



**UNIVERSITÉ
D'ORLÉANS**



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
LABORATOIRE**

THÈSE présentée par :

Eric LESPESSAILLES

soutenue le : **20 Janvier 2009**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences et techniques des activités physiques et sportives. Filière biologie et santé.

Effets sur le tissu osseux (microarchitecture, densitométrie, biomécanique et remodelage) et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique chez la rate ovariectomisée

THÈSE dirigée par :
Daniel COURTEIX

Professeur – Université de Clermont-Ferrand II

RAPPORTEURS :
Bernard CORTET
Christian ROUX

Professeur – Hôpital universitaire de Lille
Professeur – Hôpital universitaire de Paris-Cochin

JURY

Nicola FAZZALARI
Daniel COURTEIX
Christelle JAFFRÉ
Patrice FARDELLONE
Bernard CORTET
Christian ROUX

Professeur – Université d'Adélaïde – Président
Professeur – Université de Clermont-Ferrand II
Maître de conférences – Université d'Orléans
Professeur – Hôpital universitaire d'Amiens
Professeur – Hôpital universitaire de Lille
Professeur – Hôpital universitaire de Paris-Cochin



**UNIVERSITÉ
D'ORLÉANS**



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
LABORATOIRE**

THÈSE présentée par :

Eric LESPESSAILLES

soutenue le : **20 Janvier 2009**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences et techniques des activités physiques et sportives. Filière biologie et santé.

Effets sur le tissu osseux (microarchitecture, densitométrie, biomécanique et remodelage) et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique chez la rate ovariectomisée

THÈSE dirigée par :
Daniel COURTEIX

Professeur – Université de Clermont-Ferrand II

RAPPORTEURS :
Bernard CORTET
Christian ROUX

Professeur – Hôpital universitaire de Lille
Professeur – Hôpital universitaire de Paris-Cochin

JURY

Nicola FAZZALARI
Daniel COURTEIX
Christelle JAFFRÉ
Patrice FARDELLONE
Bernard CORTET
Christian ROUX

Professeur – Université d'Adélaïde – Président
Professeur – Université de Clermont-Ferrand II
Maître de conférences – Université d'Orléans
Professeur – Hôpital universitaire d'Amiens
Professeur – Hôpital universitaire de Lille
Professeur – Hôpital universitaire de Paris-Cochin

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères s'adressent tout particulièrement à mon directeur de recherche, le Professeur **Daniel Courteix**, Université de Clermont-Ferrand II. Je le remercie pour sa confiance en moi, la qualité de ses conseils scientifiques lors des moments clés du déroulement de ce travail. Je ne doute pas que m'ayant donné le goût d'étudier les effets de l'exercice physique sur le tissu osseux nous puissions continuer en dépit de son éloignement d'Orléans une collaboration scientifique fructueuse.

Je souhaite exprimer également ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de recherche, Melle **Christelle Jaffré**, maître de conférence à l'UFR STAPS d'Orléans. Melle Christelle Jaffré m'a apporté une aide constante dans les moments faciles comme les plus difficiles de la gestion de ce travail. Sa compétence dans le domaine de l'expérimentation animale a été très précieuse.

Au Docteur **Claude-Laurent Benhamou**, directeur de l'Unité Inserm U 658 d'Orléans « *CTI - Caractérisation du tissu osseux par imagerie : techniques et applications* », chef du Service de Rhumatologie d'Orléans, je souhaite exprimer ma très sincère et profonde reconnaissance. Nous partageons depuis plusieurs années de belles aventures scientifiques et humaines dans lesquelles il a su m'entraîner. Véritable guide scientifique dans le domaine de l'ostéoporose, Laurent Benhamou a contribué de façon essentielle au développement chez moi du goût pour la recherche médicale. Qu'il trouve là un témoignage modeste de ma reconnaissance et qu'il soit remercié de l'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mes sincères remerciements vont bien sûr aux membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail. A Monsieur le Professeur **Christian Roux**, Hôpital Universitaire de Paris Cochin, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de rapporter ce travail. Je lui adresse ma respectueuse et très sincère considération, en n'oubliant pas qu'il a lui aussi su développer chez moi l'intérêt pour l'étude de l'ostéoporose et de ses méthodes d'investigation. Ma très sincère et profonde reconnaissance s'adresse également au Professeur **Bernard Cortet** de l'Hôpital Universitaire de Lille, qui a accepté de rapporter ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur **Patrice Fardellone** de l'Hôpital Universitaire d'Amiens, pour avoir accepté d'être membre du jury. Je le prie d'accepter ma reconnaissance ainsi que mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur **Nick Fazzalari**, Professeur à l'Université d'Adelaïde, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma haute considération et ma profonde gratitude.

Je remercie également très vivement Melle **Hélène Beaupied**, M. **Eric Dolléans**, M. **Arnaud Marchadier**, M. **Pierre Nanyan**, pour leurs aides, leurs soutiens, leurs conseils dans la réalisation de ce travail au sein du laboratoire.

Ma reconnaissance s'adresse également à Mme **Isabelle Marty**, Mme **Anne-Marie Vigneron** et Mme **Cécile Bourdias** (Novartis Pharma France) qui ont cru en mes capacités à mener à bien ce projet et qui m'ont permis de financer la réalisation de ce travail. Je souhaite leur exprimer à chacune mes plus sincères remerciements.

Un grand merci à **Domitelle Le Guin**, **Claude Navarro** et **Sylvie Renson**, pour l'aide à la finalisation de ce travail. Merci pour leur disponibilité, leur gentillesse, leur soutien.

Merci à l'ensemble du personnel de l'IPROS, du Service de Rhumatologie pour leur soutien, leur bienveillance et la bonne ambiance dans laquelle nous travaillons.

Je tiens à remercier également mes collègues rhumatologues, **Michel Bardet**, **François Caplan**, **Christine Chappard**, **Anca Corondan**, **Sylvie Loiseau-Peres** et **Stéphanie Rist** de m'avoir soutenu directement ou indirectement en me permettant aux moments cruciaux de la réalisation de ce travail de me libérer des contraintes quotidiennes de ma fonction de Praticien Hospitalier.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien constant et l'amour et l'affection que me portent ma femme **Corinne**, ma mère, **Michelle** et mes filles **Morgane** et **Clara**. Merci d'avoir accepté que j'empiète sur mon temps de loisir et de vie familiale pour que ce travail aboutisse ; veuillez trouver ici un tout petit témoignage de l'amour immense que je vous porte. A ma famille un grand merci et toute mon affection.

A mes ami(e)s, qu'ils comprennent a posteriori pourquoi j'ai délaissé quelque peu les matches de rugby, les boîtes de jazz, les circuits et dégustations œnologiques... ce n'est que parties remises.

Sommaire

1. Introduction

2. Ostéoporose

2.1. Définition

2.2. Incidence

2.3. Coût socio-économique

2.4. Physiopathologie

2.4.1. L'os cortical

2.4.2. L'os trabéculaire

2.4.3. Le tissu osseux

2.4.4. Les cellules osseuses

2.4.4.1. Les ostéoblastes

2.4.4.2. Les cellules bordantes

2.4.4.3. Les ostéocytes

2.4.4.4. Les ostéoclastes

2.4.5. Le processus de remodelage osseux

3. Stratégies de prise en charge de l'ostéoporose post-ménopausique

3.1. Généralités

3.2. Agents thérapeutiques utilisés dans l'ostéoporose post-ménopausique

3.2.1. Agents antirésorbeurs

3.2.1.1. Traitement hormonal de la ménopause

3.2.1.2. Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes

3.2.1.3. Calcitonine

3.2.1.4. Calcium et vitamine D

3.2.1.5. Les bisphosphonates

3.2.1.6. L'acide zolédronique

3.2.2. Agents ostéoformateurs

3.2.2.1. La PTH

3.2.2.2. Le ranélate de strontium

3.3. Approches non pharmacologiques dans l'ostéoporose post-ménopausique

3.3.1. Conseils alimentaires

3.3.2. Prévention des chutes

3.3.3. Exercice physique

3.3.3.1. Généralités

3.3.3.2. Exercice de course sur tapis roulant : effet osseux chez le rat

3.3.3.3. Synergie entre les effets de l'exercice et les thérapies reminéralisantes : comparaison des effets chez la rate et chez la femme

3.3.3.4. Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis ?

4. Hypothèses et objectifs

5. Matériels et méthodes

5.1. Animaux

5.1.1. Traitement des animaux

5.1.2. Protocole d'entraînement sur tapis roulant

5.1.3. Dispositif du tapis roulant

5.2. Densitométrie

5.2.1. Dispositif

5.2.2. Protocole de mesure

5.2.3. Reproductibilité de la mesure

5.3. Microtomographie à rayons X

5.3.1. Dispositif

5.3.2. Protocole de mesure, les points critiques

5.3.3. Paramètres mesurés

5.3.4. Reproductibilité

5.4. Biomécanique

5.4.1. Dispositif

5.4.2. Protocole de mesure

5.4.3. Paramètres mesurés

5.5. Dosage des paramètres du remodelage osseux, des lipides et du TNF- α

5.5.1. Dosage des marqueurs biochimiques du remodelage osseux

5.5.2. Evaluation de l'équilibre entre les processus de formation et de résorption osseuse : calcul de l'index de découplage osseux

5.5.3. Paramètres lipidiques

5.5.4. Dosage plasmatique de la cytokine TNF- α

5.6 Méthodologie statistique

6. Etudes

6.1 Etude 1

6.1.1 But de l'étude

6.1.2 Rationnel de l'étude

6.1.3 Matériels et méthodes

6.1.4 Résultats

6.1.4.1 *Paramètres anthropométriques et densitométriques*

6.1.4.2 *Microarchitecture trabéculaire osseuse par analyse 3D μ CT*

6.1.4.3 *Propriétés biomécaniques*

6.1.4.4 *Remodelage osseux*

6.1.5 Discussion

6.2 Etude 2

6.2.1 But de l'étude

6.2.2 Rationnel de l'étude

6.2.3 Matériels et méthodes

6.2.4 Résultats

6.2.4.1 *Paramètres anthropométriques et densitométriques*

6.2.4.2 *Profil lipidique*

6.2.4.3 *Cytokine TNF- α plasmatique*

6.2.5 Discussion

7. Conclusion et perspectives

8. Références

1. Introduction

L'ostéoporose constitue un problème majeur dans le domaine de la santé. L'expression clinique de cette affection qui fragilise les os est la survenue de fractures. A l'échelle du monde, ces fractures affectent des millions d'individus. Du fait du vieillissement de la population, la prévalence de l'ostéoporose et le nombre de fractures vont aller croissant. Ainsi, pour ce qui concerne la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF), son nombre était estimé en 1990 à 1.26 millions, il pourrait être de 2.6 millions en 2025 et 4.5 millions en 2050. Les fractures ostéoporotiques ont de nombreuses conséquences en termes de morbidité, d'altération de la qualité de vie et de mortalité. Dans les suites des FESF en particulier, la mortalité est plusieurs fois supérieure à celle observée dans la population générale.

De nombreux traitements sont capables de prévenir et de réduire le risque de fractures ostéoporotiques chez des sujets à haut risque. Des interventions non pharmacologiques (nutrition, exercice physique) ont également été proposées afin de réduire le risque de fracture.

Il est bien établi que l'os est un tissu sensible aux contraintes mécaniques. La réponse du tissu osseux aux déformations relatives qu'il subit se traduit par une augmentation de la formation osseuse [1-2-3]. Les bisphosphonates quant à eux ont un mode d'action fondé essentiellement sur leur capacité à inhiber la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes et à réduire le remodelage osseux [4-5-6].

Il est donc concevable en se fondant sur les mécanismes d'action d'une part de l'exercice physique et d'autre part des bisphosphonates, d'imaginer que la combinaison des deux actions thérapeutiques puisse avoir des effets supérieurs sur la masse osseuse et la résistance osseuse que chacune des interventions thérapeutiques appliquées séparément.

Le but du présent travail a été d'étudier à partir du modèle de la rate mature ovariectomisée les effets séparés et combinés de l'exercice physique (course sur tapis roulant) et du zoledronate (une seule injection) sur le contenu minéral osseux, le remodelage osseux, la résistance osseuse, la microarchitecture osseuse caractérisée par μ CT et le métabolisme lipidique.

2. Ostéoporose

2.1. Définition

L'ostéoporose est une maladie métabolique osseuse fréquente caractérisée par une faible masse osseuse et par des détériorations microarchitecturales du tissu osseux conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse et à un risque de fracture, en particulier à la hanche, au rachis et au poignet.

L'espérance de vie progressant, on peut penser que l'ostéoporose post-ménopausique qui est la forme la plus commune d'ostéoporose va être de plus en plus répandue dans le

futur. On estime que plus de 40 millions de citoyens des Etats-Unis ont une ostéoporose ou une ostéopénie, la majorité étant des femmes de plus de 50 ans [7].

En Europe, on estime que plus d'une femme sur 3 ayant plus de 50 ans est ostéoporotique en se fondant sur la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [8-9]. En France, 25 % des femmes de 65 ans et 50 % des femmes de 80 ans présenteraient une ostéoporose, selon le rapport du Groupe Technique National de Définition des Objectifs [10].

2.2. Incidence

L'ostéoporose est la cause la plus importante de fractures chez les sujets âgés ; les fractures ostéoporotiques sont responsables de phénomènes douloureux, de handicap, d'une réduction de la mobilité, de déformation, de perte de taille et de cyphose (pour les fractures vertébrales), de dépression, de réduction de la qualité de la vie, de perte d'indépendance et d'une surmortalité [11-12-13].

Les fractures ostéoporotiques les plus fréquentes sont celles des vertèbres, du poignet et de l'extrémité supérieure du fémur [14]. L'incidence de la fracture de hanche, qui est la fracture ostéoporotique la plus grave, augmente actuellement de 3 % par an dans la plupart des pays du monde [11]. A l'échelle de l'Union Européenne, on estime que le nombre de fractures de hanche par an pourrait passer de 414 000 à 972 000 dans les 50 ans qui viennent [15]. En France, on estime à plus de 50000 le nombre actuel de fractures de l'extrémité supérieure du fémur [16], et au moins à 35 000 celui des fractures du poignet [17]. Une étude estime que pour la France, le nombre de fracture de hanche annuel pourrait être en 2050 de 150 000 [16]. En 1990, entre 40000 et 65000 sujets auraient eu des fractures vertébrales [18]. La prévalence des fractures vertébrales chez les femmes françaises âgées de plus de 75 ans est de 22 % [19].

2.3. Coût socio-économique

Les fractures ostéoporotiques contribuent, de façon substantielle au coût économique de la santé. En 2000, une étude européenne a estimé le coût total direct des fractures ostéoporotiques à 31.7 billions d'euros. Les experts prévoient, du fait du vieillissement de la population, que ce coût pourrait être de 76.7 billions d'euros en 2050 [20]. Les dépenses en soins de santé attribuables aux fractures ostéoporotiques aux Etats Unis en 1995 ont été estimées à 13.8 billions de dollars, approximativement 80 % de cette somme étaient dévolus à la prise en charge des femmes qui étaient pour la plupart ménopausées. Les fractures de l'extrémité supérieure du fémur représentaient à elles seules approximativement +63 % du coût total de santé attribué aux fractures ostéoporotiques [21].

2.4. Physiopathologie

2.4.1. L'os cortical (compact), qui constitue environ 80 % du squelette, est surtout présent au niveau de la diaphyse des os longs (fémur, humérus). Cet os cortical est formé par l'association d'unités de base appelées ostéons. L'ostéon est composé de lamelles concentriques au canal de Havers qui renferme les vaisseaux sanguins nourriciers pour l'os. Les ostéons, de structure cylindrique, sont reliés entre eux par des lamelles interstitielles formées par les restes d'ostéons antérieurs. Les canaux de Volkmann constituent un réseau centré par des vaisseaux qui font le lien avec les canaux de Havers et assurent donc la vascularisation de l'os cortical, du périoste à la cavité médullaire. Les canaux de Volkmann sont dépourvus d'entourage lamellaire concentrique. Les ostéons sont des formations tubulaires d'une longueur médiane de 2 mm et d'un diamètre de 200 µm. Les ostéons, dont la taille peut atteindre jusqu'à 8 mm de longueur, sont faits de lamelles concentriques entre lesquelles des ostéocytes sont situés. Les ostéons sont séparés les uns des autres par des lignes cimentantes périostéoniques. Le grand axe des ostéons corticaux des os longs est parallèle au grand axe des os eux mêmes.

2.4.2. L'os trabéculaire ou os spongieux est présent au sein des épiphyses des os longs, des os plats et courts. Le tissu trabéculaire est formé de travées osseuses anastomosées entre elles, formant un réseau tri-dimensionnel. L'os trabéculaire constitue environ 20 % du squelette osseux de l'adulte. La disposition des plateaux et des poutres de l'os trabéculaire répond à une orientation prédominante s'accordant aux lignes de forces soumises aux os, particulièrement bien visibles à des sites osseux comme la vertèbre, l'extrémité supérieure du fémur et le calcaneum.

Les surfaces d'échange de l'os trabéculaire sont 8 à 10 fois plus grandes que celles de l'os cortical [22]. L'activité métabolique de l'os étant liée de façon prédominante à des phénomènes reposant sur les surfaces disponibles pour le remodelage osseux, il est bien compréhensible que les phénomènes ostéoporotiques vont être plus précoces et plus marqués sur les sites osseux riches en os trabéculaire.

2.4.3. Le tissu osseux

Le tissu osseux est constitué de cellules (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes et cellules bordantes), d'une matrice extracellulaire contenant une substance fondamentale glycoprotéique et de fibrilles de collagène. Ces fibres de collagène servent de matrice pour le dépôt du cristal osseux.

- ❖ Composante minérale : la matrice extra-cellulaire est très fortement minéralisée, la quantité de minéral rend compte des 2/3 environ du poids total de l'os sec. Sur le plan chimique, le microcristal est constitué par de l'Hydroxyapatite impur (contient également des ions

carbonates, citrates, magnésium, sodium, fluor et strontium). Cette minéralisation de la matrice extra-cellulaire confère à l'os ses propriétés de solidité, de rigidité mais aussi d'élasticité.

- ❖ Composante organique : 35 % du poids sec de l'os sont dus à cette matrice organique. Le collagène de type I est la protéine la plus abondante dans cette matrice. D'autres protéines non collagéniques dont le rôle n'est encore qu'imparfaitement élucidé, sont également présentes. Parmi celles ci, les plus abondantes sont : l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse.

2.4.4. Les cellules osseuses

2.4.4.1. Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse et du dépôt de la matrice osseuse. Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules précurseurs mesenchymateuses. Les ostéoblastes forment à la surface de l'os une structure de type épithélioïde. Les jonctions communicantes de type gap formées par les connexions contrôlent l'activité fonctionnelle des ostéoblastes [23], d'autres molécules d'adhérence intercellulaires, comme la N-cadherine sont impliquées dans l'induction des gènes de différenciation [24-25]. Les ostéoblastes secrètent la matrice organique osseuse qui secondairement en site extracellulaire sera calcifiée. De nombreuses hormones et cytokines influencent in vitro les ostéoblastes. Leurs rôles individuels, in vivo n'ont pas encore été clairement élucidés. Les messagers de cellule à cellule qui stimulent ou inhibent la résorption osseuse ou la formation osseuse seraient médiés par ces cytokines ou hormones en réponse aux contraintes induites par les stimulations mécaniques exercées sur l'os.

