récepteur.

Le domaine de mort recrute des protéines adaptatrices intracellulaires dépendantes du récepteur activé. La liaison du ligand Fas au récepteur Fas entraîne la liaison de la protéine adaptatrice FADD et la liaison du ligand TNF au récepteur TNF, induisant la liaison de la protéine adaptatrice TRADD avec recrutement de FADD et RIP [208,211] (Figure 34). FADD recrute des pro-caspases initiateuses, principalement la pro-caspase-8. La caspase-8 active initie la cascade apoptotique en clivant directement les pro-caspases effectrices telle que la caspase 3. La caspase 3 clivent des protéines structurales et des régulateurs du cycle cellulaire, conduisant à la fragmentation de l'ADN, la rétraction du cytoplasme, et la formation de corps apoptotiques.

Les cellules apoptotiques subissent un certain nombre de changements morphologiques distincts qui facilitent la reconnaissance et l'élimination par les cellules phagocytaires [210].

1.2. Influence de l'apoptose ostéocytaire sur la santé osseuse

Les ostéocytes issus de la différenciation des ostéoblastes sont emmurés dans la matrice osseuse et jouent un rôle central dans la régulation du remodelage osseux, détectant les micro-dommages et régulant l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes [212]. Manolagas et Parfitt en 2011 ont estimé qu'environ 2,5 % des ostéocytes meurent par apoptose chaque année et que leur durée de vie peut varier de 1 à 50 ans [213]. Le taux d'apoptose des ostéocytes est régulé par l'âge de l'os, ainsi que par les hormones systémiques, les facteurs de croissance locaux, les cytokines, les agents pharmacologiques et les forces mécaniques. En condition pathologique notamment le vieillissement, les micro dommages, la décharge/l'inutilisation, l'excès de glucocorticoïdes, la carence en œstrogènes, l'inflammation et l'alcoolisme, l'apoptose ostéocytaire est corrélée à une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) et à une augmentation de la perte osseuse [201,214]. Ru *et al.* en 2020 [214] ont répertorié tous les facteurs pathologiques impliqués dans l'apoptose des ostéocytes et leurs rôles potentiels sur ces cellules. Leurs travaux sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Rôles potentiels des facteurs pathologiques sur le tissu osseux et expression en conséquence des facteurs pro- ou anti- apoptotiques. Reproduit et traduit librement des travaux de Ru *et al.*, en 2020 [214]. BAX : B-cell lymphoma associated X protein ; ROS : reactive oxygen species; NOX1-2: NADPH oxidase 1-2; AMPK: AMP-activated protein kinase; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Atg7: Autophagy related 7; BNIP3: BCL2 Interacting Protein 3; HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha; BAD: BCL2-associated death promoter; FAK: Focal adhesion kinase; NO: nitric oxide; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ORP150: Oxygen-regulated protein 150; PGE2: prostaglandine E2; FGF7: fibroblast growth factor; CCN2: cellular communication network factor 2; PIP3: phosphoinositide 3-kinase; RSK2: ribosomal S2 kinase; Pyk2: Protein tyrosine kinase 2 beta; JNK: c-Jun N-terminal kinases; DMP-1: Dentin matrix acidic phosphoprotein 1; CTSK: Cathepsin K; HMGB1: high mobility group box 1; CREB: cAMP Response Element-Binding Protein; STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3; NAFT: Nuclear factor of activated T-cells.

Facteur	Rôles potentiels	Biomarqueurs pro-apoptotiques	Biomarqueurs anti-apoptotiques
Vieillessement	Perturbation de la voie Cx43/miR21 ; surproduction de ROS ; induction de la sénescence mitochondriale et des dommages à l'ADN	BAX, ROS, cytochromeC, P53, P21	miR21, AMPK, PGC-1 α , Atg7, LC3II, Beclin-1
Déchargement/désutilisation	Génération du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) ; régulation positive de la sclérostine pour inhiber la signalisation WNT/ β -caténine ; perturbation du réseau lacuno-canaliculaire et augmentation de l'hypoxie localisée ; surproduction de ROS	BNIP3, ROS, HIF-1 α , NOX1, NOX2, sclérostine, BAD	β 1-intégrine, FAK, NO, AMPK, Irisine, PGC-1 α , Beclin-1, BCL-2, ORP150, PGE2, FGF7, LC3II, Cx43
Fatigue/ micro dommages	Rupture des processus dendritiques ; destruction de la brèche Cx43 ; perturbations de la membrane plasmique ; régulation positive du réseau de communication cellulaire ; régulation positive de CCN2 par la voie ERK1/2	HIF-1, ROS, NOX1, NOX2, Caspase-3, BAD, BAX, CCN2	FAK, c-fos, AMPK, PGC-1 α , LC3II, cavéoline-1, β 1-intégrine, Beclin-1, PGE2, Cx43, BCL-2
Déficit en œstrogènes/ androgènes	Surproduction de ROS ; activation de la voie d'autophagie ; activation de la signalisation antioxydante dépendante de MAPK ; élévation de l'expression d'iNOS et d'eNOS ; activation des signalisations Sema3A-sGC-cGMP	BAD, ROS, NOXA, P53, P66	Sema3A, AMPK, PGC-1 α , NO, AKT, Beclin-1, LC3II, PI3K, RSK2
Excès de glucocorticoïdes	Dégénérescence du LCN des ostéocytes ; régulation positive de la sclérostine pour inhiber la signalisation WNT/ β -caténine ; activation de la voie de signalisation FAS/CD95 ; stimulation des voies de signalisation PTH et de l'autophagie	ROS, NOX1, NOX2, CD95, Pyk2, JNK, Sclérostine, RANKL, DMP-1, CTSK, Caspases-3, -7, -8	AMPK, PGC-1 α , cavéoline-1, LC3II, Beclin-1, PGE2, PI3K, AKT, Cx43, cavéoline-1, BCL-2
Inflammation	Libération de la majeure partie des cytokines pro-inflammatoires par une boucle de rétroaction positive ; renforcement du stress oxydatif ; activation de la voie AGEs/RAGE	HMGB1, ROS, NOX1, NOX2, NF- κ B, AP-1, CREB, STAT3, NFAT, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, VEGF-A, Caspase-1	CD40, AMPK, PGC-1 α , Beclin-1, LC3II

L'apoptose ostéocytaire est nécessaire pour le renouvellement osseux, la réparation des microfissures et la réponse adaptative au stress mécanique. L'apoptose ostéocytaire permet l'élimination des cellules endommagées ou vieillissantes et déclenche la réparation des microdommages par le remodelage osseux. Lors de l'entrée en apoptose, l'ostéocyte envoie des signaux aux ostéoclastes pour qu'ils résorbent l'os endommagé autour de lui [215]. En effet, il a été montré que des ostéoclastes TRAP positifs présentaient de grandes vacuoles contenant des structures apoptotiques TUNEL positives (Terminal deoxynucleotidyl transferase d'UTP Nick End Labeling), probablement dérivées d'ostéocytes [216]. De plus, des ostéocytes viables à proximité des cellules apoptotiques expriment un rapport RANKL/OPG élevé dans des os soumis à une charge de fatigue [217]. Une augmentation du rapport RANKL/OPG a également été observée dans les ostéocytes déficients en connexine 43, suggérant que la perturbation de la communication intercellulaire entre l'ostéocyte apoptotique et l'ostéocyte sain pourrait provoquer la libération des cytokines pro-ostéoclastogènes par ce dernier [218,219].

II Rôle de l'autophagie dans la régulation de l'homéostasie osseuse

L'autophagie est un processus biologique fondamental par lequel les cellules dégradent et recyclent leurs propres composants. L'autophagie a été découverte par le biologiste belge Christian de Duve dans les années 1960 (prix Nobel de physiologie en 1974). Il a été le premier à utiliser le terme "autophagie" (du grec αυτο, « soi-même », et φαγειν, « manger ») ou autolyse ou auto-phagocytose pour décrire ce processus de dégradation et de recyclage des composants cellulaires. Les travaux de Yoshinori Ohsumi, (biologiste japonais prix Nobel de physiologie en 2016) ont permis de mieux comprendre ce processus au niveau moléculaire, notamment en identifiant les gènes impliqués dans le mécanisme de l'autophagie. Ce mécanisme est essentiel pour maintenir l'homéostasie cellulaire, surtout en réponse à des conditions de stress ou de manque de nutriments.

2.1. Mécanismes cellulaires de l'autophagie

La nature dynamique de la vie cellulaire nécessite un apport constant de nutriments pour satisfaire l'équilibre entre synthèse et dégradation continue. Chez les animaux, la source la plus abondante de nutriments pour les cellules est issu de la digestion des protéines alimentaires dans le tube digestif. L'homéostasie des protéines intracellulaires du corps nécessite un renouvellement continu. Cela a été démontré par les travaux pionniers de Schoenheimer qui ont introduit le concept de « renouvellement des protéines » dans le corps [220]. Les protéines qui constituent l'organisme sont remplacées presque entièrement tous les 1 à 2 mois afin de s'adapter l'organisme à des changements continus ou brusques des conditions environnementales. Dans la nature, la famine constitue la principale menace à l'encontre du maintien et la préservation de l'homéostasie. Le recyclage des protéines apparaît comme une solution essentielle par laquelle les cellules peuvent réutiliser des acides aminés pour maintenir une synthèse basale de protéines indispensables à la survie [220]. La dégradation des protéines et *in fine* l'ensemble des constituants cellulaires nécessite des mécanismes de lyse hautement régulés et compartimentés. Par exemple, les protéases intracellulaires sont confinées dans un grand complexe formant un tonneau appelé protéasome. De plus, afin de garantir une spécificité, les cibles à dégrader sont modifiées de manière sélective tel que l'ubiquitination des protéines avant la dégradation. Enfin, les autres enzymes hydrolytiques sont contenus dans un compartiment membranaire appelé lysosome, séparant physiquement au sein de la cellule l'activité des hydrolases. Cependant, le transport des cibles à dégrader dans le lysosome nécessite un transporteur qui dépend dans une large mesure de l'autophagie.

La dégradation des constituants internes de la cellule (exemple : mitochondrie) par les lysosomes nécessite leur empaquetage dans une structure membranaire appelé autophagosome (vacuole autophagique). La formation de l'autophagosome repose sur une série d'événements membranaires dynamiques. Dans le cytoplasme, une membrane d'isolement : le phagophore apparaît, puis s'étend pour former une structure en forme de coupe qui se scelle, donnant ensuite naissance à une structure à double membrane. L'autophagosome ainsi formé enferme une partie du cytoplasme et fusionne avec le lysosome pour former l'autophagolysosome (Figure 35).

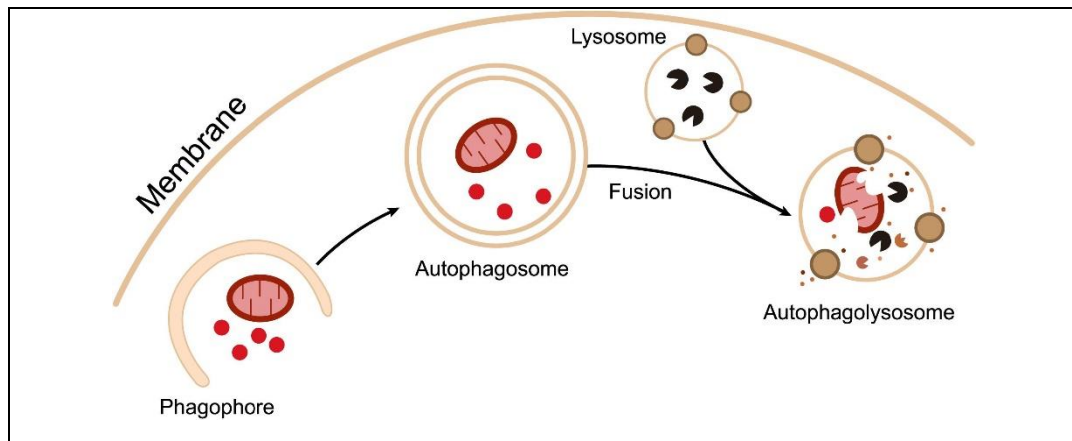


Figure 35: Illustration de la formation du phagophore autour de la cible à dégrader pour former l'autophagosome qui fusionnera avec le lysosome pour former l'autophagolysosome. Issu de Wu *et al.* en 2020 [221].

Trois types d'autophagies ont été identifiées chez les mammifères: la macro-autophagie, la mitophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (ou micro-autophagie) (Figure 36). La macro-autophagie est le type le plus commun d'autophagie dont les grandes lignes ont été décrites dans le paragraphe précédent. Les détails moléculaires seront développés dans les paragraphes suivants. La mitophagie est une forme sélective d'autophagie qui élimine les mitochondries endommagées ou dysfonctionnelles en réponse à l'inflammation, l'hypoxie, la génotoxicité et les carences nutritionnelles.

L'autophagie médiée par les chaperonnes est une forme spécialisée d'autophagie qui, contrairement à la macro-autophagie, ne nécessite pas la formation d'autophagosomes ou de vésicules. Elle est très sélective, ciblant spécifiquement certaines protéines cytosoliques pour leur dégradation dans les lysosomes. Cette forme d'autophagie est une voie de dégradation alternative à celle du système ubiquitine protéasome. L'autophagie médiée par les chaperonnes joue un rôle essentiel dans la régulation de la qualité des protéines. Les protéines cibles possèdent une séquence peptidique spécifique appelée motif pentapeptide KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), qui est reconnue par la protéine chaperonne Hsc70 (Heat shock cognate 70). Hsc70 et d'autres chaperonnes (comme les co-chaperonnes Hsp90 et Hsp40) se lient à cette séquence KFERQ, marquant ainsi la protéine pour l'autophagie. Le complexe protéine-chaperonne est dirigé vers la membrane du lysosome, où il interagit avec le récepteur lysosomal LAMP-2A (Lysosome-associated membrane protein 2A) qui permet l'entrée des protéines cibles dans le lysosome. Une fois la protéine cible liée à LAMP-2A, cette dernière subit une oligomérisation pour former un canal transmembranaire. La protéine chaperonnée est ensuite

transloquée à travers ce canal dans la lumière lysosomale. Après la translocation, la protéine cible est dégradée par les enzymes protéolytiques lysosomales en acides aminés, qui sont ensuite recyclés pour d'autres processus cellulaires [222].

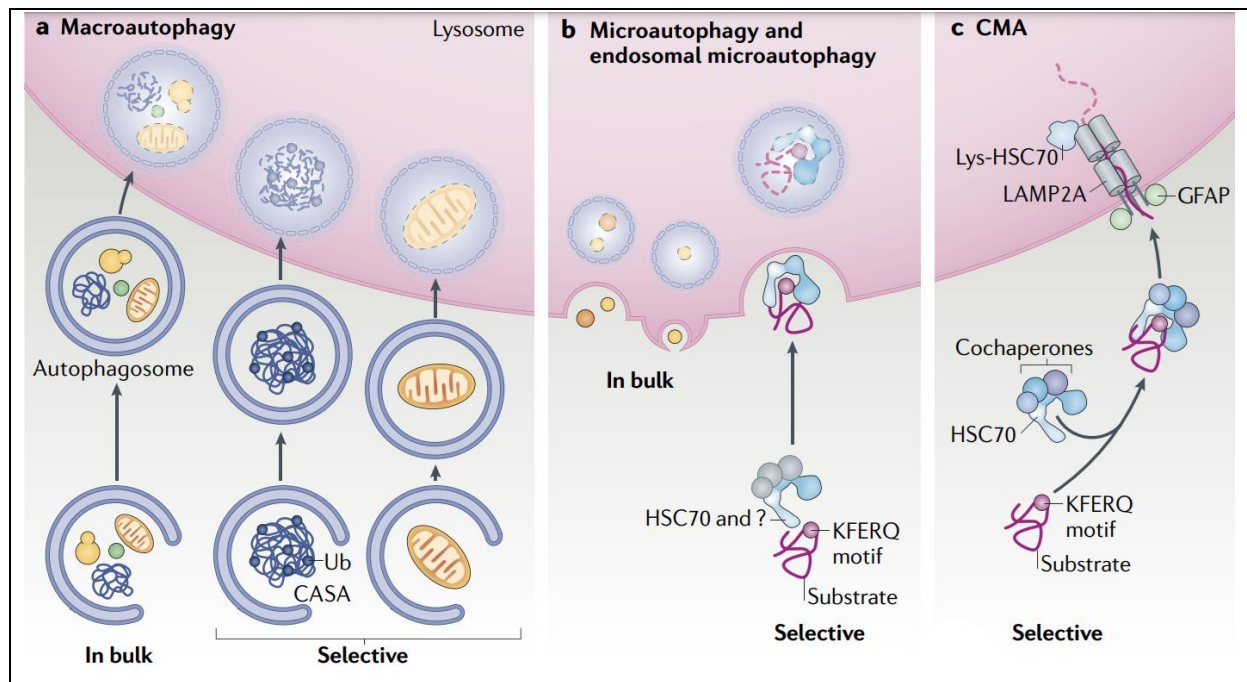


Figure 36: Illustrations des trois types d'autophagie: la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie à médiation chaperonne. Issu de Kaushik *et al.* en 2018 [222].

L'autophagie (macro-autophagie) est médiée par les gènes ATG (« autophagy related genes ») et les protéines ATG qui sont considérés comme le mécanisme central de la biogenèse des autophagosomes. La formation de l'autophagosome est divisée en cinq grandes étapes, chacune orchestrée par un ensemble spécifique de molécules (Figure 37).

1. Initiation de la macro-autophagie : signalisation mTOR

En réponse à un manque de nutriments, d'énergie, ou d'autres signaux de stress, mTORC1 (« mammalian target of rapamycin complex 1 ») est inhibé. mTORC1 est un complexe protéique qui fonctionne comme un capteur de nutriments/énergies/redox et contrôle la synthèse des protéines. Cette inhibition a été découverte dans les années 1960 puis, Ashford *et al.*, en 1962 ont montré que le traitement avec le glucagon, entraînait une augmentation de la fréquence des lysosomes contenant des composants cytoplasmiques [223]. Cette inhibition permet l'activation de l'ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1). Le complexe

ULK1, qui inclut les protéines ULK1, ATG13, FIP200, et ATG101, phosphoryle et active les protéines nécessaires à la formation du phagophore. En parallèle, l'AMPK (AMP-activated protein kinase), est activée par un faible niveau d'énergie cellulaire (rapport AMP/ATP haut). L'AMPK phosphoryle ULK1 sur des sites distincts de ceux phosphorylés par mTORC1, favorisant ainsi son activation [224].

2. Nucléation du phagophore : formation du complexe PI3K de classe III

ULK1 (activée) phosphoryle Beclin-1, sur des résidus spécifiques et modifie sa conformation facilitant ainsi l'assemblage du complexe PI3K. Le complexe PI3K composé de Vps34, Beclin-1, Vps15, et ATG14, est recruté sur la membrane pour produire du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), pour initier la formation du phagophore. Le PIP3 est crucial pour le recrutement des protéines effectrices de l'autophagie, comme les protéines du complexe ATG18-ATG2, qui facilitent l'élongation du phagophore [225]. La reconnaissance et la empaquetage des cibles spécifiques à recycler dans les autophagosomes sont médiées par des récepteurs de l'autophagie, notamment P62/ SQSTM1, NBR-1 (neighbor of the Brca-1 gene) et LC3 [226,227].

3. Élongation et maturation de l'autophagosome : complexe ATG12–ATG5-ATG16L1 :

Ce complexe est essentiel pour l'élongation du phagophore. ATG12 est conjuguée à ATG5 par une réaction enzymatique similaire à l'ubiquitination, catalysée par ATG7 (E1-like) et ATG10 (E2-like). Le complexe ATG12-ATG5 interagit ensuite avec ATG16L1, formant un complexe qui agit comme une plateforme pour l'élongation de la membrane du phagophore. LC3 (ou ATG8) est d'abord converti en LC3-a par clivage de sa séquence C-terminale par ATG4. LC3-a est ensuite conjugué à la phosphatidyléthanolamine (PE) pour former LC3-b, une étape catalysée par ATG7 et ATG3. LC3-b s'associe à la membrane du phagophore, facilitant l'élongation et la fermeture de l'autophagosome [228].

4. Fermeture de l'autophagosome et fusion avec le lysosome

Une fois que le phagophore a complètement englobé le matériel cytoplasmique destiné à la dégradation, il se ferme pour former l'autophagosome. Les mécanismes exacts de cette fermeture sont moins bien compris, mais impliquent probablement la dissociation des complexes ATG à mesure que la structure se mature. L'autophagosome fusionne avec un

lysosome pour former un autolysosome. Ce processus est médié par des protéines telles que Rab7 (une petite GTPase), LAMP-2 (« Lysosomal-associated membrane protein ») et les complexes SNARE (« N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor »), qui facilitent la fusion membranaire [229].

5. Dégradation et recyclage

Une fois la fusion effectuée avec le lysosome, les enzymes lysosomales dégradent les composants intracellulaires enfermés dans l'autophagosome. Les produits de cette dégradation, tels que les acides aminés, les acides gras, et les sucres, sont ensuite libérés dans le cytoplasme pour être réutilisés dans des processus métaboliques.

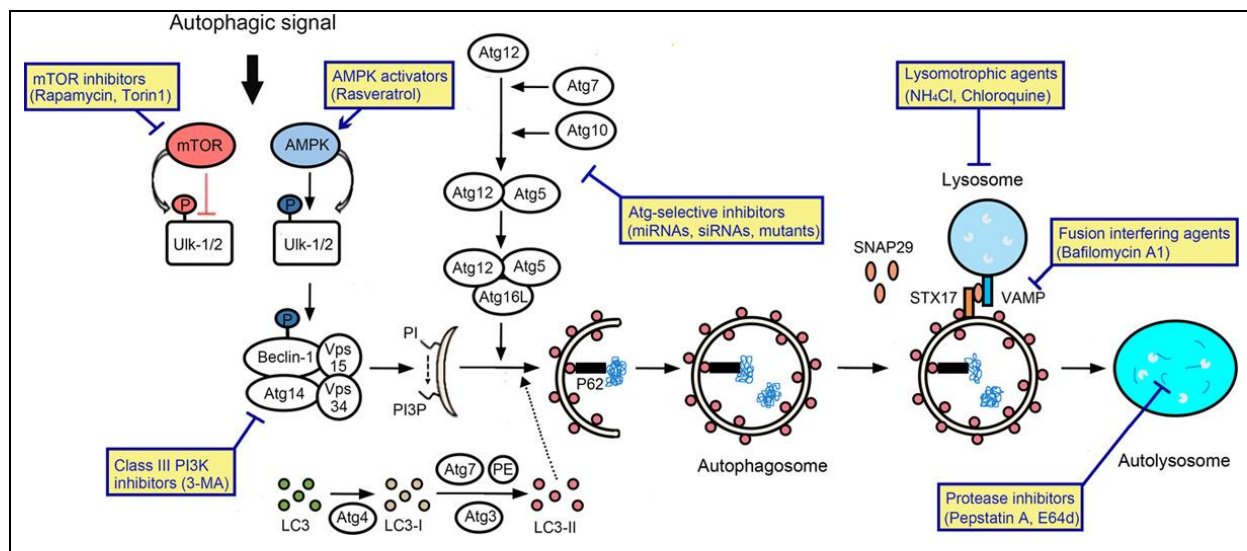
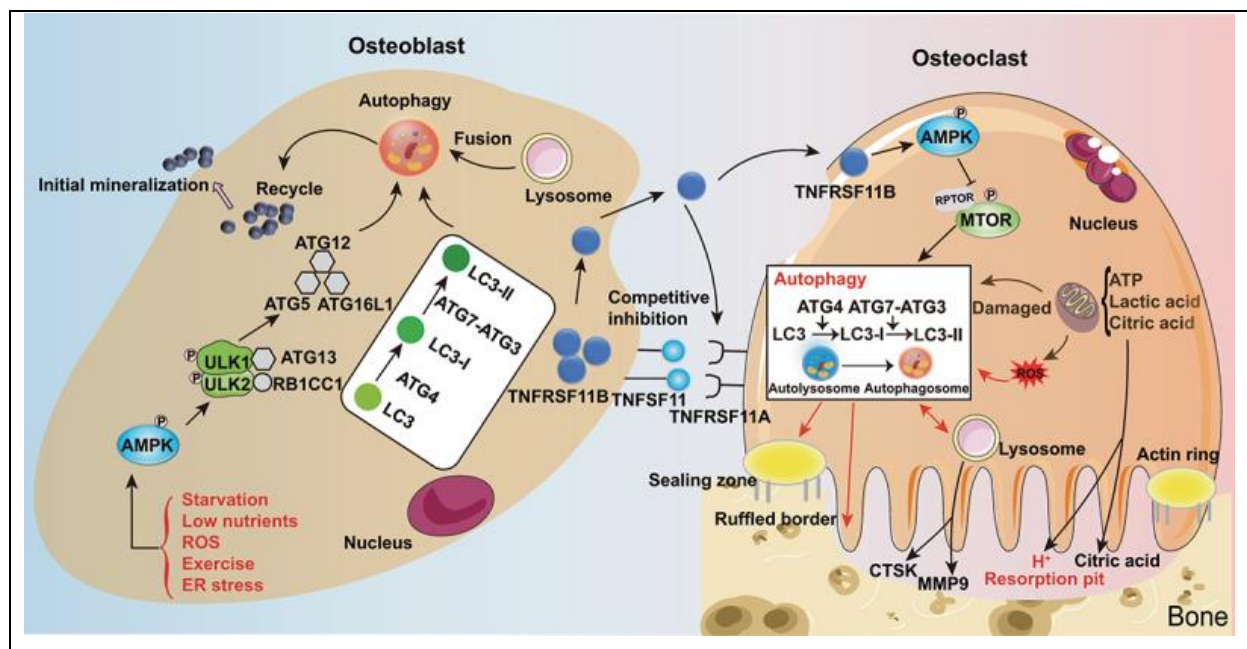


Figure 37: Illustration de la voie moléculaire de la macroautophagie initié par mTOR et AMPK. Issu de Kim *et al.* en 2018 [230].

2.2. Implications de l'autophagie dans le métabolisme osseux

L'autophagie joue un rôle important dans la formation osseuse, notamment dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et en ostéocytes, puis dans l'ostéogenèse, la différenciation et la formation de la matrice osseuse. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses nécessite de l'énergie, tandis que les produits de la dégradation autophagosomale peuvent être oxydés par les mitochondries pour fournir un apport énergétique approprié à leur différenciation [231]. Un blocage de l'autophagie inhibe la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et leurs capacités immuno-régulatrices



91

L'autophagie au sein des ostéocytes est une réponse protectrice en aval d'une situation pathologique le plus souvent liée à une augmentation du stress oxydatif. Les carences en œstrogènes et les traitements aux glucocorticoïdes conduisent à une augmentation du stress oxydatif qui est compensé par une augmentation du flux autophagique (augmentation du niveau d'expression d'ATG5, LC3 et Beclin-1) mais qui reste insuffisante et conduit au final à une perte osseuse [234].

III Études antérieures sur l'exercice, l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire

3.1. Effets de différents types d'exercices sur l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire

Les contraintes mécaniques, notamment l'exercice physique sont vitales pour maintenir la qualité osseuse, ce qui se traduit au niveau ostéocytaire, par le maintien de l'intégrité du réseau lacuno-canaliculaire. Noble *et al.*, en 2003 [38] ont montré que la stimulation mécanique au travers de compressions maximales de 3000 à 4000 micro-contraintes réduisait l'apoptose des ostéocytes de 40%. Les contraintes de cisaillement stimulent les intégrines qui préviennent l'apoptose des ostéocytes via la voie de signalisation Src kinase /ERK [236]. Également, les contraintes de cisaillement activent la signalisation de la PI3-kinase, induisant la phosphorylation de l'Akt et inhibant l'activation de la caspase 3 [237]. De plus, il a été montré que la libération de l'irisine par les muscles et sa fixation sur l'intégrine α_v/β_5 inhibe l'apoptose en régulant l'expression de la caspase 3 et 9 et favorise la croissance et la prolifération cellulaires par l'activation des MAP kinases Erk1 et Erk2 chez des cellules MLO-Y4 et dans l'os cortical des modèles murins ostéoporotiques [172]. Plus généralement, dans des modèles d'exercice physique, la course continue inhibe l'apoptose ostéocytaire induite par l'alcoolisme chronique [201] et par la perte osseuse liée à l'âge [238]. Chez des modèles de rats pathologiques, les études ont montré que le HIIT n'améliorait pas l'apoptose ostéocytaire comparé au groupe contrôle [27,29,239].

Les contraintes mécaniques augmentent le flux autophagique des ostéocytes induit par l'activation de la voie mTORC2 associée à une augmentation de l'expression de l'ATG5, ATG4, ATG7, LC3B ainsi que ULK1 et favorise la survie des ostéocytes et la différenciation des ostéoblastes [240,241]. Cependant, concernant les ostéoclastes, des études contradictoires montrent que l'augmentation de l'autophagie ostéocytaire peut soit augmenter l'ostéoclastogenèse par la sécrétion de RANKL [242] soit diminuer l'ostéoclastogenèse[241].

In vivo chez des souris diabétiques, le HIIT active l'autophagie des ostéoblastes et favorise la formation osseuse avec une augmentation de l'expression de Beclin-1, LC3 II et Runx2 comparé au groupe pathologique [39]. Chez une population de rats sains, notre laboratoire (B3OA) a montré que les contraintes mécaniques générées lors de la course HIIT activent une voie de signalisation impliquant la protéine FHL2 nucléaire [243]. Il a été montré que cette protéine à doigt de zinc, et notamment le domaine LIM interagit avec LC3-II dans la formation des autophagosomes pour réguler le développement des cellules musculaires [244]. Bien qu'il n'y ait pas encore de preuve directe du lien entre FHL2 et LC3-II spécifiquement dans les ostéocytes, il est plausible qu'un mécanisme similaire à celui observé dans les cellules musculaires puisse exister dans les cellules osseuses. FHL2, en tant que régulateur de nombreux processus cellulaires, pourrait potentiellement influencer l'autophagie dans les ostéocytes via LC3, particulièrement dans des conditions de stress mécanique ou de remodelage osseux.

3.2. Interactions potentielles entre exercice physique, l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire

L'exercice physique au travers des stimulations mécaniques et de l'augmentation de la perfusion des organes locomoteur, notamment les os, permet de stimuler d'une part, la multiplication et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et d'autre part, de favoriser la croissance et de maintenir l'homéostasie ostéocytaire [245]. Au travers des canalicules, l'exercice physique permet d'augmenter les flux et donc les apports de nutriments et l'évacuation des déchets. Le destin de l'ostéocyte emmuré vivant est de mourir par apoptose et de permettre la régénération du tissu osseux vieillissant [212]. L'autophagie permet de maintenir la vie de l'ostéocyte en lui permettant de recycler ses composants endommagés. Cependant, l'impact réel d'un protocole d'exercice étudié *in vivo* sur l'apoptose et l'autophagie n'a pas fait l'objet de recherches spécifiques. Néanmoins, les études *in vitro* dressent une esquisse des relations qui peuvent exister et suggèrent qu'il existe un mécanisme de communication croisée entre la mort cellulaire et l'autophagie, dans lequel les biomarqueurs pro-apoptotiques pourraient participer à l'autophagie et inversement [214].

L'autophagie est vue comme une « épée à double tranchant » impliquée à la fois dans la protection des cellules et dans l'augmentation de l'apoptose [214]. En effet, en situation de stress les ostéocytes augmentent leur flux autophagique mais, un stress excessif ou plus prolongé pourrait entraîner un recyclage important des organites endommagés et l'accumulation

d'autophagosomes, induisant finalement l'apoptose. Le « cross talk » entre autophagie et l'apoptose serait le fruit de Béclin 1 et de la voie P62. Les stimuli pro-apoptotiques qui induisent Beclin-1, se déplacent vers les mitochondries et sensibilisent les cellules aux signaux apoptotiques et empêchent BCL-2 de supprimer les biomarqueurs pro-apoptotiques, améliorant ainsi l'apoptose cellulaire (Figure 39). Ainsi, l'autophagie en situation pathologique ou de stress intense amplifie la mort cellulaire par une boucle de rétroaction positive [214]. L'exercice physique pourrait donc réguler l'autophagie à un niveau basal pour permettre à l'ostéocyte de vivre plus longtemps et de retarder son apoptose.

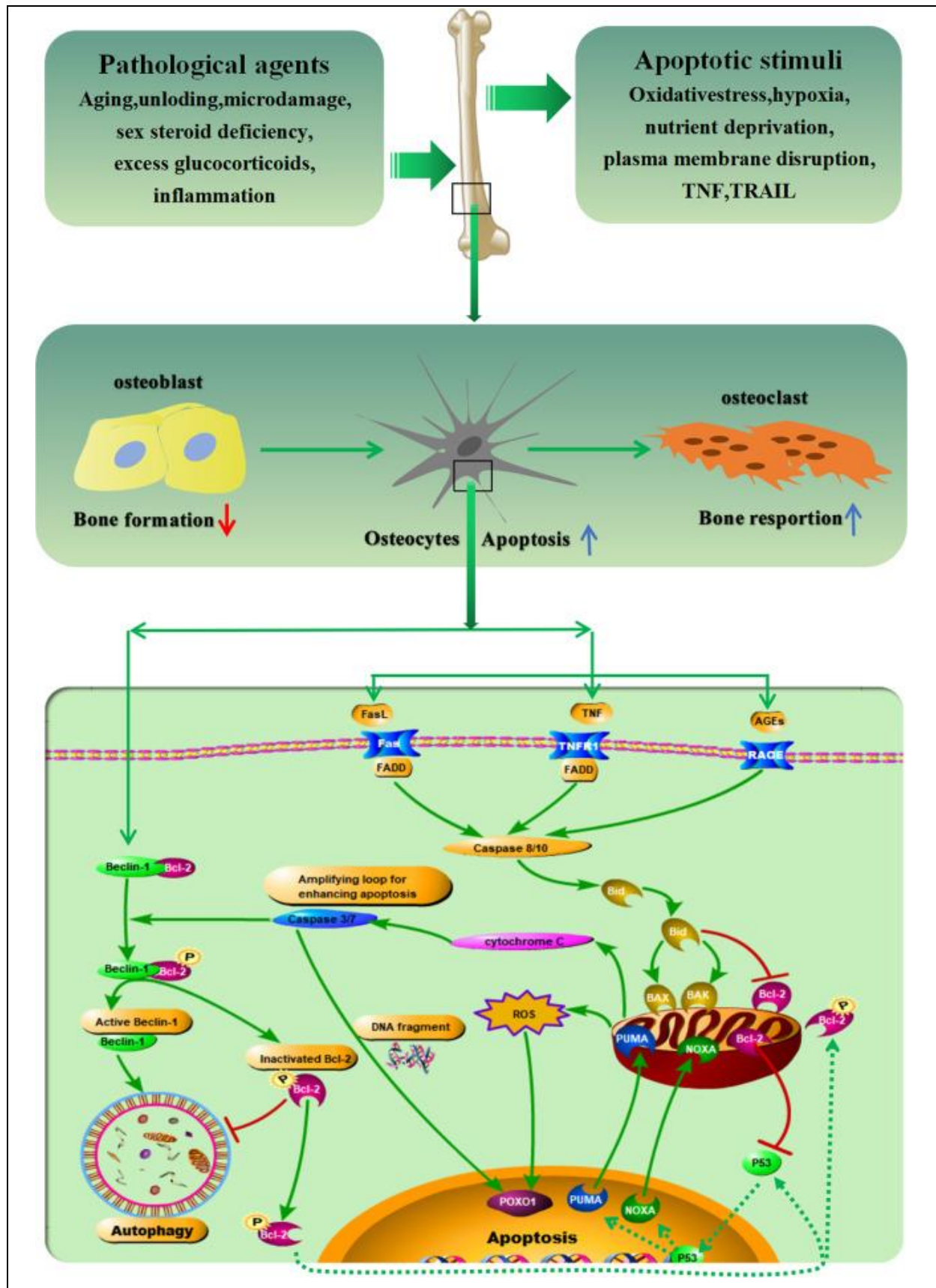


Figure 39: Modèle de voie de signalisation intracellulaire possible de l'interaction entre l'apoptose et l'autophagie ostéocytaire. Issu de de Ru *et.al* en 2020 [214].

Cette dernière partie a abordé les mécanismes complexes que sont la mort cellulaire programmée et l'autophagie. L'apoptose ostéocytaire est un processus qui permet le renouvellement osseux en induisant localement le remodelage osseux. Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont stimulés par des facteurs pro-apoptotique véhiculés au travers des canalicules ce qui permet une réponse ciblée et adaptative pour, soit maintenir l'intégrité du tissu, soit améliorer sa structure. L'autophagie apparaît comme un mécanisme de recyclage des déchets cellulaires permettant aux ostéocytes de maintenir leur intégrité. Mais, l'autophagie permet également de favoriser l'apoptose en cas de dommage trop important. L'exercice physique permet à la fois de prévenir l'apoptose ostéocytaire et d'augmenter l'autophagie. Cependant, aucune étude *in vivo* précise n'a explorée quels seraient les effets de protocoles de courses sur ces deux mécanismes. Ainsi, la suite de la thèse au travers des expériences réalisées tentera de comprendre comment évoluent ces deux mécanismes.