2.4.4.2. Les cellules bordantes

Une fois la matrice osseuse synthétisée et minéralisée, la majorité des cellules s'aplatissent et bordent la surface de l'os. On parle alors de cellules bordantes ou d'ostéoblastes au repos. Les ostéoblastes actifs et au repos forment une membrane à la surface de l'os qui pourrait constituer en quelque sorte une barrière sang-os limitant un « milieu intérieur osseux » [26].

2.4.4.3. Les ostéocytes

Une partie des ostéoblastes subissent un phénomène d'apoptose. Les autres ostéoblastes vont se laisser inclure dans la matrice qu'ils ont

synthétisée devenant alors des ostéocytes. Ces ostéocytes communiquent entre eux et avec les cellules bordantes de la surface endostéale [27]. En dépit du fait que les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses dans l'os, leurs fonctions sont encore peu connues [28]. Les ostéocytes sont situés dans des lacunes et sont connectés entre eux par un réseau d'extensions cytoplasmiques présentes dans des canalicules. Les lacunes et les canalicules contiennent le fluide osseux qui est au contact immédiat du tissu osseux. Les ostéocytes influenceraient la composition du fluide osseux. Ce dernier étant relié au fluide extra-cellulaire et donc au sang, les ostéocytes pourraient jouer un rôle dans la régulation des minéraux plasmatiques et en particulier du calcium. Du fait de leur situation dans le tissu osseux, les ostéocytes sont bien placés pour répondre aux contraintes mécaniques. Il est admis aujourd'hui que les ostéocytes joueraient un rôle clé dans la transformation des charges mécaniques perçues en variation de la formation et de la résorption osseuse [29-30].

2.4.4.4. Les ostéoclastes

L'ostéoclaste est la cellule responsable de la résorption osseuse [31]. L'ostéoclaste est d'origine hématopoïétique et la différenciation de prémonocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moelle osseuse. Cette spécification se fait sous l'influence de facteurs de transcription et de facteurs de croissance. Parmi eux, trois sont essentiels M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), RANKL L ligand de RANK (récepteur pour l'activation du facteur de transcription NF Kappa B) et son antagoniste l'ostéoprotégérine (OPG). C'est le rapport quantitatif entre ces deux protéines solubles antagonistes (RANKL et OPG) qui détermine le nombre d'ostéoclastes formés le long des surfaces osseuses, ainsi que leur activité [32]. L'activité des ostéoclastes alterne des phases de résorption créant des lacunes osseuses et des phases de migration sur la surface osseuse. Le rôle de l'apoptose dans la régulation de la résorption osseuse via le nombre d'ostéoclastes est maintenant clairement établi et l'activité antirésorbante des estrogènes semble s'exercer surtout par l'induction de l'apoptose ostéoclastique via l'activation du TGF β (Transforming Growth Factor β) [33]. Les bisphosphonates semblent agir principalement par l'induction de l'apoptose des ostéoclastes, leur spécificité étant liée à leur pharmacocinétique particulière qui permet leur accumulation au niveau des surfaces osseuses, mais par un mécanisme différent de celui des estrogènes et impliquant l'inhibition du métabolisme du mévalonate [34].

2.4.5. Le processus de remodelage osseux

L'os est un tissu dynamique, vivant, qui tout au long de la vie est le siège d'un remodelage dont le but est non seulement de maintenir l'homéostasie calcique mais aussi de réparer les microdommages osseux et donc de maintenir une bonne qualité osseuse. Ce remodelage de l'os met en jeu des fonctions cellulaires s'efforçant d'obtenir une résorption de l'os vieilli (par les ostéoclastes) et une formation d'os jeune (par les ostéoblastes) dans le cadre d'une séquence coordonnée appelé couplage osseux [35]. Ce cycle de remodelage osseux débute par une phase d'activation caractérisée par la différenciation des ostéoclastes, suivie d'une phase de résorption de la matrice par les ostéoclastes. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, puis les précurseurs des ostéoblastes se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice comblant la lacune de résorption.

Le processus de couplage osseux est perçu comme une réponse à type de formation osseuse qui résulterait d'une résorption osseuse préalable, avec une quantité d'os formé équivalente à celle résorbée [36]. On parle de découplage osseux quand l'équilibre entre la formation et la résorption est dissocié, ce qui peut conduire à l'ostéoporose. La diminution de production des stéroïdes sexuels ovariens chez la femme après la ménopause conduit à une accélération du remodelage osseux avec prédominance de la résorption sur la formation osseuse [37]. Du fait de ce phénomène, la balance calcique négative conduit à une perte d'os, à une augmentation de la fragilité osseuse et donc à une augmentation du risque de fracture [38]. Une approche thérapeutique rationnelle pour lutter contre ce phénomène est l'utilisation d'agents luttant contre la résorption osseuse, comme les bisphosphonates. Cependant, ces agents antirésorbeurs génèrent également une inhibition de la formation osseuse du fait du couplage entre les événements cellulaires [39].

3. Stratégies de prise en charge de l'ostéoporose post-ménopausique

3.1. Généralités

L'objectif principal des stratégies d'intervention thérapeutique dans l'ostéoporose post-ménopausique est la réduction de la fréquence des fractures vertébrales et non vertébrales. Les stratégies de prise en charge de l'ostéoporose post-ménopausique [40-41] reposent : d'une part sur des approches non pharmacologiques dont le but est la promotion de la prévention de la maladie et la réduction du risque fracture et d'autre part sur l'utilisation d'agents thérapeutiques dont certains vont freiner la perte osseuse (agents antirésorbeurs), d'autres exerçant une action de formation osseuse (agents anaboliques).

3.2. Agents thérapeutiques utilisés dans l'ostéoporose post-ménopausique

3.2.1. Agents antirésorbeurs

3.2.1.1. Traitement hormonal de la ménopause

Le traitement hormonal de la ménopause (THM) abolit la perte osseuse qui survient après la ménopause et réduit la fréquence des fractures ostéoporotiques (jusqu'à 50 % pour le risque de fracture vertébrale et d'environ 30 % pour le risque de fracture non vertébrale [42-43]. Cet effet bénéfique est le résultat d'une part de l'action des estrogènes sur la densité minérale osseuse sur tous les sites osseux mais aussi probablement sur une amélioration de la dextérité et la mobilité et par la même d'une réduction du risque de chute. Très récemment encore le THM était considéré être le traitement de première ligne pour la prise en charge préventive de l'ostéoporose post-ménopausique. Cette opinion est désormais révolue du fait principalement des résultats de deux études cliniques d'envergure ayant rapporté l'association entre THM et augmentation du risque de cancer du sein [44-45] mais aussi de maladies cardiovasculaires [45]. De part le monde, désormais, de nombreuses administrations et services gouvernementaux chargés de l'application des règlements en matière de santé publique, recommandent l'utilisation du THM pour des périodes de temps les plus courts possibles, aux doses les plus faibles possibles pour l'interruption des symptômes de la ménopause comme les bouffées de chaleur [40-46-47]. Le THM n'est donc plus une option thérapeutique validée pour son utilisation au long cours dans le cadre de la prévention ou du traitement de l'ostéoporose post-ménopausique. Son usage doit être fondé désormais sur l'évaluation attentive de l'équilibre des bénéfices et des risques à l'échelle individuelle de la patiente.

3.2.1.2. Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes

Les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs aux Estrogènes (SERMs) ont été développés pour pallier les difficultés potentielles associées à l'usage du THM. En effet, ces composés ont d'une part un effet estrogène-like sur l'os

et d'autre part des effets antagonistes des estrogènes sur le tissu mammaire [48]. Le raloxifène est à l'heure actuelle le seul SERM disponible et ayant l'autorisation de mise sur le marché pour la prise en charge de l'ostéoporose. Il a été montré que le raloxifène augmentait la DMO au rachis lombaire et à l'extrémité supérieure du fémur mais aussi réduisait le risque de survenue de fracture vertébrale chez des femmes ayant une ostéoporose post-ménopausique [49]. Chez ces mêmes femmes, le risque de développer une néoplasie mammaire était diminué (analyse posthoc [50]). En revanche, il a été montré que l'efficacité du raloxifène était au moins aussi efficace que celle du tamoxifène (produit de référence) pour réduire le risque de cancer du sein invasif et diminuait le risque thrombo-embolique et de cataracte chez des femmes à risque augmenté à 5 ans de cancer du sein [51]. En ce qui concerne l'efficacité du traitement par le raloxifène dans la prévention des fractures non vertébrales, la démonstration n'était fournie que dans une analyse post hoc dans un sous groupe de femmes avec des fractures ostéoporotiques sévères en début d'étude [52].

3.2.1.3. Calcitonine

La calcitonine est une hormone polypeptidique endogène qui inhibe partiellement la résorption osseuse en bloquant l'activité des ostéoclastes. La calcitonine nasale et sous cutanée n'a pas reçu d'AMM en France mais est approuvée par la FDA. En effet, il a été montré qu'un traitement par calcitonine nasale à la dose de 200 UI par jour réduisait l'incidence des fractures vertébrales (mais pas des fractures non vertébrales). Cet unique essai randomisé n'ayant pas une méthodologie parfaite, l'enthousiasme envers ce traitement est resté limité [53]. Des études contrôlées versus placebo testant la calcitonine nasale ont montré une diminution des douleurs associées aux nouvelles fractures vertébrales ; cependant, il est actuellement recommandé de traiter l'ostéoporose par des agents thérapeutiques plus puissants et de prendre en charge la douleur séparément [54].

3.2.1.4. Calcium et vitamine D

La supplémentation calcique devrait être donnée de façon complémentaire à tous les agents thérapeutiques pour le traitement des femmes ostéoporotiques. Le calcium ralentit en effet la perte osseuse, en particulier chez les femmes âgées et celles qui ont des apports limités. Une augmentation des apports calciques réduit l'hyperparathyroïdie associée au vieillissement et peut augmenter la minéralisation de l'os nouvellement

formé. Une métaanalyse récente incluant 15 essais interventionnels avec du calcium chez des femmes ménopausées ostéoporotiques a montré un gain de près de 2 % au rachis en DMO après deux ans. Cependant, la réduction du risque de fracture vertébrale et non vertébrale dans cette métaanalyse n'atteignait pas la limite statistique de significativité [55]. Les recommandations aux Etats-Unis sont d'obtenir des apports calciques totaux de 1200 à 1500 g par jour (à travers le régime alimentaire, les suppléments ou les deux) pour toutes les femmes ménopausées [56].

La vitamine D est essentielle à la bonne santé osseuse. Elle favorise l'absorption digestive calcique et la minéralisation osseuse. L'insuffisance vitaminique D est une problématique croissante ; deux patients sur trois victimes d'une fracture de l'extrémité supérieure du fémur sont classées déficitaires en vitamine D (taux sérique en vitamine D en dessous de 15 ng/ml soit inférieur à 37.4 mmole/litre [57].

Les personnes âgées atteintes de maladies chroniques nécessitant des aides au domicile sont particulièrement sensibles à la carence en vitamine D du fait d'une exposition solaire insuffisante. Une vaste étude a montré chez des patientes institutionnalisées recevant aléatoirement du calcium et de la vitamine D ou un placebo que la supplémentation vitamino-calcique réduisait de 33 % le risque de fracture de hanche [58]. Dans une autre étude, un traitement par une dose orale de 100 000 UI de vitamine D3 tous les quatre mois réduisait le risque de fracture non vertébrale de presque un tiers chez des personnes âgées capables de marcher [59]. Dans une étude menée en Grande Bretagne, l'administration quotidienne chez des hommes et femmes âgées de citrate de calcium 500 mg et de vitamine D 700 UI réduisait le risque de fracture non vertébrale [60]. Des données solides ont montré qu'une supplémentation en vitamine D favorise le renforcement musculaire et réduit le risque de chutes [61].

3.2.1.5. Les bisphosphonates

Structure chimique

Les bisphosphonates sont des composés chimiques dont la première synthèse fût réalisée au XIXe siècle par des chimistes allemands. C'est à la fin des années soixante que leur rôle de modulateur du calcium et du métabolisme osseux fût reconnu [62-63]. Initialement développés pour leur capacité à inhiber la croissance et dissoudre les cristaux de calcium, leur action suppressive sur la résorption osseuse fût à l'origine de leur

développement par l'industrie pharmaceutique. Sur le plan chimique, les bisphosphonates sont caractérisés par leur chaîne phosphate-carbone-phosphate (P – C – P) résistante à l'hydrolyse enzymatique. Cette liaison P – C – P leur confère leur analogie aux pyrophosphates (P – O – P). Cette structure permet un grand nombre de variations de ces composés soit en variant les deux chaînes latérales des atomes de carbone, soit par esterification des groupes phosphonates (**figure 1**).

Il n'a pas été établi de relation claire entre effet et structure. Cependant, il apparaît que la liaison au minéral osseux soit due à la structure P-C-P alors que l'activité antirésorptive soit influencée d'une part par la chaîne P-C-P mais aussi par les chaînes latérales et donc par la structure tridimensionnelle de la structure du bisphosphonate. En effet, des stéréoisomères de même structure chimique pourraient avoir des différences d'activité dans un rapport de 1 à 10 [64].

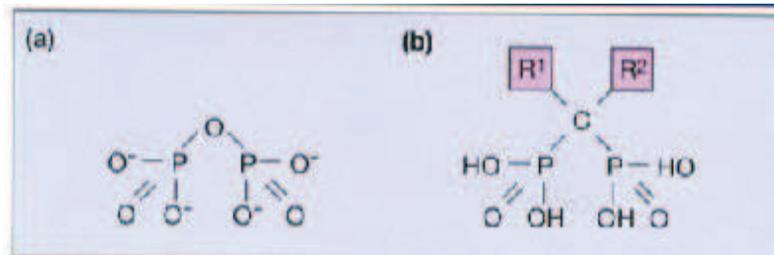


Figure 1 : Structure générale du pyrophosphate et des bisphosphonates

a : pyrophosphate

b : bisphosphonate, R1 et R2 sont des chaînes latérales qui déterminent l'affinité pour l'os du bisphosphonate considéré et sa capacité antirésorptive.

Actions

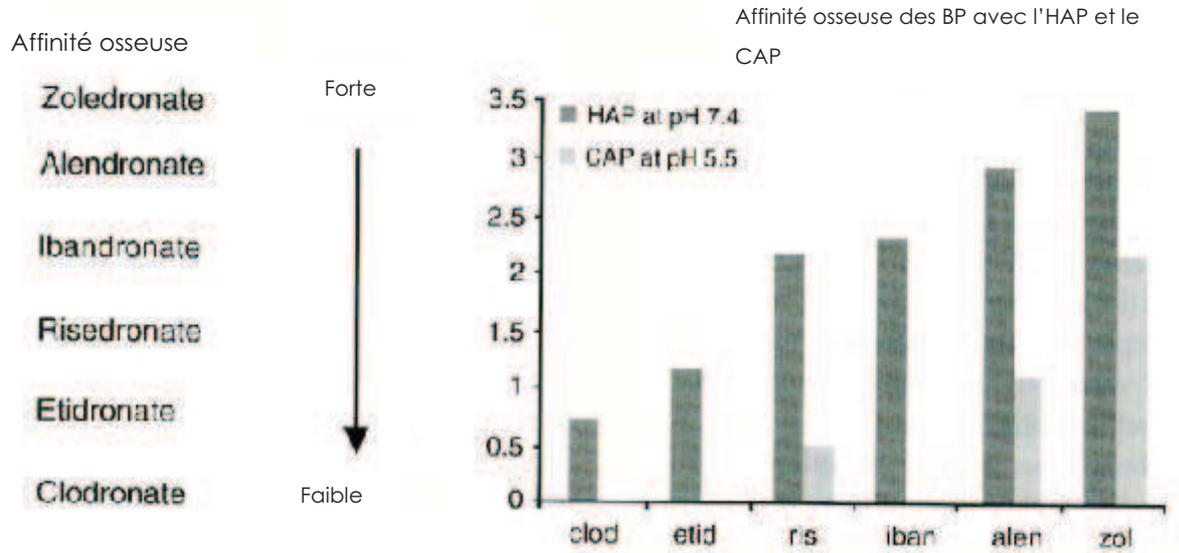
Les bisphosphonates ont une forte affinité pour les phosphates de calcium et se portent avec avidité à la surface de l'os, et en particulier dans les régions de remodelage actif. Cette affinité pour le minéral osseux est à la base de leur utilisation en tant que marqueurs du squelette osseux, d'inhibiteur des calcifications ectopiques et d'inhibiteur de la résorption osseuse. En effet, le principal effet des bisphosphonates pharmacologiquement actifs est l'inhibition de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes [65-66]. L'activité des bisphosphonates sur la résorption osseuse varie singulièrement d'un composé à l'autre (**figure 2 et 3**). Ainsi pour l'étidronate, la dose requise pour inhiber la résorption est

relativement élevée (au dessus d'1 mg/kg/jour par voie IV chez le rat). En revanche, certains composés ont été développés plus récemment dont la puissance par rapport à l'étidronate est jusqu'à 10000 fois supérieure sans pour autant être plus actif dans l'inhibition de la minéralisation dans des expérimentations animales. Cette relation de 1 à 10000 par exemple entre l'étidronate et le zolédronate, chez le rat, est d'un ordre 10 fois moindre chez l'homme [67]. Les bisphosphonates simples (ne contenant pas de dérivés nitrés), comme l'étidronate ou le clodronate, sont métabolisés en analogues de triphosphate adenosine cytotoxique-bisphosphonate qui s'accumulent dans les ostéoclastes et induisent leur apoptose [66]. Les bisphosphonates comportant des dérivés nitrés dans leur chaîne latérale (alendronate, ibandronate) (figure 4) ou contenant des substituants cycliques comme le risédronate et le zolédronate avec un anneau imidazole, sont internalisés dans les ostéoclastes actifs matures et altèrent la voie enzymatique du mévalonate, en inhibant la farnesyl pyrophosphate (FPP) synthase (figure 5). Cette inhibition conduit à la diminution de la formation des lipides isoprénoides comme les farnesyl et geranylgeranyl pyrophosphates. Ces composés sont nécessaires à la prenylation post-translationnelle des protéines (transfert des chaînes d'acide gras) incluant des protéines porteuses de GTP. Ces protéines sont importantes pour de nombreuses fonctions cellulaires comme l'assemblage du cytosquelette et les signaux intracellulaires. Ces fonctions cellulaires altérées conduisent à la réduction de l'activité ostéoclastique et la suppression de la résorption osseuse [66-68]. Les modes d'action des bisphosphonates ont fait l'objet de nombreuses mises au point [69-70].

Les bisphosphonates ou phosphonosulfates liés à une chaîne isoprène sont de puissants inhibiteurs de la squalène synthase et donc seraient de potentiels agents anticholestérolémiants chez l'animal [71].

Depuis plus de 30 ans, les bisphosphonates sont utilisés en clinique. Cependant, notre connaissance de leur relation pharmacocinétique et pharmacodynamique est encore incomplète du fait de difficultés techniques pour leur mesure dans les fluides biologiques [72]. La plupart des schémas posologiques des bisphosphonates ont été conçus de façon empirique en se fondant principalement sur des informations pharmacodynamiques qui peuvent être évaluées en mesurant les marqueurs biochimiques du remodelage osseux et par les mesures de la densité minérale osseuse.

Figure 2 : affinité osseuse des bisphosphonates



BP = bisphosphonates ; Clod = clodronate ; Etid = etidronate ; Ris = risedronate ; Iban = ibandronate ; Alen = alendronate ; Zol = zoledronate ; HAP = hydroxyapatite - Adapté de Nancollas et Col, Bone, 2006

Figure 3 : Inhibition de la FPP synthase par les bisphosphonates

rhFPP synthase activity
(% of control)

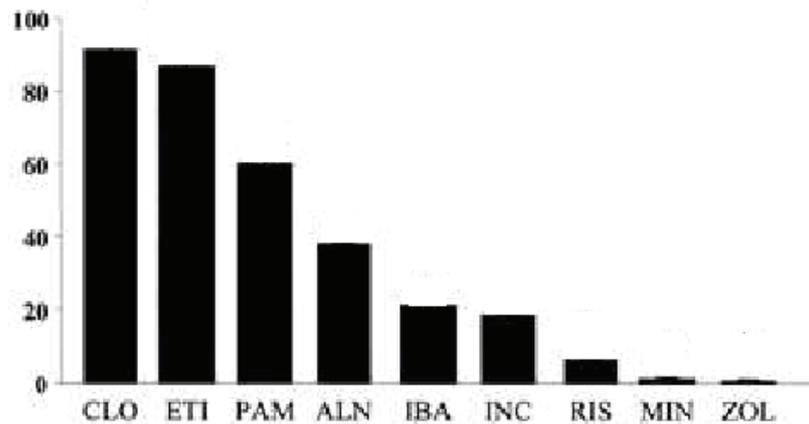


Figure 4 : Les bisphosphonates utilisés chez l'humain

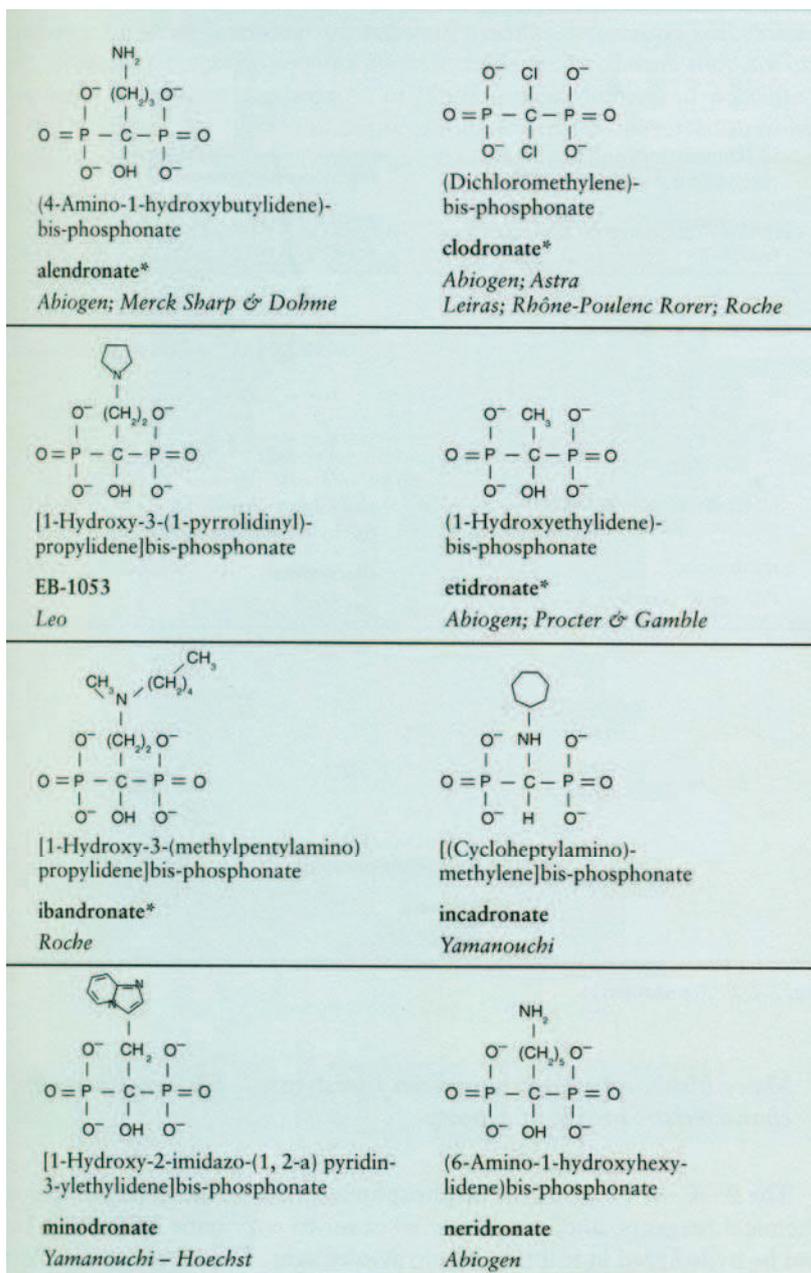
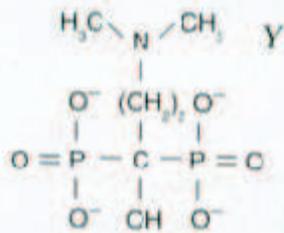


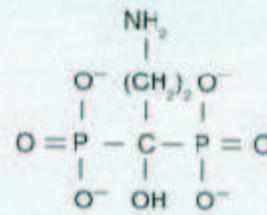
Figure 4 : les bisphosphonates utilisés chez l'humain (suite)



[3-(Dimethylamino)-1-hydroxypropylidene]bis-phosphonate

olpadronate

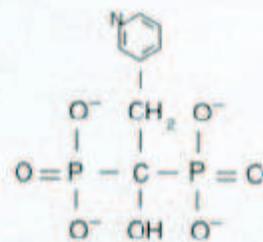
Gador



(3-Amino-1-hydroxypropylidene)bis-phosphonate

pamidronate*

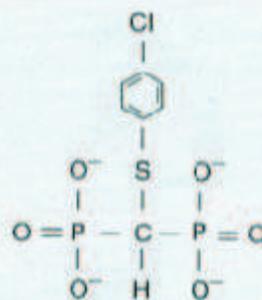
Gador; Novartis



[1-Hydroxy-2-(3-pyridinyl)ethylidene]bis-phosphonate

risedronate*

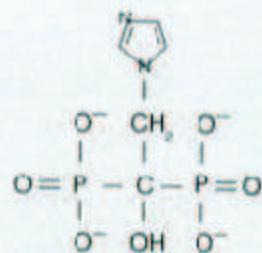
Procter & Gamble



[[4-Chlorophenyl]thio]methylene]bis-phosphonate

tiludronate*

Sanofi

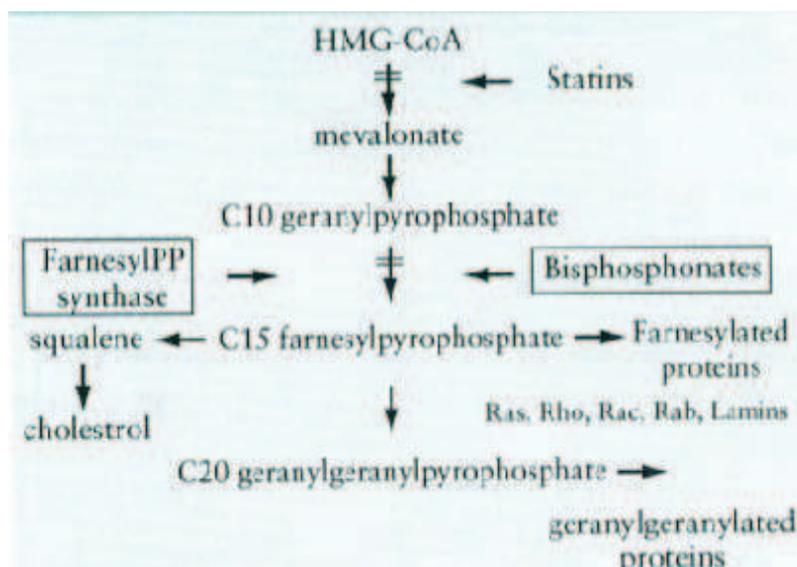


[1-Hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl)ethylidene]bis-phosphonate

zoledronate

Novartis

Figure 5 : Voie enzymatique du mévalonate



Bisphosphonates et métabolisme lipidique

Certains bisphosphonates comme le clodronate sont capables de générer un métabolite toxique pour l'ATP qui va s'accumuler dans le cytoplasme et conduire à l'apoptose des ostéoclastes en inhibant une enzyme mitochondriale l'ADP/ATP translocase [73]. En revanche, les amino BP n'ont pas la capacité de s'incorporer à l'ATP ; leur action est principalement liée à l'inhibition d'enzymes de la voie intracellulaire du mévalonate au sein de l'ostéoclaste. Des amino BP, comme l'ibandronate, inhibent puissamment la squalène synthase et la biosynthèse du cholestérol chez le rat [74]. L'alendronate et le pamidronate inhibent aussi la biosynthèse des stérols mais sans affecter cette enzyme, suggérant une possible inhibition de la voie mévalonate en amont de la squalène synthase [74]. D'autres BP ne contenant pas de groupe amine dans leur structure comme le clodronate et l'étidronate ne semblent pas interférer avec la biosynthèse intracellulaire des stérols. La principale cible enzymatique des amino BP est la FPP synthase, son inhibition conduisant à des perturbations fonctionnelles des ostéoclastes et par voie de conséquence à une réduction de la résorption osseuse. Parmi les BP, il a été montré que l'acide zoledronique avait un profil particulier de puissant inhibiteur de l'activité de la FPP synthase, en fait 70 fois plus puissant en comparaison du pamidronate, couplé à une forte affinité pour le minéral osseux [75]. Récemment, un effet notable des amino BP sur le métabolisme des lipides a été rapporté chez des femmes ostéoporotiques traitées par perfusion itérative de nérédronate [76] et chez

des patients pagétiques traités par pamidronate IV tous les trois mois [77]. Une étude in vitro sur des lignées cellulaires de prostate a montré que l'acide zoledronique pouvait inhiber la production de cholestérol [78]. Enfin, chez des patients ayant un myélome rampant, le traitement par acide zoledronique semble capable de modifier le profil lipidique dans le sens d'une amélioration de l'indice de risque d'athérosclérose [79].

3.2.1.6. L'acide zoledronique ou zoledronate (ZOL)

L'acide zoledronique appartient à la famille des bisphosphonates contenant un dérivé nitré. Parmi les bisphosphonates contenant une fonction aminée, le ZOL est le plus puissant si l'on en juge ses capacités de suppression de l'activité recombinante humaine de la FPPS [80].

L'ordre croissant de la puissance des bisphosphonates pour l'inhibition de la FPPS reflète fidèlement leur capacité à inhiber la résorption osseuse in vitro (pamidronate<alendronate<ibandronate<risédronate<zoledronate) comme l'ont démontré Dunford et coll [81] dans une étude s'intéressant à la puissance de plusieurs bisphosphonates avec groupement amine. Ainsi, une corrélation était trouvée entre la capacité du BP à inhiber in vitro la FPP synthase d'une part et d'autre part l'inhibition de la prenylation protéique dans des extraits de cellules libres et des ostéoclastes purifiés in vitro mais aussi la capacité à inhiber la résorption osseuse in vivo. L'ordre de puissance d'inhibition de la FPP synthase était étroitement apparié à l'ordre de la puissance antirésorptive [81].

Chez l'homme, il a été montré que le zoledronate était un puissant inhibiteur de la résorption osseuse pouvant être administré en intraveineux une fois par an [82]. Chez la femme ménopausée, le traitement par acide zoledronique 5 mg est associé à une augmentation de la DMO au rachis et à la hanche, à une réduction du remodelage osseux ainsi qu'à une réduction significative du risque de fracture vertébrale, de fracture de l'extrémité supérieure du fémur et des fractures non vertébrales [83]. Dans une étude menée chez des patients âgés, un traitement par l'acide zoledronique 5 mg dans les trois mois suivant la survenue d'une fracture de hanche à faible niveau d'énergie est associée à une diminution du taux de nouvelles fractures cliniques et à une amélioration de la survie [84].

Chez la rate ovariectomisée, l'acide zoledronique prévient la perte osseuse induite par la carence estrogénique aux vertèbres [85]. De plus, un effet prononcé sur la prévention de la réduction de l'amincissement de l'épaisseur des travées était montré [85]. Dans ce même travail où des rates

ovariectomisées ont été traitées pendant un an par l'acide zoledronique, les résultats suggéraient une diminution du remodelage osseux, une prévention des détériorations structurales et des modifications biomécaniques induites par l'ovariectomie [85]. Les effets d'un traitement par le zoledronate donné pendant un an à des rates adultes ostéopéniques ont fait l'objet d'un autre travail des mêmes auteurs [86]. Dans cette dernière étude, les rates recevaient pendant un an une injection sous cutanée hebdomadaire d'acide zoledronique (différentes doses). Les auteurs concluaient à l'efficacité du traitement pour préserver la masse osseuse, l'architecture et la résistance osseuse [86]. D'autres auteurs se sont intéressés à l'intérêt d'un traitement séquentiel chez la rate ovariectomisée, un traitement par zoledronate étant injecté après un traitement par PTH [87].

3.2.2. Agents ostéoformateurs

3.2.2.1. La PTH (parathormone)

Il a été démontré que le traitement par le fragment 1-34 de la PTH (tériparatide, en administration sous cutanée quotidienne) augmentait la DMO au rachis, au fémur et au corps entier [88]. De plus, ce traitement donné pendant 18 mois permet la réduction du risque de fracture vertébrale et de fracture non vertébrale chez des femmes ménopausées ayant déjà des fractures vertébrales prévalentes [88]. Le tériparatide est un agent anabolique qui augmente à la fois la formation osseuse et la résorption osseuse mais dans des proportions qui favorisent globalement la formation osseuse dans le sens d'une meilleure résistance [89].

3.2.2.2. Le ranélate de strontium

Le ranélate de strontium est un composé chimique qui aurait la propriété d'une part d'augmenter la formation osseuse tout en diminuant la résorption osseuse, on parle d'agent découplant positif [90]. Il a été montré que le traitement quotidien per os par ranélate de strontium augmentait significativement la DMO au rachis, au col du fémur et à la hanche totale [91]. Deux études multinationales multicentriques en double aveugle contre placebo ont montré respectivement une diminution significative du risque de fracture vertébrale [92] et du risque de fracture non vertébrale chez des femmes ménopausées à risque de fracture [93].

3.3. Approches non pharmacologiques dans l'ostéoporose post-ménopausique

3.3.1 Conseils alimentaires

Plusieurs interventions destinées à réduire le risque de fracture peuvent être recommandées pour la population générale [94]. Le tabagisme et l'absorption excessive d'alcool seront combattus.

Des apports de calcium et de vitamine D dits « adéquats » sont recommandés (cf chapitre 3.2.1.4). Des interventions thérapeutiques contrôlées ont fait la démonstration que la combinaison de suppléments calciques et de vitamine D peuvent réduire le risque de fracture. Quand les apports calciques exogènes sont insuffisants, la nécessité de maintenir à l'équilibre l'homéostasie calcique conduit à une augmentation de la résorption osseuse. Aux Etats-Unis, la Fondation Nationale contre l'Ostéoporose (NOF) soutient les recommandations de l'Académie Nationale des Sciences qui stipulent que les femmes de plus de 50 ans devraient consommer au moins 1200 mg de calcium élément par jour [95]. Des apports excessifs de calcium (plus de 1200 à 1500 mg par jour) ont un intérêt potentiel limité ; selon une étude récente, dans une analyse en objectif secondaire planifié, une supplémentation calcique, des femmes ménopausées en bonne santé pourrait augmenter l'incidence des évènements cardiovasculaires [96].

La vitamine D joue un rôle majeur pour l'absorption digestive du calcium, la bonne santé osseuse, les performances musculaires, l'équilibre et le risque de chutes. La NOF recommande des apports de 800 à 1000 unités internationales de vitamine D3 par jour pour les adultes de plus de 50 ans. Cet apport est susceptible de conduire à des taux sériques de 25OHVitD au seuil souhaité de 30 ng/ml (75 nmol/l) ou plus. De nombreux patients âgés sont à risque de carence en vitamine D, parmi eux les patients ayant une malabsorption (maladie coeliaque par exemple...), une insuffisance rénale chronique, ceux qui ont des maladies chroniques, qui sont confinés chez eux et qui n'ont donc pas d'exposition solaire suffisante. Chez ces personnes âgées, des apports en vitamine D sont donc recommandés. En 1997, aux Etats-Unis, la limite supérieure sans risque pour la santé des apports vitaminiques D a été portée à 2000 UI par jour [95]. Des données plus récentes indiquent que des apports plus élevés sont nécessaires et bien tolérés par les personnes âgées.

Des apports protéiques adéquats sont également essentiels chez les personnes âgées fragiles [97].

3.3.2 Prévention des chutes

Tous les patients ayant eu des fractures périphériques devraient faire l'objet d'une évaluation de leur risque de chute.

Une des plus vastes études de prévention des chutes chez la personne âgée a inclus plus de 300 patients de plus de 70 ans ayant au moins un facteur de risque de chute. Dans le groupe intervention de cette étude contrôlée et randomisée, une évaluation gériatrique et des modifications des facteurs de risque de chutes étaient proposés alors que le groupe témoin avait des soins « habituels ». Au cours du suivi de 12 mois, 35 % des patients du groupe intervention sont tombés contre 47 % dans le groupe témoin. Cette différence, bien que significative n'était pas associée à une réduction du risque de fracture du fait du manque de puissance de l'étude [98]. Par la suite, bien que des essais de vaste envergure aient montré qu'il était possible de réduire les chutes [99-100], les études randomisées n'ont jamais pu mettre en évidence une diminution du risque de fracture. Certains essais cliniques ont montré que porter des protecteurs de hanche pourrait réduire le risque de fracture de hanche, en particulier chez les personnes âgées institutionnalisées. Cependant, une métaanalyse récente des essais randomisés laisse planer un doute sur l'efficacité de cette mesure [101-102-103]. Parmi les stratégies ayant pour but la prévention des chutes on peut citer : la vérification et la correction de la vue [104] et de l'audition, l'évaluation des problèmes neurologiques, l'analyse critique des prescriptions du patient à la lumière des effets indésirables influençant potentiellement l'équilibre, l'amélioration des facteurs environnementaux au domicile des patients (évacuation des sols glissants, éclairage adéquat...).

3.3.3 Exercice physique

3.3.3.1 Généralités

Les stratégies habituelles et actuelles de prévention des fractures ostéoporotiques chez la femme se concentrent sur deux axes principaux, d'une part l'optimisation du pic de masse osseuse lors de la maturation squelettique et, d'autre part, la réduction de la perte osseuse après la ménopause, par la normalisation du remodelage osseux, l'augmentation de la masse osseuse et la prévention des chutes chez la femme âgée.