Matériel et méthodes

I Protocole d'expérimentation animale

Les échantillons analysés proviennent de 40 rats mâles de souche Wistar âgés de 5 semaines avec un poids initial compris entre 182 et 217 grammes. Les rats proviennent de l'élevage Janvier (Le genet-St-Isle, France) et ont été hébergés dans l'animalerie du laboratoire B3OA ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, photopériode 12H/12H). Les rats ont été répartis aléatoirement 4 par cage et ont été acclimatés pendant deux semaines. Les rats ont reçu une alimentation standard (Genestil, Royaucourt, France) contenant 53.4% de glucides, 19.2% de protéine brutes, 11.3% d'humidité, 6.1% de cellulose brute, 5.9% de cendres brutes et 4.1% de matières grasses, ainsi qu'un accès *ad libitum* à l'eau. Deux semaines après acclimatation, les rats ont été répartis en quatre groupe expérimentaux de dix rats. Le Groupe contrôle ou sédentaire, le groupe course continue, le groupe course par intervalle et le groupe course mixte.

1.1. Protocole de course sur tapis roulant

Les rats ont suivi un protocole expérimental de courses sur tapis roulant approuvé par le comité d'éthique et de la recherche animale de Lariboisière/Villemin, Paris (Comité n°9) et par le ministère de l'agriculture Français (APAFIS #9505). Les protocoles de courses ont duré huit semaines consécutives au bout desquelles les rats ont été euthanasiés. Une semaine avant le début des protocoles de course sur tapis roulant, la vitesse maximale aérobie (VMA) de chaque rat a été mesurée. La VMA est la vitesse pour laquelle la consommation maximale d'oxygène est atteinte. Le test débute par un échauffement de 5 minutes à 13 m/min avec une pente à 10° , puis la vitesse est incrémentée de 4m/min toutes les 2 minutes. A la suite du test, la vitesse de course des rats était calculée en fonction des groupes d'entraînement.

Les trois groupes de courses ont suivi un entraînement de 45 minutes sur tapis roulant de course sans inclinaison, tous les jours, à la même heure, cinq jours par semaine, pendant huit semaines. Les rats étaient alors âgés de sept semaines au début du protocole d'entraînement. Tous les groupes ont suivi un échauffement de cinq minutes à une vitesse de 12 m/min. Le corps de séance comprenait pour les rats du groupe de course continue, une course à 15m/min

Matériel et méthodes

correspondant à 70% de la VMA. Les rats du groupe de course par intervalle, suivaient un entraînement en 7 blocs de 6 minutes de course, en alternant moyenne intensité à 12m/min pendant 3 min et haute intensité à 21 m/min (100% VMA) pendant une minute suivi d'une minute de repos. Le groupe mixte suivait deux modalités de course dans la semaine d'entraînement. Le lundi, le mercredi et le jeudi les rats couraient en course continue à 15m/min pendant 40 minutes. Le mardi et le vendredi les rats couraient en course par intervalle, en 7 blocs de 3 minutes à 12m /min suivi de 2 minutes à 25m /min suivi d'une minute de repos. Le groupe de rats sédentaires n'avait aucune activité hormis leur déplacement dans leur cage. Aucune roue d'activité n'était à disposition dans chacun des groupes. Si nécessaire, les rats étaient invités à courir au moyen d'une impulsion d'un jet d'air comprimé.

II Microtomographie aux rayons X *in vivo*

2.1. Généralités

La microtomographie d'absorption à rayons X également appelée microtomodensitométrie ou « micro-computed tomography » (μ CT) est une méthode d'imagerie en trois dimensions non destructive. Elle repose comme pour une radiographie à deux dimensions classique, sur l'émission de rayons X polychromatiques au travers d'un échantillon. Le faisceau de photons résiduel est alors capté par un détecteur. L'acquisition d'une coupe consiste en une succession de radiographies à deux dimensions lors d'une rotation de 360° de l'échantillon sur lui-même ou du couple source à rayons X / détecteur (Figure 40). La coupe est alors reconstruite par ordinateur. La succession de coupes permet d'obtenir une image à trois dimensions après reconstruction informatique. Le détecteur mesure l'atténuation du faisceau de rayons X au cours de la traversée d'un matériau. Lorsque ce dernier traverse un matériau, les photons interagissent avec la matière et sont soit transmis (1/absorption) soit diffusés. Plus le matériau est dense ou composé d'éléments de numéro atomique Z élevé, plus l'atténuation du faisceau sera grande.

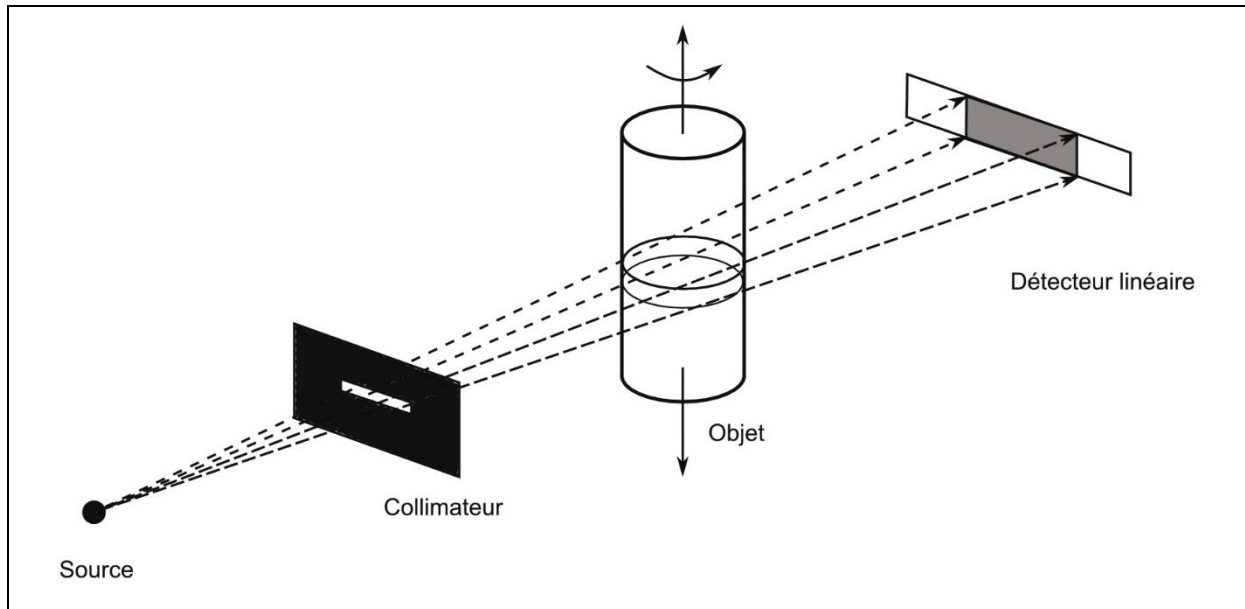


Figure 40: Schéma de principe d'un micro scanner. Issu de Wils en 2020 [246].

2.2. Méthodes d'analyses et de mesure de la microarchitecture osseuse au μ CT

2.2.1. Acquisitions des échantillons

Les pièces osseuses ont été scannées dans leur intégralité avec le microtomographe à rayons X (μ CT) Skyscan modèle 1172 (Skyscan®, BrukerBiospin, Belgique). Pour les acquisitions, les radius et les humérus étaient positionnés dans un cryotube de 1.8 mL roulé dans un film de mousse en polyéthylène avec de l'éthanol à 70°C. Ainsi l'échantillon était parfaitement centré et fixé sur le support d'acquisition. Deux types d'acquisitions étaient réalisées sur les membres supérieurs : un scan complet à une résolution de 9.82 μ m et un scan à mi-diaphyse à 4.91 μ m pour mesurer la porosité corticale. Afin de positionner le champ d'acquisition dans les mêmes conditions entre les pièces osseuses, les coupes des diaphyses radiales ont été réalisées à 10 mm des condyles distaux. Les paramètres d'acquisition sont présentés dans le [Tableau 5](#).

Matériel et méthodes

Tableau 5: Paramètres d'acquisitions au micro-scanner à rayons X en fonction de la résolution, et de la région anatomique osseuse considérée.

Paramètres d'acquisition	Microarchitecture trabéculaire	microarchitecture corticale
Tension d'accélération des photons	80 kV	80 kV
Intensité	100 μ A	100 μ A
Temps d'exposition	175 mS	345 mS
Pas de rotation	0,3°	0,3°
Filtre	Aluminium 0,5 mm	Aluminium 0,5 mm
Résolution	9,81 μ m	5,00 μ m

2.2.2. Reconstruction des images et analyse de la microarchitecture osseuse

Les coupes acquises au μ CT ont été reconstruites sous forme de « stack » d'images avec le logiciel N-Recon (V1.7.4.2 (Skyscan®, BrukerBiospin, Belgique)). Pour limiter les artefacts liés au durcissement du faisceau, une correction a été appliquée sur l'ensemble des reconstructions (« Beam Hardening » Correction =100%). Les artefacts liés au pixel défectueux du détecteur ont été corrigés (« Ring Artifact » Correction=20).

Les acquisitions ont été analysées avec le logiciel Dragonfly (version 2022.2 build 1361). L'analyse des pièces osseuses portait dans un premier temps sur les acquisitions 9.81 μ m sur l'ensemble de la pièce osseuse (ulna, radius, humérus, tibia, fémur, vertèbre L5, mandibule et calvaria). Avant l'analyse de la microarchitecture, les reconstructions issues de NRecon ont été pré- traitées. Un seuillage global a été utilisé pour séparer le signal du tissu osseux du bruit de fond. La valeur du seuil supérieur était de 255 et le seuil inférieur pour chaque échantillon a été attribué automatiquement à l'aide de la méthode du seuil d'Otsu [247]. Cette méthode permet d'effectuer un seuillage automatique à partir de l'histogramme de l'image entre le seuil Otsu et la valeur de données maximale dans l'ensemble de données sélectionnées. Les acquisitions à une résolution de 9,81 μ m ont été analysées selon trois modalités pour évaluer la qualité de la microarchitecture trabéculaire : os complet (les os entiers ont été analysés sans les plaques de croissance), épiphyse proximale (une région d'intérêt composée de 200 sections transversales à partir de l'extrémité distale de la plaque de croissance a été sélectionnée), épiphyse distale (une région d'intérêt composée de 200 sections transversales à partir de l'extrémité proximale de la plaque de croissance a été sélectionnée) (Figure 41). Pour examiner l'os cortical au milieu de la diaphyse osseuse, une région d'intérêt de 100 sections transversales a été sélectionnée. Sur

Matériel et méthodes

l'humérus, nous avons analysé les paramètres microarchitecturaux de la plaque de croissance proximale.

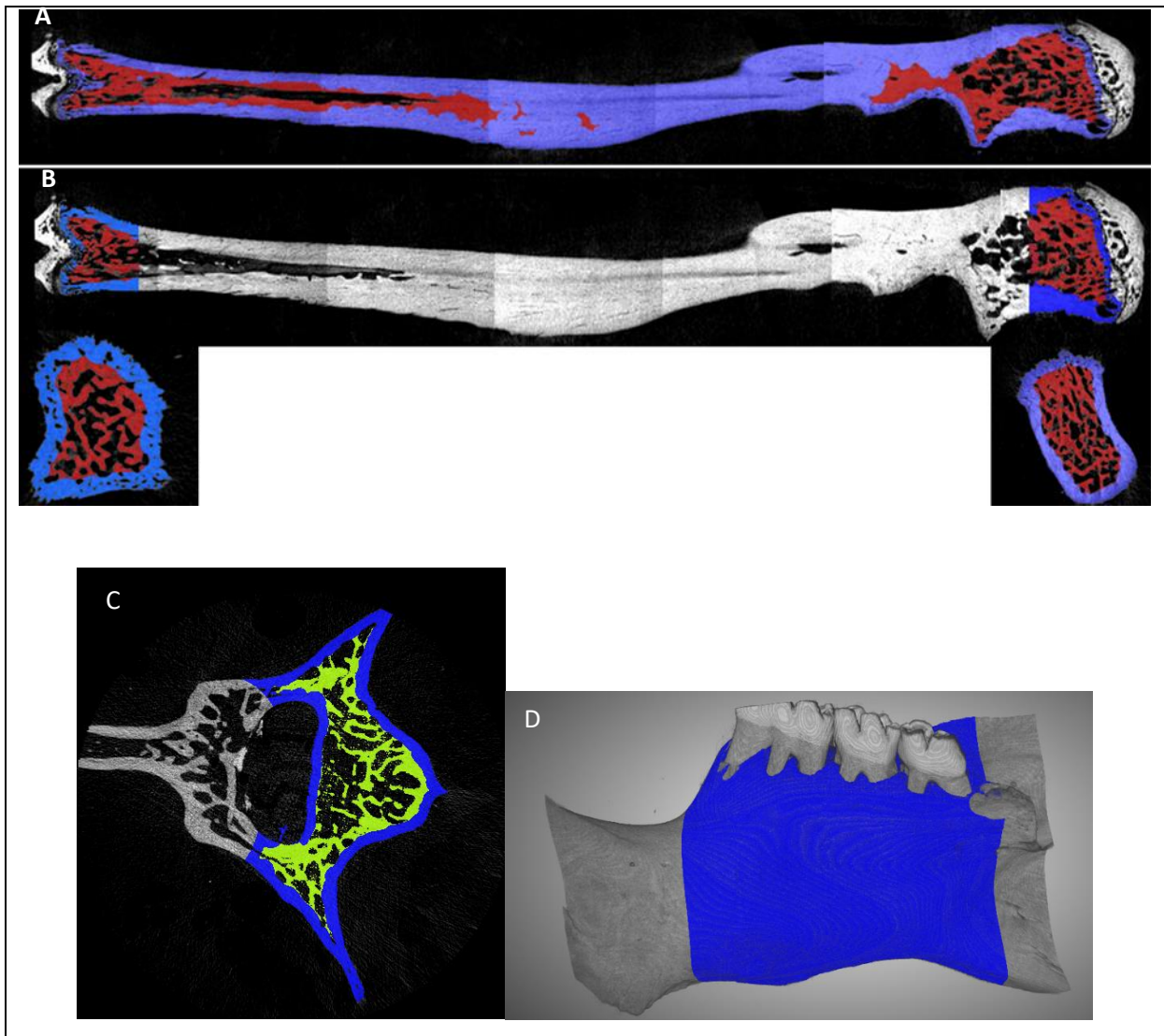


Figure 41 : Illustration des segmentations osseuses réalisées sur l'ulna, la vertèbre L5, et la mandibule, avec le logiciel DragonFly. L'image A, représente l'analyse de l'os complet, en rouge, l'os trabéculaire et en bleu, l'os cortical. L'image B représente la sélection de 200 coupes sur les épiphyses proximale et distale. L'image C représente la segmentation de la vertèbre L5. L'image D représente la segmentation de l'os alvéolaire à la mandibule.

Suite à la pré-segmentation initiale par la méthode d'Otsu, une ROI remplie est créée, qui correspond à la fois à l'os cortical et à l'os trabéculaire (« filled » = 0,2). Le résultat de ce processus a servi d'entrée au module d'analyse pour séparer l'os cortical de l'os trabéculaire. La segmentation de l'os trabéculaire et de l'os cortical a ensuite été réalisée par la méthode de Buie *et al.*, en 2007, [248]. Cette méthode nécessite de mesurer manuellement l'épaisseur de la plus grosse travée de la pièce osseuse. L'analyse de la microarchitecture a été réalisée en suivant les

recommandations de Buxsein *et al.* [249] avec le module d'analyse osseuse du logiciel DragonFly. La microarchitecture trabéculaire des os complets, des épiphyses proximales et des épiphyses distales a été calculée selon les paramètres suivants : le volume osseux sur le volume total BV/TV, la surface osseuse spécifique/volume osseux (BS/BV), la densité de surface osseuse (BS/TV), l'épaisseur des travées Tb.Th, le nombre de travées, Tb.N, l'espace entre les travées, Tb.Sp. La porosité corticale a été évaluée en mesurant les paramètres suivants : la surface osseuse corticale (Ct.Ar), la surface transversale totale (Tt.Ar), la fraction de surface corticale calculée par la surface osseuse corticale sur la surface totale (Ct.Ar/Tt.Ar), et l'épaisseur corticale (Ct.Th). Les outils proposés par le logiciel DragonFly ont permis de calculer des paramètres supplémentaires, notamment le périmètre endocortical (Ec.Pm), la surface totale de l'endocortex (Ec.S3D), la surface moyenne de la moelle (Ma.Ar), la surface totale du périoste (Ps.S.3 D) et la surface totale moyenne de l'os cortical et de la moelle (Tt.Ar).

2.2.3. Mesures morphologiques des pièces osseuses

Les mesures morphométriques des os ont été réalisées avec le logiciel DragonFly (version 2022.2 build 1361, Comet Technologies Canada Inc., Montreal, Canada; logiciel disponible sur <https://dragonfly.comet.tech/>) à partir des acquisitions au micro-scanner afin d'obtenir une image tri-dimensionnelle de la pièce osseuse à très haute résolution. Les mesures ont été effectuées dans les trois plans (sagittal, transversal et frontal). Les mesures dans les plans sagittal et transversal ont été prises à mi-diaphyse. Au niveau de la calvaria la mesure de l'épaisseur a été réalisée sur l'os pariétale.

L'épaisseur de l'os sous-chondral a été mesurée au milieu des condyles distaux des radius et des ulna à l'aide du logiciel DragonFly. Les résultats sont exprimés en millimètres (Figure 42).

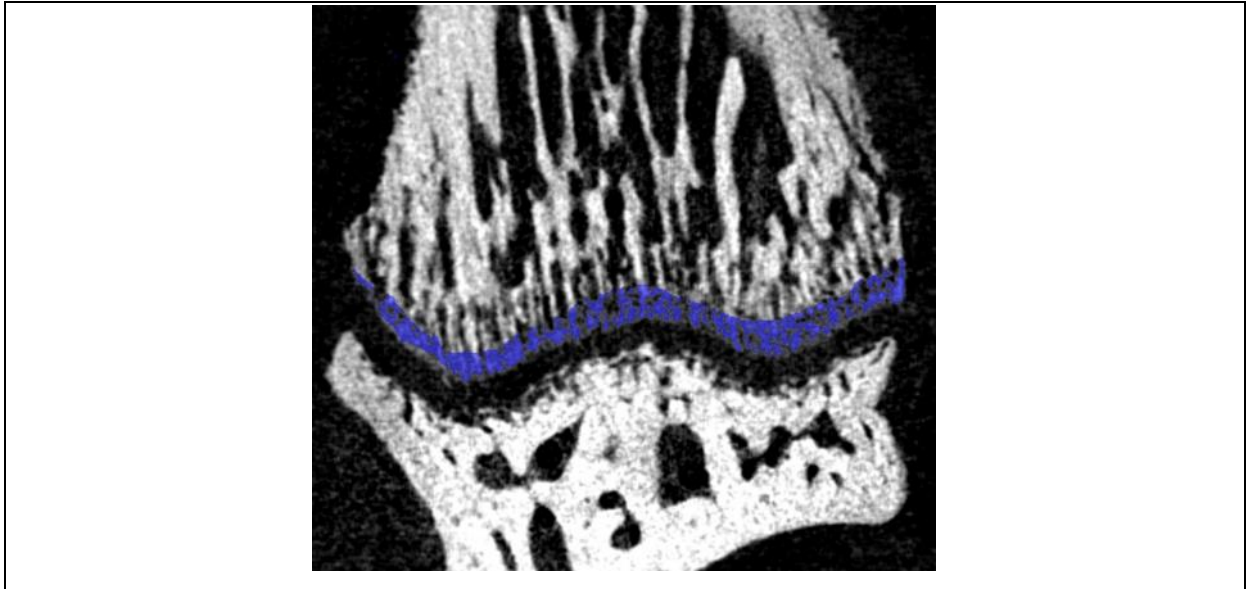


Figure 42 : Mesure moyenne de l'os sous-chondral de l'ulna distal (Articulatio mediocarpalis) réalisée avec le logiciel DragonFly. La zone colorée en bleu correspond à l'os cortical sélectionné selon le niveau de gris. Une seule mesure de cette zone a été réalisée au milieu des condyles.

III Protocole d'histologie, d'immunohistochimie et d'analyse sanguine.

3.1. Traitement des tissus

A l'issue des 8 semaines de protocoles de courses, l'ensemble des animaux ont été euthanasiés par ponction cardiaque, sous anesthésie à l'isoflurane à 4% v/v. Le sang de la ponction a été collecté dans des tubes héparinés et immédiatement centrifugés à 700 g à 4 °C pendant 10 minutes. Le plasma a été stocké à -80°C pour analyse. Les os (fémur, tibia, ulna, radius, humerus, vertèbre lombaire L5 and calvaria) ont été disséqués et nettoyés de leur tissu mou et fixés dans le PFA (Paraformaldehyde) 4% v/v. Après 48 heures de fixation, les os ont été rincés au PBS (« Phosphate Buffered Saline ») et décalcifiés dans des bains successifs de solution d'EDTA (« Ethylene Diamine Tetra Acetic ») à 14,5% p/v à pH= 7,4. Les bains ont été renouvelés tous les trois jours pendant un mois. Les os ont ensuite été déshydratés et inclus en paraffine. Les pièces osseuses ont été coupées en trois sections (épiphyses proximale et distale, ainsi que la diaphyse) et positionnées afin d'obtenir des coupes transversales de chaque section. Les blocs ont été coupés au microtome en sections de 5 µm d'épaisseur.

3.2. Mesure du taux d'occupation lacunaire ostéocytaire.

Toutes les coupes des corticales à mi-diaphyse ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (45 secondes et 1 minute respectivement) pour déterminer l'occupation des lacunes ostéocytaires. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope numérique (LEICA, DM-RXA) au grossissement X20. Douze régions d'intérêt (ROI) ont été définies sur chaque section corticale (3 ROIs par orientation anatomique : antérieure, postérieure, latérale et médiale). Chaque région avait une surface de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ou $0,01 \text{ mm}^2$ (Figure 43).

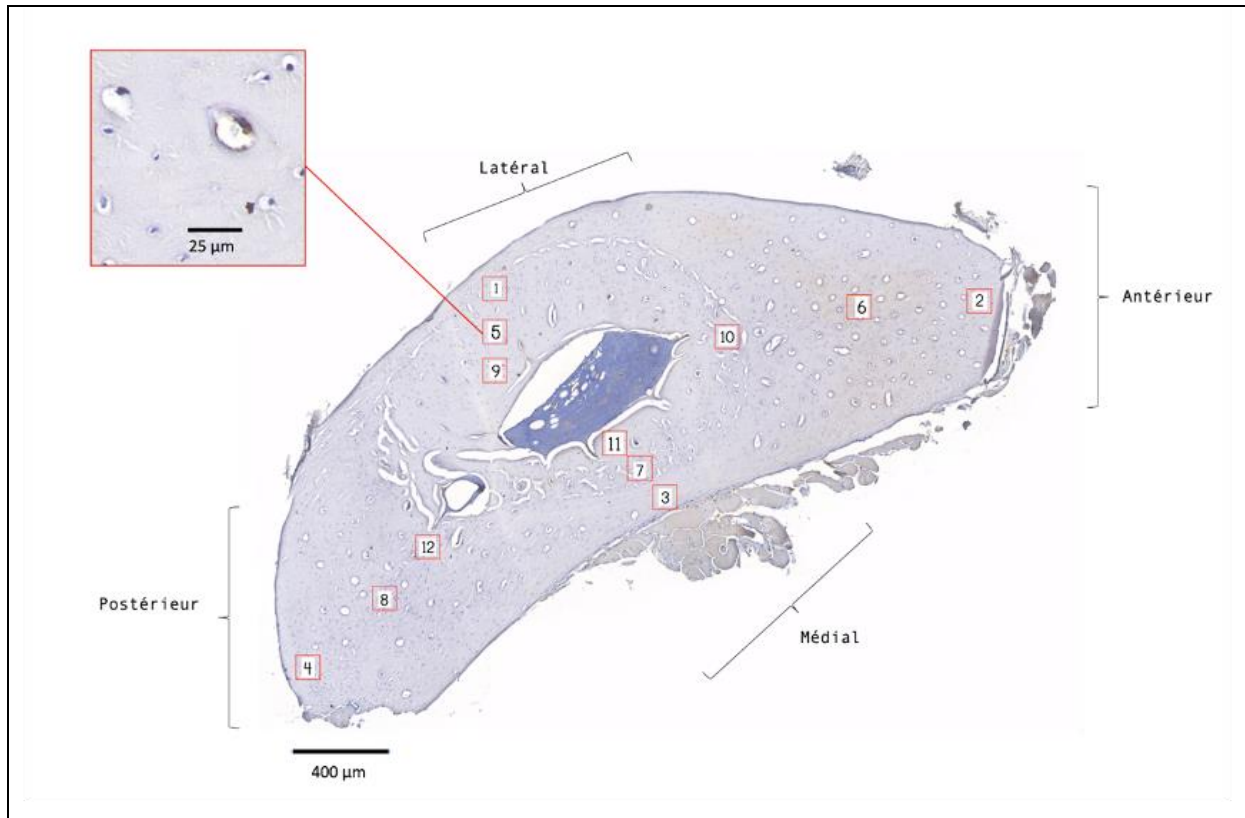


Figure 43: Répartition des régions d'intérêt ROI sur les sections corticales analysées.

Dans chaque ROI les lacunes pleines et vides ont été comptées. Les zones 1 à 4 correspondent au périoste, les zones 5 à 8 correspondent à la zone intermédiaire, et les zones 9 à 12 correspondent à l'endoste sur une section transversale à mi-diaphyse ulnaire.

3.3. Marquages immunohistochimiques sur les diaphyses

Pour toutes les colorations immunohistochimiques, les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope numérique (LEICA, DM-RXA) à un grossissement X20. 12 ROIs ont été définies sur chaque lame (3 ROIs par orientation anatomique : antérieure, postérieure, latérale et médiale), chaque région ayant une surface de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ou $0,01 \text{ mm}^2$. Un contrôle négatif

et un contrôle positif avec un tissu de référence (rein, cerveau et poumon) ont été produits pour chaque marqueur. Toutes les analyses ont été effectuées en duplicat.

3.3.1. Apoptose ostéocytaire, marquage à la Caspase 3 clivée

L'apoptose des ostéocytes a été évaluée par marquage immunohistochimique avec la caspase-3 clivée. Brièvement, des coupes de tissu osseux ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps anti-caspase-3 clivée (« cleaved caspase-3 » (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb #9664, Ozyme, dilution 1/100). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 minutes dans une chambre humide à température ambiante avec une solution commerciale d'anticorps secondaire anti-souris (« Envision+system-HRP labelled polymer anti-mouse » #K 4000 Dako Agilent Technologies). Le développement a été réalisé avec le DAB du même kit, incubé pendant cinq minutes (coloration brune positive). Enfin, une contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline pendant trente secondes.

3.3.2. Marquage de l'autophagie ostéocytaire par Beclin1

L'autophagie des ostéocytes a été évaluée par marquage immunohistochimique avec Beclin1. Les anticorps primaires (anticorps monoclonal anti Beclin 1 (OTI1F1) # MA5-25480 invitrogen ; dilution 1/500) ont été incubés pendant une nuit à 4°C puis révélés avec un kit d'anticorps secondaires et une solution DAB commerciale (Dako REALTM EnVisionTM Détection System, Peroxidase/DAB+, Rb/Mo #K500711-2) et contre-colorés avec de l'hématoxyline.

3.3.3. Marquage de la mécanotransduction par l'intégrine $\alpha V \beta 3$

La mécanotransduction ostéocytaire a été analysée par marquage immunohistochimique de l'intégrine Alpha V $\beta 3$ (anticorps monoclonal anti CD51/CD61 (23C6) # MA1-33578, invitrogen ; dilution de 1/200), puis révélée avec un kit d'anticorps secondaire et une solution DAB commerciale (Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rb/Mo #K500711-2) et contre-colorée avec de l'hématoxyline.

3.3.4. Evaluation de la différenciation des ostéocytes marqués au CD44

L'évaluation de la différenciation des ostéocytes ostéocytaires a été analysée par marquage immunohistochimique au CD44 (anticorps monoclonal anti-CD44 (E7K2Y) Cell Signaling Technology; dilution 1/150) puis révélée avec un kit d'anticorps secondaire et une solution DAB commerciale (Dako REALTM EnVisionTM Detection System, Peroxidase /DAB+, Rb/Mo #K500711-2) et contre-colorée avec de l'hématoxyline.

3.4. Evaluation de l'activité ostéoclastique

L'activité des ostéoclastes a été révélée par la détection enzymatique de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP : « Tartrate-resistant Acidic Phosphatase »). La coloration TRAP a été réalisée avec une concentration définie de substrat de naphthol (naphthol AS-TR) (16 mg dans 1 ml de diméthylformamide) et d'acide tartrique (100 mg d'acide tartrique pour 100 ml de solution préparée) et incubée dans une chambre humide à 37°C pendant une heure. Une contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline pendant 30 secondes. Les sections ont été scannées à l'aide d'un microscope numérique (LEICA, DM-RXA) à un grossissement X20. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel de traitement d'images QuPath. Le logiciel identifie les régions d'intérêts par machine learning, pixel classifier. Brièvement, deux zones d'intérêts, ont été créées, la première négative incluait le fond de la lame et la seconde, positive incluait le tissu osseux contre coloré à l'hématoxyline (teinte légèrement bleu). Dans la zone d'intérêt positive, les événements rares qui sont la présence de pixel rouge correspondant à la coloration TRAP étaient identifiés. Puis une délimitation manuelle des cellules TRAP positives était réalisée. Une cellule était considérée comme positive quand elle était multi-nucléée et avec une coloration rouge en périphérie. L'aire totale cellulaire positive segmentée a été calculée puis exprimée en taux par rapport à l'aire de la surface totale du tissu osseux. Les résultats ont été exprimés en taux de cellules positives au marquage (%).

3.5. Evaluation de l'activité des ostéoblastes

Les épiphyses proximales des tibias ont été déshydratés puis inclus dans une résine de polyméthacrylate de méthyle acrylique (PMMA). Les blocs ont été débités en coupe de 100µm et montés sur lame. Les lames ont été colorées avec la coloration de Von Kossa. Chaque lame a été

Matériel et méthodes

plongé dans une solution de nitrate d'argent à 5% puis dans une solution de Sodium formaldéhyde carbonate avant d'être contre coloré à la Picrofuchisine selon van Gieson.

3.6. Dosages sériques des biomarqueurs osseux

La phosphatase alcaline (ALP), marqueur de la formation osseuse, a été dosée à l'aide d'un analyseur de laboratoire standard (Selectra xl, Elitech) et d'un kit cinétique enzymatique (ALP (DEA) SL, Elitech), dans la même série pour tous les échantillons, en suivant les instructions des fabricants. La limite de détection était égale à 6 U/L. Le N-telopeptide du collagène de type I (NTx), un marqueur de la résorption osseuse, a été mesuré à l'aide de kits de dosage immuno-enzymatique chez le rat (Antibodies-online GmbH, Aachen, Allemagne), en suivant les instructions des fabricants. Les coefficients de variation intra/inter-essai et la limite de détection pour le NTx étaient respectivement <12% et 2,47 ng/mL.

IV Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un logiciel disponible dans le commerce (GraphPad Prisme, version 8.0.2). Les statistiques descriptives ont été présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (ET). La normalité de la distribution des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances a été vérifiée à l'aide du test de Leven. Les données ne suivaient pas une loi normale des tests non paramétriques ont été effectués. Les différences entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un test de Kruskal Wallis, puis d'un test U de Mann-Whitney pour la comparaison entre deux groupes spécifiques. Les corrélations ont été réalisées avec un test de Spearman.

L'intégralité des analyses effectuées selon la pièce osseuse sont répertoriées dans le Tableau 6.

Matériel et méthodes

Tableau 6 : Présentation des analyses qui ont été réalisées pour chaque pièces osseuses.

Pièces osseuse	Morphométrie osseuse	Analyses de la microarchitecture trabéculaire par μ CT	Analyses de la porosité corticale par μ CT	Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire (HE)	Apoptose (Caspase 3 clivée)	Autophagie (Beclin 1)	Intégrine (α V β 3)	Différenciation ostéocytaire (CD44)	Activité ostéoclastique (TRAP)	Activité ostéoblastique (Von Kossa)
Ulna	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Radius	X	X	X							
Humérus	X	X	X	X	X				X	
Tibia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fémur	X	X								
Vertèbre		X								
Mandibule		X								
Calvaria	X									

. Résultats

I Etude 1 : Effet de différents protocoles de course sur la morphologie osseuse et la microarchitecture des membres antérieurs chez un modèle de rat Wistar mâle adulte.

L'analyse de la cinématique de course des rats par notre laboratoire et les données de la littérature [250], montre que les os des membres supérieurs (ulna, radius et humérus) sont soumis à des contraintes égales ou supérieures aux membres postérieurs. Partant de ce postulat, cette étude a exploré les effets de trois modalités de course (la course continue, le HIIT et la course combinée) sur la morphologie et les microarchitectures des os des membres supérieurs. Les os ont été scannés à 9,81µm de résolution pour analyser la microarchitecture trabéculaire et les diaphyses à 4,91µm de résolution pour analyser la porosité corticale. Les analyses ont été effectuées avec le logiciels Dragon Fly. Les os ont été analysés dans leur intégrité, puis par région d'intérêt (200 coupes aux épiphyses proximales et distales et 100 coupes au milieu de la diaphyse).

Les résultats ont montré que la course continue, le HIIT et la course combinée ont conduit à une adaptation osseuse qui s'est traduite par une augmentation des diamètres corticaux à mi-diaphyse et une adaptation de la microarchitecture de l'ulna. Le protocole de course combinée, qui visait à reproduire le plus fidèlement possible l'entraînement des athlètes de haut niveau, présente des effets positifs sur la microarchitecture trabéculaire du radius distal (en particulier sur les paramètres Tb.Th. et Ma.Ar). Les trois modalités ont conduit à un épaississement de l'os sous-chondral dans l'épiphyse distale, à l'ulna et au radius. Les trois protocoles de course n'ont induit aucune variation des niveaux de biomarqueurs osseux plasmatiques. Au vu des résultats, le HIIT est la modalité de course qui induit une augmentation de la surface corticale au niveau de l'ulna et du radius associée à une augmentation de la porosité corticale. En outre, la réponse osseuse au stress mécanique de la course est essentiellement localisée sur les épiphyses distales du radius et de l'ulna, c'est-à-dire à proximité du point d'impact, ce qui conforte la loi de Wolff.

RESEARCH ARTICLE

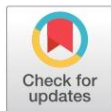
Effect of different running protocols on bone morphology and microarchitecture of the forelimbs in a male Wistar rat model

Andy Xavier^{1,2,3*}, Céline Bourzac^{1,4}, Morad Bensidhoum¹, Catherine Mura²,
Hugues Portier¹, Stéphane Pallu^{1,3}

1 Laboratoire B3OA UMR7052 CNRS U1271 INSERM, Université de Paris, Paris, France, **2** Laboratoire INEM UMR7355 CNRS, Université d'Orléans, Orléans, France, **3** Sport, Physical Activity, Rehabilitation and Movement for Performance and Health (SAPR  M), Université d'Orléans, Orléans, France, **4** Plateforme de Recherche Biom  dicale, Ecole Nationale V  t  rinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

   These authors contributed equally to this work.

* andy.xavier@univ-orleans.fr



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Xavier A, Bourzac C, Bensidhoum M, Mura C, Portier H, Pallu S (2024) Effect of different running protocols on bone morphology and microarchitecture of the forelimbs in a male Wistar rat model. PLoS ONE 19(11): e0308974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974>

Editor: Masoud Rahmati, Lorestan University, ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Received: April 25, 2024

Accepted: August 2, 2024

Published: November 7, 2024

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974>

Copyright:    2024 Xavier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Background

It is accepted that the metabolic response of bone tissue depends on the intensity of the mechanical loads, but also on the type and frequency of stress applied to it. Physical exercise such as running involves stresses which, under certain conditions, have been shown to have the best osteogenic effects. However, at high intensity, it can be deleterious for bone tissue. Consequently, there is no clear consensus as to which running modality would have the best osteogenic effects.

Aim

Our objective was to compare the effects of three running modalities on morphological and micro-architectural parameters on forelimb bones.