L'intérêt de l'exercice physique a obtenu le statut d'axiome favorable dans la prise en charge de l'ostéoporose post-ménopausique par la reconnaissance de son rôle dans l'adaptation squelettique [105] et par l'observation répétée de masse osseuse relativement élevée chez les athlètes [106]. Ainsi, les recommandations françaises de l'HAS [40] soulignent l'effet bénéfique de

l'exercice physique sur la DMO et rapportent chez la femme ménopausée son rôle pour ralentir la diminution de la masse osseuse, et indiquent que le bénéfice sur l'os persisterait même à l'arrêt de l'activité, ce qui reste débattu **[107]**.

Les recommandations de l'AFFSSAPS quant à elles soulignent l'intérêt du maintien d'une activité en charge pour préserver le capital osseux en traitement complémentaire de l'ostéoporose post-ménopausique.

Quant à la Fondation Nationale de l'Ostéoporose (NOF), ses recommandations encouragent la pratique régulière d'une activité en charge et des exercices de renforcement musculaire pour réduire le risque de chutes et de fractures. La NOF encourage fortement la pratique de l'activité physique tout au long de la vie et à tout âge, d'une part pour la prévention de l'ostéoporose, et d'autre part globalement pour la santé, parce que les bénéfices sont perdus à l'arrêt de l'activité physique **[41]**.

Durant les dernières années, de nombreux essais thérapeutiques randomisés contrôlés versus placebo ont montré que différents traitements sont susceptibles de réduire le risque de fracture en particulier vertébrale de 50 à 70 % **[18]** chez les patientes répondant aux critères densitométriques de l'OMS **[8]**. Cette possibilité thérapeutique est cependant confinée aux patientes les plus à risque alors que la plupart des fractures sont issues de plus vastes groupes de patientes à risque individuel plus faible chez des patientes ostéopéniques **[108-109]**. Les patientes ostéopéniques ayant déjà eu une fracture peuvent également bénéficier d'un traitement mais les femmes dont le seul facteur de risque est une ostéopénie ne se voient pas proposer de thérapies préventives. C'est pourquoi le problème des fractures à l'échelle de population plus larges ne peut être résolu par les thérapies médicamenteuses seules. Des interventions thérapeutiques sans danger, facilement accessibles, peu coûteuses à mettre en place et qui pourraient augmenter la résistance osseuse sont souhaitées. L'exercice physique semble pouvoir au moins réunir les trois premières conditions pré-requises citées ci-dessus et constitue donc une approche thérapeutique attractive pour réduire le nombre des événements fracturaires.

La démonstration du rôle important de l'exercice physique dans le métabolisme du tissu osseux est apportée par des travaux cliniques menés à la fois en diminution des contraintes mécaniques sur l'os - immobilisation en décubitus prolongé **[110]**, vols spatiaux **[111]** - mais aussi en augmentation des contraintes.

Dans de très nombreuses études transversales comparant la masse osseuse de femmes actives ou d'athlètes à celle de femmes sédentaires de même âge, la masse osseuse était plus élevée de façon significative chez les femmes non sédentaires, voir [112] pour revue. Cependant, les résultats des essais cliniques contrôlés randomisés sont plus controversés, montrant des effets positifs [113-114], négatifs [115-116] ou mixtes [117-118].

L'approche méta-analytique est intéressante dans de telles situations, et la littérature anglo-saxonne en fournit d'assez récentes [119-120-121-122-123]. La méta-analyse de Berard et al [119] avait pour but l'évaluation des effets d'une activité physique chez des femmes ménopausées en bonne santé. 18 études publiées entre 1966 et 1996 ont été retenues dans l'analyse. L'exercice physique apparaissait efficace dans la prévention de la perte osseuse du rachis lombaire mais pas au col du fémur ni au radius. Cependant cette méta-analyse n'incluait pas que des essais randomisés [119]. L'absence de randomisation peut conduire à une surestimation de l'effet propre de l'intervention thérapeutique comme le montre bien le travail de Wolff et al [120]. Ainsi dans cette méta-analyse [120], l'effet global du traitement (programmes d'entraînement physique) des essais randomisés était d'environ 0,9% par an signifiant que les programmes d'entraînement d'activité physique prévenaient la perte osseuse de presque 1% par an comparés aux témoins, alors que l'effet global du traitement pour les essais contrôlés non randomisés était proche du double (1,85% par an). L'absence de randomisation dans le cas particulier des essais testant l'intérêt de l'exercice physique peut en effet introduire des biais liés à la génétique, à l'auto sélection de patients dans les groupes « activité physique », aux éventuelles activités physiques antérieures à l'essai clinique. Kelley s'est quant à lui intéressé aux effets de l'exercice physique sur la densité minérale osseuse régionale chez la femme ménopausée [121]. Sa méta-analyse a inclus 11 essais randomisés publiés entre 1975 et 1995. L'effet global constaté, mesuré en variation relative pondérée sur la taille des échantillons des études testées, apparaît relativement faible (0,27%, [IC 95% (0,16 – 0,37%)]). Cependant, quand l'auteur ne retient dans son analyse que les essais pour lesquels la mesure de densité osseuse a été faite au site osseux spécifiquement mis en charge par le programme d'activité physique, l'effet préventif semble plus important puisque de l'ordre de 0,76% ; [IC 95% (0,6 – 0,93%)] [121].

Des programmes d'activité physique avec impact ont-ils une efficacité relative différente de programmes d'activité physique sans impact ? C'est à cette question qu'ont essayé de répondre Wallace et Cumming [122]. Dans cette étude étaient considérées comme activités physiques avec impact : la

marche, la course à pied, la danse, l'aérobic et les exercices sur tapis roulant. Les exercices comportant des entraînements en résistance, en force, ainsi que les exercices aux poids et haltères étaient considérés comme activités physiques sans impact. Cette méta-analyse n'a pas trouvé de différences évidentes d'efficacité entre les programmes d'exercices physiques avec ou sans impact. Cependant, elle confirmait le ralentissement du taux de perte osseuse lié à la ménopause par l'activité physique en particulier au rachis **[122]**.

Deux études plus récentes soulignent en revanche l'intérêt sur le tissu osseux des sports à impact élevé. La première avait pour but de déterminer si la DMO supérieure observée 15 ans après l'arrêt de la pratique en compétition de la gymnastique artistique restait toujours plus élevée neuf ans plus tard, au sein de la même cohorte de femmes approchant la ménopause **[123]**. Les valeurs de DMO étaient mesurées au rachis, au col du fémur, au corps entier ainsi qu'au poignet dans un groupe de 10 gymnastes, d'âge moyen 45.3 comparé à un groupe témoin de 13 femmes âgées en moyenne de 45.4 ans. Les gymnastes conservaient à l'entrée dans l'étude des valeurs de DMO supérieures à celles des témoins d'environ 10 %. L'autre étude menée celle là chez l'homme **[124]** s'est intéressée à la relation entre activité sportive et de loisir au cours de leur vie chez des hommes âgés de plus de 50 ans. Un questionnaire permettait de définir le temps total d'activité et un score dit « ostéogénique » fondé sur le type d'activité sportive pratiqué. Le score « ostéogénique » était pondéré selon l'intensité des impacts lors des pratiques sportives, l'impact étant considéré comme nul pour la natation, le vélo ; faible pour la marche, le tai-chi, le golf ; intermédiaire pour la danse, le jogging, le football ; élevé pour la gymnastique, le volley, le basket. Si le temps total d'activité n'était pas associé à de meilleurs paramètres osseux, l'analyse montrait un bénéfice osseux associé à un plus fort score « ostéogénique » tout au long de la vie de 13 à 50 ans et plus **[124]**

La plus récente méta-analyse évaluant l'effet de l'exercice physique pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique est celle de la collaboration Cochrane **[125]**. 18 études publiées entre 1966 et 2000 satisfaisaient les critères d'éligibilité de cette méta-analyse. Dans ce travail, les auteurs ont pu étudier les effets d'exercices augmentant la capacité respiratoire, d'exercices en résistance (renforcement spécifiques des muscles) et de la marche.

L'ensemble de ces types d'exercices est apparu efficace sur la DMO au rachis, la différence moyenne pondérée entre groupe exercice et groupe

témoin étant de 1,79 [IC 95% (0,58 – 3,01)]. Les exercices augmentant la capacité respiratoire étaient efficaces au rachis et au poignet mais pas au col du fémur [125].

La marche d'un bon pas est une activité physique peu coûteuse, accessible à tous et populaire auprès du grand public ; elle pourrait donc être une intervention intéressante dans la stratégie de prévention de perte osseuse à la ménopause. Bonaiuti et al [125] ont pu évaluer l'efficacité de la marche en combinant les résultats de trois études, la population globale étudiée étant de 77 sujets inclus dans les groupes exercices contre 79 témoins. Le résultat de leur méta-analyse montrait que la marche était efficace, à la fois sur la différence moyenne pondérée au rachis [1,31 (IC 95% – 0,03 ; 2,65)] mais aussi à la hanche [0,92 (IC 95%, 0,21 ; 1,64)]. Les résultats étaient statistiquement significatifs.

Effet d'autres types d'activité physique

La pratique du Tai-Chi-Chuan semble être efficace dans la prévention des chutes [126]. Mais le rôle de cette pratique dans la prévention de la perte osseuse à la ménopause n'avait pas été étudié. Quin et al [127] rapporte la première étude cas témoin montrant que la pratique régulière du Tai-Chi-Chuan pourrait retarder la perte osseuse des sites osseux porteurs chez la femme ménopausée. Cependant, il ne s'agit pas d'une étude randomisée. En outre, seuls les paramètres osseux les plus sensibles mesurés par pQCT, rendaient compte d'un taux de perte osseuse significativement plus faible dans le groupe Tai-Chi-Chuan par rapport au groupe témoin.

Des travaux expérimentaux récents ont pu suggérer que des déformations mécaniques de très faible amplitude pourraient augmenter la masse osseuse quand elles étaient appliquées à haute fréquence [128]. Cependant, il n'existe aucun travail chez la femme ménopausée. Par ailleurs, chez des sujets hommes et femmes de 19 à 38 ans, un programme de 8 mois de vibration sur plateforme n'a conduit à aucun effet sur la masse, la structure et la résistance osseuse estimée et ceci quel que soit le site (rachis, hanche, calcaneum, radius) [129].

Réversibilité des gains liés à l'exercice physique

Il semble établi que le gain osseux lié à l'activité physique soit réversible à l'arrêt de cette activité [130-131-107]. Cependant trois études récentes suggèrent la possibilité de bénéfices osseux à long terme après un programme d'entraînement avec fort impact chez des femmes préménopausées [132-123] et chez l'homme [124]. Le critère d'évaluation dans la prévention de l'ostéoporose chez la femme ménopausée devrait être la fracture ; cependant il est plus qu'improbable qu'un essai clinique étudiant

les effets d'un programme d'exercice physique avec la fracture clinique comme critère de jugement principal soit conduit. On peut relever dans ce contexte le travail de Sinaki et al [133] qui rapportent un risque relatif de tassement vertébral 2,7 fois plus élevé dans un groupe témoin par rapport à un groupe ayant fait 8 ans plus tôt un programme de 2 ans d'exercices de renforcement des muscles dorsaux . On peut noter avec intérêt que dans leur travail initial (résultat des 2 années d'exercice) il n'avait pas été observé de gain osseux apparent chez les sujets ayant suivi le programme d'exercice par rapport aux témoins [134].

3.3.3.2 Exercice de course sur tapis roulant : effet osseux chez le rat

Le modèle animal du rat a été souvent utilisé pour prédire l'efficacité sur le squelette humain de diverses interventions thérapeutiques incluant l'exercice physique [135]. Selon certains auteurs [136-137], des études chez le rat permettent de modéliser le statut squelettique de l'homme. La Food and Drug Administration a depuis 1994 établi des recommandations soulignant l'intérêt d'études précliniques chez l'animal pour tester les nouveaux traitements préventifs et curatifs de l'ostéoporose [138]. Du fait des relations entre l'ostéoporose post-ménopausique avec déplétion estrogénique chez la femme et la perte osseuse induite chez la rate ovariectomisée, ce dernier modèle est devenu le gold standard de ces travaux précliniques.

Dans l'esprit de Frost et Jee, le modèle du rat peut reproduire le statut squelettique humain [139]. Les gains en masse osseuse (croissance longitudinale en particulier), mais aussi les pertes osseuses (remodelage fondé sur les unités multicellulaires de base (BMU)) pourraient répondre aux effets de l'exercice physique en terme d'augmentation des contraintes mécaniques en charge tant chez le jeune rat et le rat âgé que chez l'homme [139]. Cependant, du fait de l'absence de système haversien de remodelage dans l'os cortical du rat, contrairement à l'homme, l'applicabilité à l'homme des effets de l'exercice physique observés chez le rat n'est pas absolue dans tous ses détails.

La course sur tapis roulant est le mode d'exercice physique le plus utilisé chez le rongeur [140]. Dans le cadre des recherches faites dans le domaine de l'ostéoporose, la course sur tapis roulant a été utilisée pour tester les effets de l'exercice sur la masse osseuse, le métabolisme osseux ainsi que la résistance osseuse chez le rat. Le rat est un quadrupède, quand il court sur tapis roulant, la charge mécanique qui s'exerce sur son squelette périphérique est supérieure à celle qui s'exerce sur son squelette axial. Chez l'homme, en revanche, lors de la course à pied, le squelette axial (les vertèbres) et les

membres inférieurs sont soumis à des charges mécaniques. Les effets de la course sur tapis roulant sur les vertèbres du rat ne sont que peu extrapolables à l'homme. Chez le rat, la sensibilité de la réponse à l'exercice sur tapis roulant aux os porteurs que sont le fémur et le tibia est plus grande que celle observée au rachis lombaire **[141-142-143-144]**. Chez la jeune rate, l'exercice de course sur tapis roulant est considéré comme utile à l'augmentation des surfaces osseuses corticales et à l'augmentation du BV/TV de l'os trabéculaire au tibia, principalement sous l'effet d'une augmentation de la formation osseuse **(145-146)**. Chez la rate adulte de 14 mois, deux travaux montrent d'une part une augmentation du BT/TV au tibia (26) mais aussi un accroissement de l'os cortical résultant d'une stimulation de la formation osseuse périostée et d'une diminution de la résorption osseuse endostéale **[147]**. Chez la rate adulte ovariectomisée, il est bien établi que les effets osseux sont caractérisés par une perte prononcée d'os trabéculaire, et que la perte osseuse corticale est plus marquée chez la rate adulte que chez le jeune rat **[148]**. Il a été montré qu'un exercice de course sur tapis roulant chez des rates âgées de 9 mois prévenait la perte osseuse liée à l'ovariectomie au tibia et au fémur mais pas aux vertèbres (évaluation par mesure du poids des cendres), prévenait la perte osseuse trabéculaire au tibia par stimulation de la formation osseuse et diminution de la résorption **[149-150]**. Chez la rate adulte ostéopénique, la prévention de la perte osseuse mesurée par le poids des cendres au tibia mais pas aux vertèbres lombaires a été obtenue chez des rates de 12 mois ovariectomisées trois mois plus tôt **[151]**. Yeh et coll. ont étudié les effets combinés de l'exercice physique de course sur tapis roulant et du traitement par Estradiol sur la masse osseuse tibiale chez des rates ostéopéniques de 12 mois ovariectomisées deux mois plus tôt **[152]**. Le traitement par Estradiol semblait atténuer la perte osseuse trabéculaire au tibia, l'exercice sur tapis roulant ayant des effets similaires mais aussi des effets de prévention de la perte du contenu calcique sur l'os cortical du tibia **[152]**. Dans une autre étude où seule la durée **[153]** de l'activité de course sur tapis roulant était modifiée (18 m/mn, 45 mn/j, 5j/semaine pendant sept semaines versus 18 m/mn, 45 mn/j, 5 j/semaine pendant quatre mois) par rapport à l'étude citée ci-dessus (34), YEH et coll. montrent que l'intervention combinée de l'Estradiol et de l'exercice pourrait prévenir le développement de l'ostéopénie. Dans cette dernière étude (35), l'effet de l'Estradiol semblait plus marqué sur les vertèbres lombaires, l'exercice physique affectant les os longs comme le fémur. Les deux interventions semblaient avoir un effet additif sur la masse osseuse.

Fondé sur le début d'accumulation des lactates sanguins, Iwamoto et coll. dans un modèle de rates ostéopéniques Wistar âgées de 37 semaines ovariectomisées 14 semaines plus tôt définissaient une vitesse de tapis roulant dite modérée 12 m/mn et une vitesse plus intense de 18 m/mn [141]. Dans ce travail [141], une vitesse de tapis roulant élevée et de longue durée n'apparaissait pas indispensable à l'augmentation de la densité osseuse.

3.3.3.3 Synergie entre les effets de l'exercice physique et les thérapeutiques reminéralisantes : comparaison des effets chez la rate et chez la femme

Pouvoir parler d'effet synergique entre deux modalités thérapeutiques nécessite la mise en place d'un essai clinique selon un plan factoriel à deux facteurs croisés à deux modalités [154]. Dans ce type d'intervention il est possible de tester séparément l'efficacité de chacune des deux modalités thérapeutiques mais aussi par un test d'interaction d'évaluer l'intérêt de leur association par rapport à chacune des deux interventions. Ce type de plan factoriel requiert souvent un grand nombre de patients et il n'est qu'assez peu souvent adopté dans les essais cliniques rapportés dans la littérature et participe au faible niveau méthodologique déjà dénoncé concernant les essais cliniques faisant intervenir le rôle de l'exercice physique [155].

Bisphosphonates et exercice physique

De nombreuses études cliniques ont confirmé que les bisphosphonates pouvaient inhiber la perte osseuse à la ménopause [156]. Associer les effets potentiellement ostéogéniques de l'exercice physique aux effets anti-résorbeurs des bisphosphonates est une démarche logique d'autant plus qu'il a été suggéré qu'une partie de la perte osseuse post-ménopausique était liée à une diminution de la force musculaire résultant d'une réduction de l'activité physique [157].

Les effets de l'exercice physique (EP) appliqué à la suite d'un traitement par étidronate (Eti) ont été étudiés chez la rate ovariectomisée [158]. Les rates étaient réparties en cinq groupes : 1 – sham ; 2- ovariectomie (ovx) ; 3 – ovx + EP ; 4 – ovx + Eti ; 5 – ovx + EP + Eti. Les résultats montrent qu'il existe une interaction entre l'exercice physique (course sur tapis roulant) et l'administration d'etidronate deux semaines avant l'exercice physique en ce qui concerne la surface osseuse trabéculaire mesurée au tibia proximal par histomorphométrie. Une interaction était également mise en évidence concernant la DMO au fémur proximal, en revanche il n'y avait pas d'interaction concernant l'évaluation de la DMO dans les régions moyenne et distale du fémur. A l'échelle de la cellule l'etidronate diminuait le nombre d'ostéoclastes alors que l'exercice physique augmentait le nombre

d'ostéoblastes sans influencer le nombre d'ostéoclastes. La combinaison etidronate et exercice physique a fait également l'objet chez la femme d'un essai randomisé [159]. 48 femmes de 57 ans de moyenne d'âge ménopausées depuis 8 ans étaient réparties en 4 groupes (Eti + EP ; Eti seul ; EP seul ; Eti – EP . L'etidronate était prescrit pendant un an (400 mg, pendant 14 jours, tous les 90 jours), l'entraînement en résistance était effectué 3 fois par semaine pendant 45 minutes. Si les gains des données poolées des groupes etidronate étaient significativement supérieurs au placebo au rachis lombaire et au corps entier, il n'y avait aucune interaction entre l'exercice physique et l'etidronate.

L'alendronate a fait l'objet en association avec l'exercice physique d'essais cliniques chez la femme [160] et chez la rate [161]. Uusi Rasi et coll [160] dans une étude dessinée avec un plan factoriel 2 x 2 ont étudié chez 164 femmes âgées de 54 ± 2 ans, ménopausées depuis 4 ans en moyenne, l'intérêt d'une association d'un exercice physique en charge [sauts multidirectionnels (20 mn), stretching et autres exercices sans impact 15 minutes par jour] et de l'alendronate 5 mg/jour. L'alendronate augmentait la DMO au rachis lombaire et au col du fémur. L'exercice seul n'avait pas d'effet significatif sur la DMO, au rachis lombaire et au col du fémur. Aucune interaction n'était mise en évidence entre l'alendronate et l'exercice physique. Cependant certains indices structuraux tels que le module de section et le ratio surface corticale sur surface osseuse totale au tibia était significativement augmenté au tibia dans les groupes exercices physiques comparativement aux groupes sans exercices. En revanche chez la rate ovariectomisée, il semble que l'exercice physique (course sur tapis roulant) associé à l'alendronate puisse avoir un effet synergique sur la masse osseuse mais aussi sur la charge à la rupture au fémur et sur la surface de section transversale des vertèbres [161].

SERM et exercice physique

L'effet de l'exercice physique associé aux modulateurs des récepteurs sélectifs aux estrogènes n'a pratiquement pas été étudié. Il n'existe chez la femme qu'un seul travail rapportant chez trois patientes l'expérience de l'association de l'exercice physique (travail avec des impacts forts, sauts) et raloxifène pendant 40 semaines [162]. La seule conclusion que l'on puisse partager avec les auteurs de ce travail étant la nécessité de pouvoir analyser des études avec un plus grand nombre de sujets, une plus longue durée et un groupe contrôle.

Phytoestrogènes et exercice physique

Des études chez l'animal ont montré que les phytoestrogènes pourraient être efficaces dans la prévention de l'ostéoporose [163]. Cependant, les données chez la femme ménopausée sont moins démonstratives [164]. Les principaux

phytoestrogènes consommés par l'homme sont présents dans le soja et appelés isoflavones. Wu et coll [165] ont étudié les effets de l'administration du genistein (une isoflavone de soja) et de l'exercice physique (course) sur la masse osseuse chez la souris ovariectomisée. Une interaction significative était mise en évidence ; l'effet coopératif de l'exercice modéré et d'une dose sous-maximale de genistein prévenant la perte osseuse notamment aux sites riches en os trabéculaire. On notera également dans cette étude que bien que la surface de section transversale et le périmètre périostéal ne soient pas affectés par l'ovariectomie ces paramètres augmentaient significativement dans le groupe de rates soumises à l'exercice seul et dans celui combinant les effets du genistein et de l'exercice physique [165]. Nakajima et coll ont [166] dans leur étude chez la rate ovariectomisée testé isoflavone et exercice physique (course sur un tapis roulant avec charges accrochées aux dos des rates). Si les groupes recevant l'isoflavone seule et celui faisant intervenir l'exercice physique seul avaient une plus grande DMO au fémur comparés au groupe placebo, le bénéfice le plus net était trouvé dans le groupe combinant les deux interventions. De plus seul le groupe combinaison des deux interventions avait une résistance osseuse significativement plus élevée que le groupe contrôle [166].

Calcium et exercice physique

Une des plus importantes questions encore sans réponse définitive dans le domaine du rôle des facteurs environnementaux et de santé osseuse concerne l'interaction éventuelle entre les effets de l'exercice physique et la supplémentation calcique. Comme nous l'avons souligné plus haut mettre en évidence un effet synergique entre calcium et activité physique nécessite la mise en place d'un essai clinique avec un plan factoriel 2 x 2 ayant pour facteurs principaux la supplémentation calcique (oui ou non) et l'exercice physique (oui ou non). Le fait que les apports calciques puissent modifier la réponse osseuse en cas d'augmentation de l'activité physique a été suggéré il y a déjà plus d'une dizaine d'années. Cependant les travaux publiés à ce jour dans ce domaine sont encore rares. Une revue de la littérature [168] s'est intéressée à tous les essais interventionnels reportant les effets de l'activité physique sur la masse osseuse et ceux où figuraient également les apports calciques moyens. 16 études étaient identifiées, la plupart s'intéressaient à la période péri ou post-ménopausique, la taille des échantillons variant de 5 à 130 sujets par groupe. La conclusion de cette meta-analyse apporte des éléments de preuve indirecte selon lesquels un effet positif de l'activité physique n'apparaît que quand les apports calciques sont supérieurs à 1000 mg/jour [168] Quant aux effets bénéfiques d'un apport élevé de calcium, ils

ne seraient présents qu'en cas d'activité physique associé ; la modulation par la supplémentation calcique sur la DMO dans les groupes exercice physique était plus prononcée au rachis lombaire qu'au radius. Il est intéressant de comparer ce résultat à celui relevé dans une autre meta-analyse [169] s'intéressant à l'effet de l'exercice aerobic sur la masse osseuse, qui rapporte un effet plus marqué chez les sujets qui consomment plus de 1000 mg de calcium par jour par rapport à ceux qui en consomment moins de 1000 mg. On peut également rapprocher de ces résultats le fait que chez l'animal de faibles apports calciques ou une biodisponibilité réduite du calcium pourrait limiter la réponse osseuse à l'exercice physique [170]. Plus récemment, un essai interventionnel combinant chez 239 enfants (178 ont complété l'étude) de 3 à 5 ans les effets d'une supplémentation calcique et de l'activité physique a été mené [171]. Les enfants étaient randomisés en deux groupes, l'un effectuant des activités motrices grossières, l'autre des activités motrices plus fines puis dans chacun de ces groupes les enfants recevaient de façon aléatoire un placebo ou 1000 mg de calcium. Une interaction significative était trouvée entre les groupes supplémentation calcique et activité physique sur l'épaisseur et la surface corticale : en effet chez les enfants recevant le placebo l'épaisseur et la surface étaient plus petites en cas d'activité motrice grossière comparée à l'activité motrice fine, mais chez les enfants recevant du calcium, l'épaisseur et la surface étaient plus grandes dans le groupe « activité motrice grossière ». De plus il n'était pas trouvé d'effet positif de l'activité physique sur les modifications de masse osseuse à la jambe sauf quand les enfants prenaient plus de 1100 mg/jour. Dans une autre étude [172] menée sur 8.5 mois, 66 filles âgées de 8.8 ans étaient aléatoirement réparties en quatre groupes : exercice avec impact modéré plus ou moins calcium, et exercice avec impact faible plus ou moins calcium. L'exercice physique durait 20 mn trois fois par semaine, la nourriture était enrichie en calcium (434 ± 19 mg / jour). Une analyse en covariance testait l'interaction et les principaux effets du calcium et de l'activité physique sur la masse osseuse après ajustement sur les données initiales de CMO et de croissance en longueur des membres. Une interaction calcium – exercice était trouvée au fémur, en revanche au tibia bien que le CMO soit plus élevé de 3% dans le groupe exercice versus groupe pas d'exercice ($p < 0, 05$) il n'existait pas d'interaction. A des sites non porteurs (humérus et radius – ulna) le CMO augmentait de 2 à 4% en plus dans les groupes supplémentés en calcium par rapport à ceux qui ne l'étaient pas. Les auteurs concluent de leur travail que des gains plus prononcés en masse osseuse à des sites en charge pourraient être obtenus quand de petites périodes d'exercice modéré sont associées à une augmentation des apports

calciques. L'exercice conférerait des effets régionaux spécifiques, le calcium produisant lui des effets plus systémiques [172].

L'hypothèse selon laquelle le calcium aurait un effet systémique sur des sites osseux même non soumis à des contraintes alors que l'exercice physique lui augmenterait la masse osseuse des sites osseux en charge est également confortée par les résultats d'une étude transversale récente menée chez 218 femmes préménopausées ou ménopausées [173]. Des apports calciques élevés étaient associés aux caractéristiques mesurées par QCT au radius (os non porteur) alors que l'exercice physique paraissait lui être particulièrement bénéfique à un os porteur : le tibia. Nous avons étudié les effets combinés de l'exercice physique et du calcium sur le gain osseux à la période pubertaire [174]. Quatre groupes étaient constitués [exercice (7,2 h par semaine) + 800 mg de phosphate de calcium, exercice + placebo, sédentaire (1,2 h d'exercice par semaine) + 800 mg de phosphate de calcium, sédentaire + placebo]. Les gains en DMO à 1 an étaient significativement plus élevés dans le groupe calcium et exercice par rapport aux gains des autres groupes. De plus aucune différence significative n'était observable entre les trois autres groupes. L'exercice physique pour stimuler efficacement le gain en DMO semble donc nécessiter des apports calciques élevés [174].

En conclusion, il est toujours difficile de comprendre comment les effets combinés de l'exercice physique et de la supplémentation calcique semblent donner de meilleurs résultats que chacune des interventions isolées.

Estrogènes et exercice physique

Le traitement par estrogènes à la ménopause diminue efficacement la perte osseuse post-ménopausique et a longtemps été considéré comme la pierre angulaire du traitement préventif de l'ostéoporose [175].

La diminution des taux sériques d'estrogènes associée à la ménopause pourrait augmenter la sensibilité de l'os à la détection des contraintes mécaniques, rendant l'exercice physique (la contrainte en charge) moins efficace pour augmenter la masse osseuse [176]. Des données récentes ont conduit à suggérer que la réponse précoce des cellules osseuses à la contrainte mécanique et aux estrogènes pourrait partager une voie commune qui impliquerait le récepteur aux estrogènes ER- α [177-178-179-180]. Par ailleurs il a été récemment démontré que la réponse adaptative de l'os aux contraintes mécaniques nécessitait un récepteur aux estrogènes alpha fonctionnel [181]. Plus récemment encore, il a été montré chez des jeunes filles en début de puberté ou prépubertaires que le récepteur alpha aux estrogènes modulait la réponse en DMO à l'exercice physique [182].

Certaines études indiquent que les effets des estrogènes et de la contrainte mécanique sur la DMO sont soit indépendants soit selon les sites osseux additifs ou synergiques [152-183-184-185]. D'autres études n'ont pas trouvé que l'exercice physique ajouté à un traitement hormonal substitutif était plus efficace que le traitement hormonal substitutif seul. [186-187-188-189]. Les principales limites de ces études étaient l'absence de randomisation [183], une puissance statistique trop faible du fait de la faible taille des groupes testés [184], d'études de femmes prenant déjà un traitement hormonal avant d'être incluses [184-185-186-187-188-189], parfois le site de mesures où l'on souhaite mesurer un effet (radius) n'est stimulé par l'exercice prévu qu'une seule fois par semaine [186], parfois l'exercice physique proposé n'est pas clairement décrit [187] parfois encore la quantité d'exercice physique proposée dans le groupe exercice physique seul et exercice physique combiné aux estrogènes diffère [188]. La seule étude qui fait état dans le titre du travail d'un effet synergique de l'exercice physique et des estrogènes force un peu cette conclusion [185]. En effet, cette étude menée chez la rate ovariectomisée ne montrait finalement une interaction que pour 3 des 13 paramètres étudiés au fémur et aucun des 9 paramètres étudiés au rachis lombaire concernant l'association exercice physique et estrogènes.

L'étude la plus récente menée chez la femme récemment ménopausée s'intéressant à l'action combinée de l'exercice physique et du THM ne semble pas montrer de bénéfices additionnels à l'adjonction du THM à l'exercice physique pour la prévention de la perte osseuse en particulier au rachis [190]. Dans ce travail, des femmes récemment ménopausées (moins de 3 ans) âgées de 52 ans en moyenne traitées ou non par THM étaient assignées aléatoirement à un groupe activité physique (AP) et à un groupe témoin (T). Quatre groupes étaient aussi constitués selon que les femmes recevaient ou non un THM et effectuaient ou non un exercice physique régulier. Le programme d'exercice physique consistait en la pratique de travail en résistance de soulevés de barre en squat ou à partir du sol pendant 10 mn environ précédé d'une période de 15 à 20 mn d'échauffement et suivi d'un programme de 10 mn de relaxation musculaire. Cet exercice physique était fait 2 fois par semaine pendant un an.

Après un an d'exercice, au rachis lombaire il était observé une diminution moyenne de 3.6 % de la DMO chez les femmes du groupe témoin (ni exercice, ni THM). Les femmes traitées par THM n'avaient qu'une diminution de 0.66 % de leur DMO. En revanche les femmes du groupe exercice avaient une augmentation de 0.43 % et 0.70 % respectivement selon la présence ou non d'un THM. Aucune différence significative n'était observée entre ces deux

derniers groupes exercices. Les auteurs concluaient ainsi à l'efficacité de la pratique d'un exercice en résistance sur la prévention de la perte osseuse au rachis sans qu'il ne puisse être démontré d'effet additif ou synergistique avec le THM [190].

Conclusion

Les études combinant l'exercice physique et les thérapies reminéralisantes tant pour augmenter la masse osseuse lors de l'acquisition du pic de masse osseuse que lors de la prévention de la perte osseuse après la ménopause sont prometteuses mais donnent des résultats mitigés. Si chez l'animal la combinaison bisphosphonates et exercice physique semble plus efficace pour augmenter la DMO que chacune des interventions isolées, chez la femme les résultats sont moins prometteurs. D'autres études comportant un plan factoriel 2 x 2 sont nécessaires pour répondre plus clairement à la question de l'interaction exercice physique et thérapie reminéralisante. Enfin au delà de l'intérêt de l'exercice physique sur l'aspect quantitatif de l'os d'autres études doivent s'intéresser au rôle de l'exercice physique sur les propriétés structurales (macroarchitecture et microarchitecture) et qualitatives de l'os [191].

3.3.3.4 Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis ?

Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis?

E. Lespessailles¹, S. Prouteau^{1,2}

Eric Lespessailles, MD; Stephanie Prouteau, PhD.

¹Institute of Prevention and Research in Osteoporosis (IPROS) - INSERM Unit 658 - Orleans Regional Hospital; ²Bone Tissue Architecture and Physical Exercise (ATOSEP Laboratory), University of Orleans, Orleans, France.

Please address correspondence to: Eric Lespessailles, IPROS-INSERM U 658, C.H.R. Orleans, 1, rue Porte Madeleine, B.P. 2439, 45032 Orleans Cedex 1, France. E-mail: eric.lespessailles@chu-orleans.fr
Received on September 7, 2005; accepted in revised form on April 24, 2006.

Clin Exp Rheumatol 2006; 24: 191-195.
© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2006.

Key words: Exercise, drug therapies for osteoporosis, synergistic effects.

ABSTRACT

Combining physical exercise with drug therapies for osteoporosis has been attempted with the aim to maximize osteogenic stimulus. Potential synergistic effects may prevent post-menopausal bone loss, or maximize gains during peak bone mass acquisition. However, research studies yielded mixed results, impeding the emergence of a consensus on the effects of exercise and drug therapies for osteoporosis on bone tissue. Independent, additive or synergistic effects of exercise and drug therapies have been reported, but while animal studies offer promising results, human studies are less clear.

The aim of this work was to critically review existing data on the subject in an attempt to clarify existing knowledge and to encourage further investigations with a 2 x 2 factorial design, as elucidation of these questions will benefit osteoporosis prevention.

Introduction

Osteoporosis may be defined conceptually as a condition of general skeletal fragility evidenced by low BMD and micro architectural alterations such that fractures occur with minimal trauma, often no more than is applied by routine daily activity. Osteoporosis is unarguably a major public health problem, and osteoporotic fractures are expected to grow with increasing life expectancy of the population (1).

Interventions based on preventive or curative treatments have proven efficient in preventing bone loss, increasing bone mass, and eventually reducing fracture risk (2). It should not be overlooked however, that osteoporosis aetiology is multifactorial and bone fragility is not only dependent on bone mass. At any age, intervention strategies other than medication should not be underestimated (3). Accordingly, nutri-

tional, hormonal, and exercise interventions have been applied, with varying outcomes (4). Regular physical exercise seems to be effective in maintaining and even increasing bone mass and strength in pre and post-menopausal women (5, 6). Although peak bone mass is mainly dependent on genetic factors, environmental influences such as calcium intake (7) and physical activity make a significant contribution (8, 9). Many studies have proven the ability of physical exercise to increase peak bone mass, especially if activity is initiated before puberty (10). Thus, achievement of peak bone mass and postmenopausal bone loss, are two critical phases during which exercise interventions are of particular clinical interest.

Hence, it appears relevant to question whether therapies aimed at increasing bone mass increase their potency when associated with physical exercise, as outcomes may greatly influence osteoporosis prevention strategies.

In order to look upon the synergistic effect of two therapeutic modalities, one needs to implement a clinical trial with a 2 x 2 factorial design (11). This kind of intervention not only allows testing the efficiency of each therapeutic modality separately, but also enables to appraise their interaction. Designing studies, which adequately measure the interaction between therapy and physical activity, is extremely difficult and requires a great number of patients, hence data are scarce. Other investigators pointed out that these aspects contribute to the poor methodology affecting clinical trials with exercise interventions (12).

Bisphosphonates and physical exercise

Numerous studies confirmed the ability of bisphosphonate treatment to inhibit

bone loss during menopause (13). A logical strategy for tackling osteoporosis is to associate the osteogenic effects of exercise to the anti-resorptive action of bisphosphonates. Additionally, part of post-menopausal bone loss has been associated with decreased muscle strength resulting from a reduction in physical activity (14).

The effects of physical exercise (PE, running on a treadmill) initiated after a two-week Etidronate (Eti) treatment have been studied in ovariectomized rats (15). In this study, rats were split into five groups: 1) sham; 2) ovariectomy (ovx); 3) ovx + EP; 4) ovx+Eti; 5) ovx + EP + Eti. Using histomorphometry, the results show an interaction between Etidronate treatment and subsequent physical exercise, as evidenced by increased trabecular bone area of the proximal tibia. Additionally, a gain in BMD was seen at the proximal femur, but mid- and distal regions however, remained unchanged. At a cellular level, etidronate reportedly reduced the osteoclast number while exercise increased the osteoblast number, without altering the osteoclast number (15).