Methods

Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups: high intensity interval training (HIIT), continuous running, combined running ((alternating HIIT and continuous modalities) and sedentary (control). The morphometry, trabecular microarchitecture and cortical porosity of the ulna, radius and humerus were analyzed using micro-tomography.

Results

All three running modalities resulted in bone adaptation, with an increase in the diaphyseal diameter of all three bones. The combined running protocol had positive effects on the trabecular thickness in the distal ulna. The HIIT protocol resulted in an increase in both medio-lateral diameter and cortical bone area over total area (Ct.Ar/Tt.Ar) at the ulnar shaft compared with sedentary condition. Moreover, the HIIT protocol decreased the mean surface area of the medulla (Ma.Ar) according to sedentary condition at the ulnar shaft.

Funding: G  rond'if DIM Long  vit   & Vieillissement Région   le de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

This study has shown that HIIT resulted in a decrease in trabecular bone fraction in favor of cortical bone area at the ulna.

Introduction

With the ageing of the population, degenerative diseases such as musculoskeletal disorders (osteoarthritis, osteoporosis, for instance) represent a major public health issue [1]. Given the increase in healthcare expenditure associated with these diseases, new therapies and prevention are being explored. Physical exercise is recognized for its beneficial effects on the whole body and particularly on the musculoskeletal system [2]. Muscular activity during exercise generates mechanical stress and releases myokines and cytokines which have beneficial effects on bone tissue [3]. Bone tissue is made up of two complementary microarchitectural (trabecular and cortical) structures. A such organisation adapts in response to mechanical stress. Consequently, depending on the type and the frequency of physical exercise applied. These two structures exhibit different metabolic answers [4]. According to Wolff's law [5], bone tissue models and remodels itself according to the stresses it undergoes. According to Frost's mechanostat theory [6], however, the osteogenic effects of physical exercise are dependent on a threshold intensity and a frequency of mechanical stress which remains to be defined [7]. This intensity is highly dependent on the type of activity (weight-bearing activity (running, jumping), loading with vibration (vertical whole vibration), partial unloading (cycling), or total unloading (swimming)). Indeed, Scheuren *et al.*, 2020 [8] highlight the mechanical signals influencing bone formation and resorption in the local environment *in vivo*. Consequently, the mechano-regulation of bone tissue logarithmically depends on the loading frequency. For frequencies below a certain threshold, the effects on bone tissue are catabolic, while higher frequencies have anabolic consequences on bone status.

Animal models remain necessary to improve the understanding of these mechanisms. Portier *et al.*, 2020, [9] have reviewed all the effects of physical exercise on bone tissue in rat-model studies. They concluded that interval running on a high-intensity treadmill (as well as repeated jumps at a certain frequency and height (jumps performed between 30 and 60 cm, 10 to 50 times a day, three to five days a week for eight weeks) induced the best osteogenic effects (increase in Bone Mineral Density (BMD), Bone Volume/Tissue Volume (BV/TV) and Trabecular number (Tb.N)) in male and female rats. However, the rat jumping model cannot strictly be applied as a therapy to humans, as it would represent a three-storey fall on a human scale, obviously leading to fractures.

Running can be performed in two main modalities: moderate continuous running and interval running. Continuous running consists of moderate exercises to constant intensity, performed over a prolonged period without interruption, lasting from 30 minutes to several hours. The intensity corresponds to around 50 to 80% of maximal oxygen uptake (VO₂max). High-Intensity Interval Training (HIIT) consists of alternating periods of high-intensity exercise and recovery (active or rest). Sessions are generally short, often lasting between 20 and 30 minutes. HIIT has a very high intensity during periods of effort, which can reach maximum VO₂max (90% to 110% VO₂max) [10–12]. Historically, moderate continuous running has been the most widely used modality in studies on bone tissue due to its ease of application [13–16]. In osteopenia conditions, compared to sedentariness, continuous running has shown osteoprotective effects [13, 16]. Very few experimental studies have previously compared the

effects of both moderate continuous and high interval running on the bone status [17–19]. The interval model seems to have a better osteogenic or osteoprotective effect. Nevertheless, in both humans and animals, high-intensity running cannot be practiced on a daily basis because it leads to a depletion of the organism. Indeed, Polisel *et al.*, 2021 [20], have shown that HIIT in healthy mice 26 week-old at the end of the protocol), trained for 30 minutes five times a week for 10 weeks, induced a decrease in bone strength). In order compare the effects of these running modalities on bone tissue and understand the osteogenic mechanisms involved, there is a need to quantify the total workload.

Few studies have used a protocol of moderate continuous running and interval running based on the overall mean exercise intensity, calculated according to the equation described by Mujika *et al.*, 1995, [17, 18]. Boudenot *et al.*, 2015 [19], reported that interval running improved the BMD by 20% at the femoral neck and over the whole body. There is a third running modality, which combines continuous running and interval running over several training sessions. The combined running is practiced by top-level athletes during their training since the 20th century [21]. However, scarce research has been achieved on the effects of this modality on bone tissue. The study by Wazzani *et al.*, 2023 [22], shed light these three running modalities and their respective effects on femoral properties. In the combined exercise group, the trabecular thickness (Tb.Th) in the proximal femur was higher compared to respective results in the other exercise groups (interval and continuous), and in the control sedentary condition ($p < 0.001$). Furthermore, the trabecular BMD measured by micro-computed tomography (μ CT) in the interval exercise group was higher compared to respective results in all other experimental groups.

The majority of studies on bone tissue in animal models report their results mainly in both femur and tibia and in the lumbar spine because of the deleterious effects of human diseases such as osteoporosis on these sites. Running has been shown to have positive effects on the hindlimbs in both humans and animal models. During locomotion in quadrupeds, the forelimbs are used to absorb impact and modify posture so that the hindlimbs can propel the body. It would therefore appear that the forelimbs absorb just as much mechanical stress as the hindlimbs [23]. Thus, in animal models, a bone adaptation to exercise for the forelimbs could be envisaged. To date, no study in rats has compared the impact of three different running modalities (HIIT, continuous, combined) on the forelimbs.

The aim of this study was to explore the effects of three treadmill running modalities (HIIT, continuous, combined), in a male Wistar rat model, on bone quality parameters in the forelimbs (humerus, radius, ulna) and determine which protocol is the most osteogenic. The study also aims to determine which specific anatomical regions of the forelimb bones are the most subjected to changes in their microarchitecture. These effects will be assessed by bone morphological analyses and μ CT microarchitectural analysis.

Material & methods

2.1. Animals

Forty 5-week-old, male, Wistar rats were randomly divided into four groups (4 rats per standard cage) and acclimatized for a week on a 12h/12h photoperiod cycle. The rats were obtained from Janvier Labs (Le genet-St-Isle, France) and fed ad libitum with a standard diet (Genestil, Royaucourt, France) containing 53.4% carbohydrate, 19.2% crude protein, 11.3% moisture, 6.1% crude cellulose, 5.9% crude ash and 4.1% fat, and ad libitum access to water. Two weeks after acclimatization, the rats were divided into four experimental groups of ten rats. The Sedentary control group (SED), the Continuous Running group (CR), the High

Table 1. Rat weight and length, maximal aerobic speed (MAS) and BMI (body mass index) at T0 (beginning of the study), and T8 (end of the running protocol).

Parameters	Time	SED	HIIT	CR	ComR
Weight (g)	T0	199 ± 8	197 ± 7	192 ± 6	201 ± 9
	T8	492 ± 36	475 ± 31	486 ± 33	491 ± 16
Length (cm)	T0	19.8 ± 0.5	19.8 ± 0.4	19.7 ± 0.4	19.6 ± 0.5
	T8	26.7 ± 1.1	26.4 ± 0.6	26.4 ± 0.6	26.5 ± 0.7
BMI (g/cm ²)	T0	0.51 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.53 ± 0.03 I C
	T8	0.69 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.04
MAS (m/min)	T0	28 ± 9	32 ± 5	33 ± 6	31 ± 8
	T8	23 ± 6	35 ± 11 S	33 ± 8 S	37 ± 3 S

Measurements are expressed as mean ± SD. S: p-value < 0.05 vs SED; I: p-value < 0.05 vs HIIT; C: p-value < 0.05 vs CR. SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.t001>

Intensity Interval Training group (HIIT) and the Combined Running group (ComR). The characteristics of each group are presented in Table 1

2.2. Experimental design

The rats followed an experimental treadmill running protocol approved by the Ethics and Animal Research Committee of Lariboisière/Villemin, Paris (Committee n°9) and by the French Ministry of Agriculture (APAFIS #9505). The age of the rats was seven weeks old at the beginning of the training protocol. At the beginning (T0) and end (T8) of the protocol, body weight and body length (nose to anus) were measured, and body mass index (BMI = body weight (g)/length² (cm²)) calculated for each rat.

Before beginning the running protocols, the rats were subjected to a maximal aerobic speed (MAS) test on the fifth day of acclimatization, to determine their running speeds. 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, then increments of 4 m/min every 1min30s. The rats were subjected to the test until they could no longer keep up with the speed of the treadmill, despite two successive stimulations with compressed air. The rat's maximum speed was defined as the last fully sustained incremental speed before cessation of the test. Once the exercise protocols had been completed, a MAS test was performed to validate the exercise programs.

The running protocols lasted eight consecutive weeks, after which the rats were euthanized. The three running groups underwent 45 minutes of training on a treadmill without incline every day, five days a week, for eight weeks. All groups underwent a five-minute warm-up at a speed of 12m/min before beginning their own protocol. The running speed chosen for the exercise protocol corresponds to the average MAS of each group.

For the rats in the CR group, the training session consisted of a 15 m/min run at 70% MAS. Rats in the HIIT group were trained in 7 blocks of 6 minutes each, alternating between medium intensity at 12m/min for 3 min and high intensity at 21 m/min (100% MAS) for 2 min followed by 1 min of rest. The ComR group followed the two running modalities during the training week. On Monday, Wednesday and Thursday, the rats ran continuously at 15m/min for 40 minutes. On Tuesday and Friday, the rats ran in interval runs, in 7 blocks of 3 minutes at 12m/min followed by 2 minutes at 25m/min followed by 1-minute rest (Fig 1).

If necessary, the rats were encouraged to run by means of a compressed air jet pulse. The SED group had no activity other than moving around their cage.

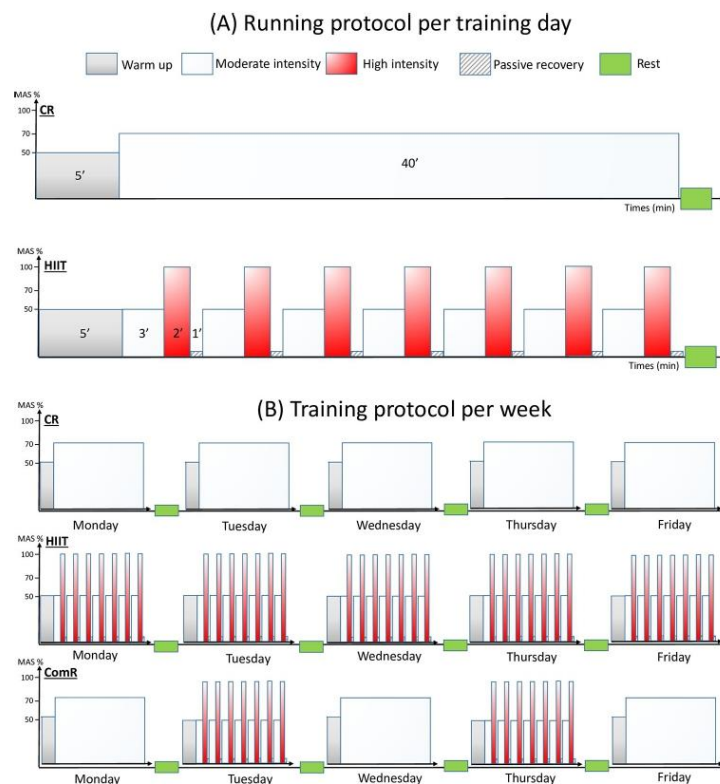


Fig 1. Exercise protocols. (A) During a day, rats, according to their group, either practiced continuous running (CR), or high intensity interval training (HIIT). (B) Organization of the 5 training days per week according to running protocols. CR: Continuous Running group; HIIT: High Intensity Interval Training group; ComR: Combined Running group (i.e. alternating between the continuous and the HIIT running).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.g001>

To ensure that the level of intensity of running is equivalent and comparable, we have calculated training scores based on the work by Boudenot *et al.*, 2015 [19]; Mujika *et al.*, 1995 [17]. The equation is based on three coefficients according to speed (I#1: low speed ≤ 15 m/min, coefficient 1; I#2 moderate speed: 15 to 20 m/min, coefficient 2; I#3 intense speed: >20 m/min, coefficient 3). This score gives information about the difficulty of the exercise: the higher the score, the more difficult the exercise. The intensity score for each rat and then for each group was calculated as the average of the scores measured each week of running. The mean intensity score was 1.6 ± 0.5 for the HIIT group and 1.7 ± 0.7 for the CR group. No difference in score was observed between the two groups.

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

2.3. Tissue sampling

At the end of the 8-weeks running protocols, all animals were euthanized by exsanguination confirmed by cervical dislocation. The blood was collected in heparinized tubes, immediately cooled and centrifuged at 700g at 4  C for 10 minutes, and the plasma was stored frozen at 80  C until analysis. Radius, ulna and humerus were collected, cleaned of soft tissues and fixed in 4% v/v paraformaldehyde (PFA).

2.4. Bone morphological analysis

The morphology of the complete bones was evaluated using reconstructions of μ CT sections at 9.81 μ m resolution and analyzed on Dragonfly software (version 2022.2 Build 1399), in the coronal, axial and sagittal planes. The diameter of the medullary canal at the midshaft diaphysis of each bone was measured along the anteroposterior and mediolateral axis.

2.5. Cortical and trabecular bone microarchitecture measurements using *ex vivo* microcomputed tomography (μ CT)

The left ulna, radius and humerus were scanned *ex vivo* using μ CT (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgium). The bones were positioned on a holder in a 1.8 mL cryotube rolled in polyethylene foam film with ethanol at 70  . Two types of acquisitions were performed: a full scan at a 9.81 μ m resolution and a mid-diaphysis scan at 4.91 μ m resolution to measure cortical porosity (measurement of the pores of the vascular channels). The X-rays source was set at a voltage of 80 kV with a current of 100 μ A with an integration time of 175 ms for full bone and 375 ms for the cortical porosity. For all scans, a rotation step of 0.3  , and a 0.5 mm aluminum filter were used. Acquired images were reconstructed using NRecon software (version 1.6.9.10, Bruker). The same parameters were applied to all the area from each bone site to ensure consistency (smoothing = 1, ring artefact = 20%, beam hardening = 100%). Regions of interest were selected and analyzed using Dragonfly software (version 2022.2 Build 1399) [24, 25]. Global thresholding was used to segment bone from the background. The upper threshold value was 255 and the lower threshold for each sample was assigned automatically using the Otsu threshold method [26]. The 9.81 μ m resolution acquisitions were analyzed in three modalities to assess the quality of the trabecular microarchitecture: full bone (whole bones were analyzed without the growth plates), proximal epiphysis (a region of interest consisting of 200 transversal sections from the distal end of the growth plate distal was selected), distal epiphysis (a region of interest consisting of 200 transversal sections from the proximal end of the growth plate proximal was selected). To examine the cortical bone at the midshaft diaphysis, a region of interest of 100 transversal sections was selected.

Following the initial pre-segmentation, the bone segmentation was filled corresponding to the bone cortex and marrow (filled = 0.2). The output of this process is a filled region of interest, which is an input to separate cortical and trabecular bone. Segmentation of cortical and trabecular bone was performed using the Buie method [27]. This method requires the thickness of the largest trabecular section of bone to be measured manually in order to supply the algorithm. For the data set, we set this parameter at 0.20 mm.

Following guidelines from Bouxsein *et al.*, 2010 [28], the following μ CT parameters were reported. The trabecular outcome measures for the full bone, proximal epiphysis and distal epiphysis included the Bone Volume / Tissue Volume (BV/TV), Specific bone surface/ bone volume (BS/BV), Bone surface density (BS/TV), Trabecular Thickness (Tb.Th), Trabecular Number (Tb.N), Trabecular Spacing (Tb.Sp). Cortical outcome measures for the bone diaphysis included cortical bone area (Ct.Ar), total cross-sectional area (Tt.Ar), cortical area fraction

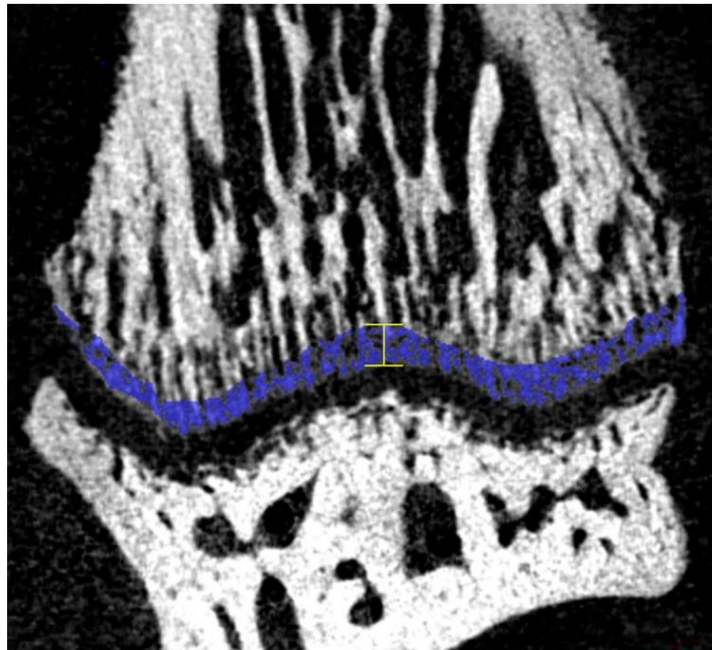


Fig 2. Example of the subchondral bone selection on a cross-section of the distal ulna using Dragonfly software. The area colored in blue corresponds to the subchondral bone selected according to the grey level. The yellow line corresponds to the measurement of the thickness of the subchondral bone.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.g002>

calculated by cortical bone area over total area (Ct.Ar/Tt.Ar), and cortical thickness (Ct.Th). The dragonfly software has been used to calculate additional parameters, including the endocortical perimeter (Ec.Pm), the total surface area of the endocortex (Ec.S.3D), the mean surface area of the medulla (Ma.Ar), the total surface area of the periosteum (Ps.S.3D) and the mean total surface area of the cortical bone and marrow (Tt.Ar).

2.6. Subchondral bone thickness measurement

The thickness of the subchondral bone was measured in the middle of the distal condyles of radius and ulna at the *articulatio radiocarpalis* and at the *articulatio ulnocarpalis* using Dragonfly software. Results are reported in millimeters (Fig 2).

2.7. Blood bone markers analysis

Total alkaline phosphatase (ALP), a marker of bone formation, was assayed using a standard laboratory analyzer (Selectra xl, Elitech) and an enzymatic kinetic kit (ALP (DEA) SL, Elitech), in the same run for all the samples, following the manufacturers' instructions. The limit of detection was equal to 6 U/L. Cross linked N-Telopeptide of type I collagen (NTx), a marker of bone resorption, was measured using established rat enzyme linked immunosorbent assay kits (Antibodies-online GmbH, Aachen, Germany [29]), following the manufacturers'

instructions. The intra-/interassay coefficients of variation and limit of detection for NTx were <12% and 2.47 ng/mL respectively.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a commercially available software (GraphPad Prism, Version 8.0.2). Descriptive statistics were reported as means $\pm$ standard deviation (SD). The normality of the data distribution was performed with the Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variances was performed with the Leven test. Because normality of the data distribution was not achieved, therefore non parametric tests were used: first Kruskal Wallis test to compare all 4 groups then U Mann–Whitney test for comparison between two specific groups. The level of significance was set at p -value < 0.05.

Results

3.1. Body parameters, food and water consumption

Body parameter results are summarized in [Table 1](#). At the end of the protocol, the body mass index, weight, and body length were not statistically different between SED and the three running groups. Food and water consumptions were not different between SED and all running groups (mean food: 25.1 ± 4.1 and 27.6 ± 2.9 g, for SED and running groups rats respectively; mean water: 31.4 ± 3.1 and 37.6 ± 11.3 mL for SED and all running groups respectively).

3.2. MAS

At the beginning of the running protocol, no statistically significant differences in MAS were observed among groups. After 8 weeks of training (T8), an increase in MAS was observed in all running groups, whereas the MAS in the SED group remained similar to the beginning of the study (T0) ([Table 1](#)), these results validate the training protocol.

3.3. Morphological examination

Morphological measurements of the radius, ulna and humerus in each group are presented in [Table 2](#). No differences in bone length (proximal-distal) were found. The results have shown that 8 weeks of training did not interfere with bone growth, whatever the type of running modality.

In the radius, ComR resulted in a significant increase in the mediolateral diameter (7.5% and 5.4% compared to sedentariness and CR, respectively). It also resulted in a significant 29% increase in the antero-posterior diameter of the medullary canal compared to SED. In the ulna, HIIT resulted in a significant increase in mediolateral diameter (9%) compared to SED. CR and ComR resulted in a significant increase in the mediolateral diameter of the medullary canal (37% and 45%, respectively), compared to SED. In the humerus, a significant decrease (13%) in the mediolateral diameter of the medullary canal in the HIIT group was reported, compared to the CR group. In contrast, ComR resulted in an increase in the mediolateral diameter of the medullary canal, compared to both SED and HIIT (8% and 13%, respectively).

3.4. Bone trabecular and cortical microarchitecture measurements by μ CT in radius, ulna and humerus

3.4.1. Radius. The μ CT measurements in the radius are presented in supplementary files ([S1 Table](#)). No significant differences were found in trabecular microarchitectural parameters (BV/TV, BS/BV, Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th) among groups. Differences in bone and medullary morphology, however, were observed ([Table 3](#)). An increase in the mean cortical surface fraction

Table 2. Morphological measurements of the radius, ulna and humerus limbs according to the running protocols.

Bones	Morphological measurements (mm)	SED	HIIT	CR	ComR
Radius	Proximal-distal length	25.49 ± 0.60	25.38 ± 0.48	25.54 ± 0.53	25.40 ± 0.65
	Antero-posterior diameter	1.74 ± 0.10	1.68 ± 0.11	1.67 ± 0.09	1.78 ± 0.18
	Medio-lateral diameter	1.99 ± 0.10	2.10 ± 0.25	2.03 ± 0.09	2.14 ± 0.10 S C
	Anterior cortical thickness	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.07	0.62 ± 0.08	0.62 ± 0.07
	Posterior cortical thickness	0.50 ± 0.07	0.50 ± 0.09	0.56 ± 0.06	0.54 ± 0.08
	Medial cortical thickness	0.76 ± 0.09	0.70 ± 0.09	0.64 ± 0.09	0.65 ± 0.12
	Lateral cortical thickness	0.44 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.04
	MC medio-lateral diameter	0.36 ± 0.07	0.37 ± 0.10	0.40 ± 0.08	0.43 ± 0.07
Ulna	MC antero-posterior diameter	0.58 ± 0.05	0.61 ± 0.12	0.66 ± 0.10	0.75 ± 0.12 S
	Proximal-distal length	33.00 ± 0.58	32.92 ± 0.59	33.10 ± 0.71	33.10 ± 0.60
	Antero-posterior diameter	2.74 ± 0.13	2.75 ± 0.14	2.82 ± 0.02	2.75 ± 0.06
	Medio-lateral diameter	1.14 ± 0.09	1.24 ± 0.06 S	1.23 ± 0.07 S	1.21 ± 0.04
	Anterior cortical thickness	1.19 ± 0.16	1.22 ± 0.07	1.15 ± 0.08	1.18 ± 0.07
	Posterior cortical thickness	0.96 ± 0.06	0.91 ± 0.07	0.89 ± 0.13	0.86 ± 0.08
	Medial cortical thickness	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.02
	Lateral cortical thickness	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.41 ± 0.05
Humerus	MC medio-lateral diameter	0.165 ± 0.044	0.195 ± 0.043	0.226 ± 0.049 S	0.239 ± 0.028 S I
	MC antero-posterior diameter	0.721 ± 0.115	0.707 ± 0.103	0.767 ± 0.069	0.780 ± 0.077
	Proximal-distal length	29.62 ± 0.53	29.36 ± 0.49	29.70 ± 0.67	29.84 ± 0.59
	Antero-posterior diameter	4.54 ± 0.57	4.34 ± 0.56	4.97 ± 0.36 I	4.63 ± 0.36
	Medio-lateral diameter	2.68 ± 0.14	2.70 ± 0.13	2.71 ± 0.15	2.78 ± 0.07
	Anterior cortical thickness	0.83 ± 0.11	0.83 ± 0.10	0.83 ± 0.04	0.84 ± 0.10
	Posterior cortical thickness	0.57 ± 0.07	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.56 ± 0.06
	Medial cortical thickness	0.55 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.04
	Lateral cortical thickness	0.57 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.54 ± 0.04
	MC medio-lateral diameter	1.57 ± 0.33	1.50 ± 0.08	1.60 ± 0.12	1.70 ± 0.16 S I
	MC antero-posterior diameter	1.98 ± 0.22	1.97 ± 0.16	1.86 ± 0.24	2.11 ± 0.15

Measurements are expressed as mean ± SD in mm. Proximal-distal length was measured between the proximal and distal epiphyses of each bone, and bone diameters (antero-posterior, medio-lateral, MC medio-lateral, MC antero-posterior) were measured at the mid-diaphysis. MC = medullary canal. S: p-value < 0.05 vs SED; C: p-value < 0.05 vs CR; I: p-value < 0.05 vs HIIT. SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.t002>

was reported in the HIIT group, compared to respective results in the ComR (5% increase) and CR (4% increase) groups. Similar results were obtained for the endocortical perimeter (Ec.Pm), the total endocortex surface area (Ec.S.3D) and the mean medullary surface area (Ma.Ar). Compared to ComR, HIIT also induced a 5% decrease in the total periosteal surface area (Ps.S.3D) and a 8% decrease in the mean total surface area of cortical bone and marrow (Tt.Ar).

3.4.2. Ulna. In the ulna, differences in trabecular microarchitecture were only observed in the distal metaphysis (S2 Table). More specifically, compared to the SED groups, decreases in BV/TV of 11% and 8% were reported in the HIIT and CR groups, respectively. Tb.Th in the ComR group was increased by 11% and 24% compared to respective results in the HIIT and CR groups.

The mean cortical surface fraction (Ct.Ar/Tt.Ar) in the HIIT group was increased, compared respective results in all the other groups (Table 3). This result may be explained by the decrease in endocortical perimeter (EC.Pm), endocortical surface area (Ec.S.3D), and mean

Table 3. Cortical bone microarchitectural parameters and medullary canal morphology analysis by μ CT in the radius, ulna, and humerus according to the running protocols.

Cortical bone microarchitectural parameters		SED	HIIT	CR	ComR
Radius	Ct.Ar/Tt.Ar (%)	0.731 $\pm$ 0.024	0.743 $\pm$ 0.034	0.714 $\pm$ 0.021 I	0.710 $\pm$ 0.027 I
	Ec.Pm (mm)	3.40 $\pm$ 0.26	3.22 $\pm$ 0.33	3.58 $\pm$ 0.24 I	3.68 $\pm$ 0.25 I
	Ec.S.3D (mm ²)	101 $\pm$ 8	94 $\pm$ 10	106 $\pm$ 8 I	109 $\pm$ 7
	Ma.Ar (mm ²)	0.67 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.08 I	0.76 $\pm$ 0.09 S I
	Ps.S.3D (mm ²)	166.8 $\pm$ 4.8	161.5 $\pm$ 7.4	167.1 $\pm$ 5.7	169.4 $\pm$ 4.0 I
	Tt.Ar (mm ²)	2.49 $\pm$ 0.15	2.38 $\pm$ 0.16	2.52 $\pm$ 0.12 I	2.60 $\pm$ 0.08 I
Ulna	Ct.Ar/Tt.Ar (%)	0.689 $\pm$ 0.013	0.720 $\pm$ 0.018 S	0.682 $\pm$ 0.026 I	0.695 $\pm$ 0.021 I
	Ec.Pm (mm)	4.86 $\pm$ 0.22	4.41 $\pm$ 0.29 S	4.98 $\pm$ 0.25 I	4.80 $\pm$ 0.30 I
	Ec.S.3D (mm ²)	175 $\pm$ 11	158 $\pm$ 12 S	182 $\pm$ 9 I	174 $\pm$ 12 I
	Ma.Ar (mm ²)	0.99 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.09 S	1.05 $\pm$ 0.10 I	0.98 $\pm$ 0.10 I
	Ps.S.3D (mm ²)	249.5 $\pm$ 8.2	243.5 $\pm$ 10.9	251.3 $\pm$ 7.2	253.5 $\pm$ 6.8
	Tt.Ar (mm ²)	3.18 $\pm$ 0.14	3.07 $\pm$ 0.18	3.31 $\pm$ 0.09	3.22 $\pm$ 0.13 S I
Humerus	Ct.Ar/Tt.Ar (%)	0.481 $\pm$ 0.023	0.477 $\pm$ 0.022	0.475 $\pm$ 0.022	0.458 $\pm$ 0.024
	Ec.Pm (mm)	10.64 $\pm$ 0.45	10.36 $\pm$ 0.39	10.70 $\pm$ 0.51	10.91 $\pm$ 0.22 I
	Ec.S.3D (mm ²)	349 $\pm$ 18	336 $\pm$ 17	349 $\pm$ 19	359 $\pm$ 11 I
	Ma.Ar (mm ²)	4.58 $\pm$ 0.35	4.45 $\pm$ 0.34	4.68 $\pm$ 0.36	4.97 $\pm$ 0.30 S I
	Ps.S.3D (mm ²)	396.7 $\pm$ 15.5	388.2 $\pm$ 11.6	398.9 $\pm$ 13.4	406.5 $\pm$ 10.5
	Tt.Ar (mm ²)	8.82 $\pm$ 0.36	8.49 $\pm$ 0.39	8.90 $\pm$ 0.38 I	9.17 $\pm$ 0.26 S I

Values are expressed as mean $\pm$ SD, obtained from μ CT acquisition (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgium) and analyzed with DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). S: p-value < 0.05 vs SED; I: p-value < 0.05 vs HIIT. SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. Ct.Ar/Tt.Ar: Cortical Area/ Total Area is the ratio of the mean cortical surface to the mean total surface; Ec.Pm: Endocortical Perimeter; Ec.S.3D: Endocortical Surface 3D is the measure of total endocortex surface area; Ma.Ar: Marrow Area is the mean medullary surface area; Ps.S.3D: total surface area of the periosteum; Tt.Ar: Total Area is the mean total surface area of cortical bone and marrow.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.t003>

medullary surface area (Ma.Ar). These results confirm the morphologic evaluation, in which the diameter of the medullary canal in the ulna obtained from rats subjected to HIIT was decreased compared to the respective results for ulna obtained from rats subjected to ComR (Table 3, Fig 3).

3.4.3. Humerus. No difference in BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp parameters was observed in humerus obtained from all the experimental groups (S3 Table). Similarly to what was observed in the ulna, the endocortical perimeter (Ec.Pm), endocortical surface area (Ec.S.3D) and mean medullary surface area (Ma.Ar) in the HIIT group were decreased, compared to respective results in the ComR group (Table 3). Humerus obtained from rats subjected to HIIT had a significantly lower periosteal perimeter than humerus obtained from rats subjected the CR and ComR (by 2% and 3%, respectively).

3.5. Cortical porosity in radius, ulna and humerus

The cortical porosity parameters for the radius, ulna and humerus obtained from each group are presented in Table 4. In the radius obtained from the CR group, the pore number (Po.N) was 75% upper than results from the SED group, 74% and 87% upper than respective results from both HIIT and ComR group. The pore diameter (Po.Dm) was 40% lower than results observed in SED group. In the ulna obtained from the HIIT group, the cortical porosity (Ct.

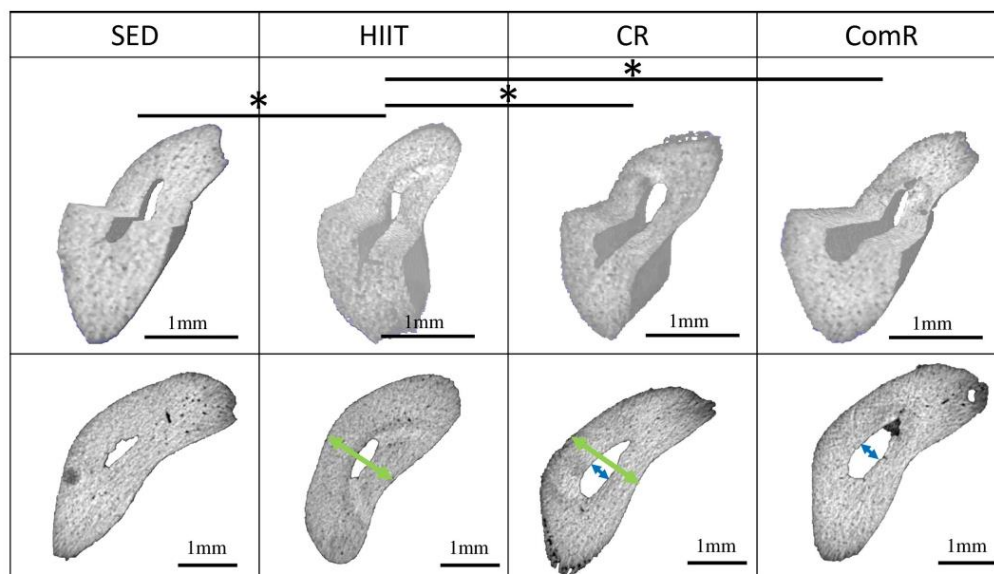


Fig 3. Illustration of the main differences in ulna morphology between running groups, based on morphometric and microarchitecture analyses. Images acquired with Bruker SkyScan 1176 (Kontich, Belgium) and analyzed by DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). The upper images represent the three-dimensional reconstruction of the ulna at mid-diaphysis. The upper line of table corresponds to the differences in the analysis of the cortical microarchitecture (Ct.Ar/Tl.Ar: Cortical Area/Total Area) of the ulna at the mid-diaphysis. The lower images represent the ulnar cortices at mid-diaphysis. The lower line of table corresponds to the morphometric measurements of the ulnar cortical at mid-diaphysis (the arrows correspond to the significant difference compared to the SED group: green arrow: medio-lateral diameter, blue arrow: medio-lateral diameter of the medullary canal). SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. The statistically significant differences (*p-value<0.05) are summarized in Tables 2 and 3.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.g003>

Table 4. Cortical porosity at mid diaphysis analyzed by μ CT of the radius, ulna and humerus with respect to running modality.

Cortical porosity parameters		SED	HIIT	CR	ComR
Radius	Ct.Po (%)	2.17 $\pm$ 0.22	2.27 $\pm$ 0.37	2.15 $\pm$ 0.27	2.01 $\pm$ 0.12
	Po.N (mm ⁻¹)	4.99 $\pm$ 0.27	5.02 $\pm$ 0.44	8.71 $\pm$ 2.64 S I B	4.66 $\pm$ 0.44
	Po.Sp (mm)	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
	Po.Dm (mm)	0.20 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.04 S I B	0.21 $\pm$ 0.02
Ulna	Ct.Po (%)	2.24 $\pm$ 0.16	3.70 $\pm$ 0.96 S B	3.50 $\pm$ 1.49	2.11 $\pm$ 0.16
	Po.N (mm ⁻¹)	5.22 $\pm$ 0.40	13.43 $\pm$ 3.78 S B	10.85 $\pm$ 5.45	5.33 $\pm$ 0.24
	Po.Sp (mm)	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
	Po.Dm (mm)	0.19 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.04 S B	0.12 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.01
Humerus	Ct.Po (%)	2.32 $\pm$ 0.44	2.32 $\pm$ 0.32	2.10 $\pm$ 0.34	2.27 $\pm$ 0.52
	Po.N (mm ⁻¹)	11.75 $\pm$ 0.96	9.56 $\pm$ 1.43 S	10.91 $\pm$ 1.09	11.00 $\pm$ 1.20
	Po.Sp (mm)	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
	Po.Dm (mm)	0.09 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01

Values are expressed as mean $\pm$ SD, obtained from μ CT acquisition (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgium) and analysed with DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). S: p-value < 0.05 vs SED; C: p-value < 0.05 vs CR; B: p-value < 0.05 vs ComR. SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. Ct.Po: Cortical Porosity; Po.N: Pore Number; Po.Sp: Pore Spacing; Po.Dm: Pore Diameter.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.t004>

Po) was 65% and 75% greater than respective results from the SED and ComR group. The pore number (Po.N) was 157% and 152% upper than respective results from the SED and ComR group. The pore diameter (Po.Dm) was 58% and 56% lower than respective results from the SED and ComR group. For the humerus, the HIIT group had a lower (19%) pore number (Po.N) than that observed in the SED groups.