Chilibeck *et al.* set up a randomized trial to study the combined effects of etidronate and exercise in post-menopausal women (16). Forty-eight women, with a mean age of fifty-seven years, were divided into four groups: 1) Eti + PE; 2) Eti only; 3) PE only and 4) placebo without PE. Etidronate was taken over 12 months, at a dose of 400mg/day during fourteen days, every nineteen days. Resistance training was carried out three times a week, for forty-five minutes. When pooling the data of all the Eti groups, bone density gains at the lumbar spine and whole

body significantly outperformed those of the placebo group. However, no interaction between PE and Eti emerged.

Alendronate, another potent amino-bisphosphonate, has been tested in association with physical exercise in women (17) and rats (18). Uusi *et al.* (17), in a clinical trial using a 2 x 2 factorial design, studied the association of physical exercise with a daily intake of 5mg of alendronate in 164 postmenopausal women (age: 54 + 7 years). Daily exercise protocol comprised 20 minutes of jumping activities, 15 minutes of stretching and other non-impact exercises. It appeared that the alendronate treatment increased BMD at the lumbar spine and femoral neck, but that exercise alone had no effect. Besides, no interaction between alendronate and PE could be evidenced. Nevertheless, some structural indices, such as the section modulus and the ratio cortical surface over total bone surface at the tibia, were significantly increased in the exercise groups, while remaining unchanged in the sedentary groups. In contrast, it seems that in ovariectomized rats, alendronate associated with PE (treadmill running) induces a synergistic effect, as evidenced by increases in bone masses and failure loads at the femur and L4 vertebral body (18). Human studies combining bisphosphonates and physical exercise meeting the 2x2 factorial design criteria are summarized in Table I.

SERM and physical exercise

To our knowledge, the combined effects of SERM and physical activity have barely been studied. One study examined the combined effects of a 40-week raloxifene treatment associated

with impact loading activities (19) in three women. Unfortunately, this interesting project would have required a greater number of subjects and a control group to yield conclusive results.

Calcium and physical exercise

One of the most important questions unanswered in the field of lifestyle-related bone health research is whether there is an interaction between calcium intake and physical activity. As aforementioned, this requires a clinical trial with a 2 (calcium/no calcium) x 2 (exercise/no exercise) factorial design. It was already suggested more than ten years ago, that calcium supplementation has the potential to modify the bone response to increased training loads (20). However, published data on this issue are still scarce. Specker (21) looked upon intervention studies reporting the effects of daily calcium intake and physical exercise on bone mass. This review identified 16 intervention studies, with peri- or post-menopausal cohorts ranging from 5 to 130 subjects. This meta-analysis yields indirect evidence that physical activity has a positive effect on bone mass, but only for calcium intake above 1000 mg/day. Similarly, high calcium intake triggered BMD changes only if associated with physical exercise.

Another meta-analysis (22) came to the same conclusion: it appears that a certain threshold is required for calcium to have an effect. Indeed, BMD changes in response to aerobic exercise were greater in the groups consuming more than 1000 mg calcium per day than in those taking less than 1000 mg/day. Also, animal studies suggest that low calcium intake or reduced calcium

Table I. Summary of the studies with a 2x2 factorial design combining bisphosphonates and physical exercise in post-menopausal women.

Authors	Mean age	Intervention	Duration of exercise program	Measurement site	Main BMD outcomes
Chilibeck <i>et al.</i> (16)	57	Strength training	3 days/week over 12 months	Total body Lumbar spine Proximal femur	No interaction between physical exercise and Etidronate. Pooled Etidronate groups: \uparrow 2.3% vs. \downarrow 0.2% for the placebo group at the lumbar spine.
Uusi-Rasi <i>et al.</i> (26)	54	Alternate aerobic jump or step program	3 days/week over 12 months	Lumbar spine Proximal femur Distal radius	Neither additive nor interactive effects of Alendronate and physical exercise. Exercise only had no effects on bone mass at any site. Alendronate had positive effects on the lumbar spine and proximal femur.

bioavailability limit the bone response to exercise (23).

A recent intervention study on 239 children, aged between three and five years old, (178 of whom completed the study) associated calcium supplementation with an exercise program (24). The children were randomized into two groups, one being assigned to gross motor activities and the other to fine motor activities. In both groups, children were then supplemented at random with either 1000 mg/day calcium or placebo. Bone measurements were made at the distal tibia. A significant interaction between exercise and calcium supplementation emerged, evidenced by an increase in cortical thickness and cross sectional area. Gross motor activities induced greater tibial periosteal and endosteal circumferences than did fine motor activities. Calcium intake did not affect periosteal or endosteal circumferences. Conversely, in the calcium-supplemented group, the greatest increase in cortical thickness and cross sectional area at the tibia occurred in the subjects assigned to fine motor activities. Eventually, physical activities had no positive effects on bone mass unless calcium intake exceeded 1100 mg/day.

A research team led by Tulano-Burns followed during 8.5 months 66 girls (mean age 8.3 years) divided into four different groups (25). The girls were randomly assigned to either moderate impact exercise with or without calcium supplementation; or low impact exercise with or without calcium supple-

mentation. Exercise sessions lasted 20 minutes and were performed three times a week. Food was enriched with 434 ± 19 mg of calcium/day. Analysis of covariance was carried out to test main effects and interaction of calcium and exercise on bone mass. In order to account for changes inherent to growth, bone parameters were adjusted for initial bone length and BMC. As a result, an interaction between calcium and exercise was seen at the femur, but not at the tibia, despite a 3% increase in BMC at the tibia and fibula. At non-weight bearing sites, such as the humerus, radius and ulna, an additional 2 to 4% increase in BMC was seen in the calcium-supplemented groups, compared to the non-supplemented groups. The authors concluded that the greatest bone gains at weight bearing sites were achieved when short exercise bouts of moderate intensity were associated with increased calcium intake. Exercise has been shown to induce specific local adaptations whereas calcium is thought to have more systemic effect (25).

Bearing in mind that physical exercise increases bone mass at weight-bearing bone sites, the assumption that calcium may have effects even on non-weight-bearing bone sites has been confirmed in a recent study involving 218 perimenopausal women (26). Using QCT, the investigators found that high calcium intake was associated with greater cortical cross-sectional area and bone strength index at the radius. In contrast, physical exercise exerted positive effects on the bone mass of weight bear-

ing sites such as the tibia.

Our team investigated the combined effects of physical exercise and calcium intake on bone accrual during puberty (27). A cohort of young girls were divided into four groups: 1) exercise (7.2h/week) + 800 mg calcium phosphate/day; 2) exercise (7.2h/week) + placebo; 3) moderate activity (1.2h/week) + 800 mg calcium phosphate/day; 4) moderate activity (1.2h/week) + placebo. BMD gains after one year were significantly greater in the 'exercise+calcium' group, while no difference emerged between the three other groups. Thus, it seems that exercise requires high calcium intake to induce significant BMD gains. Studies in children combining calcium and physical exercise with a 2 x 2 factorial design are presented in Table II. To conclude, the mechanisms that underpin bone gains remain a matter of debate, as it is still not fully understood why the combined effects of calcium and exercise are more efficient than either one alone.

Physical exercise and estrogens

Oestrogen therapy at menopause proved efficient in lowering post-menopausal bone loss and has long been considered the backbone of osteoporosis prevention (28). The menopause-related decrease in oestrogen levels is thought to enhance sensitivity of the bone to mechanical strain, thus rendering physical exercise less efficient in increasing bone mass (29). Recent data indicate that the early response of bone

Table II. Summary of the studies with a 2 x 2 factorial design combining calcium and physical exercise in children.

Authors	Mean age	Intervention	Duration of exercise program	Measurement site	Main BMD outcomes
Specker <i>et al.</i> (24)	4	Fine Motor Group (FMG): activities designed to keep children seated Gross Motor Group (GMG): jumping, hopping, skipping	30 min/day over 12 months	Total body Arm Leg	The difference in BMC gain at the leg between FMG and GMG was more marked in the children taking calcium than in the placebo-fed group.
Tulano-Burns <i>et al.</i> (25)	9	Low impact group: low impact dance routines and stretching Moderate impact group: jogging, jumping and skipping	20 min, 3 times/week over 8.5 months	Total body Lumbar spine Arm Leg	Bone gains at the femur were greater in the calcium+exercise group than in the calcium-only group. Physical exercise but not calcium increased bone mass at loaded sites. Calcium but not physical exercise increased bone mass at non-loaded sites.

cells to mechanical strain and estrogens might share a common path involving the oestrogen-receptor ER- α (30-33).

Besides, Lee and co-workers reported that the adaptive response of bone to mechanical strain required a functional oestrogen receptor- α (34). Additionally, evidence showed that the oestrogen-receptor ER- α modulates the bone density response to physical exercise in young pubertal and pre-pubertal girls (35). The literature reflects the absence of a consensus: Some studies indicate that the effects of oestrogen and mechanical strain on bone mass density are independent; while others claim effects are additional or synergistic depending on the bone site considered (36-39). Furthermore, some investigators reported that adding physical exercise to hormonal replacement therapy (HRT) was no more effective on BMD than HRT alone (40-43). However, the main limitations of these studies were lack of randomization (37), insufficient statistical power due to small group size (38), inclusion of women already taking HRT before entering the study (38, 43), insufficient loading of bone (40), poor description of exercise prescription (45), and discrepancies in training volume in-between study groups (42).

To our knowledge, only one study bears the title "synergistic effect of physical exercise and oestrogen". This work analyzed histomorphometric parameters at the femur and lumbar vertebrae in response to exercise in ovariectomized rats (39). However, it seems that the results do not quite echo the title, as none of the nine parameters tested at the lumbar spine evolved, and only three out of the 13 femoral parameters revealed the announced interaction between treatment and exercise.

Conclusion

Studies combining physical exercise with drug therapies for osteoporosis in an attempt to either prevent postmenopausal bone loss, or maximise gains during peak bone mass acquisition, yielded mixed results. If animal studies showed that bisphosphonate combined to exercise are more effective in increasing BMD than each factor taken separately, results in humans

are less promising. Further investigations with a 2 x 2 factorial design are required to shed more light on the interaction between exercise and therapy. Eventually, beyond the effects of exercise on bone mass, bone quality, as well as structural changes in bone micro and macro architecture, need to be described. Indeed, elucidation of such mechanism may lead to a novel therapeutic approach to osteoporosis.

References

- KANNIS P, VIERNI S, PIRKKARI J, PALVANEN M, VUORI I, JARVINEN M: Hip fractures in Finland between 1977 and 1997 and predictions for the future. *Lancet* 1999; 353: 802-5.
- DE MAS FD: Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 2002; 359: 2018-26.
- DEPREZ X, PARDELLEONE P: Non-pharmacological prevention of osteoporotic fractures. *Jour Bone Spine* 2003; 70: 8: 8-28.
- PFEILER M, SINAKI M, GEUSENS P, FOONEN S, PREISINGER E, MINNE HW: For the ASBMR working group on musculoskeletal rehabilitation in osteoporosis: a review. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1208-14.
- WALLACE RA, CUMMINGS RG: Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre and postmenopausal women. *Colef Tissue Int* 2000; 67: 10-8.
- BONALTDI D, SHEA B, DIVINE R, NEGRINI S et al.: Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Data Base Syst Rev* 2002; 3: CD000333 Review.
- BONDUR JP, CARRIE AL, FERRARI S et al.: Calcium-enriched foods and bone mass growth in prepubertal girls: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Invest* 1997; 99: 1287-94.
- COURILIX D, LESPESSAILLES E, PERES SL, OBERT P, GERMAIN P, BENHAMOU CL: Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls: a comparative study between impact loading and non-impact loading sports. *Osteoporos Int* 1998; 8: 152-8.
- BAILEY DA, MC KAY HA, MINSWALD RL, CROCKER PR, FAULKNER RA: A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the University of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 1993; 14: 1673-9.
- BARR SL, MCKAY HA: Nutrition, exercise and bone status in youth. *Int J Sport Nutr* 1998; 8: 124-42.
- FISHER LD, DIXON SO, HURSON J, FRANKOWSKI RR, HEARRON MS, PEACE KE: Intention-to-treat in clinical trials. In: PEACE KE, Eds. *Statistical Issues in Drug Research and Development*. New York, Marcel Dekker 1990; 31-350.
- BLICK JE: Interpreting studies of exercise and osteoporosis: a call for rigor. *Controlled Clinical Trials* 1997; 18: 54-7.
- Bisphosphonates in bone diseases*. 4th edition Academic press, Harben Flaich, 2000.
- LIPS P, HESP R, REEVE J, WOOTTON R, GREEN JR, KLEINERMAN L: High indices of remodelling in iliac trabecular bone predict reduced bone mineral density in patients with proximal femoral fractures. *Bone Miner* 1998; 11: 95-100.
- TAMAKI H, AKAMINE T, GOSHIN N, KURATA H, SASO T: Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and tubular bone in ovariectomized rats. *Bone* 1998; 23: 147-53.
- CHILIBECK PD, DAVISON ES, WILCHING EI, SUZUKI Y, JANZEN CL, PELOSO P: Effect of strength training combined with bisphosphonate (etidronate) therapy on bone mineral, lean tissue and total fat mass in postmenopausal women. *Clin J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 941-50.
- GUSTI RASI K, KARNUS P, CHENG S et al.: Effect of alendronate and exercise on bone and physical performance of postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Bone* 2003; 33: 132-42.
- FUCHS RK, SHEA M, WIDRICK J, STARK S, HANSEN S, SNOW CM: Synergistic effects of exercise plus alendronate on bone mass and structural properties in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2002; 17: (Suppl. 1): S-152 (abstract).
- VAN HEIDEKEN WAGERT P, LUTTERANO H, JOHANSSON A, NORDSTRÖM R, GUSTAFSSON Y: Jumping exercises with and without calcium treatment in healthy elderly women. *J Bone Miner Metab* 2002; 20: 375-82.
- KELLY P, EISMAN JA, SAMBROOK PN: Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. *Osteoporos Int* 1993; 1: 56-64.
- SWICKER BL: Evidence for an interaction between calcium intake and physical activity on changes in bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1539-44.
- KELLEY GA: Aerobic exercise and bone density in the hip in postmenopausal women: a meta analysis. *Preventive Medicine* 1998; 27: 798-807.
- LANYON JE, RUBIN CJ, BOUST G: Modulation of bone loss during calcium insufficiency by controlled dynamic loading. *Colef Tissue Int* 1986; 38: 209-16.
- SPECKER B, HINKLEY T: Randomized trial of physical activity and calcium supplementation on bone mineral content in 5 to 5 year old children. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 885-92.
- JULIANO BURNS S, SAXENI L, NAUGHTON G, GIBBONS K, BASS SL: Regional specificity of exercise and calcium during skeletal growth in girls: a randomized controlled trial. *Bone Miner Res* 2003; 18: 156-62.
- DIJST-RASI K, STEVANEN H, PASANEN M, OJA P, KUORI E: Association of calcium intake and physical activity with bone density and size in premenopausal and postmenopausal: a peripheral quantitative computed tomography study. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 544-52.
- CCURTEIX D, JAFFRE C, LESPESSAILLES E, BENHAMOU CL: Cumulative effects of calcium supplementation and physical activity on bone accretion in premenarchal children: a

- double-blind randomised placebo-controlled trial. *Int J Sports Med* 2004; 25: 1-7.
28. EASTELL R: Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 736-46.
29. LANYON LE: Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone* 1996; 18: 37-43.
30. CHENG MZ, ZAMAN G, RAWLINSON SCF, SUSWILLO RFC, LANYON LE: Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures *rat ulna*. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 502-11.
31. DAMIEN E, PRICE JS, LANYON LE: The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 275-83.
32. DAMIEN E, PRICE JS, LANYON LE: Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in male as well as female. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2169-77.
33. JESSOP HL, SJOBERG M, CHENG MZ, ZAMAN G, WHEELER-JONES CP, LANYON LE: Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1345-55.
34. LEE K, JESSOP H, SUSWILLO R, ZAMAN G, LANYON L: Endocrinology: bone adaptation requires estrogen receptor-alpha. *Nature* 2008; 454: 389.
35. SUURINEMI M, MAHONEN A, KOVANEN V, ALEN M, LYYTIKAINEN A, WANG Q: Association between exercise and peripheral BMD is modulated by estrogen receptor and genotype. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1758-65.
36. YEH JK, LIU CC, ALVAZOF: Additive effect of treadmill exercise and 17 α -estradiol replacement on prevention of tibial bone loss in adult ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 677-83.
37. KOERT WM, SNEAD DB, SLATOPOLSKY E, BERGE SJ: Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1302-11.
38. NOTELOVITZ M, MARTIN D, TESAR E *et al.*: Estrogen therapy and variable-resistance weight training increase bone mineral in surgically menopausal women. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 583-9.
39. LI CY, JEE WS, CHEN E *et al.*: Estrogen and exercise have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int* 2005; 72: 43-9.
40. PRINCE RL, SMITH M, DICK IM *et al.*: Prevention of post-menopausal osteoporosis. A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormonal replacement therapy. *N Engl J Med* 1991; 1180-95.
41. HEIKKINEN J, KURTTILA-MATERO E, KYLLONEN L, VUORI J, TAKALA T, VAANANEN HK: Moderate exercise does not enhance the positive effect of estrogen on bone mineral density in post-menopausal women. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 583-884.
42. CHENG S, SIPIA S, TAAFFE DR, PUOLAKKA J and SUOMINEN H: Change in bone mass distribution induced by hormone replacement therapy and high-impact physical exercise in post-menopausal women. *Bone* 2002; 31: 126-35.
43. LOHMAN TG, CABALLERO B, HIMES JE *et al.*: Effects of exercise on bone mineral density in calcium replete postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Osteoporosis Int* 2003; 14: 637-43.

L'ostéoporose postménopausique est caractérisée par une diminution de la masse osseuse conduisant à des évènements fracturaires et à un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de la résorption. L'ovariectomie chez la rate est à l'origine d'une diminution de la densité minérale osseuse, de la résistance osseuse et d'une augmentation du taux de remodelage osseux [192,193], tels qu'on les observe chez les femmes ostéoporotiques. Par conséquent, les traitements qui entraînent soit une inhibition de la résorption osseuse ou qui stimulent la formation osseuse sont susceptibles d'être efficaces pour prévenir la perte osseuse induite par la déficience en estrogènes.

L'administration d'acide zolédronique s'est à cet égard révélé être efficace chez la femme [83,84] pour réduire le risque de fracture et chez le rongeur pour prévenir la perte osseuse et la diminution de la résistance mécanique osseuse induite par l'ovariectomie [85,86].

Il a par ailleurs été rapporté que la pratique de l'exercice physique augmentait la formation osseuse tant chez le rongeur que chez la femme [150,107]. Les exercices physiques qui induisent un stress mécanique en charge sont efficaces pour prévenir la perte de masse osseuse chez la femme récemment ménopausée [121,122]. Il a également été suggéré que les exercices de course augmentaient la densité minérale osseuse par l'amélioration du stress mécanique sur l'os et par l'induction d'une hypertrophie de l'os cortical dans des modèles animaux expérimentaux [194,195].

Il apparaît donc concevable d'imaginer que la combinaison d'un bisphosphonate, l'acide zolédronique, et de la course sur tapis roulant puisse apporter des effets supérieurs à ceux de chacune des interventions thérapeutiques appliquées séparément dans le modèle de la rate mature ovariectomisée. Cette hypothèse est également confortée par le fait que les effets de chacune des interventions thérapeutiques mettent en jeu des cellules et des modes d'actions différents : action sur les ostéoclastes pour l'acide zolédronique, action sur la triade ostéoblaste, ostéocyte, cellule bordante, pour l'exercice physique.