3.6. Subchondral bone thickness

An increase in the radial subchondral bone thickness at the *articulatio radiocarpalis* by 32% and 51% in the HIIT and CR groups respectively, was measured compared to the SED group. An increase in ulnar subchondral bone thickness was measured in all running groups (by 95%, 69%; and 19% in the HIIT, CR and ComR groups, respectively) compared to the SED group (Fig 4).

3.7. Bone turnover markers

Plasma analyses of bone remodeling markers (ALP, NTX) at the end of the protocol showed no significant difference among the groups.

Discussion

The aim of the present study was to compare the effects of three different treadmill running modalities on forelimb bones in a male Wistar rat model (Fig 5). The studies carried out in the forelimbs in the literature have proposed models of resistance exercise in terms of force (pulling on a force lever) [30, 31], constraint (forearm compression) [32] or continuous running [33]. In quadrupeds, the function of the forelimbs is to cushion the impact when running, whereas the function of the hindlimbs is to propel the body, which resulted in an increase in stress on the ulna and radius. The study by Wallace *et al.*, 2015, [23] compared the effects of continuous running in a mouse model in all four limbs. Their biomechanical study on a force platform showed that the forelimbs were subjected to higher-intensity impacts than the hindlimbs. However, they showed through trabecular microarchitecture analyses that the bones in mouse forelimb bones were less sensitive to exercise than the bones in the hind limbs [23]. In rodents, it appears that there are no changes in the bone quality in forelimb, in trabecular microarchitecture specifically, in response to gripping and object handling (food) tasks. This hypothesis is supported by studies in birds. Although the forelimbs are subjected to enormous stress during flight, the trabecular microarchitecture of their skeleton has adapted to maintain a light structure and has a lower volume fraction than that of land animals [34].

The 8-weeks protocol led to an increase in MAS in all running groups compared with the SED group. This increase is in line with our expectations, since it has been shown in the literature that endurance training improves MAS and maximum oxygen consumption [35]. The increase in MAS in our running groups validates our treadmill running protocols.

Morphological measurements of the bones in the forelimbs obtained from each experimental group showed that 8 weeks of training did not interfere with bone growth, whatever the type of race, since no difference in bone length was measured. These results are consistent with the weight recordings, in which no difference was observed. Morphometric measurements revealed an increase in the mediolateral diameter of the ulna from rats subjected to HIIT and CR., Radius obtained from rats in the ComR group presented an increase in their mediolateral diameter. The internal diameter of the medullary canal in the mediolateral axis was also increased in both the ulna and humerus in the ComR group compared to the SED and HIIT groups. This increase in diameter was also found in the radius in its antero-posterior axis. The measurements were performed using the axis of the rat's body as the theoretical

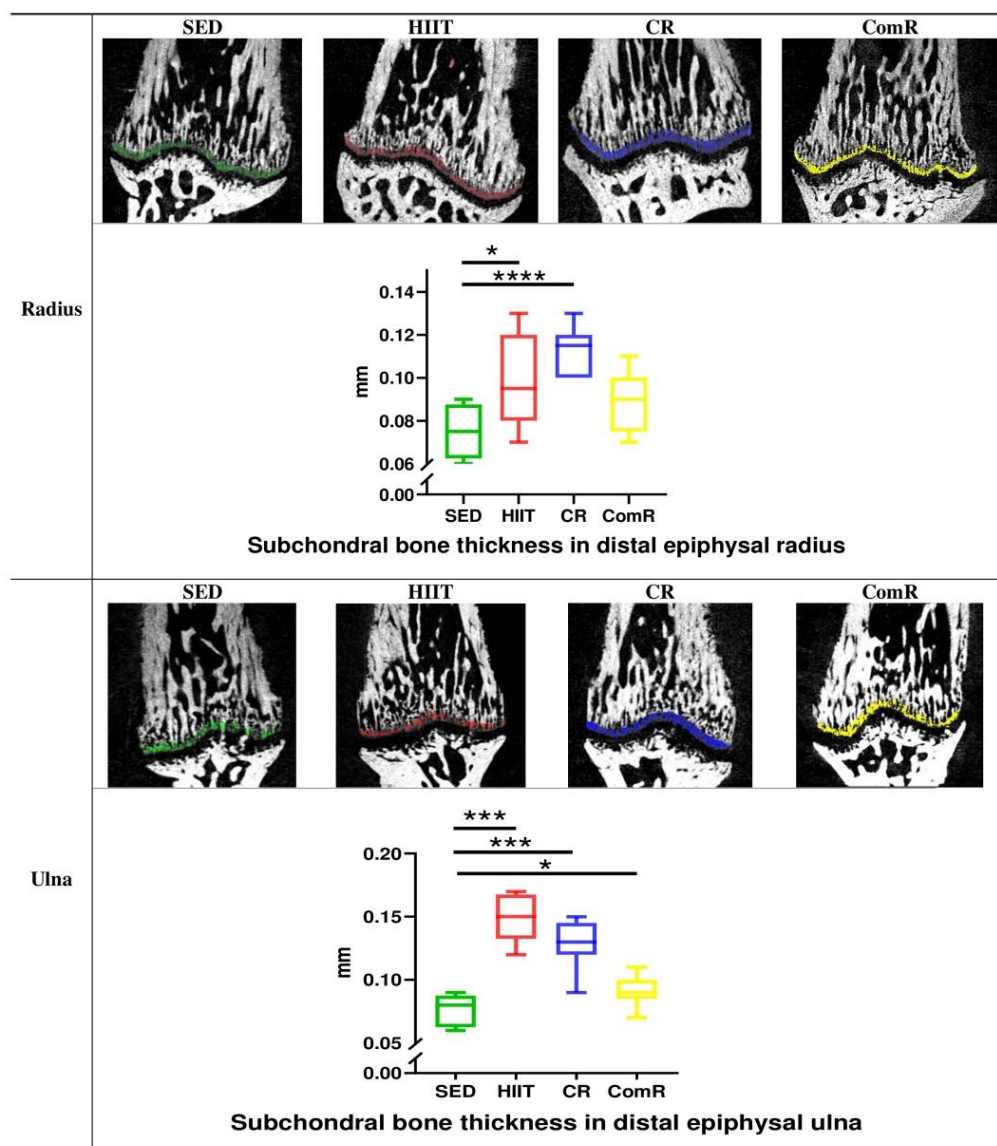


Fig 4. Subchondral bone thickness in the distal radius and ulna. Measurements were performed with Dragonfly software from μ CT images. Values are expressed in mm. *: p-value < 0.05; ***: p-value < 0.001. SED: Sedentary group (green); HIIT: High Intensity Interval Training group (red); CR: Continuous Running group (blue); ComR: Combined Running group (yellow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.g004>

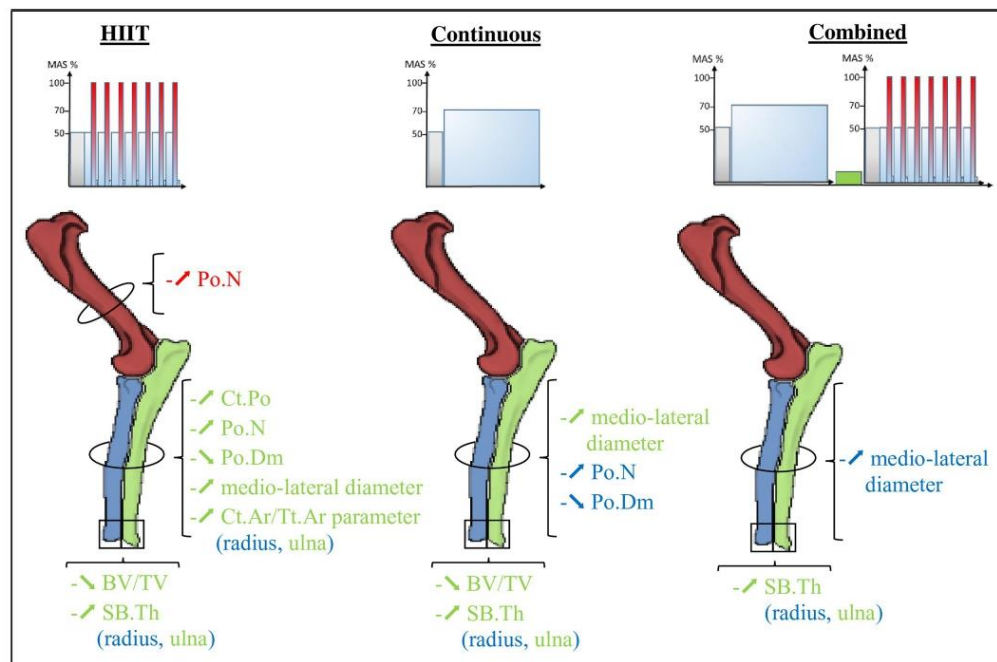


Fig 5. Summary schematic of the main statistically significant results of the effects of the three running modalities on the upper limbs compared with the sedentary group. (humerus in red, radius in blue, ulna in green); HIIT: High Intensity Interval Training group. ↘: Decrease; ↗: Increase; Ct.Po: Cortical Porosity; Po.N: Pore Number; Po.Dm: Pore diameter; BV/TV: Bone Volume/Tissue Volume; SB.Th: Subchondral Bone Thickness.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308974.g005>

reference frame, according to anatomical representations in the literature. However, when the rat is walking, the radius undergoes a translation and a medial rotation so that it is completely crossed over the ulna when it rests on the ground. This rotation was measured at around 174–178° compared to a theoretical reference position during an analysis of the rat's walking [36]. This means that at the time of weight-bearing, the initial axis of the antero-posterior radius would potentially be in the mediolateral axis. The increase in the bone diameter at mid-diaphyseal level is probably a tissue response to the mechanical stresses associated with exercise, increasing the resistance of bone to flexion and torsion [37]. This phenomenon has been evaluated in athletes [38, 39] particularly in tennis players during and after puberty [40], as well as in continuous running models in rats [16] and in the forearm axial compression loading model [41].

The microarchitecture of the forelimb bones was analyzed in three regions (proximal epiphysis, distal epiphysis and whole bone) because the study aimed to determine whether the effects of impact resulted in local adaptation (epiphysis) or an adaptation of the whole bone. From a biomechanical point of view, the ulna appeared to be the bone that received the most stress, as it transmits the motor force through the insertion of the *Musculus Triceps brachii*. Analysis of the trabecular microarchitecture parameters [28] (including BV/TV, Tb.Th) revealed a difference between running groups, in the distal ulna only. Specifically, ComR had

the best osteogenic effects on trabecular bone microarchitecture at the distal ulnar epiphysis, with the highest value of the Tb.Th. parameter. The femur study by Wazzani *et al.*, 2023 [22] revealed that combined running improved trabecular microarchitecture parameters (Tb.Th; Tb.BMD) in the proximal femur. Here, specific analysis of the proximal and distal epiphyses of the radius and humerus revealed no significant difference. In the study herein, ComR running increased the internal medullary cavity area (Ma.Ar) in radius and humerus, compared to respective results in the SED and HIIT groups, in ulna compared to respective results in the HIIT condition. These results are consistent with morphometric measurements of medullary canal diameter at mid-diaphysis. In the ulna and radius, these results are reflected in a decrease in the average cortical surface fraction (Ct.Ar/Tt.Ar) in the ComR group, compared to the HIIT group. It therefore seems that combined running increases the diameter of the radius and ulna, while reducing the cortical surface. This adaptation is described in the literature during bone growth, when endocortical resorption results in an expanding medullary cavity and partly compensates for the increase in cortical surface due to periosteal apposition [37]. The consecutive result is an increase in the diameter of the cortical bone, which results in an increase in its resistance to flexion [37]. In the ulna, combined running therefore appears to have positive effects on distal trabecular microarchitecture (BV/TV, Tb.Th) as well as on the theoretical flexural strength of the diaphysis. These results are consistent with previous studies, in which young growing rats (Sprague-Dawley rats, 2.5 months of age) showed an improvement in trabecular microarchitecture parameters in the distal radius (BV/TV; Tb.Th; Tb.N) and an increase in medullary cavity area, associated with improved bone tensile strength [42] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655973/>. However, in the same study, the strength protocol also led to a degradation of the trabecular and cortical bone in adult rats. The authors concluded that excessive and repeated mechanical loadings were beneficial in young rats but presented deleterious effects in adult rats.

Assessment of cortical porosity (Ct.Po) by μ CT at 4.81 μ m resolution (vascular channels) reflects the mechanical strength of the bone [43]. This network of channels evolves as the bone develops to promote vascularization and blood perfusion and ensure the adequate supply of oxygen, minerals and nutrients required for bone homeostasis [44] and growth [45]. Our study revealed significant differences in cortical porosity at the ulna, the bone that absorbs mechanical stress and transmits muscular force during locomotion. At the ulna, the HIIT group had greater cortical porosity than the sedentary and combined running groups. Although the literature on the effects of exercise on bone health is widely developed, the actual impact of interval running on bone tissue is not yet fully understood [46]. In this respect, it has been observed in humans that high-intensity training can generate a significant loss of cortical bone, favoring the appearance of injuries or fractures [47, 48], but it has also been shown that in untrained subjects high-intensity interval running increases bone density measured in the whole body by DXA [49]. Studies in humans seem to lack homogeneity in terms of the parameters evaluated and the results reported (blood dosage and bone density), which means that no conclusions can be drawn. Nevertheless, in male mouse models, the response of bone tissue to high intensity running, either performed continuously or at intervals, appears to increase the fraction of cortical bone to the detriment of mechanical strength [48, 50]. These two studies also showed that the response of bone tissue is also dependent on the sites where measurements were performed and sexual dimorphism, with the tibias of male mice showing the greatest effects [48, 50]. Thus, speed or intensity would condition the effects on bone tissue, and it has been shown in rats (5-month-old male Sprague Dawley) that at 12m/min (continuous) running did not induce any variation in cortical porosity, whereas at 16m/min running induced an increase in cortical porosity [51]. In the radius, CR decreased the number of cortical pores (Po.N) compared with the sedentariness. CR increased pore diameter (Po.Dm)

compared with the ComR. To date, no study has compared the effects of these three running protocols on forelimb cortical porosity. However, studies that have applied compressive stress [52] or force (traction) protocols [42] have shown deleterious effects on the rate of osteocyte lacunar occupation at the mid-diaphysis, increased by cortical micro-fractures and an increase in cortical porosity in the radius. The studies which carried out their analysis on the tibiae showed contradictory results. It was shown that continuous running had no effect on morphometry at the cortical diaphysis in sprague dawley rats (17m/min for 1 h 5 day/week for 9 weeks) (cortical bone area, marrow cavity area) [53] and in C57BL/6 mice, (12m/min at 5° incline for 30 min, 5 day/week for 6 weeks) (cortical thickness) [54] 10.1016/8756-3282(94)90294-1 whereas other studies have shown that continuous running decreased cross sectional area with deleterious effects on mechanical properties (ultimate deformation) (C57BL/6) mice, 12 m/min, a 5° incline, 30 min/day for 8 weeks) [55] and on microarchitecture parameters (Po.Sp) and mediolateral tibial external diameter (Wistar rat, 20m/min for 60mins, 5 days a week for 14 weeks) [16].

The secondary aim of the study was to determine the effects of this three running protocols on the carpal and elbow joints, and more specifically the effects on subchondral bone. All three running protocols led to a thickening of the subchondral bone at the distal epiphysis of the radius and ulna. According to these results, interval or continuous trainings could have deleterious effects on the *articulatio radiocarpalis* and the *articulatio ulnocarpalis*. This is in line with the literature on osteoarthritis, in which interval running at high intensity induced thickening of the subchondral bone at the level of the tibial plateau in a rat model [56]. The study by Li *et al.*, 2017 [57] shows that continuous high-intensity running induces a change in the quality of cartilage and leads to a change in the organization of the microstructure and composition of subchondral bone in healthy Wistar rats. This study also shows that high-intensity physical activity alters both the tissue and the mechanical properties of bone and cartilage tissues concomitantly [57]. This concomitant alteration is the result of bone adaptation to mechanical stress, which leads to an increase in tissue density and hardness, which in turn leads to an increase in shear forces on the cartilage. Cartilage altered in this way is no longer able to maintain its viscoelastic properties and its role as a damper, leading to an increase in stress on the subchondral bone as it tries to adapt.

The three running protocols proposed in our study did not significantly modify the systemic markers of bone remodeling (ALP and NTx). To our knowledge, only one study has proposed similar protocols with three running modalities and did not reveal any differences in bone remodeling markers among groups [22]. In 6-month-old ovariectomized rat models, however, continuous moderate running (13 m/min for 60 min/day 5 days/week for 9 weeks) induced a decrease in CTX (C-terminal telopeptide) compared with the sedentary ovariectomized groups [14], whereas in 8-week-old male Wistar rats, continuous moderate running (22.5 m/min for 40–45 min 5 days/week for 8 weeks) induced an increase in CTX compared with the sedentary control group [15]. Studies in male Wistar rats showed that HIIT reduced NTX levels compared with the sedentary group [58].

Conclusion

This study shows that continuous running, interval running and combined running led to bone adaptation resulting in an increase in the diameters of the bone shafts, and an adaptation of the microarchitecture in the ulna. The combined running protocol, which aimed to mimic as closely as possible the training of high-level athletes, appears to have positive effects on the trabecular microarchitecture in the distal ulna (specifically Tb.Th. and Ma.Ar parameters). Interestingly, all three running modalities led to a thickening of the subchondral bone in the

distal epiphysis for both radius and ulna. The three running protocols did not induce any variation in plasma bone biomarker levels. Based on the results, HIIT is the running modality that induces the most bone adaptation with an increase in cortical area at the ulna and tibia associated with an increase in cortical porosity. Furthermore, regarding our results, it would appear that the bone response to the mechanical stress of running is essentially located on the distal epiphyses of the radius and ulna, i.e. close to the point of impact, which supports Wolff's law.

Supporting information

S1 Table. Trabecular microarchitecture analysis by μ CT of the radius as a function of running modality. Measurements are expressed as mean $\pm$ SD, measured by μ CT (Bruker Sky-Scan 1176, Kontich, Belgium) and analyzed by DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. BV/TV: Bone Volume/Tissue Volume; Tb.N: Trabecular Number; Tb.Sp: Trabecular Spacing; Tb.Th: Trabecular Thickness. (PDF)

S2 Table. Trabecular microarchitecture analysis by μ CT of the ulna as a function of running modality. Measurements are expressed as mean $\pm$ SD, measured by μ CT (Bruker Sky-Scan 1176, Kontich, Belgium) and analyzed by DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). S: p-value <0.05 vs SED; C: p-value <0.05 vs CR; I: p-value <0.05 vs HIIT. SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. BV/TV: Bone Volume/Tissue Volume; Tb.N: Trabecular Number; Tb.Sp: Trabecular Spacing; Tb.Th: Trabecular Thickness. (PDF)

S3 Table. Trabecular microarchitectural analysis by μ CT of the humerus as a function of running modality. Measurements are expressed as mean $\pm$ SD, measured by μ CT (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgium) and analyzed by DragonFly software (version 2022.2 Build 1399). SED: Sedentary group; HIIT: High Intensity Interval Training group; CR: Continuous Running group; ComR: Combined Running group. BV/TV: Bone Volume/Tissue Volume; Tb.N: Trabecular Number; Tb.Sp: Trabecular Spacing; Tb.Th: Trabecular Thickness. (PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Andy Xavier, Céline Bourzac, Morad Bensidhoum, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Data curation: Andy Xavier, Céline Bourzac, Morad Bensidhoum, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Formal analysis: Andy Xavier, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Funding acquisition: Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Methodology: Andy Xavier, Céline Bourzac, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Project administration: Andy Xavier, Céline Bourzac, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Resources: Morad Bensidhoum, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Supervision: Andy Xavier, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Validation: Andy Xavier, Céline Bourzac, Morad Bensidhoum, Catherine Mura, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Visualization: Andy Xavier, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Writing – original draft: Andy Xavier, Céline Bourzac, Morad Bensidhoum, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

Writing – review & editing: Andy Xavier, Céline Bourzac, Morad Bensidhoum, Hugues Portier, Stéphane Pallu.

References

1. Bamsley J, Buckland G, Chan PE, et al. Pathophysiology and treatment of osteoporosis: challenges for clinical practice in older people. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2021; 33:759–73. <https://doi.org/10.1007/s40520-021-01817-y> PMID: 33742387
2. Marques EA, Mota J, Carvalho J. Exercise effects on bone mineral density in older adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2012; 34:1493–515. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9311-8> PMID: 21922251
3. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1116:281–90. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.018> PMID: 17646259
4. Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ. Cortical and trabecular bone adaptation to incremental load magnitudes using the mouse tibial axial compression loading model. *Bone*. 2013; 52:372–9. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.10.026> PMID: 23111313
5. Wolff J. The Law of Bone Remodelling. *The Law of Bone Remodelling*. Published Online First: 1986. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71031-5>
6. Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2000; 18:305–16. <https://doi.org/10.1007/s007740070001> PMID: 11052462
7. Pearson OM, Lieberman DE. The aging of Wolff's "law": ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *American journal of physical anthropology*. 2004; Suppl 39:63–99. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20155> PMID: 15605390
8. Scheuren AC, Vallaster P, Kuhn GA, et al. Mechano-Regulation of Trabecular Bone Adaptation Is Controlled by the Local in vivo Environment and Logarithmically Dependent on Loading Frequency. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8:1211. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.566346> PMID: 33154964
9. Portier H, Benaitreau D, Pallu S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life (Basel, Switzerland)*. 2020; 10:1–34. <https://doi.org/10.3390/ife10100217> PMID: 32977460
10. Hannan AL, Hing W, Simas V, et al. High-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training within cardiac rehabilitation: a systematic review and meta-analysis. *Open Access J Sports Med*. 2018; 9:1–17. <https://doi.org/10.2147/OAJSM.S150596> PMID: 29416382
11. Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, et al. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*. 2015; 45:679–92. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0321-z> PMID: 25771785
12. Helgerud J, Høydal K, Wang E, et al. Aerobic high-intensity intervals improve VO2max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39:665–71. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3180304570> PMID: 17414804
13. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007; 22:578–88. <https://doi.org/10.1359/jbmr.070117> PMID: 17243867
14. Bonnet N, Laroche N, Beaupied H, et al. Doping dose of salbutamol and exercise training: Impact on the skeleton of ovariectomized rats. *Journal of Applied Physiology*. 2007; 103. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01319.2006> PMID: 17478603
15. Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, et al. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: Study in a rat model. *European Journal of Applied Physiology*. 2011; 111. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-1916-1> PMID: 21437605

16. Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, et al. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint bone spine*. 2013; 80:492–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.12.005> PMID: 23380443
17. Mujika I, Chatard JC, Busso T, et al. Effects of training on performance in competitive swimming. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee*. 1995; 20:395–406. <https://doi.org/10.1139/h95-031> PMID: 8563672
18. Atlaoui D, Pichot V, Lacoste L, et al. Heart rate variability, training variation and performance in elite swimmers. *International journal of sports medicine*. 2007; 28:394–400. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924490> PMID: 17111320
19. Boudenot A, Maurel DB, Pallu S, et al. Quick benefits of interval training versus continuous training on bone: a dual-energy X-ray absorptiometry comparative study. *International journal of experimental pathology*. 2015; 96:370–7. <https://doi.org/10.1111/iep.12155> PMID: 26754273
20. Polisel EEC, Beck WR, Scariot PPM, et al. Effects of high-intensity interval training in more or less active mice on biomechanical, biophysical and biochemical bone parameters. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021; 11:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85585-9> PMID: 33742012
21. T J Overend 1, D H Paterson DAC. The effect of interval and continuous training on the aerobic parameters—PubMed. *Can J Sport Sci* 1992 Jun; 17(2):129–34. PMID: 1324106
22. Wazzani R, Bourzac C, Elhaoui H, et al. Comparative effects of various running exercise modalities on femoral bone quality in rats. *European journal of applied physiology*. Published Online First: 2023. <https://doi.org/10.1007/S00421-023-05293-2> PMID: 37690048
23. Wallace IJ, Pagnotti GM, Rubin-Sigler J, et al. Focal enhancement of the skeleton to exercise correlates with responsiveness of bone marrow mesenchymal stem cells rather than peak external forces. *The Journal of Experimental Biology*. 2015; 218:3002. <https://doi.org/10.1242/jeb.118729> PMID: 26232415
24. Patton DM, Henning EN, Goulet RW, et al. Deep learning-based segmentation of high-resolution computed tomography image data outperforms commonly used automatic bone segmentation methods. *bioRxiv*. 2021;2021.07.27.453890. <https://doi.org/10.1101/2021.07.27.453890>
25. Viero A, Biehler-Gomez L, Messina C, et al. Utility of micro-CT for dating post-cranial fractures of known post-traumatic ages through 3D measurements of the trabecular inner morphology. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022; 12:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14530-1> PMID: 35732857
26. Otsu N. THRESHOLD SELECTION METHOD FROM GRAY-LEVEL HISTOGRAMS. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1979; SMC-9:62–6. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
27. Buie HR, Campbell GM, Klinck RJ, et al. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone*. 2007; 41:505–15. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.07.007> PMID: 17693147
28. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010; 25:1468–86. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141> PMID: 20533309
29. Zhang Y, Dong X li, Leung PC, et al. Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone*. 2009; 44:46–52. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.09.003> PMID: 18848653
30. Barbe MF, Massicotte VS, Assari S, et al. Prolonged high force high repetition pulling induces osteocyte apoptosis and trabecular bone loss in distal radius, while low force high repetition pulling induces bone anabolism. *Bone*. 2018; 110:267. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.014> PMID: 29476978
31. Jain NX, Barr-Gillespie AE, Clark BD, et al. Bone Loss from High Repetitive High Force Loading is Prevented by Ibuprofen Treatment. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2014; 14:78. PMID: 24583543
32. Kotha SP, Hsieh YF, Strigel RM, et al. Experimental and finite element analysis of the rat ulnar loading model—Correlations between strain and bone formation following fatigue loading. *Journal of Biomechanics*. 2004; 37:541–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2003.08.009> PMID: 14996566
33. Bourzac C, Bensidhoum M, Manassero M, et al. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using μ CT. *Life*. 2020; 10:1–16. <https://doi.org/10.3390/LIFE10120308> PMID: 33255288
34. Doube M, Klosowski MM, Wiktorowicz-Conroy AM, et al. Trabecular bone scales allometrically in mammals and birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011; 278:3067. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0069> PMID: 21389033
35. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, et al. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO2 max and cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*. 2001; 280:1301–10. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.2001.280.3.H1301/ASSET/IMAGES/LARGE/H40310590005.JPEG>

36. Bonnan MF, Shulman J, Varadharajan R, et al. Forelimb Kinematics of Rats Using XROMM, with Implications for Small Eutherians and Their Fossil Relatives. *PLoS ONE*. 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149377> PMID: 26933950
37. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone*. 1993; 14:595–608. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90081-k](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90081-k) PMID: 8274302
38. DUNCAN CS, R BLIMKIE CJ, KEMP A, et al. Mid-femur geometry and biomechanical properties in 15- to 18-yr-old female athletes. *Medicine and science in sports and exercise*. 2002; 34:673–81. <https://doi.org/10.1097/00005768-200204000-00018> PMID: 11932578
39. Greene DA, Naughton GA, Briody JN, et al. Bone strength index in adolescent girls: does physical activity make a difference? *British journal of sports medicine*. 2005; 39:622–7. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2004.014498> PMID: 16118299
40. Bass SL, Saxon L, Daly RM, et al. The effect of mechanical loading on the size and shape of bone in pre-, peri-, and postpubertal girls: a study in tennis players. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2002; 17:2274–80. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.12.2274> PMID: 12469922
41. Warden SJ, Fuchs RK, Castillo AB, et al. Exercise When Young Provides Lifelong Benefits to Bone Structure and Strength. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007; 22:251–9. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061107> PMID: 17129172
42. Massicotte VS, Frara N, Harris MY, et al. PROLONGED PERFORMANCE OF A HIGH REPETITION LOW FORCE TASK INDUCES BONE ADAPTATION IN YOUNG ADULT RATS, BUT LOSS IN MATURE RATS. *Experimental gerontology*. 2015; 72:204. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.10.014> PMID: 26517953
43. Uniyal P, Sihota P, Tikoo K, et al. Anatomical variation in intracortical canal network microarchitecture and its influence on bone fracture risk. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2021; 123:104770. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104770> PMID: 34392038
44. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular Biology and the Skeleton*. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006; 21:183–92. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050917> PMID: 16418774
45. Age-related changes in the 3D hierarchical structure of rat tibia cortical bone characterized by high-resolution micro-CT | *Journal of Applied Physiology*. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/japplphysiol.00948.2011> (accessed 7 June 2024)
46. Noll M, Mendonça CR, dos Santos Rodrigues AP, et al. Narrative review of the influence of high-intensity interval training on adolescents' bone health: commentary and perspectives. *Translational Pediatrics*. 2021; 10. <https://doi.org/10.21037/tp-20-166> PMID: 33633948
47. Scott JPR, Sale C, Greeves JP, et al. The effect of training status on the metabolic response of bone to an acute bout of exhaustive treadmill running. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010; 95:3918–25. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2516> PMID: 20519353
48. Koenen K, Knepper I, Klott M, et al. Sprint Interval Training Induces A Sexual Dimorphism but does not Improve Peak Bone Mass in Young and Healthy Mice. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017; 7:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep44047> PMID: 28303909
49. Ravnholt T, Tybirk J, Jørgensen NR, et al. High-intensity intermittent "5–10–15" running reduces body fat, and increases lean body mass, bone mineral density, and performance in untrained subjects. *European Journal of Applied Physiology*. 2018; 118:1221–30. <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3851-x> PMID: 29594355
50. Wallace JM, Rajachar RM, Allen MR, et al. Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. *Bone*. 2007;40. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.12.002> PMID: 17240210
51. Liu Z, Gao J, Gong H. Effects of treadmill with different intensities on bone quality and muscle properties in adult rats. *Biomed Eng Online*. 2019; 18:107. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0728-0> PMID: 31718665
52. Hao L, Rui-Xin L, Biao H, et al. Effect of athletic fatigue damage and the associated bone targeted remodeling in the rat ulna. *BioMedical Engineering Online*. 2017; 16:1–10. <https://doi.org/10.1186/S12938-017-0384-1/FIGURES/7>
53. Chen MM, Yeh JK, Aloia JF, et al. Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats: a histomorphometry and dual energy x-ray absorptiometry study. *Bone*. 1994; 15:313–9. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(94\)90294-1](https://doi.org/10.1016/8756-3282(94)90294-1) PMID: 8068453
54. Berman AG, Hinton MJ, Wallace JM. Treadmill running and targeted tibial loading differentially improve bone mass in mice. *Bone Rep*. 2019; 10:100195. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100195> PMID: 30701187

55. Friedman MA, Szczepankiewicz RP, Kohn DH. Combined mineral-supplemented diet and exercise increases bone mass and strength after eight weeks and maintains increases after eight weeks detraining in adult mice. *PLoS One*. 2018; 13:e0204470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204470> PMID: 30240447
56. Boudenot A, Presle N, Uzbekov R, et al. Effect of interval-training exercise on subchondral bone in a chemically-induced osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014; 22:1176–85. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.05.020> PMID: 24928318
57. Li Z, Liu SY, Xu L, et al. Effects of treadmill running with different intensity on rat subchondral bone. *Scientific Reports* 2017 7: 1. 2017; 7:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02126-z> PMID: 28512292
58. Boudenot A, Pallu S, Uzbekov R, et al. 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. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2021; 46. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0683> PMID: 34370961

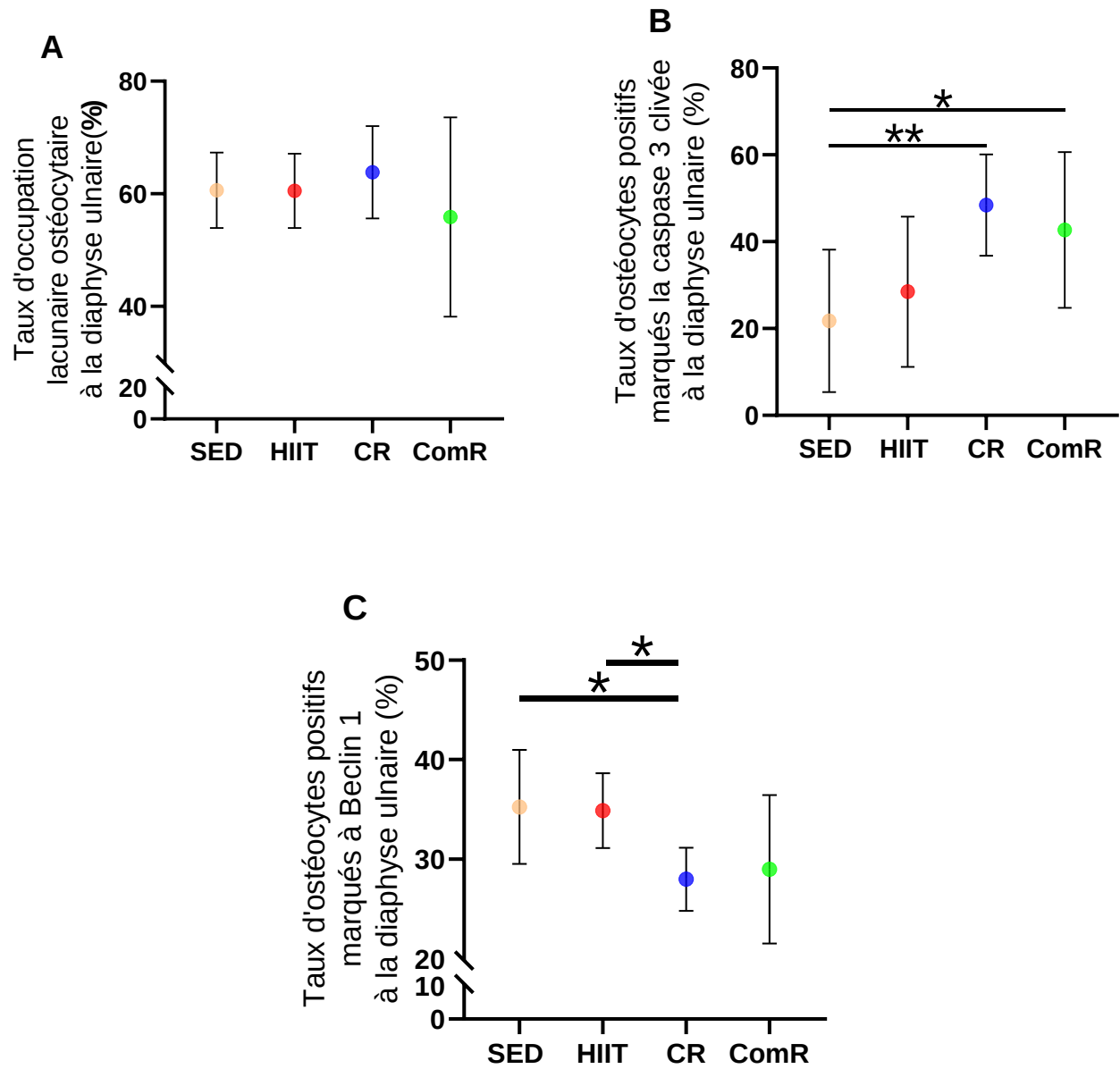
II Résultats complémentaire de l'étude 1 : effet des différents protocoles de course sur la biologie ostéocytaire et ostéoclastique de l'ulna et de l'humérus

2.1. Analyses histologique et immuno-histochimique de l'ulna

2.1.1. Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire, apoptose et autophagie

Après 8 semaines d'entraînement quotidien sur tapis roulant, le HIIT et la course combinée n'ont pas induit de changement du taux d'occupation lacunaire ostéocytaire (Figure 44). Cependant, la course continue a présenté une augmentation de 5% non significative. Cette augmentation est associée à une augmentation de 122% du taux d'apoptose ostéocytaire marqué à la caspase 3 clivé comparé au groupe sédentaire et à une diminution de 21% du flux autophagique marqué à Béclin1. Le groupe combiné présente une augmentation de 96% du taux d'apoptose ostéocytaire marqué à la caspase 3 clivée comparé au groupe sédentaire. Le HIIT ne présente pas de différence significative du taux d'apoptose ostéocytaire et du flux autophagique par rapport au groupe sédentaire.

La course continue présente une corrélation faible négative et non significative entre l'apoptose et l'autophagie. La course continue augmente l'apoptose au détriment de l'autophagie. Le groupe HIIT présente une corrélation modérée non significative entre l'apoptose et l'autophagie. Cette corrélation montre un effet positif de l'autophagie sur le taux d'ostéocytes en apoptose. Le groupe course combinée présente une absence de corrélation entre l'apoptose et l'autophagie (Figure 45).



D	Sédentaire	HIIT	Continue	Combinée
Occupation lacunaire ostéocytaire				

Résultats

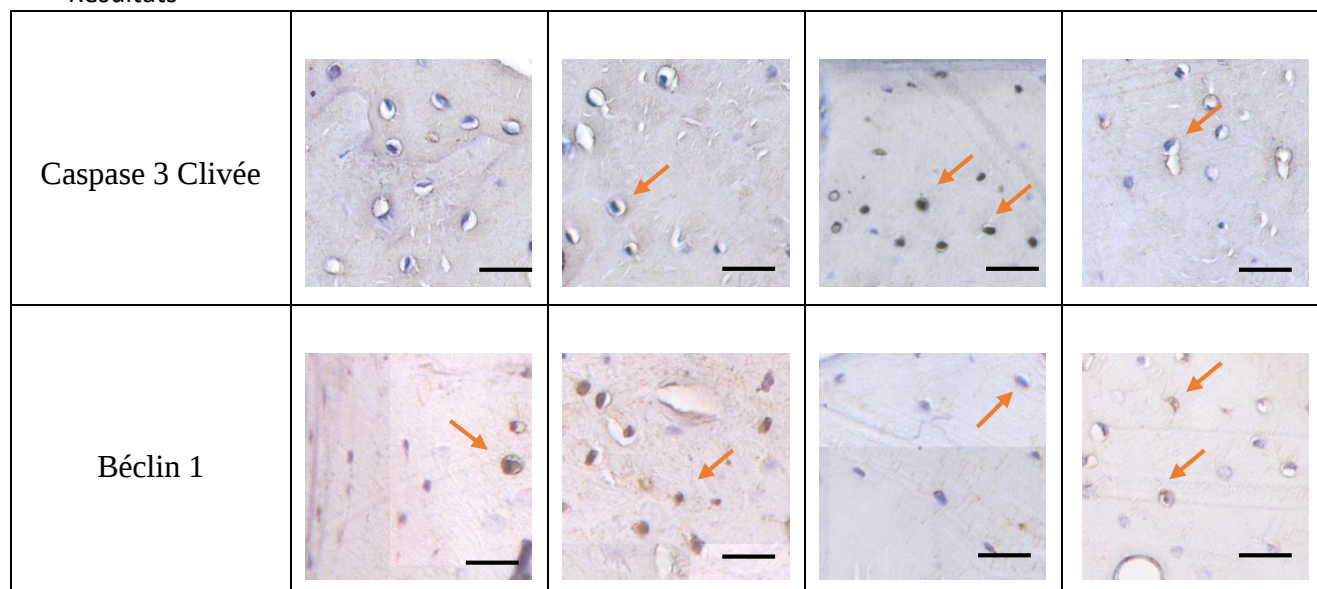


Figure 44: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse ulnaire. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100, et **C** : l'autophagie des ostéocytes a été marquée avec une concentration d'anticorps anti-Béclin 1 de 1/500. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. ** : Valeur $P < 0,01$; *** : Valeur $P < 0,001$ (test U-Mann Whitney). **D** : Les images ont été obtenues un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle est de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

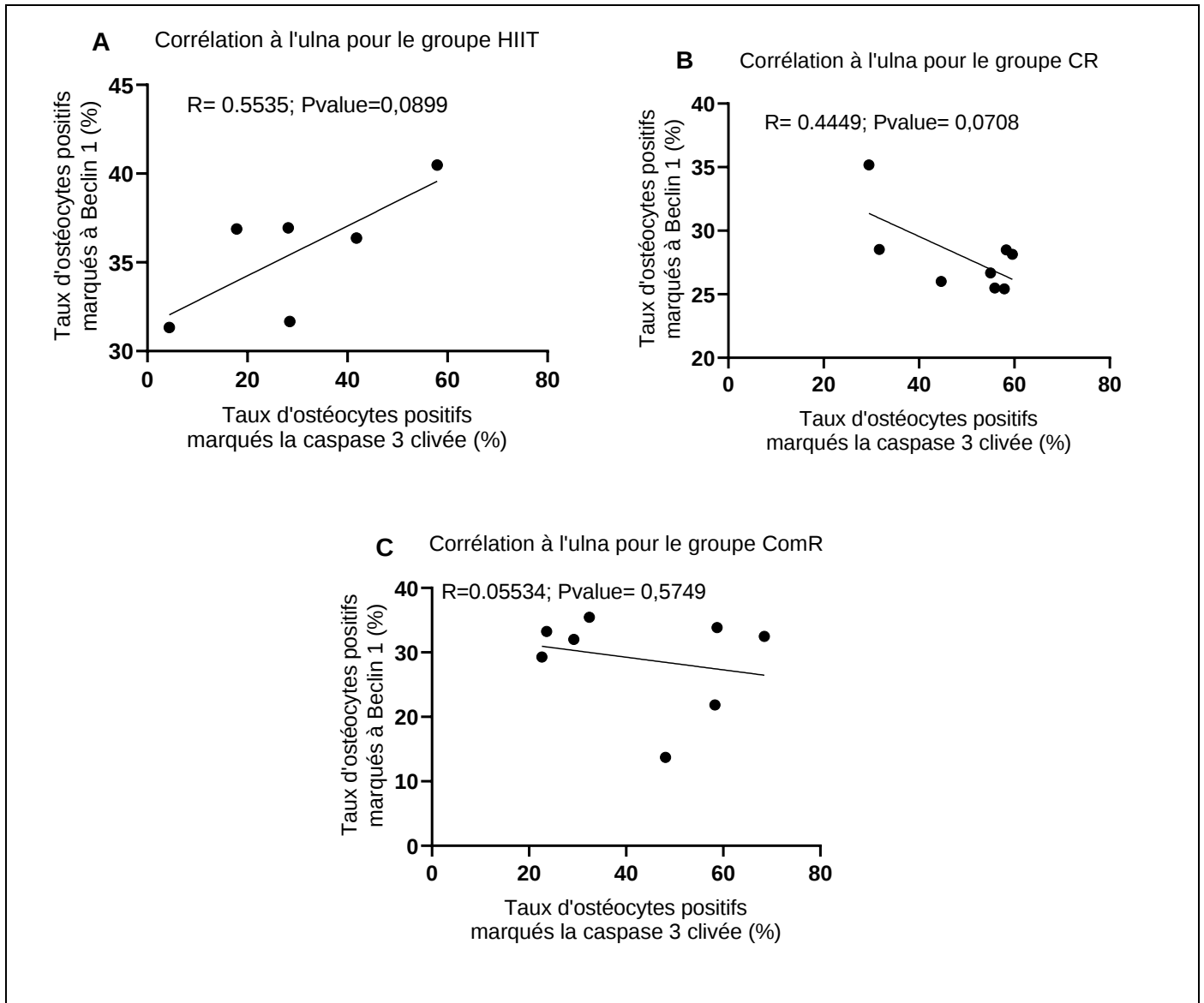


Figure 45: Résultats des tests de corrélation de Spearman entre l'apoptose et l'autophagie des trois groupes de course analysés à la diaphyse ulnaire. **A** : Corrélation modérée non significative ; **B** : Corrélation faible non significative ; **C** : Absence de corrélation.

2.1.2. Analyse de la mécano-transduction et de la différenciation ostéocytaire

Le HIIT présente une diminution significative de 67% du taux de marquage à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Tous les protocoles de course ont augmenté significativement l'expression du marqueur CD 44 par rapport au groupe sédentaire (Figure 46).

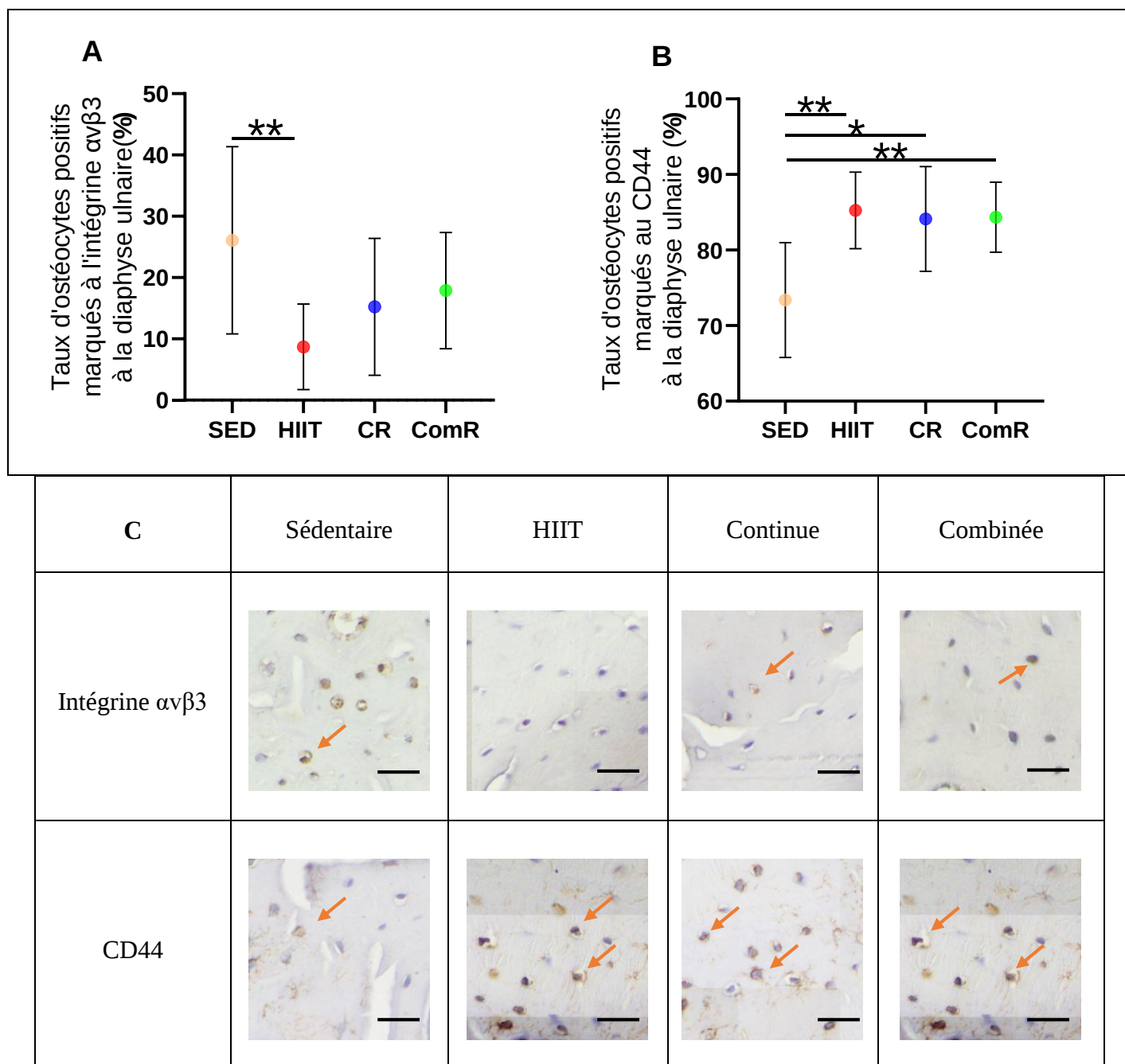


Figure 46: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse ulnaire. **A** : Le taux d'ostéocytes positifs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ au 1/200, **B** : le taux d'ostéocytes positifs CD44 a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-CD44 au 1/200. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur $P < 0,05$; ** : P valeur $< 0,01$; *** : P valeur $< 0,001$ (test U-Mann Whitney). **C** : Les images ont été obtenues un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle est de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

2.1.3. Activité ostéoclastique

L'analyse de l'activité des ostéoclastes par le marquage TRAP n'a pas montré de différence d'activité entre les groupes expérimentaux, que ce soit à l'épiphyse proximale ou distale de l'ulna (Figure 47).

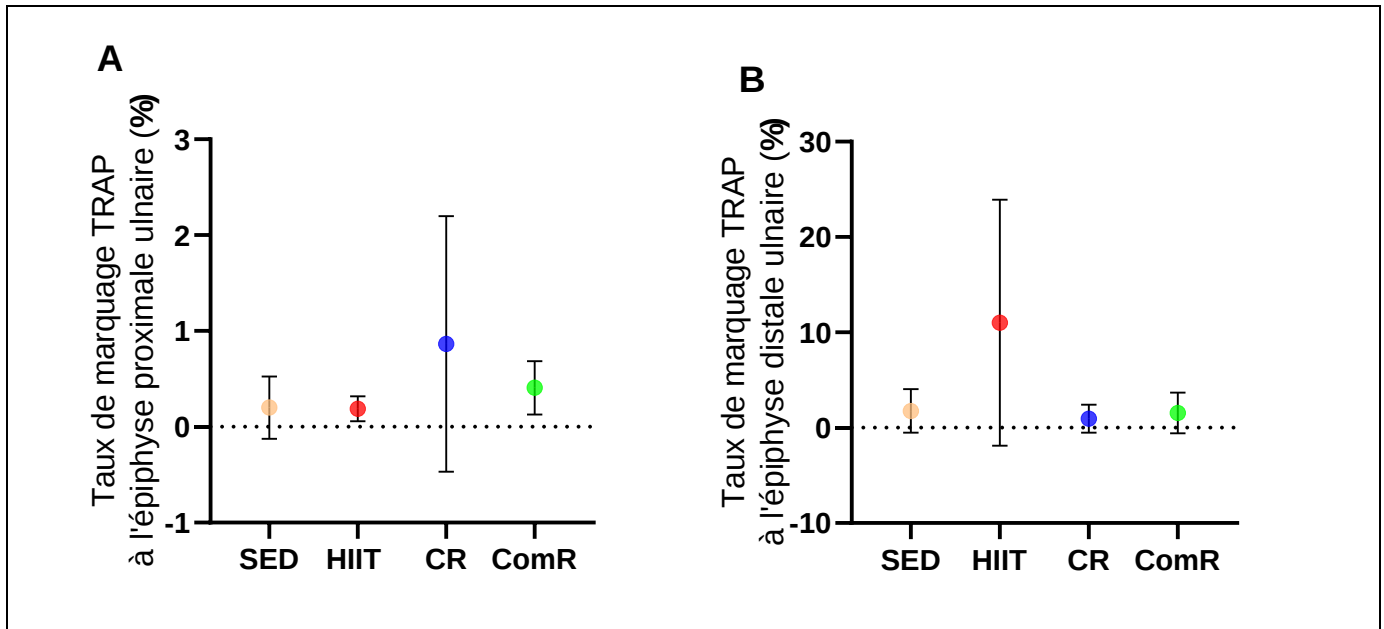
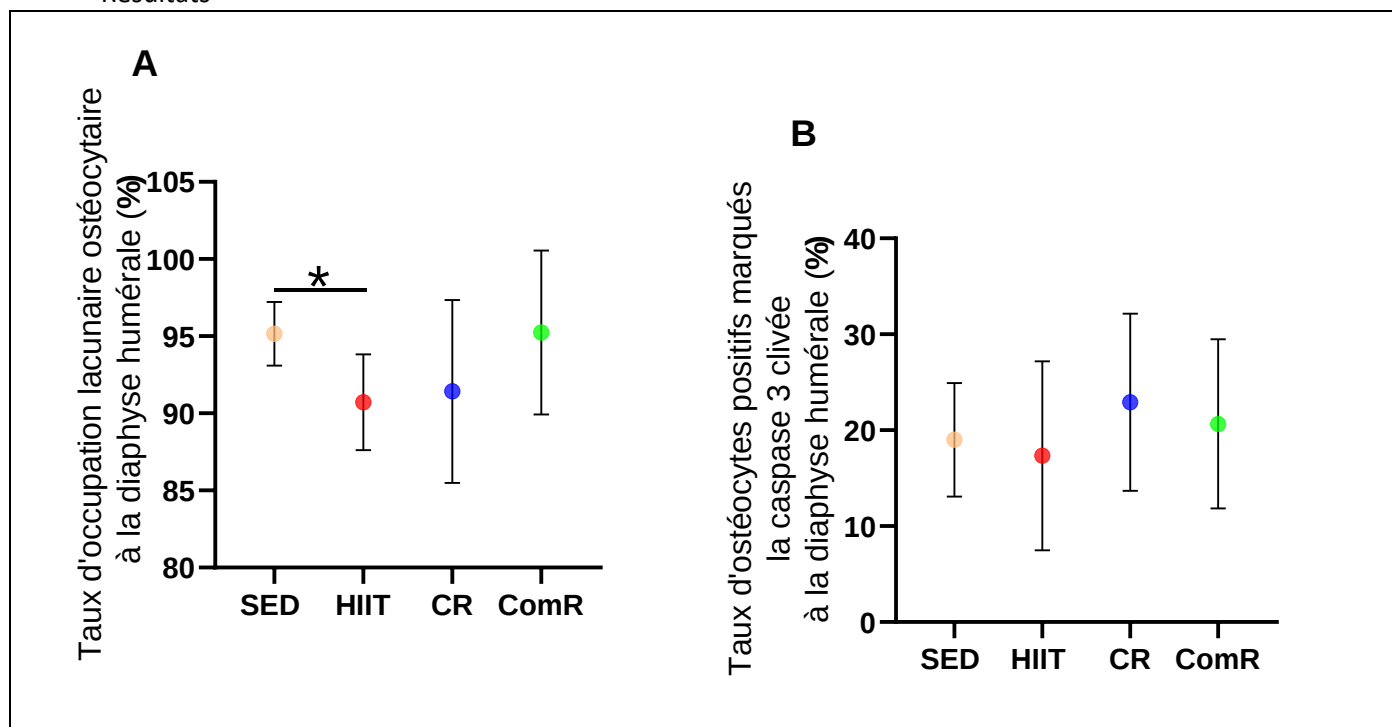


Figure 47: Résultats des analyses histochimiques de l'activité des ostéoclastes marquées à la TRAP. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

2.2. Analyses histologique et immunohistochimique de l'humérus

2.2.1. Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire et apoptose

À l'humérus, le HIIT a induit une diminution du taux d'occupation lacunaire ostéocytaire de 5% par rapport au groupe sédentaire. Les trois modalités de course n'ont pas eu d'impact sur le taux d'apoptose des ostéocytes comparé au groupe sédentaire (Figure 48).



C	Sédentaire	HIIT	Continue	Combinée
Occupation lacunaire ostéocytaire				
Caspase 3 Clivée				

Figure 48: Résultats des analyses immunohistochimiques à la diaphyse humérale. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur $P < 0,05$ (test U-Mann Whitney). **C** : Les images ont été obtenues un microscope optique Leica à un grossissement 20x de 100 μ m par 100 μ m, la barre d'échelle de 25 μ m. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

2.2.1. Activité ostéoclastique

Les modalités de course n'ont pas induit de changement d'activité des ostéoclastes à la fois à l'épiphyse proximale et distale (Figure 49).

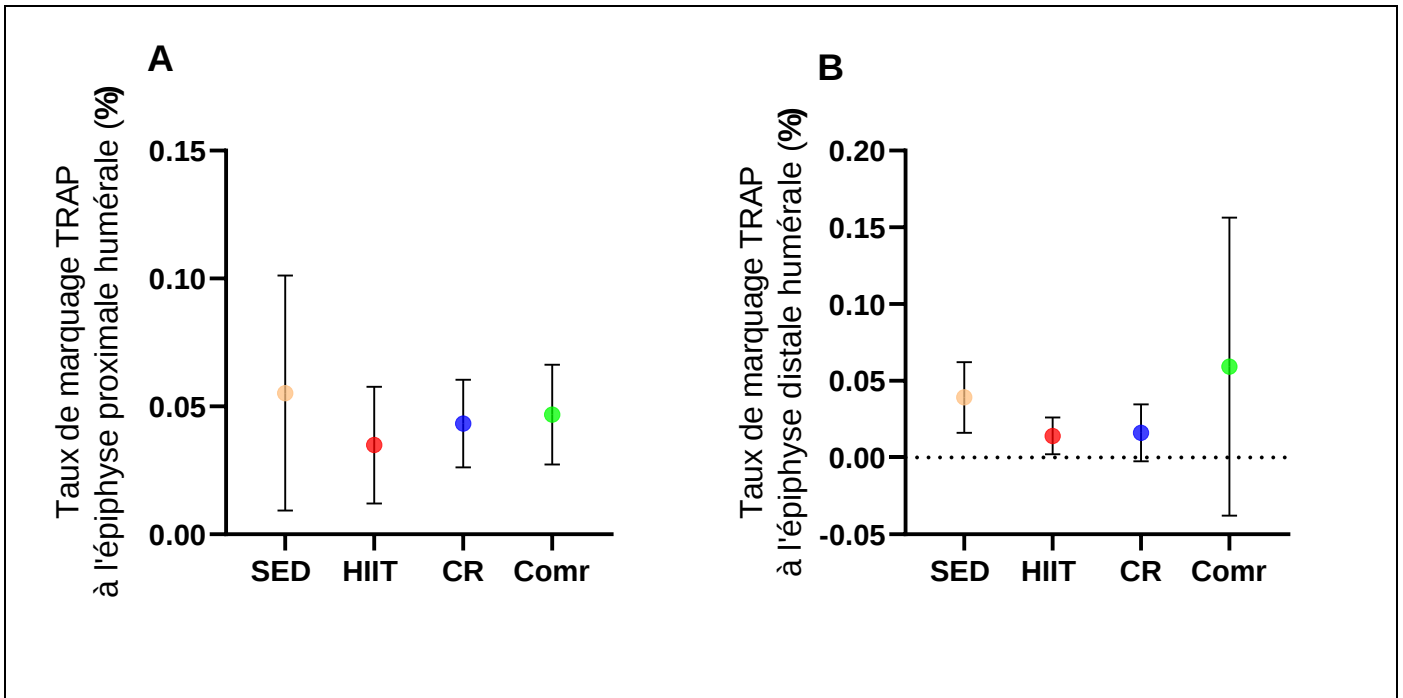


Figure 49: Résultats des analyses histochimiques de l'activité des ostéoclastes marqués à la TRAP. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

III Etude 2 : Comparaison de 2 protocoles d'entraînement au membre inférieur : l'entraînement par intervalles (HIIT) améliore les propriétés tissulaires du tibia, retarde l'apoptose des ostéocytes, active les voies de l'autophagie par rapport à la course modérée continue chez les rats Wistar.

La seconde étude ciblée sur le tibia porte sur la comparaison de la course continue et du HIIT à la fois sur les paramètres macro- et micro- architecturaux de la qualité osseuse, mais aussi sur les effets de ces deux protocoles de course sur le métabolisme ostéocytaire. En effet, l'étude s'est focalisée sur les effets de ces deux modalités sur l'apoptose, l'autophagie ainsi que la mécano-transduction ostéocytaire.

3.1. Analyse morphologique et microarchitecturales de la diaphyse tibiale

Après 8 semaines d'entraînement quotidien sur tapis roulant, les deux protocoles de course ont amélioré la vitesse aérobie maximale de 52% pour le HIIT et de 43% pour la course continue respectivement. Cependant, le HIIT n'a pas amélioré la qualité macroarchitecturale des tibias. La course continue a significativement augmenté le diamètre diaphysaire médio-latéral du tibia de 11 % et le diamètre médial du canal médullaire de 18 % (Figure 50). Cette augmentation n'a pas entraîné de modification de la microarchitecture corticale car les deux modalités de course n'ont pas eu d'effet sur la porosité corticale du tibia (Tableau 7).

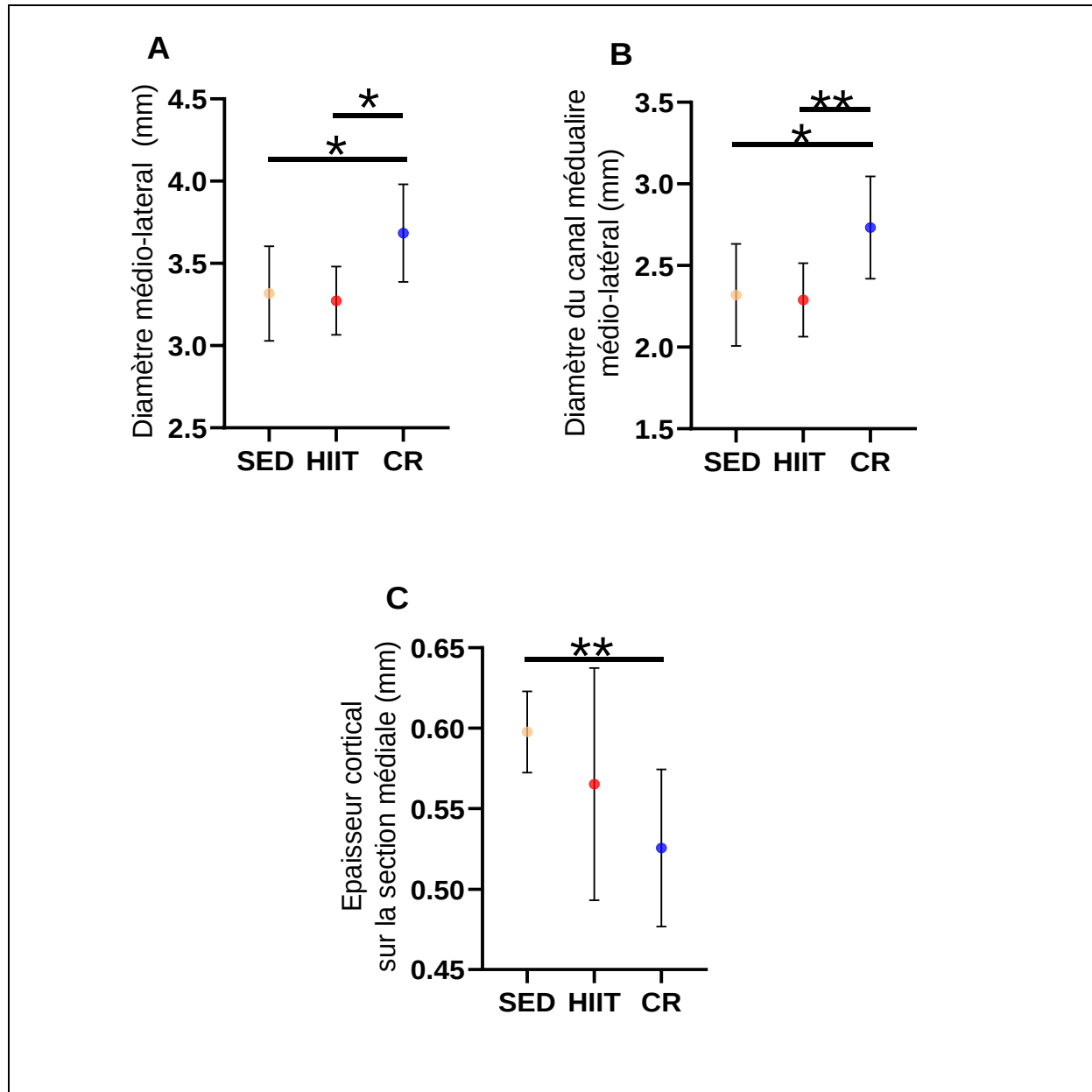


Figure 50: Mesures morphologiques du diamètre et de l'épaisseur du tibia à mi-diaphyse en fonction de la modalité de course. Les mesures ont été effectuées sur des images 3D provenant d'acquisitions de microtomographes à rayons X à une résolution de 4,91µm. Les mesures sont exprimées en moyenne ± SD en mm. * : Valeur P < 0,05, ** : P valeur < 0,01 (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue.

Tableau 7: Porosité corticale tibiale à mi-diaphyse analysée par µCT du tibia en fonction des modalités de courses.

Paramètres de porosité corticale		SED	HIIT	CR
Tibia	Ct.Po (%)	2.63 ± 0.50	3.11 ± 0.79	2.74 ± 0.44
	Po.N (mm ⁻¹)	6.22 ± 0.78	6.01 ± 0.43	5.85 ± 0.80
	Po.Sp (mm)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	Po.Dm (mm)	0.160 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.170 ± 0.03

Résultats

Résultats des mesures de porosité corticale au niveau de la diaphyse moyenne du tibia réalisées par microtomographie à rayons X à 4,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. Ct.Po : Porosité corticale (%) ; Po.N : Nombre de pores (mm^{-1}) ; Po.Sp : Espacement des pores (mm) ; Po.Dm : Diamètre des pores (mm).

3.2. Mesures de la microarchitecture trabéculaire par μCT au niveau du tibia proximal.

Dans l'épiphyse tibiale proximale, la course continue a entraîné une augmentation de 15 % du nombre de trabécules (Tb.N) associée à une diminution de l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) et à une diminution de l'espacement trabéculaire (Tb.Sp) (Figure 51).

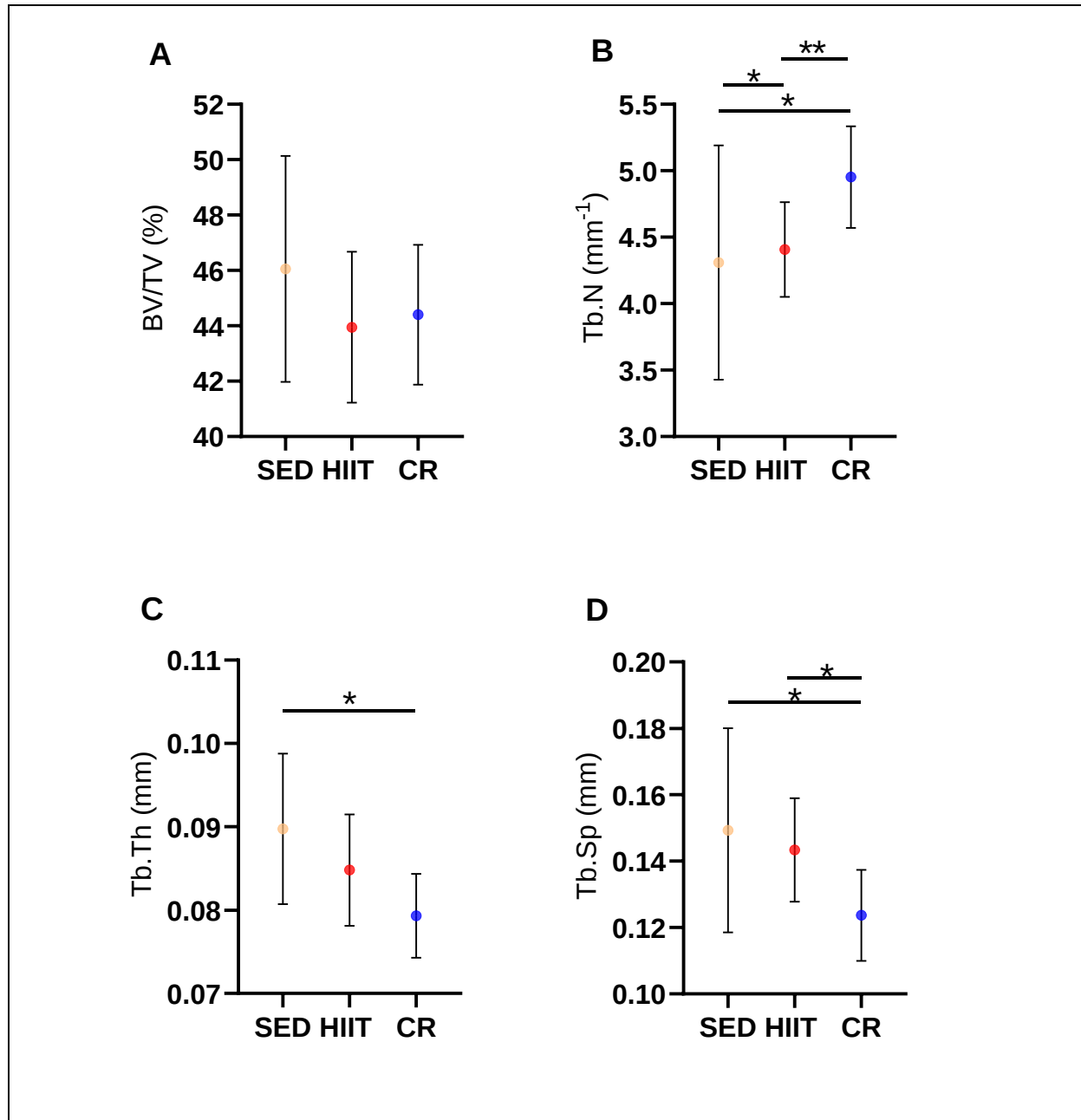


Figure 51: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse proximale du tibia réalisées par microtomographie aux rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD. * : Valeur $P < 0,05$; ** : P valeur $< 0,01$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm^{-1}) ; **C** : Tb.Sp : Séparation trabéculaire (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

3.3. Analyses histologiques et immunohistologiques ostéocytaire à la diaphyse tibiale

L'analyse histologique de coupes de diaphyses tibiales a montré que 8 semaines de HIIT entraînaient une augmentation de la qualité des tissus, le taux d'occupation lacunaire des ostéocytes augmentant significativement de 25 % et l'apoptose des ostéocytes diminuant de 82

Résultats

%. Le HIIT a également amélioré de 60 % le flux autophagique marqué dans les ostéocytes (Figure 52). La course continue a entraîné une diminution du taux d'occupation lacunaire ostéocytaire de 26%. La course continue a également entraîné une diminution du flux autophagique de 59% corrélé significativement à une augmentation de l'apoptose ostéocytaire (Figure 53)

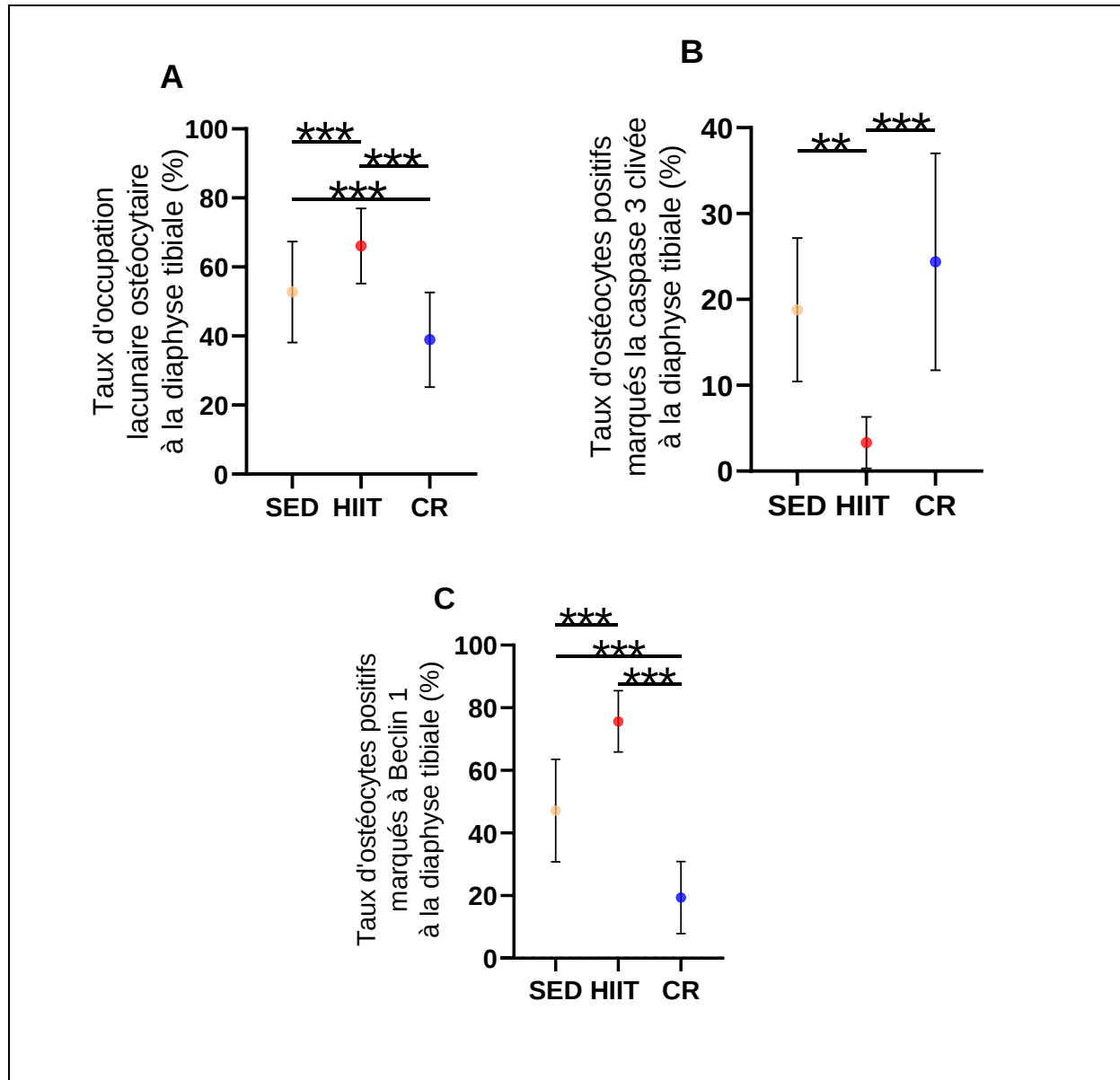


Figure 52: Résultats des analyses immuno-histochimiques à la diaphyse tibiale. **A** : Le taux d'occupation a été déterminé à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline-éosine, **B** : le taux d'ostéocytes apoptotiques a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-caspase 3 clivée de 1/100, et **C** : l'autophagie des ostéocytes a été marquée avec une concentration d'anticorps anti-Beclin 1 de 1/500. Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. ** : Valeur $P < 0,01$; *** : Valeur $P < 0,001$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue ; ComR : groupe de course combinée.