Le but de la première étude était donc de mettre en évidence un éventuel effet synergique ou additif de l'acide zolédronique et de l'exercice physique sur la prévention de la perte osseuse, des variations microarchitecturales, biomécaniques et du remodelage osseux chez des rates matures ovariectomisées.

Les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le profil lipidique des patients ont conduit à des recommandations de la part de nombreuses sociétés savantes pour encourager la pratique régulière d'un exercice physique d'intensité modérée [196,197].

En revanche, les effets des bisphosphonates sur le métabolisme lipidique sont moins bien connus. Des études récentes [74,76-79] indiquent que certains bisphosphonates dont l'acide zolédronique pourraient interférer avec le métabolisme lipidique et ainsi améliorer le risque d'athérosclérose des patients recevant ces bisphosphonates. Là encore, les modes d'action de ces deux types d'intervention thérapeutique n'étant pas identiques,

nous nous sommes intéressés, dans une deuxième étude, à une possible interaction synergique entre les effets de l'exercice physique et de l'acide zolédronique sur le profil lipidique de rates matures ovariectomisées.

5. Matériels et méthodes

5.1. Animaux

60 rates femelles de souche WISTAR âgées de 24 semaines (n=70) ont été achetées au Centre de Production Animale (Olivet, France) pour les études décrites dans ce travail. Les rates ont été utilisées pour tester l'hypothèse d'un effet synergique entre l'activité physique et l'acide zolédronique d'une part sur le remodelage osseux, le contenu minéral osseux, les paramètres biomécaniques et la microarchitecture trabéculaire osseuse, et d'autre part le métabolisme lipidique dans le modèle de la rate mature ovariectomisée. Les rates issues des mêmes groupes de traitement étaient logées deux par cages (cages standard). La température à l'animalerie était de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ avec un cycle de lumière-obscurité de 12/12 heures. Durant l'étude, les rates avaient libre accès à l'eau et à la nourriture (AO4, SAFE, France). Les rates impliquées dans l'étude testant le traitement combiné (exercice et acide zolédronique) ont été maintenues deux semaines à l'animalerie avant l'ovariectomie.

5.1.1 Traitement des animaux

Après deux semaines d'acclimatation, les rates âgées de 26 semaines étaient aléatoirement destinées à être ovariectomisées (n=48) ou pseudo-opérées [Sham] (n=12). Les rates destinées à l'ovariectomie bilatérale et assignées à un groupe traitement par placebo (sérum physiologique 0.09 %) ou par l'acide zolédronique ont reçu cette injection deux jours avant l'ovariectomie. L'ovariectomie bilatérale et la pseudo-opération étaient faites sous anesthésie par injection intrapéritonéale de Kétamine 50 mg/kg et Xylasine 10 mg/kg.

5.1.2 Protocole d'entraînement sur tapis roulant

Deux jours après l'ovariectomie, les deux groupes de rates assignées à l'exercice ont été soumises à un protocole de conditionnement à l'exercice physique (la course) sur tapis roulant. Les rates âgées de 26 semaines environ au début du protocole ont été soumises à 12 semaines d'entraînement. Durant les quatre premières semaines, la durée et la vitesse de course sont augmentées progressivement pour atteindre en fin de quatrième semaine un entraînement de course d'une heure par jour, cinq jours sur sept, avec une vitesse du tapis roulant de 15 m/mn. Le détail de la période des quatre semaines de progression de l'entraînement est résumé dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Protocole de conditionnement au tapis roulant

Semaine	Durée d'acclimatation (min)	Durée de course (min)	Vitesse de course (m/min)
1	10	15 à 30	8 à 12
2	5 à 10	30 à 60	12
3	5	60	12 à 13.5
4	5	60	13.5 à 15

Les rates ont été entraînées à la même heure chaque jour. La plupart des rates ont couru de façon volontaire mais pour certaines le câble placé à l'arrière des pistes du tapis a pu s'avérer utile (stimulation mécanique).

Les rates des groupes sédentaires (SH, OVX et OVX-Z) ont été manipulées une fois par semaine pendant toute l'étude afin de reproduire un minimum de stimulation de stress en comparaison des animaux manipulés pour l'entraînement sur tapis roulant.

5.1.3 Dispositif du tapis roulant

Un tapis roulant de 10 pistes a été conçu pour la réalisation de cet entraînement, 24 rates étant soumises à cet exercice. Les rates étaient entraînées par groupe de huit. Le tapis est constitué de 10 pistes amovibles d'une longueur de 70 cm et d'une largeur de 10.5 cm. Trois câbles espacés de 0.5 cm à l'arrière de chaque piste permettent une stimulation mécanique des rates. Le tapis d'une longueur de 3.25 m est entraîné par un moteur Siemens (250 V, 50 Hz). La vitesse est contrôlée à l'aide d'un boîtier à affichage numérique ; un système d'arrêt d'urgence est disponible. Le tapis roulant est plat et aucun degré d'inclinaison n'est donc adapté aux pistes de courses.

5.2 Densitométrie

5.2.1 Dispositif

Les analyses densitométriques ont été conduites sur un absorptiomètre à rayons X double énergie utilisant un faisceau en éventail (fan beam) de type Discovery-A (Hologic.Inc. Bedford, MA).

5.2.2 Protocole de mesure

Ce densitomètre était calibré quotidiennement en accord avec les recommandations du constructeur. Le logiciel spécifique rat corps entier (whole body WB) (petit animal) était utilisé pour mesurer le contenu minéral osseux du corps entier et la densité osseuse du corps entier. Le protocole d'imagerie du petit animal et en particulier le mode d'analyse régionale à haute résolution était utilisé pour mesurer la densité osseuse des fémurs excisés.

Lors de la réalisation des mesures densitométriques, une fine feuille plastifiée était placée sur le corps des rates. Cette feuille plastifiée était donc placée sous le fantôme du petit animal lors des procédures de contrôle de qualité. Ensuite, le fantôme était analysé chaque fois que des mesures chez les rates étaient prévues de façon à respecter les procédures de contrôle de qualité. Lors des mesures, la queue des rates était incurvée et déplacée le long du corps de l'animal de façon à pouvoir analyser correctement le corps du rat. La largeur par défaut de l'image d'analyse pour l'étude du corps entier des rates était de 17,8 cm.

Pour la mesure des fémurs excisés le logiciel d'analyse régionale en haute résolution, était utilisé. Le fémur excisé était placé au centre d'un récipient en plastique fin et à fond plat. Ce récipient, selon les recommandations du constructeur était suffisamment large (8,3 cm) pour permettre qu'une fois positionnée en son centre le fémur soit distant des parois d'au moins un pouce. Le récipient était rempli de sérum physiologique pour obtenir une profondeur de 3 cm. Cette hauteur d'eau a été calculée pour permettre de reproduire la quantité de tissu mou existant in vivo en regard du fémur.

Pour toutes les mesures une profondeur d'eau constante était obtenue en dessinant un niveau à 3 cm sur le contour du récipient. Pour obtenir les mesures densitométriques in vivo du corps entier, les rates une fois anesthésiées étaient positionnées sur la fine feuille plastifiée où les contours d'une rate « modèle » avaient été dessinés pour améliorer la reproductibilité de la mesure. Les rates étaient positionnées sur le dos, la queue et les extrémités des pattes étaient appliquées contre la feuille plastifiée à l'aide de sparadrap. La **figure 6** montre un exemple d'analyse densitométrique au corps entier.

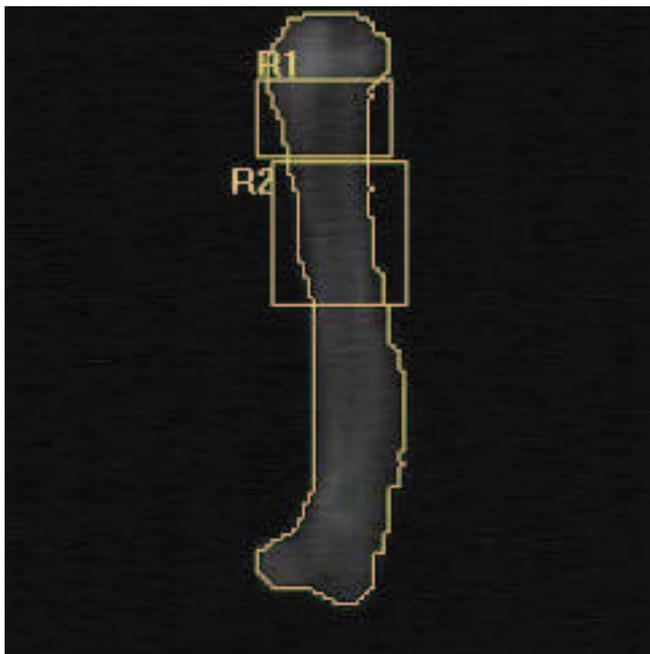
Le mode d'analyse haute résolution régionale utilisé permet l'étude d'une zone d'approximativement 7.37 cm de long au maximum et de largeur par défaut d'environ 5.08 cm. La résolution avec ce mode d'analyse est de 0.00311 cm et l'espacement entre les lignes est de même valeur. Lors de l'analyse de la projection radiographique du fémur deux sous-régions ont été considérées. La première (R1), sous la zone du plateau de croissance est située dans la région de la métaphyse distale du fémur, la deuxième (R2) est elle localisée plus distalement

dans une région diaphysaire du fémur. La zone R1 est plus riche en tissu osseux trabéculaire. La zone R2 est plus riche en os cortical (**figure 7**)

Figure 6 : Photographie montrant l'analyse par DXA du corps entier d'une rate.



Figure 7 : Photographie montrant l'analyse par DXA du fémur excisé et des sous régions R1 et R2, R1 plus riche en tissu trabéculaire, R2 plus riche en os cortical



5.2.3 Reproductibilité de la mesure

Les root-mean square CV des mesures de CMO, DMO et masse grasse au corps entier in vivo ont été déterminés par l'analyse répétée deux fois avec repositionnement chez 30 animaux. Les root-mean square CV des mesures de CMO, DMO du fémur total et des sous régions R1 et R2 ont été déterminés par l'analyse in vitro de 4 mesures répétées chez 9 animaux.

Les valeurs de la reproductibilité sont reportées dans le **tableau 2**.

Tableau 2

Root mean square CV (coefficient de variation) du corps entier, du fémur excisé en entier et des régions d'intérêt proximale (R1) et médiane du fémur (R2)

Corps entier (CE)		Total		
Surface	%	1,6		
CMO	%	1,2		
DMO	%	0,87		
Masse grasse	%	3,8		

Fémur excisé		Total	R1	R2
Surface	%	1,08	-	-
CMO	%	1,15	5.73	4.09
DMO	%	0,39	2.64	1.55

La zone R1 est plus riche en os trabéculaire
 La zone R2 est plus riche en os cortical

5.3 Microtomographie à rayons X

Dans le domaine scientifique la microarchitecture de l'os trabéculaire était classiquement étudiée par l'histomorphométrie. Cependant si cette technique donne des informations précises sur les paramètres morphologiques, elle ne fournit des informations topologiques et de connexité qu'à partir des données en deux dimensions ce qui est débattu. En effet la détermination de la microarchitecture 3D à partir de coupes 2D peut constituer une source d'erreur.

La microtomographie à rayons X est une technique non destructive issue du milieu médical où l'on a remplacé un film photosensible par un capteur au silicium pour pouvoir acquérir rapidement de multiples projections radiographiques d'un objet sous différents angles. Cette technique permet d'obtenir une image 3D, reflétant mieux les paramètres microarchitecturaux. Barou et coll. ont ainsi montré sur le tibia de rat que cette technique permettait de détecter une perte osseuse plus précocement que l'histomorphométrie [198]. Plus récemment encore les progrès de l'imagerie microscanner ont permis le développement d'appareil de type microscanner haute résolution facilitant l'étude in vivo des petits animaux. En particulier Perilli et coll ont

montré qu'il était possible de détecter in vivo les variations longitudinales des paramètres micro architecturaux associés à l'ovariectomie [199].

5.3.1 Dispositif

Nous avons utilisé le microtomographe (μ CT : Skyscan 1072) (Skyscan, Aartselaar, Belgium). La microtomographie à rayons X est basée sur l'acquisition d'une multitude de projections radiographiques selon l'axe z (**Figure 8**). Entre chaque projection, l'échantillon tourne d'un angle très faible grâce à un moteur pas à pas (0.45°). Pour une étude de l'os dans son ensemble il faut réaliser une rotation de 180° . Des coupes horizontales 2D dans le plan (x0y) sont ensuite reconstruites à partir de toutes les projections radiographiques numériques. Les projections radiographiques étant acquises en 4096 niveaux de gris (12 bits), les images sont segmentées en 8 bits au moment de la reconstruction des coupes pour obtenir des images en 256 niveaux de gris. La segmentation est l'étape la plus importante de la reconstruction des coupes, sans elle l'image serait trop complexe pour être analysée. L'histogramme des niveaux de gris de l'os entier contient : les niveaux de gris de la corticale, des travées, de la moelle et du bruit de reconstruction tomographique. Cet histogramme est difficile à segmenter, il faut donc, avant toute chose, savoir ce que l'on veut étudier pour optimiser le rapport signal sur bruit. La représentation volumique de l'objet est ensuite obtenue grâce à l'empilement de toutes les coupes.

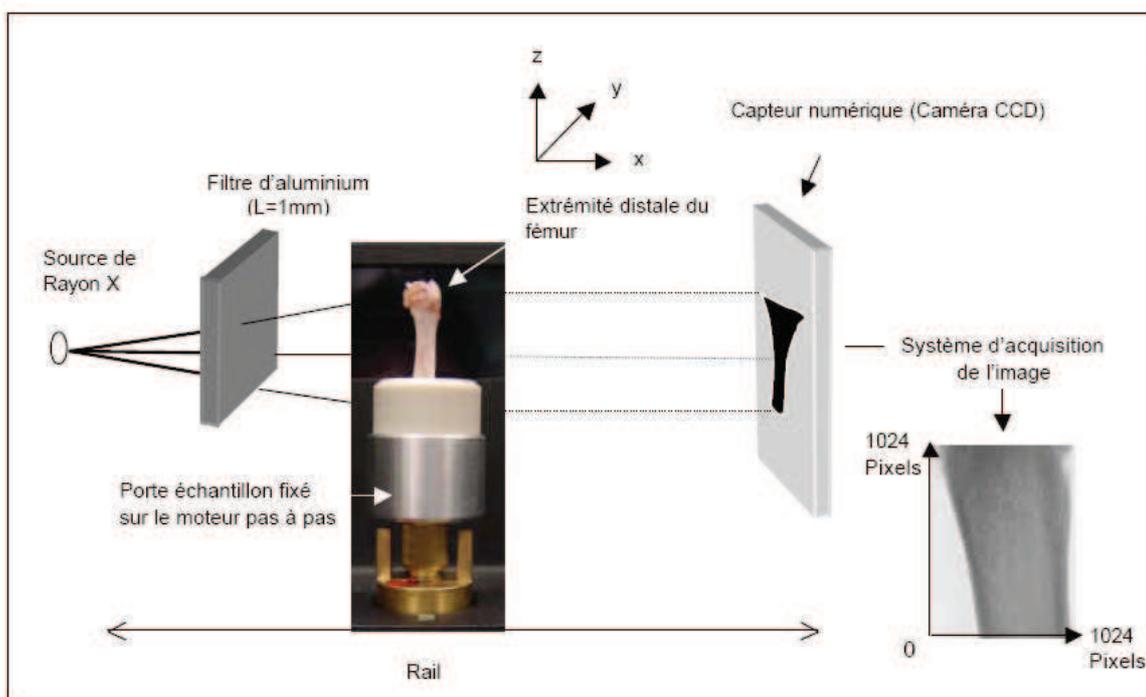


Figure 8 : Principe de fonctionnement du microtomographe. La source émet un faisceau de rayons X d'amplitude et d'intensité à déterminer selon la matière à analyser. Le filtre d'aluminium atténue les rayons X et permet d'avoir un meilleur contraste de l'image. L'échantillon est placé dans le porte échantillon lui-même installé sur un moteur pas à pas, le tout positionné sur un rail pour faire varier le grandissement de l'image. La caméra 1024*1024 capte les photons, transforme l'information photonique en information électrique et transmet l'image numérisée à l'ordinateur (système d'acquisition de l'image). La taille de l'image est de 1024*1024 pixels permettant la reconstruction au maximum de 1024 coupes. Les zones les plus denses de l'os (atténuant le plus les rayons X) sont les plus foncées dans l'échelle des niveaux de gris de l'image numérique.

5.3.2. Protocole de mesure, les points critiques

a) Zone d'étude et positionnement

La région métaphysaire distale du fémur a été choisie comme région d'intérêt pour sa richesse relative en tissu osseux trabéculaire. Le fémur est fixé de telle manière que l'extrémité proximale se situe dans le porte échantillon (**figure 8**).

b) Acquisition des projections radiographiques

L'acquisition des projections radiographiques permet de visualiser la projection de l'os dans le plan (yOz) (**Figure 8**). Grâce à une étude préalable de l'os trabéculaire, nous avons optimisé les paramètres d'acquisitions pour améliorer la qualité de l'histogramme des niveaux de gris et ainsi simplifier la segmentation de l'os trabéculaire. La tension et l'intensité de la source ont été réglées à 75kV (kilo Volt) et 104 μ A (micro Ampère). Le pas de rotation du moteur pas à pas a été fixé à 0.45°, ce qui correspond à l'acquisition de 400 (180/0.45) projections radiographiques. Pour chaque angle 4 projections radiographiques sont acquises afin d'obtenir une projection moyennée ayant un meilleur rapport signal / bruit. Un grandissement de 28 a été choisi pour obtenir un compromis entre la taille du pixel (11.16 μ m) et la taille de la zone d'étude (plus la taille de pixel est petite, plus la zone d'étude est restreinte).

c) Reconstruction 2D

Un algorithme de reconstruction tomographique basé sur l'algorithme de Feldkamp permet l'obtention de 1024 coupes à partir des projections radiographiques de l'os. Une segmentation uniforme pour tous les os a été utilisée pour minimiser les biais entraînés par le traitement de l'image

d) Régions d'intérêt

Nous avons décidé de travailler sur les 225 coupes situées en dessous de la plaque de croissance de l'extrémité distale du fémur. Pour cela nous avons sélectionné

visuellement à l'écran la coupe qui correspond à la disparition du cartilage de croissance. Pour obtenir les paramètres microarchitecturaux, on sélectionne une ROI (Region Of Interest) purement trabéculaire en plaçant visuellement sur l'écran de l'ordinateur un polygone à la limite trabécule-corticale toutes les 40 coupes (**Figure 9**). L'ordinateur interpole ensuite entre 2 ellipses positionnées des ROI elliptiques sur chaque coupe 2D. L'ensemble de ces ellipses constitue notre VOI (Volume Of Interest) dont la forme est conique.