Résultats

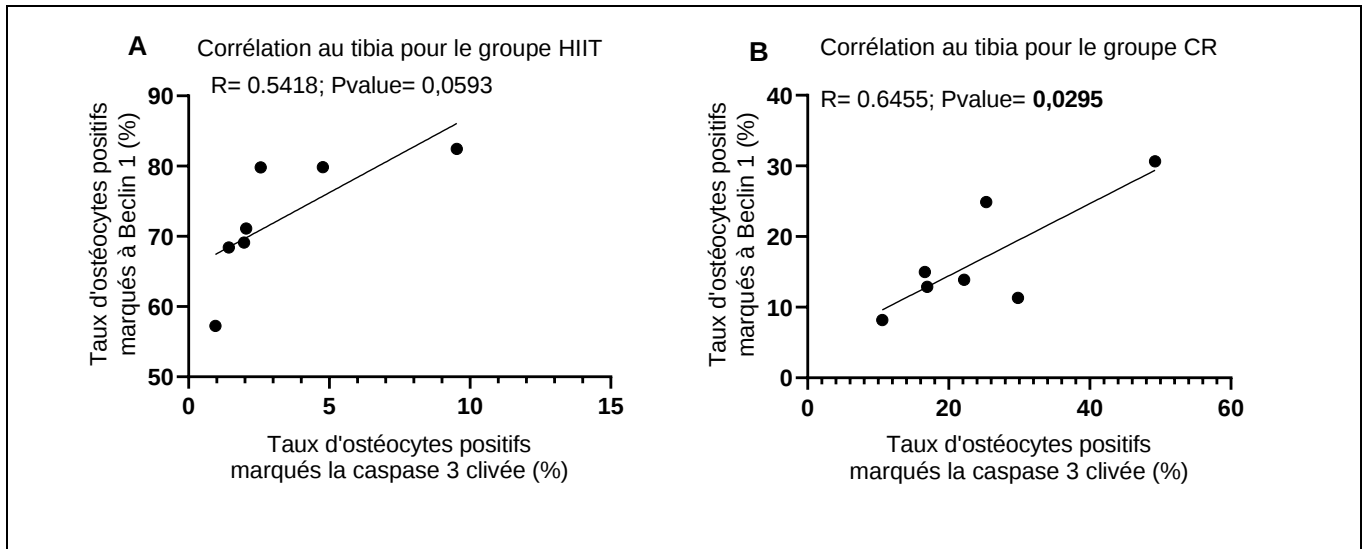


Figure 53: Résultats des tests de corrélation de Spearman entre l'apoptose et l'autophagie des deux groupes de course à la diaphyse tibiale. **A** : Absence de corrélation ; **B** : Corrélation modérée significative. HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue

Nous avons étudié un marqueur tardif de la différenciation des ostéocytes. Le CD44 est impliqué dans les voies de signalisation cellulaire qui régulent la survie, la prolifération, la différenciation et la mécanotransduction des ostéocytes. Le HIIT a entraîné une augmentation de 18 % des ostéocytes CD44-positifs. Les deux modalités de course ont conduit à une réduction du nombre d'ostéocytes positifs à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ de 60% pour le HIIT (significatif) et de 53% pour le CR (non significatif) (Figure 54).

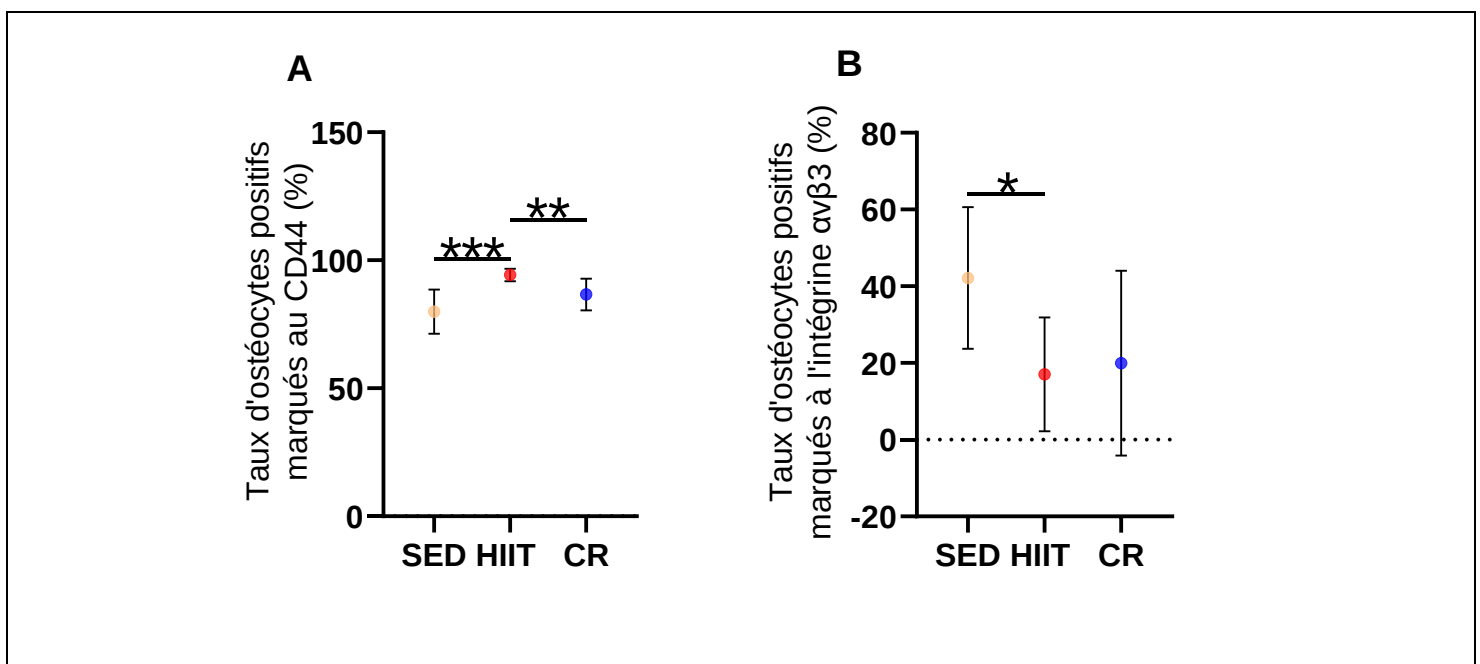


Figure 54: Résultats des analyses immunohistologiques, **A** : le taux d'ostéocytes positifs intégrine $\alpha V\beta 3$ a été marqué avec une concentration d'anticorps anti-Alfa V beta 3 1 1/200 ; **B** : le taux d'ostéocytes positifs CD44 a été

Résultats

marqué avec une concentration d'anticorps anti CD44 1/200, Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD.* : Valeur $P < 0,05$; ** : P valeur $< 0,01$; *** : P valeur $< 0,001$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue.

Pour étudier les effets de ces deux modalités de course sur le remodelage osseux, nous avons analysé l'activité ostéoclastique via l'activité TRAP et l'activité ostoblastique via les fronts de minéralisation. La course continue a entraîné une augmentation drastique de l'activité ostéoclastique TRAP-positive de 571%. Le HIIT a réduit de manière non significative l'activité des ostéoclastes de 30%. La course continue a présenté un nombre de front de minéralisation inférieur à celui du HIIT. Le HIIT a augmenté de 204 % le nombre de fronts de minéralisation (Figure 55).

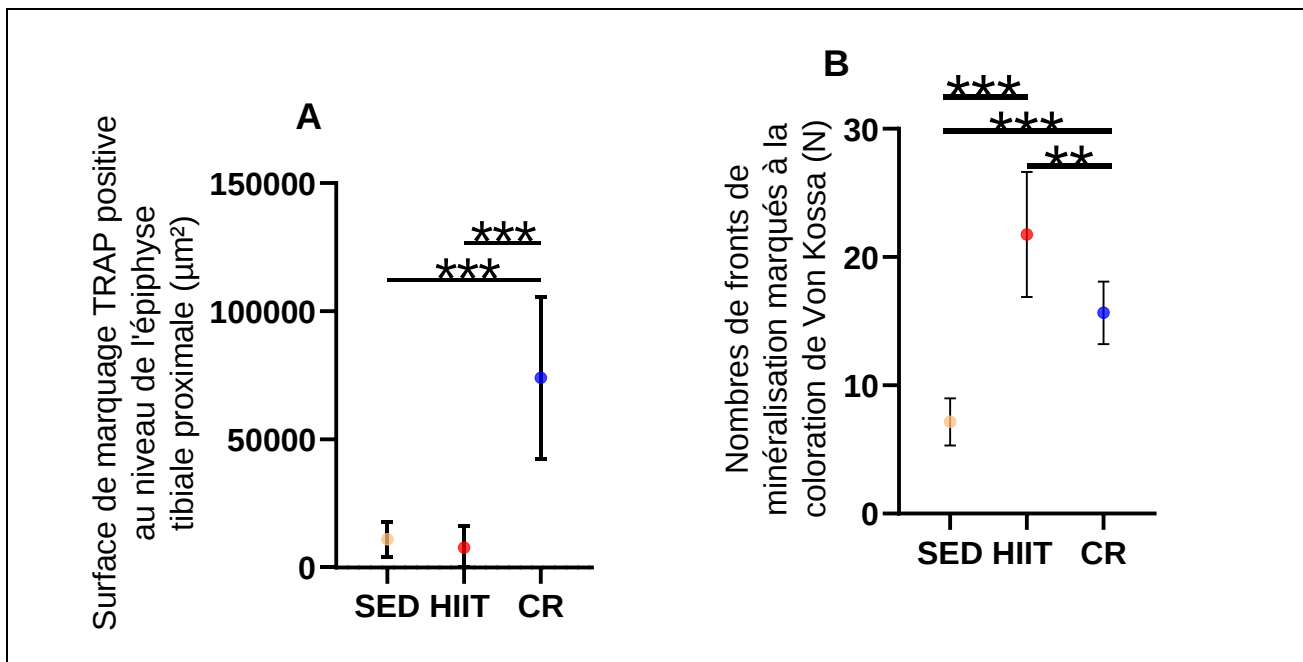


Figure 55: Résultats des analyses histochimiques, Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ SD. ** : P valeur $< 0,01$; *** : P valeur $< 0,001$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe d'entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe de course continue.

IV Résultats supplémentaires

4.1. Analyse de la microarchitecture de la vertèbre L5, la mandibule et la calvaria

Afin de montrer si l'activité physique peut avoir un effet systémique sur la santé du squelette, une analyse de la microarchitecture trabéculaire de la vertèbre L5 (os semi porteur) et de l'os alvéolaire (mandibule) a été réalisée. L'épaisseur de la calvaria (os non porteur) a également été mesurée par micro-tomographie. Aucune différence entre les groupes n'a été trouvée pour les paramètres de microarchitecture trabéculaire BV/TV, Tb.N, Tb.Sp et Tb.Th à la vertèbre L5 (Figure 56) ou à l'os alvéolaire (Figure 57). L'analyse de l'épaisseur de la calvaria mesurée au milieu de l'os pariétal n'a pas montré de différence entre les groupes expérimentaux (Figure 58).

Vertèbre L5

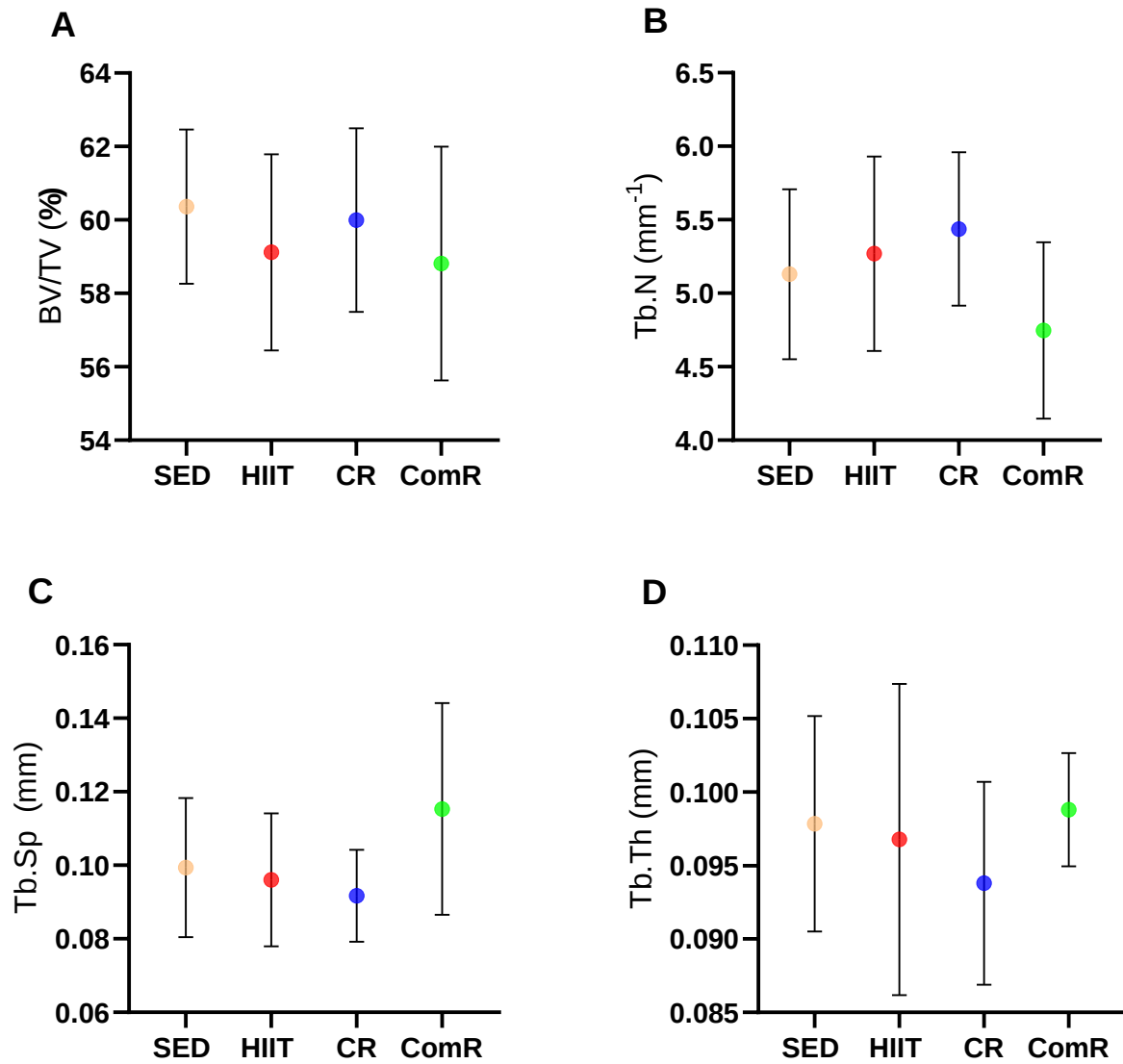


Figure 56: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de la vertèbre L5 réalisées par micro-tomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm⁻¹) ; **C** : Tb.Sp : Séparation trabéculaire (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

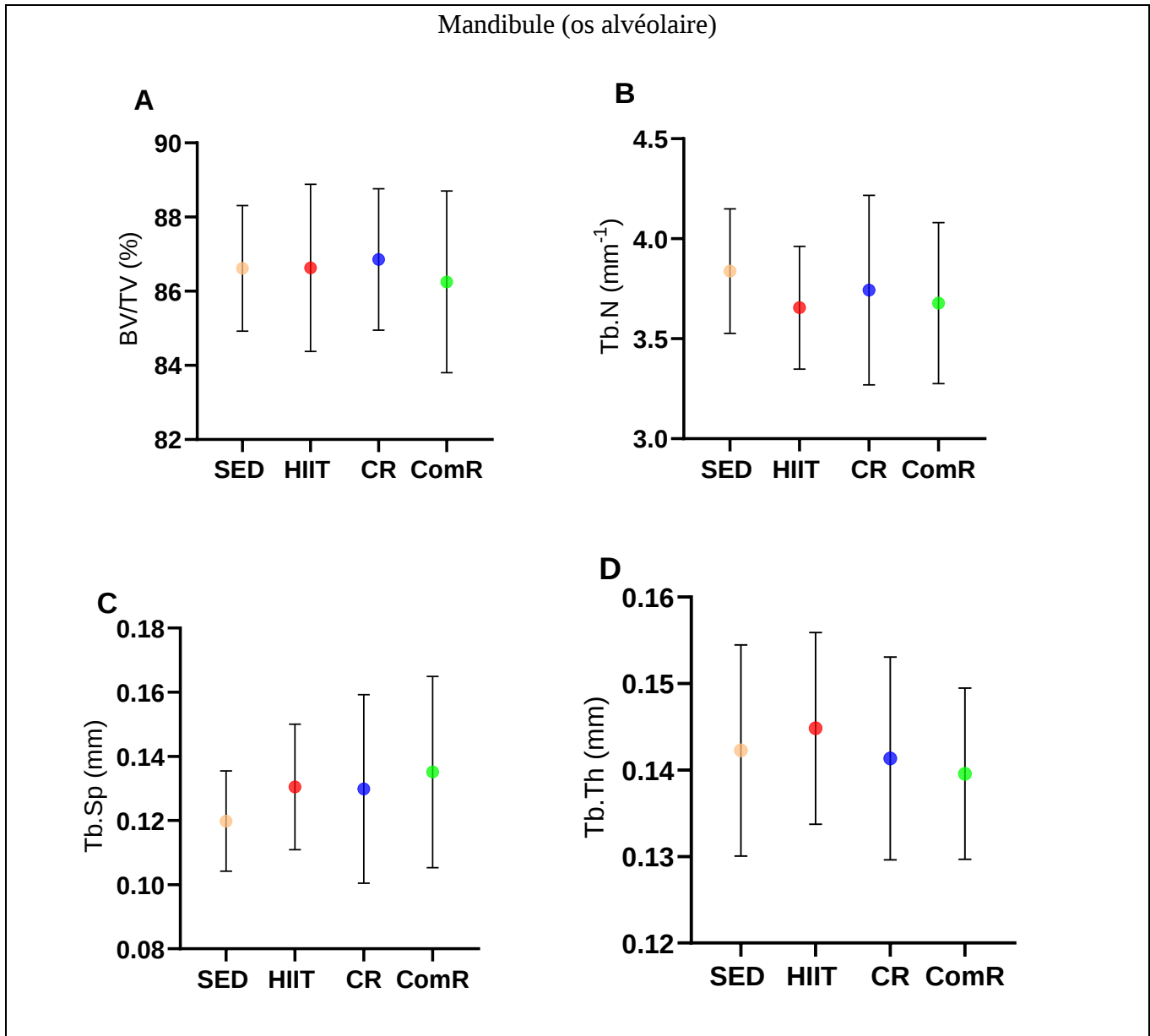


Figure 57: Mesures de la microarchitecture trabéculaire sur l'os alvéolaire de la mandibule gauche réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm⁻¹) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

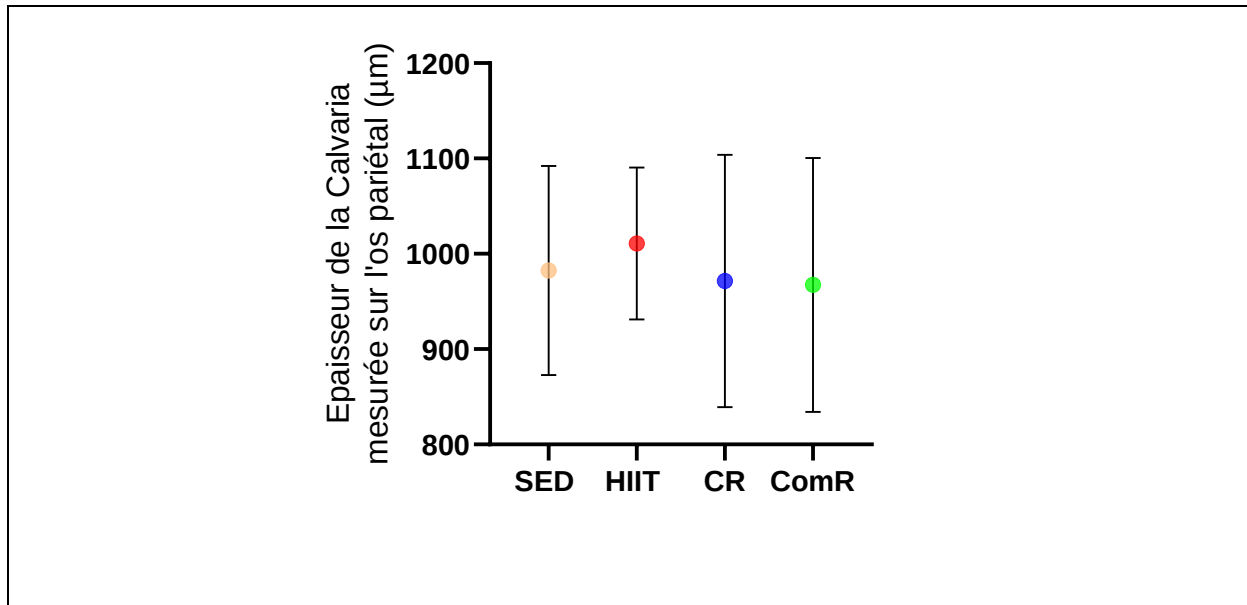


Figure 58: Mesures de l'épaisseur de la calvaria effectuée au milieu de l'os pariétal réalisées à partir des images de microtomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue ; ComR : groupe de course combinée.

4.2. Analyses de la microarchitecture du fémur.

L'analyse de la microarchitecture du fémur a montré que les adaptations majeures de microarchitecture se situent au niveau de l'épiphyse proximale (Figure 59 et Figure 60). Le HIIT a induit une diminution du nombre de travées (Tb.N) avec augmentation de leur épaisseur (Tb.Th) et une augmentation de leur espacement (Tb.Sp) (Figure 60). La course combinée a diminué l'épaisseur des travées à la fois sur l'épiphyse proximale et distale.

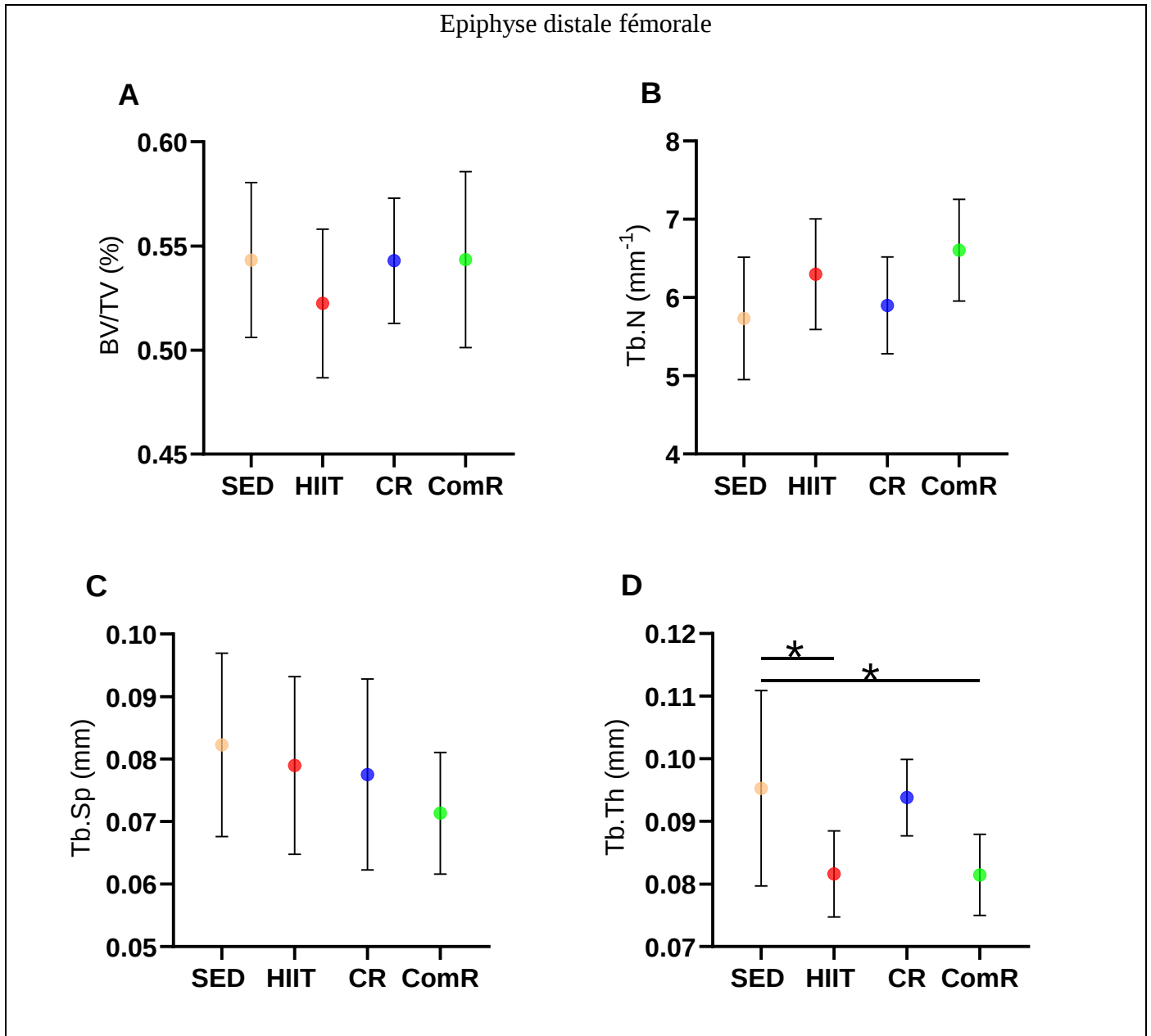


Figure 59: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse distale fémorale réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. *: Valeur $P < 0,05$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm⁻¹) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : épaisseur trabéculaire (mm).

Epiphyse proximale fémorale

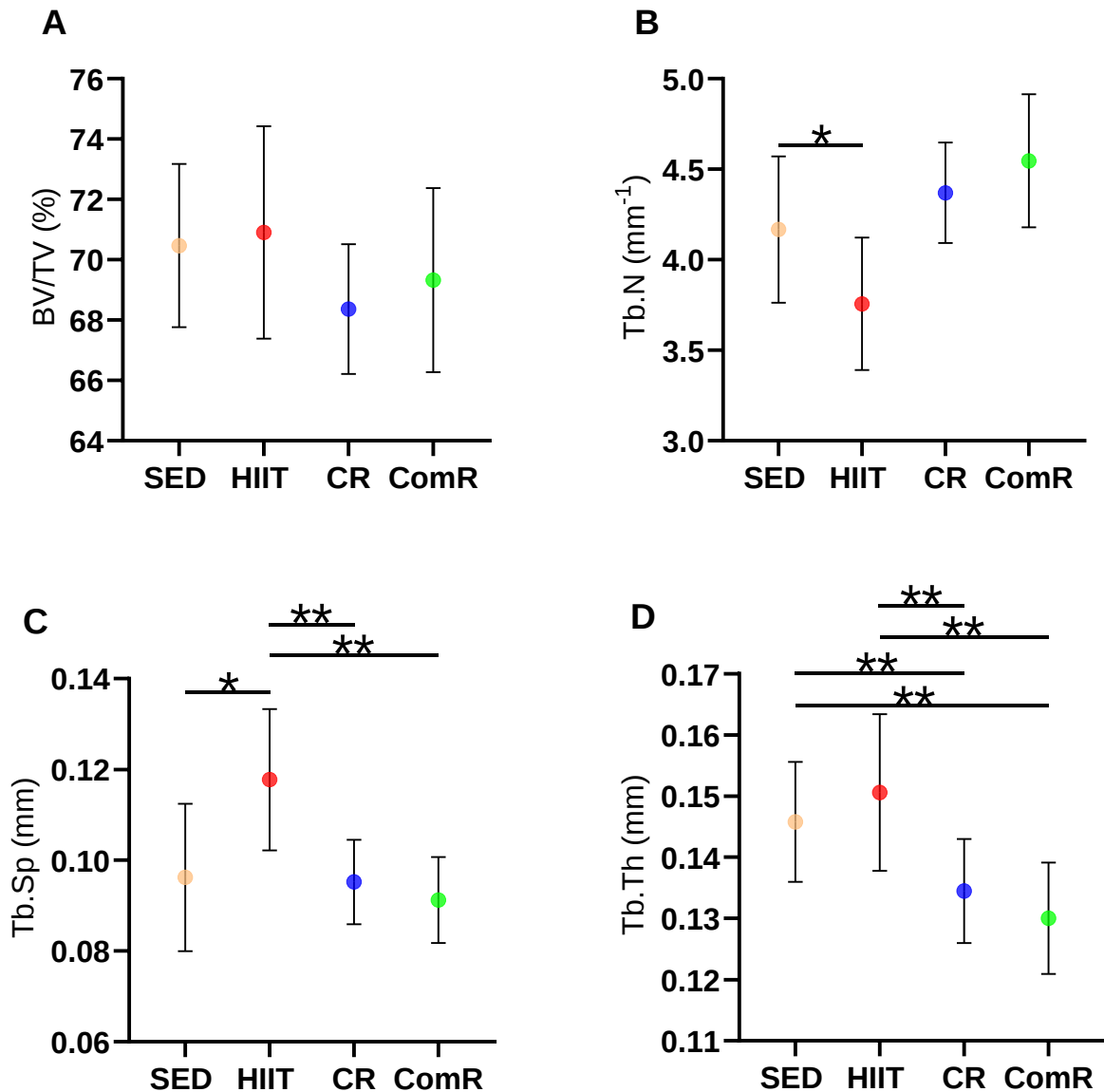


Figure 60: Mesures de la microarchitecture trabéculaire au niveau de l'épiphyse proximale fémorale réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur $P < 0,05$; ** : P valeur $< 0,01$ (test U-Mann Whitney). SED : Groupe sédentaire ; HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. **A** : BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; **B** : Tb.N : Nombre de travées (mm⁻¹) ; **C** : Tb.Sp : espace entre les travées (mm) ; **D** : Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

V Comparaison de la réponse tissulaire des membres antérieurs et postérieurs aux protocoles de courses HIIT et course continue.

Le protocole de course combiné n'ayant pas induit de changement tissulaire significatif, seul les protocoles de course HIIT et continue ont été inclus pour comparer la réponse tissulaire des membres. Les variations des paramètres de microarchitectures des groupes courses continue et HIIT ont été calculées par rapport au groupe sédentaire. Puis des multiples T-test pour ont été calculés pour déterminer si les variations observées étaient significativement différentes entre le tibia et l'ulna et entre l'humérus et le fémur (Figure 61 et Figure 62).

Le tibia présente une augmentation de la fraction volumique osseuse aux deux protocoles de courses, supérieur à l'ulna avec des travées moins nombreuse (Tb.N) qu'a l'ulna mais plus épaisse (Tb.Th) et moins espacé (Tb.Sp). Autrement dit, le tibia présente une amélioration de sa qualité osseuse supérieur à l'ulna (Figure 61).

Seul la fraction volumique osseuse à l'humérus est augmenté par rapport au fémur suite à la course continue (Figure 62).

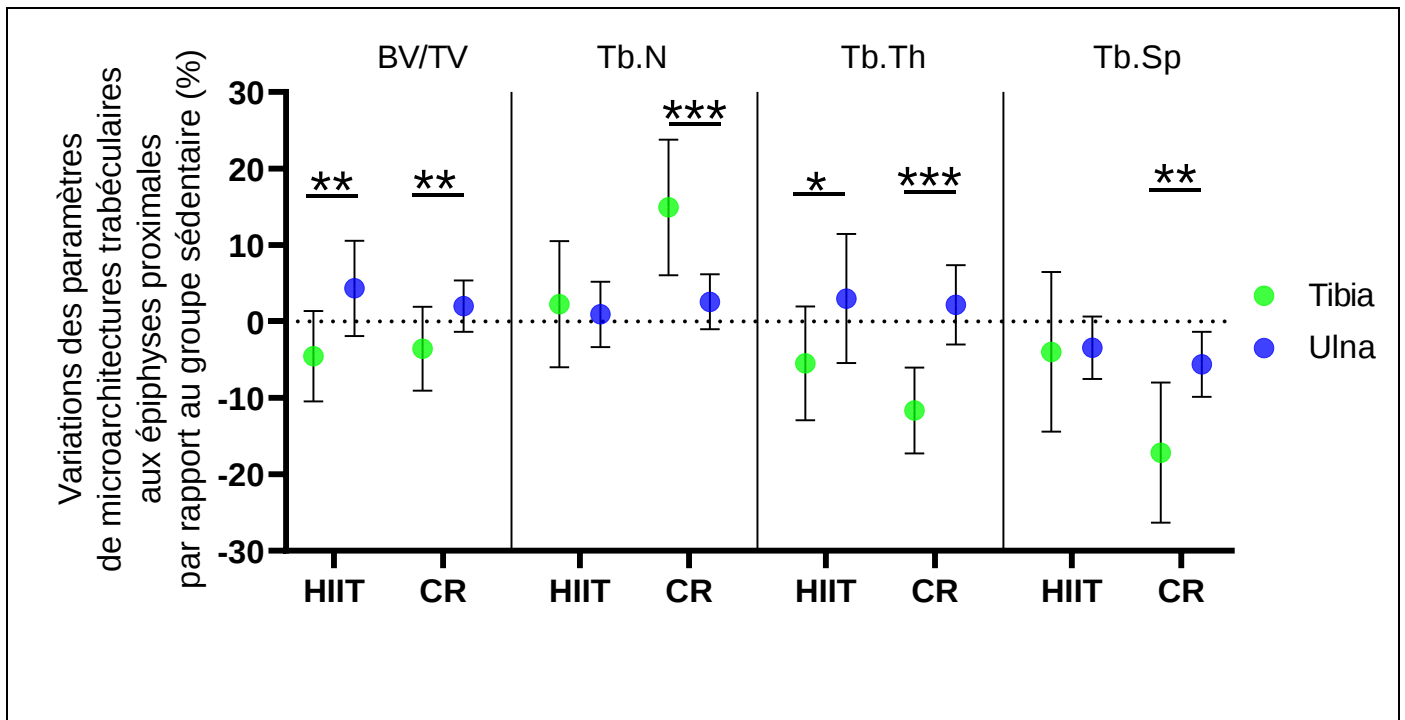


Figure 61: Comparaison des variations de microarchitecture entre le tibia et l'ulna selon les protocoles de courses HIIT et CR. Les mesures de la microarchitecture trabéculaire ont été réalisées au niveau des épiphyses proximales réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 μ m (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures de variations par rapport au groupe sédentaire sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur P < 0,05 ; ** : P valeur < 0,01 ; *** : P valeur < 0,001 (Multiple T-test). HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. BV/TV :

Résultats

Volume osseux/volume tissulaire (%) ; Tb.N : Nombre de travées (mm-1); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

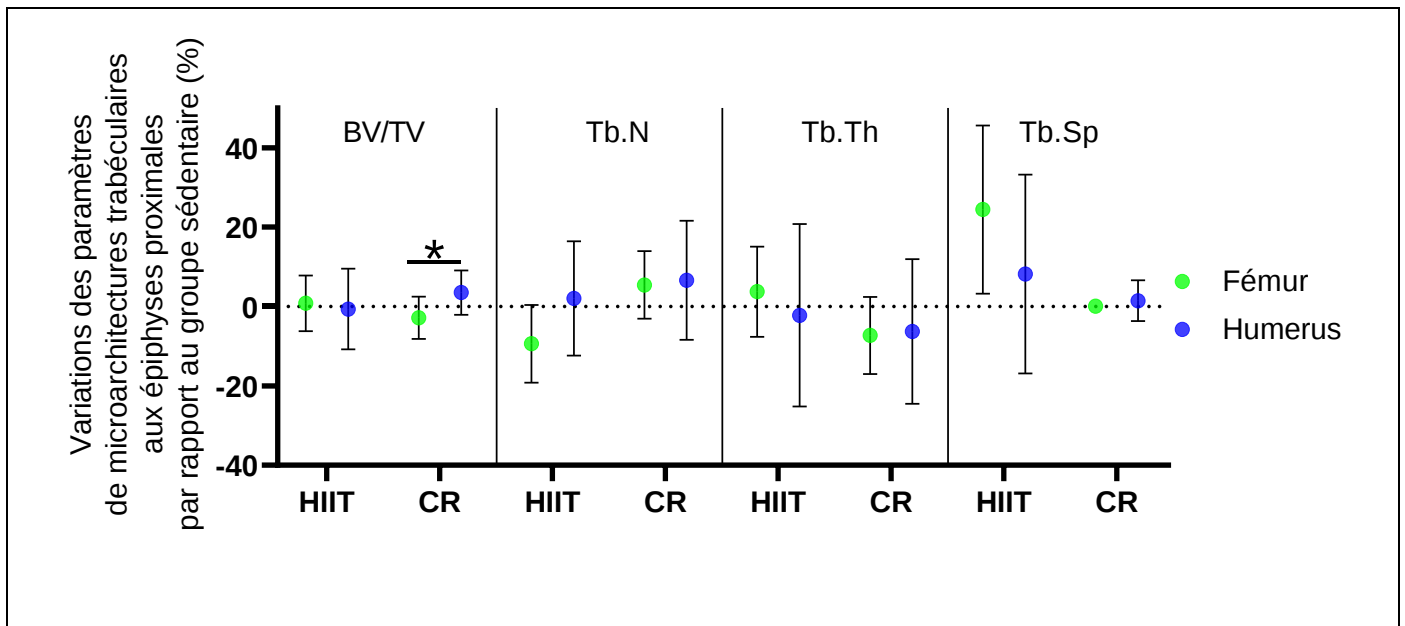


Figure 62: Comparaison des variations de microarchitecture entre le fémur et l'humérus selon les protocoles de courses HIIT et CR. Les mesures de la microarchitecture trabéculaire ont été réalisées au niveau des épiphyses proximales réalisées par microtomographie à rayons X à 9,81 μm (Bruker SkyScan 1176, Kontich, Belgique) et analysées par le logiciel DragonFly (version 2022.2 Build 1399). Les mesures de variation par rapport au groupe sédentaire sont exprimées en moyenne $\pm$ l'écart type. * : Valeur $P < 0,05$ (Multiple T-test). HIIT : groupe entraînement par intervalles à haute intensité ; CR : groupe course continue. BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%) ; Tb.N : Nombre de travées (mm-1); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

VI Synthèses des résultats.

La synthèse de l'ensemble des résultats des analyses de morphométrie, de microarchitecture trabéculaire et corticale sont présentée dans le [Tableau 8](#). Le [Tableau 9](#) présente l'ensemble des résultats significatifs des analyses histologiques.

Résultats

Tableau 8 : Présentation des paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale, de morphologie significativement différent du groupe sédentaire selon la pièce osseuse considérée. -↗ : augmentation significative par rapport au groupe sédentaire ; ↘ : diminution significative par rapport au groupe sédentaire, p-value<0,05. (test Mann-Whitney). Ct.Po : Porosité corticale (%) ; Po.N : Nombre de pores (mm⁻¹) ; Po.Sp :Espace des pores (mm) ; Po.Dm : Diamètre des pores (mm).; Ct.Ar/Tt.Ar: fraction de l'air corticale; SB.Th: Epaisseur de l'os sous chondrale; BV/TV : Volume osseux/volume tissulaire (%); Tb.N : Nombre de travées (mm⁻¹); Tb.Sp : espace entre les travées (mm); Tb.Th : Épaisseur trabéculaire (mm).

	HIIT	Continue	Combinée
Ulna	-↗ Ct.Po -↗ Po.N -↘ Po.Dm -↗ diameter médio-latéral -↗ Ct.Ar/Tt.Ar -↘ BV/TV (épiphyse distale) -↗ SB.Th	-↗ diamètre médio-latéral -↗ Po.N -↘ Po.Dm -↘ BV/TV (épiphyse distale) -↗ SB.Th	-↗ diamètre médio-latéral
Radius	-↗ Ct.Ar/Tt.Ar -↘ BV/TV (épiphyse distale) -↗ SB.Th	-↘ BV/TV (épiphyse distale) -↗ SB.Th	-↗ SB.Th
Humérus	-↗ Po.N	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire
Tibia	-↗ Tb.N	-↗ diameter médio-latéral -↗ Tb.N -↘ Tb.Th -↘ Tb.Sp	Non évalué
Fémur	-↘ Tb.N -↗ Tb.Sp (épiphyse proximale) -↘ Tb.Th (épiphyse distale)	-↘ Tb.Th (épiphyse proximale)	-↘ Tb.Th (épiphyse proximale) -↘ Tb.Th (épiphyse distale)
Vertèbre L5	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire
Calvaria	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire

Résultats

Tableau 9: Présentation des résultats des analyses histologique, immunohistologique et histochimique significativement différent du groupe sédentaire selon la pièce osseuse considéré. Les analyses ont été réalisé à mi diaphyse de chaque os. ↗ : augmentation significative par rapport au groupe sédentaire ; ↘ : diminution significative par rapport au groupe sédentaire, p-value<0,05. (test Mann-Withney).

	HIIT	Continue	Combinée
Taux d'occupation lacunaire ostéocytaire	-↘ à l'humérus -↗ au tibia	-↘ au tibia	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire
Apoptose marqué à la caspase 3 clivée	-↘ au tibia	-↗ au tibia -↗ à l'ulna	-↗ à l'ulna
Autophagie marqué à Béclin1	-↗ au tibia	-↘ au tibia -↘ à l'ulna	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire
Mécanotransduction marqué à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	-↘ au tibia -↘ à l'ulna	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire
Différenciation des ostéocytes marqué au CD44	-↗ au tibia -↗ à l'ulna	-↗ à l'ulna	-↗ à l'ulna
Activité des Ostéoclastes TRAPS positifs		-↗ au tibia	Absence de résultats significativement différents du groupe sédentaire

. Discussions

I Les membres antérieurs

Le premier objectif de la thèse était de comparer les effets de trois modalités de course sur tapis roulant sur les os des membres antérieurs dans un modèle de rat Wistar mâle. Jusqu'à présent, les études réalisées sur les membres antérieurs dans la littérature ont proposé des modèles d'exercice de résistance en termes de force (traction sur un levier de force) [251,252], de contraintes (compression de l'avant-bras) [253] ou de course continue [239,254]. L'analyse de la cinématique de course par notre laboratoire montre que la fonction des membres antérieurs est d'amortir l'impact lors de la course, ce qui entraîne une augmentation des contraintes sur l'ulna et le radius. Nos résultats ont montré qu'il n'y avait peu d'amélioration de la qualité de la microarchitecture des membres antérieurs à la contrainte mécanique que représentent les protocoles de course. Chez les rongeurs, il semble qu'il n'y ait pas de changements de la qualité des os des membres antérieurs, en particulier dans la microarchitecture trabéculaire. En outre, ces membres servent aussi à la préhension et à la manipulation d'objets (nourriture). Par ailleurs, chez les oiseaux, bien que les membres antérieurs soient soumis à d'énormes contraintes pendant le vol, la microarchitecture trabéculaire de leur squelette s'est aussi adaptée pour conserver une structure légère et présente une fraction volumique inférieure à celle des animaux terrestres [255].

Cependant, nos mesures morphologiques des os des membres antérieurs ont révélé une augmentation du diamètre médio-latéral de l'ulna chez les rats soumis au HIIT et à la course continue. Le diamètre interne du canal médullaire dans l'axe médio-latéral a également augmenté à la fois dans l'ulna et l'humérus du groupe de course combinée par rapport aux groupes sédentaire et HIIT. L'augmentation du diamètre osseux au niveau de la diaphyse est probablement une réponse tissulaire aux contraintes mécaniques associées à l'exercice, augmentant la résistance de l'os à la flexion et à la torsion [256]. Ce phénomène a été calculé à l'ulna par Kumar *et al.*, en 2012 [257]. Leur modèle mathématique de compression de l'ulna a montré des irrégularités locales de croissance du canal intramédullaire en réponse à la charge mécanique. Les résultats morphométriques ont été couplés à une analyse par micro-tomographie à rayons X. La course combinée a augmenté la surface de la cavité médullaire interne (Ma.Ar) dans l'ulna le radius et l'humérus, par rapport aux résultats des groupes sédentaire et HIIT. Au niveau de l'ulna et du radius, ces résultats se traduisent par une diminution de la fraction moyenne de la surface corticale (Ct.Ar/Tt.Ar) dans le groupe course combinée par rapport au groupe HIIT. La course combinée augmente donc le diamètre du radius et de l'ulna, tout en

réduisant la surface corticale. Cette adaptation est décrite dans la littérature lors de la croissance osseuse, lorsque la résorption endocorticale entraîne une expansion de la cavité médullaire et compense en partie l'augmentation de la surface corticale due à l'apposition périostée [256]. Le résultat est consécutif à une augmentation du diamètre de l'os cortical, ce qui se traduit par une augmentation de sa résistance à la flexion [256].

L'analyse spécifique de région d'intérêt de la microarchitecture trabéculaire a révélé une différence entre les groupes de course, uniquement au niveau de l'ulna distal. Plus précisément, le groupe de course combinée a présenté une adaptation osseuse positive avec la valeur la plus élevée de Tb.Th. D'un point de vue biomécanique, l'ulna semble être l'os le plus sollicité, car il transmet la force motrice par l'insertion du muscle triceps brachial.

Les résultats ont révélé des différences significatives dans la porosité corticale au niveau de l'ulna. **Le groupe HIIT présentait une plus grande porosité corticale comparé au groupe sédentaire et au groupe course combinée.** Bien que la littérature sur les effets de l'exercice sur la santé osseuse soit largement développée, l'impact réel de la course par intervalles sur le tissu osseux n'est pas encore totalement compris [258]. A cet égard, dans des modèles murins mâles, la réponse du tissu osseux à la course de haute intensité, qu'elle soit effectuée en continu ou par intervalles, semble augmenter la fraction d'os cortical au détriment de la résistance mécanique [259,260]. Ces deux études ont également montré que la réponse du tissu osseux dépendait aussi des sites où les mesures étaient effectuées et du dimorphisme sexuel. Les tibias des souris mâles présentaient les effets les plus importants [259,260].

Les analyses par micro-tomographie ont également permis de mettre en évidence que les trois protocoles de course ont conduit à un épaissement de l'os sous-chondral au niveau de l'épiphyse distale du radius et de l'ulna. D'après ces résultats, les entraînements par intervalles ou continus pourraient éventuellement avoir des effets délétères sur *l'articulatio radiocarpalis* et *l'articulatio ulnocarpalis*. Ceci est en accord avec la littérature sur l'arthrose, dans laquelle la course par intervalles à haute intensité utilisée de façon préventive, induit un épaissement de l'os sous-chondral au niveau du plateau tibial chez un modèle de rat [261].

Les analyses immunohistochimiques ont montré au niveau de l'ulna que la course continue avait un effet délétère sur les ostéocytes puisque le taux d'ostéocytes marqués à la caspase 3 clivée avait augmenté et le taux d'ostéocytes positifs à Bcl-2 diminuait. Autrement dit, la course continue augmente l'apoptose ostéocytaire et diminue les processus de recyclage par

autophagie. Cependant, ces résultats n'étaient pas associés à une augmentation de l'activité des ostéoclastes. CD44 est un marqueur de la différenciation des ostéocytes, qui est davantage exprimé dans ces cellules que dans les ostéoblastes. CD44 est également impliqué dans les réponses adaptatives des ostéocytes au stress mécanique. Tous les groupes de course présentent une augmentation de l'expression du CD44 comparé au groupe sédentaire. L'exercice physique favorise d'une part la multiplication et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers le stade ostéocyte, et d'autre part, favorise la croissance et le maintien de l'homéostasie ostéocytaire [245]. Ces résultats montrent donc que la course accélère la différenciation et la maturation des ostéocytes. Une des hypothèses émise dans cette thèse était que les protocoles de course, et plus particulièrement le HIIT augmenterait l'expression des intégrines, mais le marquage avec un anticorps anti- $\alpha V\beta 3$ a montré une diminution de l'expression de cette intégrine dans toutes les modalités de course à l'ulna. Les intégrines $\alpha V\beta 5$, et la sous-unité $\beta 1$ n'ont pas été évaluées quant à leurs expressions respectives.

Finalement, la course combinée qui devait refléter plus fidèlement les méthodes d'entraînement n'a pas apporté les résultats escomptés. Une des pistes pour expliquer cet échec est que les rats étant des animaux routiniers, ils ne se sont pas pleinement familiarisés avec cet entraînement variant un jour sur deux. Les membres supérieurs ne sont finalement pas les os qui présentent le plus d'adaptation osseuse suite à la course sur tapis roulant. En conséquence, la seconde étude de cette thèse a porté sur les effets des deux modalités de course que sont le HIIT et la course continue sur le tibia.

II Les membres postérieurs

Les mesures morphologiques sur le tibia ont montré que 8 semaines d'entraînement HIIT ou de course continue n'ont pas induit de changement dans le taux de croissance osseuse. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature [262,263]. Seul **le groupe course continue a montré une augmentation du diamètre médio-latéral au niveau de la diaphyse tibiale. Cette augmentation du diamètre externe s'accompagne d'une augmentation du diamètre interne du canal médullaire associée à un amincissement de l'épaisseur corticale.** Les mesures de densité ont montré une diminution de la densité minérale osseuse corticale. Tous ces résultats suggèrent que la course continue entraîne une diminution de la résistance mécanique du tibia, bien que cette hypothèse n'ait pas pu être étayée par des tests de flexion trois points. **Les résultats de la microarchitecture trabéculaire de la course continue ont**

montré une augmentation du nombre de travées osseuses associée à des trabécules plus fines et moins espacées, ce qui tendrait vers une porosité trabéculaire exacerbée. Les résultats de l'analyse immunohistochimique ont montré que le groupe CR présentait un taux d'occupation lacunaire ostéocytaire inférieur à celui du groupe témoin et était associé à une légère augmentation de l'apoptose. La réduction du nombre d'ostéocytes est probablement associée à une plus grande activité des ostéoclastes TRAP-positifs et à une plus faible activité des ostéoblastes (front de minéralisation). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la course continue a des effets délétères sur l'ensemble du tibia. La course continue se distingue du HIIT par l'absence de période de repos à intensité constante. Il semblerait donc que la CR induise un stress de surmenage (fatigue mécanique) car cet entraînement n'inclut pas de temps de récupération et soumet le tibia à des charges répétitives [264]. Bien que l'intensité de la course continue soit inférieure à la résistance mécanique du tibia, la charge répétitive appliquée peut conduire à la rupture [265].

Le protocole de course HIIT n'a pas induit de changements morphologiques notables, ni d'amélioration des paramètres de microarchitecture trabéculaire et corticale. Cependant, l'analyse histologique a montré que le HIIT augmentait le taux d'occupation lacunaire des ostéocytes et réduisait l'apoptose des ostéocytes. Le HIIT a également augmenté le taux d'ostéocytes marqués à la Beclin 1, ce qui suggère que le HIIT augmente le flux autophagique. Ce résultat a été rapporté dans une étude sur des modèles murins de diabète de type 2 où huit semaines de HIIT ont activé l'autophagie pour améliorer la formation osseuse [39]. Un des aspects novateurs de cette thèse est que nous avons présenté les effets de deux protocoles de course appliqués chez des rats sains, sur l'autophagie des ostéocytes. L'expression et la fonction du CD44 peuvent être modulées par l'activité physique, ce qui permet aux ostéocytes de mieux répondre et de s'adapter aux changements de charge mécanique [62,266]. Le HIIT induit une augmentation du taux d'ostéocytes CD44-positifs, ce qui suggère que le HIIT accélère la différenciation et la maturation des ostéocytes en réponse au stress mécanique. Une des hypothèses émise dans cette thèse était que les protocoles de course et plus particulièrement le HIIT augmenterait l'expression des intégrines, mais le marquage avec un anticorps anti- $\alpha V\beta 3$ a montré une diminution de l'expression de cette intégrine dans les deux modalités de course. Cependant, nous avons montré que le HIIT diminuait l'apoptose des ostéocytes, et que la mécano-transduction induite par l'intégrine diminuait l'apoptose via l'activation de ERK [236].

Une des hypothèses que nous avons avancées pour expliquer ce résultat contradictoire est que le HIIT, par l'intensité élevée du stress mécanique, pourrait induire une désensibilisation des de

l'intégrine $\alpha V\beta 3$ exprimée par les ostéocytes [267] et qu'une boucle de rétroaction négative inactiverait les intégrines et en particulier celle-ci [268,269]. L'ensemble de ces résultats et le marquage des ostéoclastes TRAP-positifs et des **fronts de minéralisation montrent clairement que le HIIT induit une maturation accélérée des ostéocytes et conduit à une formation osseuse supérieure**. Cependant, bien que le HIIT a des effets bénéfiques au niveau cellulaire, ces résultats ne se reflètent pas au niveau tissulaire (microarchitecture), ce qui pourrait suggérer que la durée du protocole de course n'est pas assez longue.

Les analyses de microarchitectures sur le fémur ont montré que les adaptations osseuses à l'exercice chez le rat se situe principalement à l'épiphyse proximale. L'analyse de la cinématique de course du rat réalisée en amont de la thèse par le laboratoire montre que le fémur est majoritairement à l'horizontale. L'hypothèse pour expliquer ces résultats serait que le col fémoral absorbe davantage de contraintes dûes à la masse du corps, que l'épiphyse distale.

La comparaison des deux protocoles de course montre que le tissu osseux répond à une contrainte mécanique non constante mais oscillante ou intermittente, ce qui tend à valider les lois de Turner, qui définissent l'adaptation osseuse aux stimuli mécaniques comme suit : « 1) l'adaptation osseuse est déterminée par une charge dynamique plutôt que statique. 2) seule une courte durée de mise en charge mécanique est nécessaire pour déclencher une réponse adaptative. L'allongement de la durée de la charge a un effet décroissant sur la poursuite de l'adaptation osseuse. 3) les cellules osseuses s'adaptent à un environnement de charge mécanique habituel, ce qui les rend moins réactives aux signaux de charge habituels » [196]. Cette thèse soulève des questions sur la capacité des ostéocytes à répondre au stress mécanique du protocole HIIT, mais il est clair que ce protocole d'entraînement est celui qui améliore radicalement la qualité du tissu osseux.

III Les os non porteurs

Les analyses de microarchitecture sur la vertèbre L5, la mandibule, et la calvaria avaient pour objectif de déterminer si la course, et notamment les impacts qu'elle génère, induisait des changements de qualité osseuse. Nous pensions que les vertèbres zones charnières entre les membres antérieurs et les membres postérieurs qui sont sollicitées par la marche présenteraient des adaptations micro-architecturales. Les résultats ont montré que l'exercice physique n'a pas d'effets sur l'entièreté du squelette mais uniquement sur les zones soumises aux impacts. Bott

et al., en 2015 [207] ont montré que la course en endurance n'induisait pas de changements sur les vertèbres, mais induisait à la mandibule une diminution de la fraction volumique osseuse associée à une augmentation du nombre de travées et une diminution de l'épaisseur des travées. Ces résultats étaient induits par une diminution de la prise alimentaire. La diminution de la prise alimentaire pourrait être expliquée par la diminution du stress des animaux soumis au protocoles de course associée à une libération d'endorphines.

IV Perspectives

Cette thèse clôture un cycle de recherche sur les effets de la course sur le tissu osseux et l'utilisation du rat comme modèle de course. Elle ouvre de nombreuses perspectives afin de comprendre davantage le rôle de l'ostéocyte dans les mécanismes de perceptions et de régulation du tissu osseux lors de la contrainte. Des travaux futurs devraient être consacrés à l'étude de l'impact de l'activité physique sur l'autophagie ostéocytaire et sur les interactions entre la mécano-transduction des contraintes et le maintien de l'homéostasie par les processus d'autophagie puis d'apoptose ostéocytaires. Une des approches sera l'implémentation intra-osseuse de capteur de pression mécanique pour mesurer réellement les contraintes perçues par les ostéocytes et la transformation de ces contraintes en adaptation osseuse.

La course continue et la course par intervalles sont des modèles stéréotypés qui ne représentent pas la réalité des méthodes d'entraînement ou de rééducations que ce soit chez les animaux (cheval, chien...) ou chez l'homme. Ces deux modèles ont prouvé leurs avantages et leurs limites car selon l'intensité du protocole et le site des mesures, les résultats divergent. La course combinée étudiée dans cette thèse qui devait suppléer à ce problème n'a pas apporté les résultats escomptés. Une des explications serait que les rats sont des animaux routiniers et que les changements quotidiens de protocole n'ont pas permis d'obtenir la pleine capacité des rats. Également, une des limites est que l'intensité des protocoles de course est définie après le cycle d'apprentissage du protocole de course et n'est pas réévaluée et ajustée en milieu de protocole pour des raisons pratiques évidentes. Finalement, pour obtenir des résultats plus concrets, il serait opportun de réaliser des protocoles de course sur plusieurs mois avec des sessions d'évaluation de la VO_{2max} puis d'ajustement du protocole. Cet entraînement serait à l'image des athlètes qui s'entraînent pour une compétition, puis sont évalués par la compétition et ajustent leurs entraînements après la compétition pour suppléer leurs lacunes et préparer la prochaine

Discussions

compétition. Il en va de même pour la rééducation ou un protocole n'est pas figé mais est régulièrement évalué et ajusté en fonction des progrès.

Pour conclure, à trop haute intensité, l'activité physique est néfaste.

"Le sport ne fait pas vivre plus vieux, mais fait vivre plus jeune."

. Conclusion

Cette thèse montre que la course modérée continue, la course par intervalles et la course combinée ont entraîné des adaptations osseuses sur les membres antérieurs et postérieurs. Les adaptations osseuses sur les membres antérieurs, sont essentiellement localisées sur les épiphyses distales du radius et de l'ulna, c'est-à-dire à proximité du point d'impact, ce qui conforte la loi de Wolff. La course continue qui était la modalité la plus utilisée dans la littérature, mais également celle avec le plus d'effet contradictoire a induit une détérioration de la qualité osseuse tant au niveau microarchitectural que cellulaire. Le HIIT est la modalité de course qui induit le plus d'adaptations osseuses avec une augmentation de la surface corticale au niveau de l'ulna et du tibia. Le HIIT a aussi augmenté le taux d'occupation lacunaire ostéocytaire en réduisant l'apoptose et en activant l'autophagie.

. Bibliographie

- 1 Wolff J. The Law of Bone Remodelling. *The Law of Bone Remodelling*. Published Online First: 1986. doi: 10.1007/978-3-642-71031-5
- 2 Kanis JA, Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1994;4:368–81. doi: 10.1007/BF01622200
- 3 Shiga K, Hara H, Okano G, *et al*. Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *The Journal of nutrition*. 2003;133:4207–11. doi: 10.1093/JN/133.12.4207
- 4 Seeman E, Delmas PD. Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *New England Journal of Medicine*. 2006;354. doi: 10.1056/nejmra053077
- 5 Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJA, *et al*. Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine*. 2014;44.
- 6 Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42.
- 7 Daly RM, Duckham RL, Gianoudis J. Evidence for an interaction between exercise and nutrition for improving bone and muscle health. *Current Osteoporosis Reports*. 2014;12. doi: 10.1007/s11914-014-0207-2
- 8 Turner RT, Lotinun S, Hefferan TE, *et al*. Disuse in adult male rats attenuates the bone anabolic response to a therapeutic dose of parathyroid hormone. *Journal of Applied Physiology*. 2006;101. doi: 10.1152/japplphysiol.01622.2005
- 9 Sharkey NA, Ferris L, Smith TS, *et al*. Strain and loading of the second metatarsal during heel-lift. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1995;77. doi: 10.2106/00004623-199507000-00011
- 10 Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66:397–402.
- 11 Goodman CA, Hornberger TA, Robling AG. Bone and skeletal muscle: Key players in mechanotransduction and potential overlapping mechanisms. *Bone*. 2015;80.
- 12 Kannus P, Järvinen TLN, Sievänen H, *et al*. Effects of immobilization, three forms of remobilization, and subsequent deconditioning on bone mineral content and density in rat femora. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11. doi: 10.1002/jbmr.5650110919
- 13 Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, *et al*. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med*. 2008;58:424–30.
- 14 Portier H, Benaitreau D, Pallu S. Does Physical Exercise Always Improve Bone Quality in Rats? *Life (Basel, Switzerland)*. 2020;10:1–34. doi: 10.3390/LIFE10100217
- 15 Hannan AL, Hing W, Simas V, *et al*. High-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training within cardiac rehabilitation: a systematic review and meta-analysis. *Open Access J Sports Med*. 2018;9:1–17. doi: 10.2147/OAJSM.S150596

- 16 Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, *et al.* The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2015;45:679–92. doi: 10.1007/s40279-015-0321-z
- 17 Helgerud J, Høydal K, Wang E, *et al.* Aerobic high-intensity intervals improve VO₂max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39:665–71. doi: 10.1249/mss.0b013e3180304570
- 18 Yuan Y, Chen X, Zhang L, *et al.* The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2016;122. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.005
- 19 Ju YI, Sone T, Ohnaru K, *et al.* Differential effects of jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. *Journal of Applied Physiology.* 2012;112. doi: 10.1152/jappphysiol.01219.2011
- 20 Warner SE, Shea JE, Miller SC, *et al.* Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcified Tissue International.* 2006;79. doi: 10.1007/s00223-005-0293-3
- 21 Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1998;13. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.8.1308
- 22 Zhang L, Chen X, Wu J, *et al.* The effects of different intensities of exercise and active vitamin D on mouse bone mass and bone strength. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2017;35. doi: 10.1007/s00774-016-0764-9
- 23 Hussain SR, Macaluso A, Pearson SJ. High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in the Prevention/Management of Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev.* 2016;24:273–81. doi: 10.1097/CRD.0000000000000124
- 24 Boudenot A, Achiou Z, Portier H. Does running strengthen bone? *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40:1309–12. doi: 10.1139/apnm-2015-0265
- 25 Nakajima D, Kim CS, Oh TW, *et al.* Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science.* 2001;20. doi: 10.2114/jpa.20.285
- 26 Chen X, Aoki H, Fukui Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Bio-Medical Materials and Engineering.* 2004;14.
- 27 Boudenot A, Presle N, Uzbekov R, *et al.* Effect of interval-training exercise on subchondral bone in a chemically-induced osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014;22:1176–85. doi: 10.1016/j.joca.2014.05.020
- 28 Boudenot A, Maurel DB, Pallu S, *et al.* Quick benefits of interval training versus continuous training on bone: a dual-energy X-ray absorptiometry comparative study. *International journal of experimental pathology.* 2015;96:370–7. doi: 10.1111/IEP.12155
- 29 Wazzani R, Bourzac C, Elhafci H, *et al.* Comparative effects of various running exercise modalities on femoral bone quality in rats. *European journal of applied physiology.* Published Online First: 2023. doi: 10.1007/S00421-023-05293-2
- 30 Xavier A, Bourzac C, Bensidhoum M, *et al.* Effect of different running protocols on bone morphology and microarchitecture of the forelimbs in a male Wistar rat model. *PLoS One.* 2024;19:e0308974. doi: 10.1371/journal.pone.0308974

- 31 T J Overend 1, D H Paterson DAC. The effect of interval and continuous training on the aerobic parameters - PubMed. *Can J Sport Sci* 1992 Jun;17(2):129-34. doi: PMID: 1324106
- 32 Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1116:281–90. doi: 10.1196/ANNALS.1402.018
- 33 Chang X, Xu S, Zhang H. Regulation of bone health through physical exercise: Mechanisms and types. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1029475. doi: 10.3389/fendo.2022.1029475
- 34 Zhao D, Hua R, Riquelme MA, *et al*. Osteocytes regulate bone anabolic response to mechanical loading in male mice via activation of integrin $\alpha 5$. *Bone Res*. 2022;10:49. doi: 10.1038/s41413-022-00222-z
- 35 Sontam DM, Firth EC, Tsai P, *et al*. Different exercise modalities have distinct effects on the integrin-linked kinase (ILK) and Ca^{2+} signaling pathways in the male rat bone. *Physiol Rep*. 2015;3:e12568. doi: 10.14814/phy2.12568
- 36 Tu X, Rhee Y, Condon K, *et al*. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*. 2012;50:209–17. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.025
- 37 Novak A, Hsu S-C, Leung-Hagesteijn C, *et al*. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β -catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4374–9.
- 38 Noble BS, Peet N, Stevens HY, *et al*. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003;284:C934–43. doi: 10.1152/ajpcell.00234.2002
- 39 Chen X, Yang K, Jin X, *et al*. Bone Autophagy: A Potential Way of Exercise-Mediated Meg3/P62/Runx2 Pathway to Regulate Bone Formation in T2DM Mice. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2021;14:2753–64. doi: 10.2147/DMSO.S299744
- 40 Liu F, Fang F, Yuan H, *et al*. Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation. *J Bone Miner Res*. 2013;28:2414–30. doi: 10.1002/jbmr.1971
- 41 Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, *et al*. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy*. 2014;10:1965–77. doi: 10.4161/auto.36182
- 42 Zhou Z, Shi G, Zheng X, *et al*. Autophagy activation facilitates mechanical stimulation-promoted osteoblast differentiation and ameliorates hindlimb unloading-induced bone loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;498:667–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.040
- 43 Gao C, Cao W, Bao L, *et al*. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol*. 2010;12:781–90. doi: 10.1038/ncb2082
- 44 Yin X, Zhou C, Li J, *et al*. Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis. *Bone Res*. 2019;7:1–16. doi: 10.1038/s41413-019-0058-7
- 45 Escobar KA, Welch AM, Wells A, *et al*. Autophagy response to acute high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training is dissimilar in skeletal muscle and peripheral blood mononuclear cells and is influenced by sex. *Human Nutrition & Metabolism*. 2021;23:200118. doi: 10.1016/j.hnm.2020.200118

- 46 Doyle ME, Jan de Beur SM. The skeleton: endocrine regulator of phosphate homeostasis. *Current osteoporosis reports*. 2008;6:134–41. doi: 10.1007/S11914-008-0024-6
- 47 Bayraktar HH, Morgan EF, Niebur GL, *et al.* Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *Journal of biomechanics*. 2004;37:27–35.
- 48 Day JS, Ding M, van der Linden JC, *et al.* A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19:914–8. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00012-2
- 49 Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar Bone: Structure–Function Relations. *Journal of Structural Biology*. 1999;126:241–55. doi: 10.1006/jsbi.1999.4107
- 50 Moriishi T, Komori T. Osteocytes: Their Lacunocanalicular Structure and Mechanoresponses. *Int J Mol Sci*. 2022;23:4373. doi: 10.3390/ijms23084373
- 51 Tiede-Lewis LM, Dallas SL. Changes in the Osteocyte Lacunocanalicular Network with Aging. *Bone*. 2019;122:101–13. doi: 10.1016/j.bone.2019.01.025
- 52 Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22. doi: 10.3390/IJMS22136651
- 53 Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55:273–86. doi: 10.1002/JCB.240550303
- 54 FROST HM. In vivo osteocyte death. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1960;42 A. doi: 10.2106/00004623-196042010-00011
- 55 Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010;21:1457–69. doi: 10.1007/s00198-010-1194-5
- 56 Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*. 1996;101.
- 57 Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, *et al.* Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta anatomica*. 1990;137:350–8. doi: 10.1159/000146907
- 58 Qin L, Liu W, Cao H, *et al.* Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res*. 2020;8:23. doi: 10.1038/s41413-020-0099-y
- 59 Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, *et al.* Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. *Cytometry A*. 2003;54:36–47. doi: 10.1002/cyto.a.10052
- 60 Thi MM, Suadicani SO, Schaffler MB, *et al.* Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require V 3 integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110:21012–7. doi: 10.1073/pnas.1321210110
- 61 Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the Transition from Osteoblast to Osteocyte. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:437–43. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x
- 62 Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26:229–38. doi: 10.1002/jbmr.320

- 63 Filgueira L. Fluorescence-based Staining for Tartrate-resistant Acidic Phosphatase (TRAP) in Osteoclasts Combined with Other Fluorescent Dyes and Protocols. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:411–4. doi: 10.1177/002215540405200312
- 64 Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, *et al*. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*. 2000;113:377–81. doi: 10.1242/JCS.113.3.377
- 65 Lemma S, Sboarina M, Porporato PE, *et al*. Energy metabolism in osteoclast formation and activity. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2016;79:168–80. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2016.08.034
- 66 Gambari L, Grassi F, Roseti L, *et al*. Learning from Monocyte-Macrophage Fusion and Multinucleation: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis and Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:1–30. doi: 10.3390/IJMS21176001
- 67 Takayanagi H, Kim S, Koga T, *et al*. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell*. 2002;3:889–901. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00369-6
- 68 Takito J, Inoue S, Nakamura M. The Sealing Zone in Osteoclasts: A Self-Organized Structure on the Bone. *Int J Mol Sci*. 2018;19:984. doi: 10.3390/ijms19040984
- 69 Chen X, Wang Z, Duan N, *et al*. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59:99–107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085
- 70 Yang N, Liu Y. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration. *Int J Med Sci*. 2021;18:3697–707. doi: 10.7150/ijms.61080
- 71 Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*. 2009;3:189–96. doi: 10.2174/187231309788166398
- 72 Bonfanti L, Mironov AA, Martínez-Menárguez JA, *et al*. Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae: Evidence for Cisternal Maturation. *Cell*. 1998;95:993–1003. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81723-7
- 73 Dafforn TR, Della M, Miller AD. The Molecular Interactions of Heat Shock Protein 47 (Hsp47) and Their Implications for Collagen Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:49310–9. doi: 10.1074/jbc.M108896200
- 74 Bateman JF, Boot-Handford RP, Lamandé SR. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10:173–83. doi: 10.1038/nrg2520
- 75 Gentili/snm C, >, Cancedda R. Cartilage and bone extracellular matrix. *Current pharmaceutical design*. 2009;15:1334–48. doi: 10.2174/138161209787846739
- 76 Malaval L, Aubin JE, Vico L. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009;20:1077–80. doi: 10.1007/S00198-009-0869-2
- 77 Charoenlarp P, Rajendran AK, Iseki S. Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. *Inflammation and Regeneration*. 2017;37. doi: 10.1186/S41232-017-0043-8

- 78 Nudelman F, Pieterse K, George A, *et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*. 2010;9:1004–9. doi: 10.1038/nmat2875
- 79 Dey A, Bomans PHH, Müller FA, *et al.* The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization. *Nature Materials*. 2010;9:1010–4. doi: 10.1038/nmat2900
- 80 Tavafoghi M, Cerruti M. The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *Journal of The Royal Society Interface*. 2016;13:20160462. doi: 10.1098/rsif.2016.0462
- 81 Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*. 1998;20:92–102.
- 82 Bonfield W. Mechanisms of deformation and fracture in bone. *Composites*. 1971;2:173–5. doi: 10.1016/0010-4361(71)90956-6
- 83 Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng*. 2018;20:119–43. doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121139
- 84 Ducher G, Blimkie C-J. Adaptations architecturales du tissu osseux en réponse à l'exercice physique : intérêts et limites des méthodes non invasives utilisées chez l'homme. *Science & Sports*. 2006;21:255–67. doi: 10.1016/j.scispo.2006.08.001
- 85 Friedman AW. Important determinants of bone strength: beyond bone mineral density. *J Clin Rheumatol*. 2006;12:70–7. doi: 10.1097/01.rhu.0000208612.33819.8c
- 86 Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud KE, *et al.* Hip fracture in women without osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:2787–93. doi: 10.1210/jc.2004-1568
- 87 Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone*. 1993;14:595–608. doi: 10.1016/8756-3282(93)90081-K
- 88 Bouxsein ML. Chapter 19 - Biomechanics of Age-Related Fractures. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis (Second Edition)*. San Diego: Academic Press 2001:509–31.
- 89 Nakamura T, Turner CH, Yoshikawa T, *et al.* Do variations in hip geometry explain differences in hip fracture risk between Japanese and white Americans? *J Bone Miner Res*. 1994;9:1071–6. doi: 10.1002/jbmr.5650090715
- 90 Meyrueis P, Cazenave A, Zimmermann R. Biomécanique de l'os. Application au traitement des fractures. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*. 2004;1:64–93. doi: 10.1016/J.EMCRHO.2003.11.005
- 91 Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14–8. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.035
- 92 Usami Y, Gunawardena AT, Iwamoto M, *et al.* Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2016;96:186–96. doi: 10.1038/labinvest.2015.142
- 93 Nishimura R, Hata K, Ono K, *et al.* Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2012;17:2657–67. doi: 10.2741/4076
- 94 Ballock RT, O'Keefe RJ. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2003;69:123–43. doi: 10.1002/BDRC.10014

- 95 Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *The Lancet*. 2002;359:1841–50. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08706-8
- 96 Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, *et al*. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5:243–52. doi: 10.1016/0221-8747(84)90066-3
- 97 Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5:235–42. doi: 10.1016/0221-8747(84)90065-1
- 98 Everts V, Jansen IDC, de Vries TJ. Mechanisms of bone resorption. *Bone*. 2022;163:116499. doi: 10.1016/j.bone.2022.116499
- 99 Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:3318–25. doi: 10.1172/JCI27071
- 100 Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19:615–22.
- 101 Plotkin LI, Aguilar-Pérez A, Bivi N. Chapter 4 - Local Regulation of Bone Cell Function. In: Burr DB, Allen MR, eds. *Basic and Applied Bone Biology (Second Edition)*. Academic Press 2019:57–84.
- 102 RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology - Leibbrandt - 2008 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library. <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1443.016> (accessed 1 February 2024)
- 103 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337–42. doi: 10.1038/nature01658
- 104 Quesnel B. Niches hématopoïétiques et cellules souches. *EMC - Hématologie*. 2012;7:1–9. doi: 10.1016/S1155-1984(12)49947-2
- 105 Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*. 1992;7:65–72. doi: 10.1002/jbmr.5650070110
- 106 Aslan D, Andersen MD, Gede LB, *et al*. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72:14–22. doi: 10.3109/00365513.2011.624631
- 107 Saini V, Marengi DA, Barry KJ, *et al*. Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-related Peptide Type 1 Receptor (PPR) Signaling in Osteocytes Regulates Anabolic and Catabolic Skeletal Responses to PTH. *J Biol Chem*. 2013;288:20122–34. doi: 10.1074/jbc.M112.441360
- 108 Drake MT, Khosla S. Hormonal and systemic regulation of sclerostin. *Bone*. 2017;96:8–17. doi: 10.1016/j.bone.2016.12.004
- 109 Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone*. 2013;54:250–7. doi: 10.1016/j.bone.2012.09.016
- 110 Ramp WK, Neuman WF. Some factors affecting mineralization of bone in tissue culture. *Am J Physiol*. 1971;220:270–4. doi: 10.1152/ajplegacy.1971.220.1.270

- 111 Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone*. 2009;44:11–6. doi: 10.1016/j.bone.2008.09.017
- 112 Tazawa K, Hoshi K, Kawamoto S, *et al.* Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. *J Bone Miner Metab*. 2004;22:524–9. doi: 10.1007/s00774-004-0519-x
- 113 Lisowska B, Kosson D, Domaracka K. Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:1753–8. doi: 10.2147/DDDT.S164562
- 114 Briot K. Bone and glucocorticoids. *Annales d'Endocrinologie*. 2018;79:115–8. doi: 10.1016/j.ando.2018.04.016
- 115 Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, *et al.* Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Reviews*. 2002;23:90–119. doi: 10.1210/edrv.23.1.0456
- 116 Burt LA, Billington EO, Rose MS, *et al.* Adverse Effects of High-Dose Vitamin D Supplementation on Volumetric Bone Density Are Greater in Females than Males. *J Bone Miner Res*. 2020;35:2404–14. doi: 10.1002/jbmr.4152
- 117 Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*. 2008;43:813–8. doi: 10.1016/j.bone.2008.07.003
- 118 Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2004;22:233–41. doi: 10.1080/08977190412331279890
- 119 Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;328:688–96. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.097
- 120 Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8:a031211. doi: 10.1101/cshperspect.a031211
- 121 Terauchi M. [Role of the immune system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2011;69:1215–9.
- 122 Vico L, Collet P, Guignandon A, *et al.* Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet*. 2000;355:1607–11. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02217-0
- 123 Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, *et al.* Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*. 2007;5:464–75. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.001
- 124 Friedenber ZB, Brighton CT. Bioelectric potentials in bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1966;48:915–23.
- 125 Bassett CA, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science*. 1962;137:1063–4. doi: 10.1126/science.137.3535.1063
- 126 Jones D, Scholuebbbers G, Matthias HH. Wolff's law, piezo-electricity and mechanical stress responses in the skeleton. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 1988:994 vols.2-.
- 127 Ahn AC, Grodzinsky AJ. RELEVANCE OF COLLAGEN PIEZOELECTRICITY TO “WOLFF’S LAW”: A CRITICAL REVIEW. *Med Eng Phys*. 2009;31:733–41. doi: 10.1016/j.medengphys.2009.02.006

- 128 Pienkowski D, Pollack SR. The origin of stress-generated potentials in fluid-saturated bone. *J Orthop Res*. 1983;1:30–41. doi: 10.1002/jor.1100010105
- 129 Marotti G, Palumbo C. The mechanism of transduction of mechanical strains into biological signals at the bone cellular level. *Eur J Histochem*. 2007;51 Suppl 1:15–9.
- 130 Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng*. 1991;113:191–7. doi: 10.1115/1.2891234
- 131 Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*. 1995;57:344–58. doi: 10.1007/BF00302070
- 132 Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech*. 1994;27:339–60. doi: 10.1016/0021-9290(94)90010-8
- 133 Schumacher S, Vazquez Nunez R, Biertümpfel C, *et al*. Bottom-up reconstitution of focal adhesion complexes. *The FEBS Journal*. 2022;289:3360–73. doi: 10.1111/febs.16023
- 134 Revach O-Y, Grosheva I, Geiger B. Biomechanical regulation of focal adhesion and invadopodia formation. *Journal of Cell Science*. 2020;133:jcs244848. doi: 10.1242/jcs.244848
- 135 Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*. 2009;23:397–418. doi: 10.1101/gad.1758709
- 136 Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339:269–80. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6
- 137 Verrier S, Pallu S, Bareille R, *et al*. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials*. 2002;23:585–96. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00145-4
- 138 Hamaia SW, Pugh N, Raynal N, *et al*. Mapping of Potent and Specific Binding Motifs, GLOGEN and GVOGEA, for Integrin $\alpha 1\beta 1$ Using Collagen Toolkits II and III. *J Biol Chem*. 2012;287:26019–28. doi: 10.1074/jbc.M112.353144
- 139 Laminin Receptor - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/laminin-receptor> (accessed 17 July 2024)
- 140 Arnaout MA. Biology and structure of leukocyte $\beta 2$ integrins and their role in inflammation. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2433. doi: 10.12688/f1000research.9415.1
- 141 Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*. 2019;21:25–31. doi: 10.1038/s41556-018-0234-9
- 142 Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20:457–73. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2
- 143 Torres-Gomez A, Cabañas C, Lafuente EM. Phagocytic Integrins: Activation and Signaling. *Front Immunol*. 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00738
- 144 Horton ER, Byron A, Askari JA, *et al*. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol*. 2015;17:1577–87. doi: 10.1038/ncb3257

- 145 Lu F, Zhu L, Bromberger T, *et al.* Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin. *Nat Commun.* 2022;13:2362. doi: 10.1038/s41467-022-30117-w
- 146 Pallu S, Fricain JC, Bareille R, *et al.* Cyclo-DfKRG peptide modulates in vitro and in vivo behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys. *Acta Biomater.* 2009;5:3581–92. doi: 10.1016/j.actbio.2009.05.018
- 147 Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, *et al.* Arg-Gly-Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res.* 1991;195:368–75. doi: 10.1016/0014-4827(91)90386-9
- 148 Bikle DD. Integrins, insulin like growth factors, and the skeletal response to load. *Osteoporos Int.* 2008;19:1237–46. doi: 10.1007/s00198-008-0597-z
- 149 Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, *et al.* A peptidomimetic antagonist of the $\alpha(v)\beta3$ integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J Clin Invest.* 1997;99:2284–92. doi: 10.1172/JCI119404
- 150 Grzesik WJ, Robey PG. Bone matrix RGD glycoproteins: Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1994;9:487–96. doi: 10.1002/jbmr.5650090408
- 151 Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, *et al.* A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:15941–6. doi: 10.1073/pnas.0707246104
- 152 McNamara L, Majeska R, Weinbaum S, *et al.* Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292:355–63. doi: 10.1002/ar.20869
- 153 Miyauchi A, Gotoh M, Kamioka H, *et al.* $\alpha V\beta 3$ Integrin ligands enhance volume-sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:498–504. doi: 10.1007/s00774-006-0716-x
- 154 Mao L, Wang L, Xu J, *et al.* The role of integrin family in bone metabolism and tumor bone metastasis. *Cell Death Discov.* 2023;9:1–12. doi: 10.1038/s41420-023-01417-x
- 155 Thi MM, Suadicani SO, Schaffler MB, *et al.* Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require $\alpha V\beta 3$ integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:21012–7. doi: 10.1073/pnas.1321210110
- 156 Davidson RM, Tatakis DW, Auerbach AL. Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells. *Pflugers Arch.* 1990;416:646–51. doi: 10.1007/BF00370609
- 157 Davidson RM. Membrane stretch activates a high-conductance K⁺ channel in G292 osteoblastic-like cells. *J Membr Biol.* 1993;131:81–92. doi: 10.1007/BF02258536
- 158 McDonald F, Somasundaram B, McCann TJ, *et al.* Calcium waves in fluid flow stimulated osteoblasts are G protein mediated. *Arch Biochem Biophys.* 1996;326:31–8. doi: 10.1006/abbi.1996.0043
- 159 Scott A, Khan KM, Duronio V, *et al.* Mechanotransduction in Human Bone. *Sports Med.* 2008;38:139–60. doi: 10.2165/00007256-200838020-00004
- 160 Coste B, Mathur J, Schmidt M, *et al.* Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically-activated cation channels. *Science.* 2010;330:55–60. doi: 10.1126/science.1193270

- 161 Buo AM, Stains JP. Gap Junctional Regulation of Signal Transduction in Bone Cells. *FEBS Lett.* 2014;588:1315–21. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.025
- 162 Plotkin LI, Laird DW, Amedee J. Role of connexins and pannexins during ontogeny, regeneration, and pathologies of bone. *BMC Cell Biol.* 2016;17 Suppl 1:19. doi: 10.1186/s12860-016-0088-6
- 163 Flenniken AM, Osborne LR, Anderson N, *et al.* A Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development.* 2005;132:4375–86. doi: 10.1242/dev.02011
- 164 Davis HM, Pacheco-Costa R, Atkinson EG, *et al.* Disruption of the Cx43/miR21 pathway leads to osteocyte apoptosis and increased osteoclastogenesis with aging. *Aging Cell.* 2017;16:551–63. doi: 10.1111/accel.12586
- 165 Kringelbach TM, Aslan D, Novak I, *et al.* Fine-tuned ATP signals are acute mediators in osteocyte mechanotransduction. *Cell Signal.* 2015;27:2401–9. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.08.016
- 166 Li J, Liu D, Ke HZ, *et al.* The P2X7 nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2005;280:42952–9. doi: 10.1074/jbc.M506415200
- 167 Manaka S, Tanabe N, Kariya T, *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett.* 2015;589:310–8. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.013
- 168 Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, *et al.* Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem.* 2006;281:30884–95. doi: 10.1074/jbc.M604772200
- 169 Malone AMD, Anderson CT, Tummala P, *et al.* Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13325–30. doi: 10.1073/pnas.0700636104
- 170 Li X, Kordsmeier J, Xiong J. New Advances in Osteocyte Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep.* 2021;19:101–6. doi: 10.1007/s11914-020-00650-y
- 171 Sheng R, Cao M, Song M, *et al.* Muscle-bone crosstalk via endocrine signals and potential targets for osteosarcopenia-related fracture. *Journal of Orthopaedic Translation.* 2023;43:36–46. doi: 10.1016/j.jot.2023.09.007
- 172 Storlino G, Colaianni G, Sanesi L, *et al.* Irisin Prevents Disuse-Induced Osteocyte Apoptosis. *J Bone Miner Res.* 2020;35:766–75. doi: 10.1002/jbmr.3944
- 173 Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, *et al.* Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via α V Integrin Receptors. *Cell.* 2019;178:507–8. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.028
- 174 A M, Wales TE, Zhou H, *et al.* Irisin acts through its integrin receptor in a two-step process involving extracellular Hsp90 α . *Molecular Cell.* 2023;83:1903-1920.e12. doi: 10.1016/j.molcel.2023.05.008
- 175 Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, *et al.* The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:12157–62. doi: 10.1073/pnas.1516622112
- 176 Zhang J, Valverde P, Zhu X, *et al.* Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism. *Bone Res.* 2017;5:16056. doi: 10.1038/boneres.2016.56

- 177 Li X, Han L, Nookaew I, *et al.* Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism. *eLife*. 2019;8:e49631. doi: 10.7554/eLife.49631
- 178 Coughlin TR, Voisin M, Schaffler MB, *et al.* Primary Cilia Exist in a Small Fraction of Cells in Trabecular Bone and Marrow. *Calcif Tissue Int*. 2015;96:65–72. doi: 10.1007/s00223-014-9928-6
- 179 Duncan RL, Hruska KA, Misler S. Parathyroid hormone activation of stretch-activated cation channels in osteosarcoma cells (UMR-106.01). *FEBS Lett*. 1992;307:219–23. doi: 10.1016/0014-5793(92)80771-8
- 180 Nauman EA, Satcher RL, Keaveny TM, *et al.* Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;90:1849–54. doi: 10.1152/jappl.2001.90.5.1849
- 181 Coughlin TR, Niebur GL. Fluid shear stress in trabecular bone marrow due to low-magnitude high-frequency vibration. *J Biomech*. 2012;45:2222–9. doi: 10.1016/j.jbiomech.2012.06.020
- 182 Schreivogel S, Kuchibhotla V, Knaus P, *et al.* Load-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells is caused by mechano-regulated autocrine signaling. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13:1992–2008. doi: 10.1002/term.2948
- 183 Sun Y, Wan B, Wang R, *et al.* Mechanical Stimulation on Mesenchymal Stem Cells and Surrounding Microenvironments in Bone Regeneration: Regulations and Applications. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:808303. doi: 10.3389/fcell.2022.808303
- 184 Wang L, You X, Lotinun S, *et al.* Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nat Commun*. 2020;11:282. doi: 10.1038/s41467-019-14146-6
- 185 Wang X, He Y, Tian S, *et al.* Fluid Shear Stress Increases Osteocyte and Inhibits Osteoclasts via Downregulating Receptor-Activator of Nuclear Factor κ B (RANK)/Osteoprotegerin Expression in Myeloma Microenvironment. *Med Sci Monit*. 2019;25:5961–8. doi: 10.12659/MSM.915986
- 186 Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2000;18:305–16. doi: 10.1007/S007740070001
- 187 Peuriere L. *Rôle des ostéocytes dans la perte osseuse d'immobilisation : préparation du vol spatial Bion M2*. 2021.
- 188 Sipos W, Rauner M, Skalicky M, *et al.* Running has a negative effect on bone metabolism and proinflammatory status in male aged rats. *Exp Gerontol*. 2008;43:578–83. doi: 10.1016/j.exger.2008.03.008
- 189 Rico H, Aznar L, Hernández ER, *et al.* Effects of potassium bicarbonate supplementation on axial and peripheral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *Calcif Tissue Int*. 1999;65:242–5. doi: 10.1007/s002239900691
- 190 Rico H, Gervas JJ, Hernández ER, *et al.* Effects of alprazolam supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *Calcif Tissue Int*. 1999;65:139–42. doi: 10.1007/s002239900672
- 191 Seco C, Revilla M, Hernández ER, *et al.* Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *J Bone Miner Res*. 1998;13:508–12. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.3.508

- 192 Swift SN, Baek K, Swift JM, *et al.* Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr.* 2012;142:1038–45. doi: 10.3945/jn.111.153361
- 193 Huang T-H, Hsieh SS, Liu S-H, *et al.* Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. *Calcif Tissue Int.* 2010;86:142–53. doi: 10.1007/s00223-009-9320-0
- 194 Bourrin S, Ghaemmaghami F, Vico L, *et al.* Effect of a five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study. *Calcif Tissue Int.* 1992;51:137–42. doi: 10.1007/BF00298502
- 195 Nelson ME, Fiatarone MA, Morganti CM, *et al.* Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. *JAMA.* 1994;272:1909–14. doi: 10.1001/jama.1994.03520240037038
- 196 Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone.* 1998;23:399–407. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00118-5
- 197 Vainionpää A, Korpelainen R, Leppäluoto J, *et al.* Effects of high-impact exercise on bone mineral density: a randomized controlled trial in premenopausal women. *Osteoporos Int.* 2005;16:191–7. doi: 10.1007/s00198-004-1659-5
- 198 Bonnet N, Beaupied H, Vico L, *et al.* Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2007;22:578–88. doi: 10.1359/JBMR.070117
- 199 Bonnet N, Laroche N, Beaupied H, *et al.* Doping dose of salbutamol and exercise training: Impact on the skeleton of ovariectomized rats. *Journal of Applied Physiology.* 2007;103. doi: 10.1152/japplphysiol.01319.2006
- 200 Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, *et al.* Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: Study in a rat model. *European Journal of Applied Physiology.* 2011;111. doi: 10.1007/s00421-011-1916-1
- 201 Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, *et al.* Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint bone spine.* 2013;80:492–8. doi: 10.1016/J.JBSPIN.2012.12.005
- 202 Mujika I, Chatard JC, Busso T, *et al.* Effects of training on performance in competitive swimming. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee.* 1995;20:395–406. doi: 10.1139/H95-031
- 203 Atlaoui D, Pichot V, Lacoste L, *et al.* Heart rate variability, training variation and performance in elite swimmers. *International journal of sports medicine.* 2007;28:394–400. doi: 10.1055/S-2006-924490
- 204 Boudenot A, Maurel DB, Pallu S, *et al.* Quick benefits of interval training versus continuous training on bone: a dual-energy X-ray absorptiometry comparative study. *International journal of experimental pathology.* 2015;96:370–7. doi: 10.1111/IEP.12155
- 205 Lu M, Li M, Yi L, *et al.* Effects of 8-week high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on bone metabolism in sedentary young females. *Journal of Exercise Science & Fitness.* 2022;20:77–83. doi: 10.1016/j.jesf.2022.01.001

- 206 Polisel EEC, Beck WR, Scariot PPM, *et al.* Effects of high-intensity interval training in more or less active mice on biomechanical, biophysical and biochemical bone parameters. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021;11:1–11. doi: 10.1038/s41598-021-85585-9
- 207 Bott KN, Sacco SM, Turnbull PC, *et al.* Skeletal site-specific effects of endurance running on structure and strength of tibia, lumbar vertebrae, and mandible in male Sprague-Dawley rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41:597–604. doi: 10.1139/apnm-2015-0404
- 208 Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
- 209 Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, *et al.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:166–80. doi: 10.1038/nri3607
- 210 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148:2207–16.
- 211 Marquez RT, Tsao BW, Faust NF, *et al.* Drug Resistance and Molecular Cancer Therapy: Apoptosis Versus Autophagy. *Apoptosis.* IntechOpen 2013.
- 212 Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics.* 2006;235:176–90. doi: 10.1002/dvdy.20603
- 213 Manolagas SC, Parfitt AM. WHAT OLD MEANS TO BONE. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:369–74. doi: 10.1016/j.tem.2010.01.010
- 214 Ru J, Wang Y. Osteocyte apoptosis: the roles and key molecular mechanisms in resorption-related bone diseases. *Cell Death Dis.* 2020;11:846. doi: 10.1038/s41419-020-03059-8
- 215 Plotkin LI. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12:121–6. doi: 10.1007/s11914-014-0194-3
- 216 Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res.* 2003;38:223–6. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.02006.x
- 217 Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, *et al.* Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.* 2012;50:1115–22. doi: 10.1016/j.bone.2012.01.025
- 218 Bivi N, Condon KW, Allen MR, *et al.* Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res.* 2012;27:374–89. doi: 10.1002/jbmr.548
- 219 Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, *et al.* Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS One.* 2011;6:e23516. doi: 10.1371/journal.pone.0023516
- 220 Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014;24:9–23. doi: 10.1038/cr.2013.169
- 221 Wu S, Shen Y, Zhang S, *et al.* Salmonella Interacts With Autophagy to Offense or Defense. *Front Microbiol.* 2020;11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00721

- 222 Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:365–81. doi: 10.1038/s41580-018-0001-6
- 223 Ashford TP, Porter KR. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol.* 1962;12:198–202.
- 224 Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13:132–41. doi: 10.1038/ncb2152
- 225 Russell RC, Tian Y, Yuan H, *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol.* 2013;15:741–50. doi: 10.1038/ncb2757
- 226 Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol.* 2016;428:1714–24. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.004
- 227 Reggiori F, Komatsu M, Finley K, *et al.* Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:219625. doi: 10.1155/2012/219625
- 228 Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2011;27:107–32. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
- 229 Wang Y, Li L, Hou C, *et al.* SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;60:97–104. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.009
- 230 Kim K-A, Shin D, Kim J-H, *et al.* Role of Autophagy in Endothelial Damage and Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke. *Stroke.* 2018;49:1571–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017287
- 231 Oliver L, Hue E, Priault M, *et al.* Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21:2779–88. doi: 10.1089/scd.2012.0124
- 232 Qi M, Zhang L, Ma Y, *et al.* Autophagy Maintains the Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Prevent Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis. *Theranostics.* 2017;7:4498–516. doi: 10.7150/thno.17949
- 233 Wang J, Zhang Y, Cao J, *et al.* The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance. *Autophagy.* ;19:2409–27. doi: 10.1080/15548627.2023.2186112
- 234 Zhu C, Shen S, Zhang S, *et al.* Autophagy in Bone Remodeling: A Regulator of Oxidative Stress. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:898634. doi: 10.3389/fendo.2022.898634
- 235 Na W, Lee E-J, Kang M-K, *et al.* Aesculetin Inhibits Osteoclastic Bone Resorption through Blocking Ruffled Border Formation and Lysosomal Trafficking. *Int J Mol Sci.* 2020;21:8581. doi: 10.3390/ijms21228581
- 236 Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, *et al.* Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2005;289:C633–43. doi: 10.1152/ajpcell.00278.2004
- 237 Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. *J Cell Physiol.* 2003;194:194–205. doi: 10.1002/jcp.10221

- 238 Sherk VD, Rosen CJ. Senescent and apoptotic osteocytes and aging: Exercise to the rescue? *Bone*. 2019;121:255–8. doi: 10.1016/j.bone.2019.02.006
- 239 Achiou Z, Toumi H, Touvier J, *et al*. Sclerostin antibody and interval treadmill training effects in a rodent model of glucocorticoid-induced osteopenia. *Bone*. 2015;81:691–701. doi: 10.1016/j.bone.2015.09.010
- 240 Xu H, Xia M, Sun L, *et al*. Osteocytes Enhance Osteogenesis by Autophagy-Mediated FGF23 Secretion Under Mechanical Tension. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:782736. doi: 10.3389/fcell.2021.782736
- 241 Gao L, Liu G, Wu X, *et al*. Osteocytes autophagy mediated by mTORC2 activation controls osteoblasts differentiation and osteoclasts activities under mechanical loading. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2023;742:109634. doi: 10.1016/j.abb.2023.109634
- 242 Li W, Zhao J, Sun W, *et al*. Osteocytes promote osteoclastogenesis via autophagy-mediated RANKL secretion under mechanical compressive force. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020;694:108594. doi: 10.1016/j.abb.2020.108594
- 243 Germain A, Bourzac C, Pichon C, *et al*. Impact of Treadmill Interval Running on the Appearance of Zinc Finger Protein FHL2 in Bone Marrow Cells in a Rat Model: A Pilot Study. *Life (Basel)*. 2022;12:528. doi: 10.3390/life12040528
- 244 Liu Z, Han S, Wang Y, *et al*. The LIM-Only Protein FHL2 is involved in Autophagy to Regulate the Development of Skeletal Muscle Cell. *Int J Biol Sci*. 2019;15:838–46. doi: 10.7150/ijbs.31371
- 245 Sun Y, Yuan Y, Wu W, *et al*. The effects of locomotion on bone marrow mesenchymal stem cell fate: insight into mechanical regulation and bone formation. *Cell & Bioscience*. 2021;11:88. doi: 10.1186/s13578-021-00601-9
- 246 Wils P. Analyses non destructives par tomographie à rayons X. *Les nouvelles de l'archéologie*. 2020;13–9. doi: 10.4000/nda.9047
- 247 Otsu N. THRESHOLD SELECTION METHOD FROM GRAY-LEVEL HISTOGRAMS. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1979;SMC-9:62–6. doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076
- 248 Buie HR, Campbell GM, Klinck RJ, *et al*. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. *Bone*. 2007;41:505–15. doi: 10.1016/J.BONE.2007.07.007
- 249 Buxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, *et al*. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25:1468–86.
- 250 Wallace IJ, Pagnotti GM, Rubin-Sigler J, *et al*. Focal enhancement of the skeleton to exercise correlates with responsivity of bone marrow mesenchymal stem cells rather than peak external forces. *The Journal of Experimental Biology*. 2015;218:3002. doi: 10.1242/JEB.118729
- 251 Barbe MF, Massicotte VS, Assari S, *et al*. Prolonged high force high repetition pulling induces osteocyte apoptosis and trabecular bone loss in distal radius, while low force high repetition pulling induces bone anabolism. *Bone*. 2018;110:267. doi: 10.1016/J.BONE.2018.02.014
- 252 Jain NX, Barr-Gillespie AE, Clark BD, *et al*. Bone Loss from High Repetitive High Force Loading is Prevented by Ibuprofen Treatment. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2014;14:78.

- 253 Kotha SP, Hsieh YF, Strigel RM, *et al.* Experimental and finite element analysis of the rat ulnar loading model - Correlations between strain and bone formation following fatigue loading. *Journal of Biomechanics*. 2004;37:541–8. doi: 10.1016/j.jbiomech.2003.08.009
- 254 Bourzac C, Bensidhoum M, Manassero M, *et al.* Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using μ CT. *Life*. 2020;10:1–16. doi: 10.3390/LIFE10120308
- 255 Doube M, Kłosowski MM, Wiktorowicz-Conroy AM, *et al.* Trabecular bone scales allometrically in mammals and birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;278:3067. doi: 10.1098/RSPB.2011.0069
- 256 Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone*. 1993;14:595–608. doi: 10.1016/8756-3282(93)90081-K
- 257 Chennimalai Kumar N, Dantzig JA, Jasiuk IM. Modeling of cortical bone adaptation in a rat ulna: effect of frequency. *Bone*. 2012;50:792–7. doi: 10.1016/j.bone.2011.12.008
- 258 Noll M, Mendonça CR, dos Santos Rodrigues AP, *et al.* Narrative review of the influence of high-intensity interval training on adolescents' bone health: commentary and perspectives. *Translational Pediatrics*. 2021;10.
- 259 Koenen K, Knepper I, Klodt M, *et al.* Sprint Interval Training Induces A Sexual Dimorphism but does not Improve Peak Bone Mass in Young and Healthy Mice. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7:1–10. doi: 10.1038/srep44047
- 260 Wallace JM, Rajachar RM, Allen MR, *et al.* Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. *Bone*. 2007;40. doi: 10.1016/j.bone.2006.12.002
- 261 Boudenot A, Presle N, Uzbekov R, *et al.* Effect of interval-training exercise on subchondral bone in a chemically-induced osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014;22:1176–85. doi: 10.1016/j.joca.2014.05.020
- 262 Hamann N, Kohler T, Müller R, *et al.* The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif Tissue Int*. 2012;90:429–37. doi: 10.1007/s00223-012-9593-6
- 263 McVeigh J, Kingsley S, Gray D, *et al.* Swimming Enhances Bone Mass Acquisition in Growing Female Rats. *J Sports Sci Med*. 2010;9:612–9.
- 264 Loundagin LL, Schmidt TA, Edwards WB. Mechanical Fatigue of Bovine Cortical Bone Using Ground Reaction Force Waveforms in Running. *J Biomech Eng*. 2018;140:0310031–5. doi: 10.1115/1.4038288
- 265 Suresh S. *Fatigue of Materials*. Cambridge University Press 1998.
- 266 Yan Y, Wang L, Ge L, *et al.* Osteocyte-Mediated Translation of Mechanical Stimuli to Cellular Signaling and Its Role in Bone and Non-bone-Related Clinical Complications. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18:67–80. doi: 10.1007/s11914-020-00564-9
- 267 Lerebours C, Buenzli PR. Towards a cell-based mechanostat theory of bone: the need to account for osteocyte desensitisation and osteocyte replacement. *Journal of Biomechanics*. 2016;49:2600–6. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.05.012

- 268 Liu J, Das M, Yang J, *et al.* Structural mechanism of integrin inactivation by filamin. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22:383–9. doi: 10.1038/nsmb.2999
- 269 Bouvard D, Pouwels J, De Franceschi N, *et al.* Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:430–42. doi: 10.1038/nrm3599

. **Annexe**

Poster des JFMBT 2024

COMPARISON OF THE EFFECT OF DIFFERENT TREADMILL RUNNING MODALITIES ON THE FORELIMB AND HINDLIMB IN WISTAR RATS.

Andy XAVIER^{1,2,3}, Céline Bourzac^{1,4}, Rokia Wazzani^{1,5}, Catherine MURA², Hugues PORTIER^{1,3}, Stéphane PALLU^{1,3}

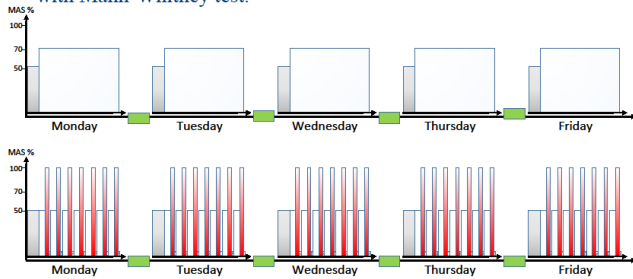
1 Laboratoire B3OA UMR7052 U1271 Université de Paris-CNRS de Paris, 2 Laboratoire INEM UMR7355 CNRS - Université d'Orléans, 3 SAPREM STAPS Université d'Orléans, 4 Plateforme de Recherche Biomédicale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, F-94700 Maisons-Alfort, France, 5 Laboratoire APERE, Université de Picardie Jules Verne, F-80000 Amiens, France.

• Background:

Bone response depends directly on the intensity of the applied mechanical loads [1]. Running is the easiest and most widely used training modality in rodent bone studies. In the literature, two main running modalities are reported: Continuous Running (CR) and High Intensity Interval Training (HIIT). Experimental studies conducted to date on these two modalities have shown controversial effects on bone tissue [2]. These divergent results can be explained on the one hand, by the heterogeneity of the protocols, and on the other hand, by the bone anatomic sites chosen to report the results, which are common to those used in humans (femur, tibia, lumbar spine). However, rats have a quadruped locomotion, so, a bone adaptation of the upper limbs is conceivable. We therefore propose to compare CR and HIIT using the same total intensity protocol on several scales (morphology, microarchitecture and tissue and cell properties), and to compare the effects of these two protocols on the tibia and ulna.

• Methods:

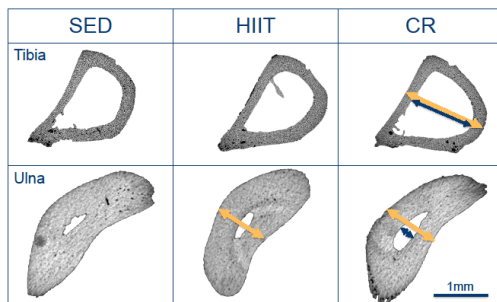
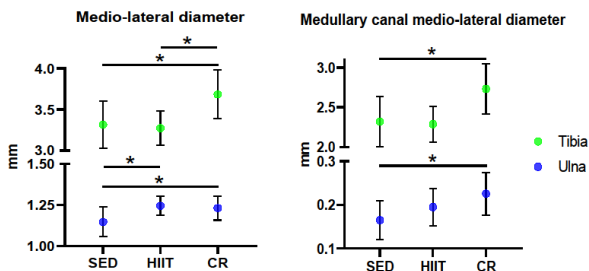
Forty 8-week-old male Wistar rats were randomly assigned to three groups: HIIT, CR, and SED. Each running group underwent treadmill running protocols for 45 min per day, 5 days a week for 8 weeks. The level of significance was set at $p < 0.05$, performed with Mann-Whitney test.



• Results:

• Morphological measurements

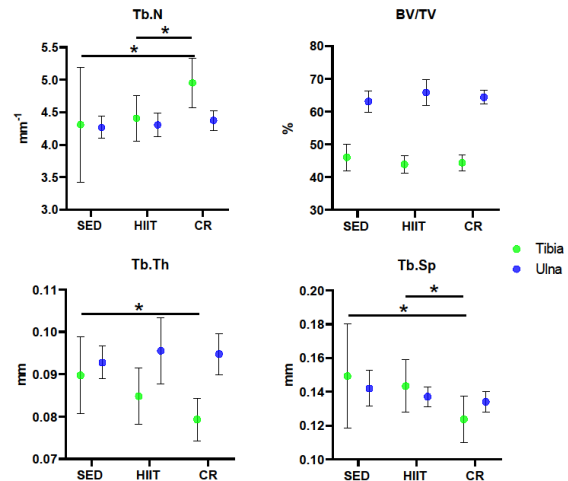
Compared with the sedentary group, CR induced an increase in the mediolateral diameter measured at the midshaft diaphysis in the tibia and ulna, which was reflected in a thinning of the cortical bone in the tibia.



• : Medullary canal mediolateral diameters, results significantly different with sedentary group
• : Medioloateral diameters, results significantly different with sedentary group

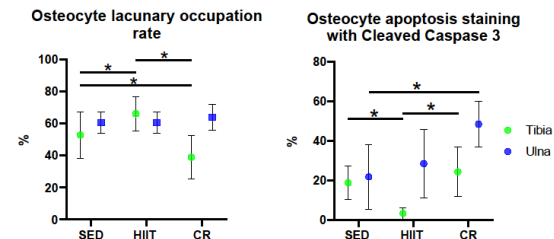
• Microarchitecture analysis by micro CT

In the tibia, CR has led to an increase in the number of trabeculae and a reduction in their thickness.



• Histological analysis

In tibia, CR induced a decrease in the rate of lacunar osteocyte occupation, whereas HIIT induced an increase in this rate compared with the sedentary groups. Cleaved caspase 3-labelled osteocyte apoptosis was increased in the CR group at both the tibia and ulna diaphysis. HIIT decrease significantly osteocyte apoptosis at the ulna diaphysis compared with sedentary group.



• Conclusion:

The HIIT running modality has the best osteogenic effect on both the tibia and ulna.

• References:

[1] Wolff J. The Law of Bone Remodelling. Published Online First: 1986. doi: 10.1007/978-3-642-71031-5
[2] Boudriot A, Maurel DB, Pallu S, et al. Quick benefits of interval training versus continuous training on bone: a dual-energy X-ray absorptiometry comparative study. International journal of experimental pathology. 2015;96:370-7.

Andy XAVIER

Analyse multi-échelle de l'effet de différentes modalités de course sur différents sites anatomiques osseux.

Les effets de la course à pied sur le tissu osseux dépendent de l'intensité, du type et de la fréquence des charges mécaniques appliquées. La course à pied, bien que bénéfique sous certaines conditions, peut devenir délétère pour le tissu osseux à haute intensité, et il n'existe pas de consensus clair sur la meilleure modalité pour favoriser l'ostéogenèse. Cette thèse compare les effets de trois modalités de course (entraînement fractionné de haute intensité, course continue, et une combinaison des deux) sur les paramètres morphologiques microarchitecturaux et cellulaire des os de rats Wistar. Les résultats montrent que toutes les modalités entraînent une adaptation osseuse, avec une augmentation du diamètre diaphysaire des os, mais que l'entraînement fractionné favorise particulièrement la croissance de l'os cortical au détriment de l'os trabéculaire dans l'ulna. D'autre part, la comparaison des effets de la course continue et de l'entraînement fractionné sur le tibia montre que l'entraînement fractionné améliore la maturation des ostéocytes et réduit leur apoptose grâce à l'activation des voies d'autophagie, ce qui stimule la formation osseuse. Ainsi, l'entraînement fractionné pourrait être une thérapie non médicamenteuse efficace contre la dégénérescence osseuse et représente un modèle pertinent pour étudier la mécanotransduction des ostéocytes dans de futures recherches.

Mots clés : HIIT, entraînement, tissus osseux, ostéocyte

Multi-scale analysis of the effect of different running modalities on different anatomical bone sites.

The effects of running on bone tissue depend on the intensity, type, and frequency of the mechanical loads applied. While running can be beneficial under certain conditions, it may become detrimental to bone tissue at high intensity, and there is no clear consensus on the best modality to promote osteogenesis. This thesis compares the effects of three running modalities (high-intensity interval training, continuous running, and a combination of the two) on the morphological, microarchitectural, and cellular parameters of Wistar rat bones. The results show that all modalities lead to bone adaptation, with an increase in the diaphyseal diameter of the bones. However, interval training particularly promotes cortical bone growth at the expense of trabecular bone in the ulna. Furthermore, the comparison of the effects of continuous running and interval training on the tibia shows that interval training improves osteocyte maturation and reduces their apoptosis by activating autophagy pathways, thereby stimulating bone formation. Thus, interval training could be an effective non-drug therapy against bone degeneration and represents a relevant model for studying osteocyte mechanotransduction in future research.

Keywords : HIIT, training, bone tissue, osteocyte