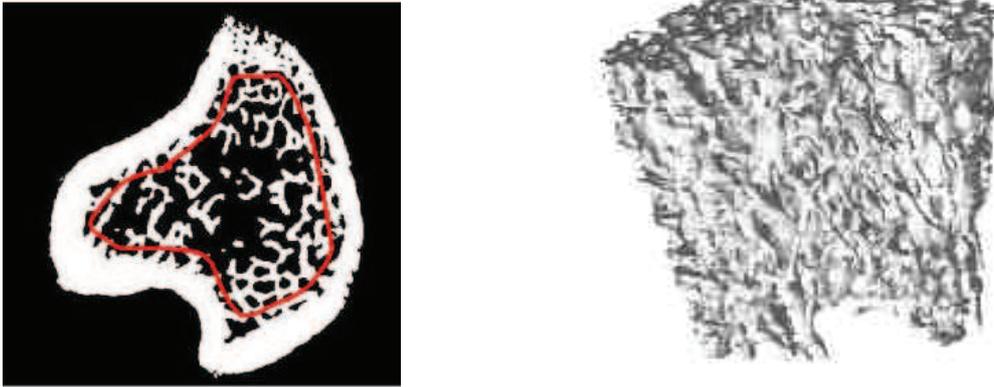


Figure 9 : Région d'intérêt (ROI) trabéculaire. La ROI, trabéculaire a été sélectionnée en traçant visuellement un polygone, toutes les 40 coupes (représentée en rouge sur la figure de gauche). La figure de droite représente la reconstruction 3D de l'os trabéculaire d'une métaphyse distale d'un fémur de rat. La taille du pixel est de $11\mu\text{m}$ dans l'analyse de l'os trabéculaire.

e) Le seuillage

Le seuillage est la dernière étape avant le calcul des paramètres microarchitecturaux. Elle consiste à séparer sur l'ensemble du VOI les niveaux de gris d'os trabéculaire, des niveaux de gris correspondant à la moelle ou à du bruit généré lors de l'acquisition et de la segmentation. La binarisation va permettre de définir si le niveau de gris visualisé est de l'os ou du vide (**Figure 10**).

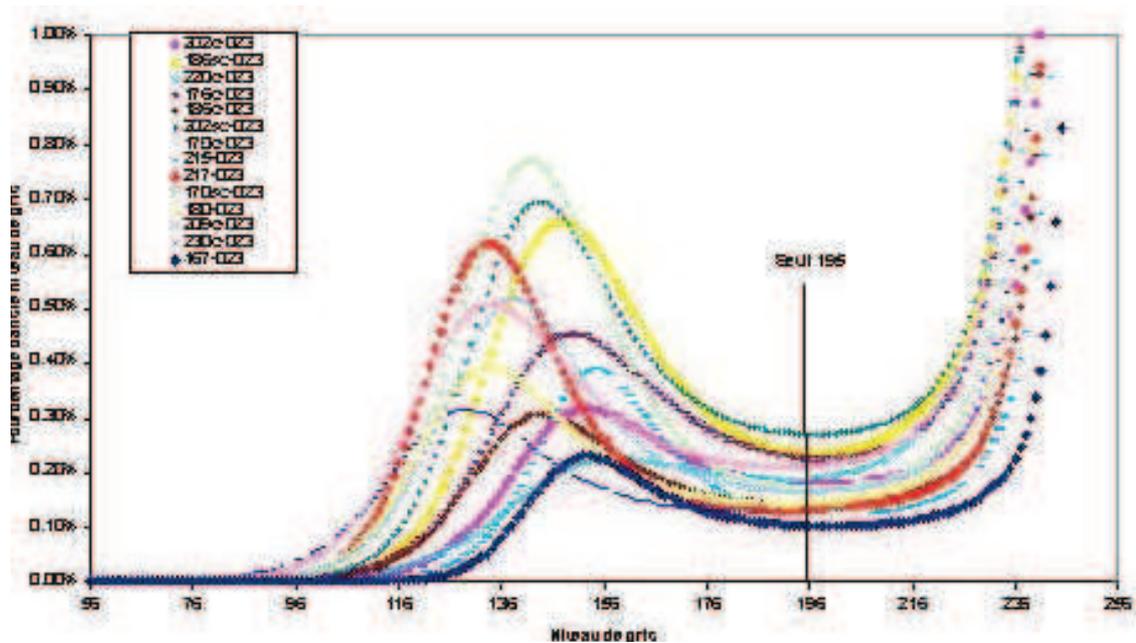


Figure 10 : Histogramme des niveaux de gris de différent échantillon. Cette représentation permet de voir qu'un seuil de 196 exclura tous les niveaux de gris dû au bruit sans éliminer l'information des niveaux de gris de l'os trabéculaire. Suite à ces histogrammes, l'analyse de l'os trabéculaire se fera quelque soit le site sur un niveau de gris compris entre 0 et 196. Tout niveau de gris supérieur à 196 sera considéré comme du vide.

5.3. 3. Paramètres mesurés

Paramètres trabéculaires

Les paramètres micro-architecturaux sont calculés à l'aide du logiciel « CT analyser ».

Paramètres morphologiques : **la proportion de volume osseux**, rapport du volume des travées osseuses (trabecular Bone Volume : BV) sur le volume du tissu osseux (trabecular Tissue Volume : TV) analysé (**BV/TV**) ; **la densité de surface osseuse**, rapport de la surface des travées osseuses (trabecular Bone Surface : BS) sur le TV (BS/TV) ; **le nombre des travées** (Trabecular Number : **TbN**) est calculé par la méthode du Mean Intercept Length (MIL). **L'épaisseur des travées** (Trabecular Thickness : **TbTh**) et **l'espacement entre les travées** (Trabecular bone Separation : **TbSp**) sont calculées par la méthode de la sphère [200].

Paramètres topologiques : le Trabecular bone pattern factor : **TBPF**. **Le TBPF** est un paramètre utilisé pour indiquer la connexité de l'os trabéculaire [201]. Ce paramètre reflète les caractéristiques « concavo-convexes » de la structure d'une surface d'os trabéculaire. Des surfaces concaves abondantes témoignent d'un réseau spongieux bien connecté alors que des surfaces convexes abondantes traduisent la présence d'un réseau de travées faiblement connecté. Le Structure Model Index (**SMI**) a été calculé à partir de la méthode décrite par Hildebrand et Rüegsegger [202]. Cet indice reflète la proportion de travées sous forme de plateau et de poutre, une valeur

« 0 » représente 100% de travées sous forme de plateaux une valeur de «3» représente 100% de travées sous forme de poutre.

Le **degré d'anisotropie (DA)** (pas d'unité) est calculé à partir du MIL. DA caractérise l'orientation de la structure dans l'espace [203]. Il renseigne sur la capacité du réseau trabéculaire à supporter des contraintes dans différentes directions d'application. Pour un degré d'anisotropie proche de 1, l'os est isotrope, il a une résistance identique dans toutes les directions. Pour un degré d'anisotropie élevé, l'os est anisotrope, sa résistance varie selon la direction.

5.3.4. Reproductibilité de la mesure

La reproductibilité de la mesure a été réalisée sur 3 os analysés 7 fois avec repositionnement de l'os entre chaque analyse. Au fémur les CV des mesures des paramètres morphologiques et des paramètres topologiques varient de 2.28% pour le BV/TV (paramètre ayant la meilleure reproductibilité) à 4.13 % pour le Tb.Sp paramètre ayant la moins bonne [204].

5.4 Macroarchitecture

Avant de réaliser les tests biomécaniques, différentes données morphologiques des fémurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse digital d'une précision de 1µm. Pour caractériser la macroarchitecture les os long ont été assimilés à une ellipse (**Figure 11**).

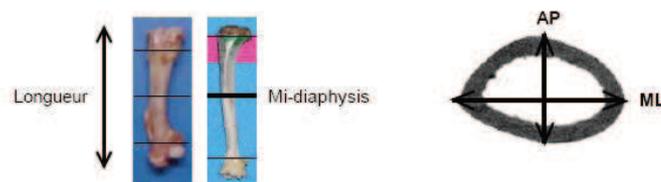


Figure 11 : Mesures morphologiques du fémur. Les diamètres des os long ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse digital dans deux directions: médio-latérale (ML) et antéro-postérieure (AP) aux niveaux des extrémités distales, proximales et au niveau de la mi-diaphyse.

5.5 Biomécanique

5.5.1. Dispositif

Les propriétés mécaniques du fémur gauche sont déterminées par le test de flexion en 3 points (Instron 4411) pour une analyse des propriétés mécaniques de l'os cortical. Le principe est d'exercer une force sur l'os jusqu'à sa rupture et de la mesurer par un capteur (**Figure 12**). Pour déterminer automatiquement la force à la rupture, le logiciel Instron 4411 a besoin de connaître le diamètre diaphysaire de chaque fémur gauche. A cause de l'irrégularité de la

forme diaphysaire et métaphysaire, le diamètre donné au logiciel est la moyenne des diamètres ML et AP.

5.5.2. Protocole de mesure

a) Essai de flexion

Les échantillons sont décongelés 24 h avant l'essai.

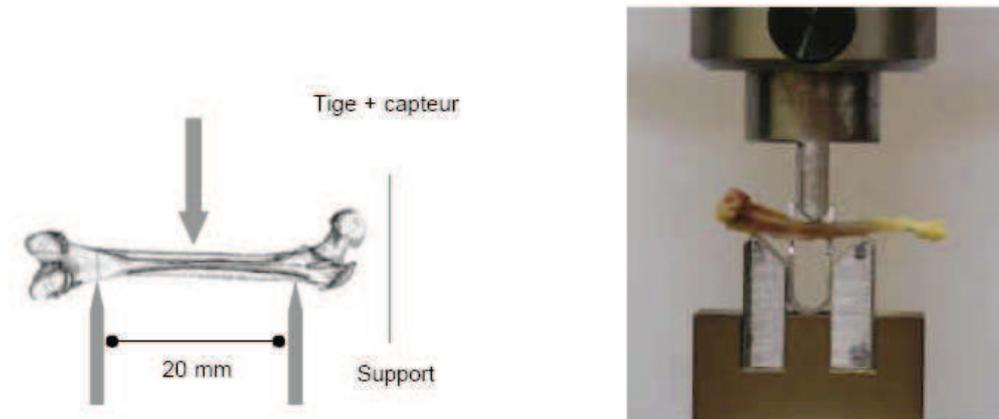


Figure 12 : Principe du test de flexion. Chaque os est placé sur deux supports fixes et subit le déplacement d'une tige. Pour assurer la comparaison des différents tests, l'os est positionné de telle manière que la tige applique une force perpendiculaire à l'axe médio-latéral au milieu de la diaphyse. La tige se déplace à une vitesse de 0.5mm/mn. Le système d'acquisition des données trace simultanément l'évolution de la force en fonction du déplacement de la tige.

5.5.3. Paramètres mesurés

Les données acquises lors des essais de flexion correspondent à la force (F en Newton) et au déplacement de l'os (en mm). A l'aide de ces données et des données géométriques des spécimens testés, il est possible de calculer les valeurs de contrainte à la rupture (σ en MPa) et de déformation à la rupture (ϵ) :

$$\sigma = F / S ; \epsilon = \Delta L / L$$

où S est la section de l'os à la mi-diaphyse pour la flexion (préalablement mesurés au microtomographe). Par le tracé de la force en fonction du déplacement et de la contrainte en fonction de la déformation on peut obtenir différents paramètres mécaniques de l'os (**Figure 13**). L'ensemble de ces paramètres a été déterminé automatiquement par un logiciel développé au sein du laboratoire.

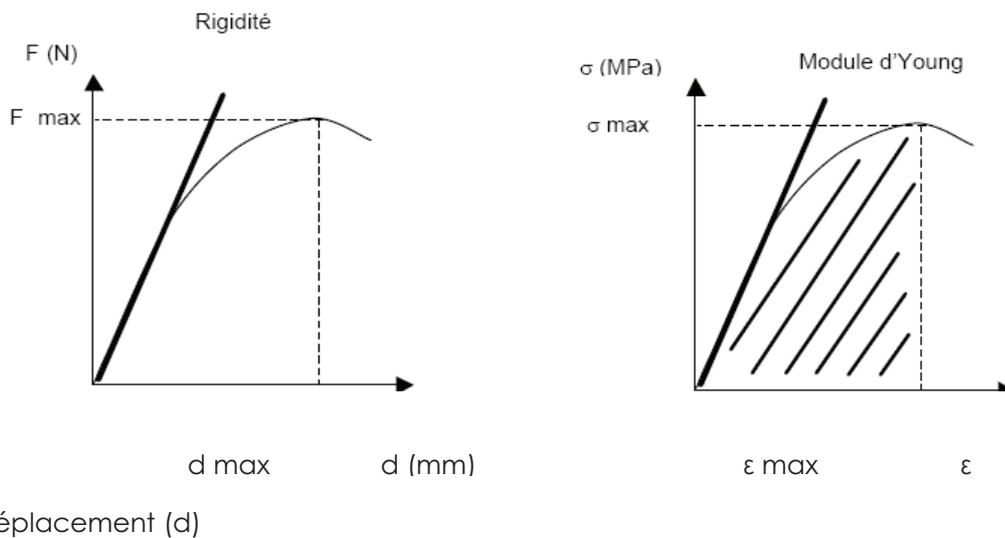


Figure 13 : Paramètres biomécaniques obtenus à partir des courbes force-déplacement et contrainte-déformation. La force maximale (F_{max} en N) correspond à l'asymptote de la courbe force-déplacement. Le déplacement à F_{max} (d_{max} en mm) correspond à l'abscisse où l'on observe F_{max} . La rigidité (kN / mm) est représentée par la pente à l'origine de la courbe force-déplacement. La contrainte max (σ_{max} en Mpa) correspond à l'asymptote de la courbe contrainte-déformation. La déformation à σ_{max} (ϵ_{max}) correspond à l'abscisse où l'on observe σ_{max} . Le module d'Young (E en MPa) est représenté par la pente à l'origine de la courbe contrainte-déformation. L'énergie à σ_{max} (U en kJ / mm^2) est définie par l'aire sous la courbe contrainte-déformation.

5.6. Dosages des paramètres du remodelage osseux, des lipides, et du TNF- α

5.6.1. Dosage des marqueurs biochimiques du remodelage osseux

Tout au long de la vie adulte, le tissu osseux est soumis à un processus de remodelage, l'os vieillissant étant détruit pour être remplacé par de l'os jeune par les effets d'un processus de couplage entre la résorption osseuse et la formation osseuse. L'ostéocalcine est une protéine non collagénique qui est sécrétée par les ostéoblastes. Cette protéine est un marqueur reconnu de l'activité ostéoblastique et donc de la formation osseuse. Lors de la résorption osseuse, les ostéoclastes libèrent de nombreux produits de dégradation du collagène de type I. Les parties N (amino) et C (carboxy) terminales des chaînes collagéniques sont liées à leurs chaînes collagéniques adjacentes par des molécules de pontage appelées cross-link. Les telopeptides sont les régions des chaînes collagéniques où ces pontages surviennent. Durant le processus de dégradation du collagène ces telopeptides sont largués dans la circulation où ils peuvent être dosés (telopeptide C terminal du collagène de type I

ou CTX sérique). Nous avons mesuré l'ostéocalcine et le CTX sérique par une méthode ELISA réalisée à partir de kits commerciaux Nordic Bioscience (Ratlaps et Rat – MID osteocalcin). Chaque mesure a été réalisée en double, en analysant 12 sérums par groupe. La précision a été évaluée à l'aide de 3 échantillons de concentrations différentes dosés 5 fois dans la même série et 5 fois dans 5 séries différentes. Les coefficients de variation intra-essais étaient respectivement de 5,5 et 5,6% pour l'ostéocalcine et le CTX sérique. Les coefficients de variation inter-essais étaient respectivement de 5 et 5,6% pour l'ostéocalcine et le CTX sérique.

5.6.2. Evaluation de l'équilibre entre les processus de formation et de résorption osseuse : calcul de l'index de découplage osseux

Des perturbations du processus de remodelage osseux peuvent survenir lors de situations pathologiques (Maladie de Paget, ostéomalacie...) mais aussi sous l'influence physiologique du vieillissement osseux, de la ménopause. Des influences environnementales sont également susceptibles de modifier l'équilibre entre les processus de formation et de résorption osseuse (traitements, apesanteur, exercice physique...) Eastell et coll [205] ont développé un index de découplage osseux permettant d'estimer la balance (ou le couplage) entre la formation et la résorption osseuse. Cet index se calcule de la façon suivante. Dans un premier temps, la moyenne et l'erreur standard des concentrations initiales des CTX et de l'ostéocalcine sont déterminées pour chaque animal. Puis les valeurs de référence du groupe sham sont utilisées pour calculer les Z-scores des CTX et de l'ostéocalcine de chaque animal.

$z\text{-score} = [\text{valeur de l'animal} - \text{moyenne initiale} / \text{écart-type initial}]$. Enfin, l'index de découplage s'obtient en soustrayant les z-scores des marqueurs de résorption au z-score des marqueurs de formation. Une valeur positive de la balance du remodelage osseux indique que les processus de formation osseuse l'emportent sur les processus, de la résorption et que l'activité métabolique de l'os est à dominante ostéoformatrice. Un index négatif, à l'inverse, indique que l'état de résorption osseuse prédomine.

5.6.3. Paramètres lipidiques

Des analyses du cholestérol total (TC), du HDL-cholestérol (HDL-C) et du LDL-cholestérol ont été déterminées par des essais colorimétriques de haute performance du cholestérol (Hitachi). Les coefficients de variation intra et inter-essais sont inférieurs à 10% dans notre laboratoire.

5.6.4. Dosages plasmatiques de la cytokine TNF- α

De façon à évaluer l'expression d'une cytokine pro-inflammatoire potentiellement induite par le protocole d'exercice de course sur tapis roulant ou par l'acide zolédronique, nous avons mesuré le TNF- α plasmatique. Cette dernière était mesurée

par un immuno-essai ELISA (IBL, Hamburg, Deutschland). Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient respectivement inférieurs à 5% et inférieur à 10%.

Les prélèvements ont été effectués chez les rates au début et à la fin de l'étude par prélèvement veineux à l'appendice caudal. Les échantillons sanguins étaient placés au froid à 4° pendant 20 mn avant leur centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes. Les sérums étaient congelés à -20°C durant 24 h avant d'être archivés à -80°C jusqu'à l'analyse.

5.7 Méthodologie statistique

Les données statistiques présentées en ce qui concerne les données densitométriques et anthropométriques sont la moyenne et les écarts-types. Pour ce qui concerne les données des paramètres biochimiques, la moyenne et l'erreur standard de la moyenne ont été utilisées. L'évaluation de la normalité de distribution des données a été étudiée par le test de Kolmogorov Smirnov. Les effets de l'ovariectomie étaient déterminés en comparant les données du groupe Sham et celles du groupe ovariectomisé par un test t de Student. Pour comparer l'effet dit principal des effets combinés de l'exercice et du zoledronate entre les groupes ovariectomisés sur les données longitudinales, l'analyse dite two-way ANOVA pour mesures répétées était effectuée. Si une interaction significative était mise en évidence, les effets de l'exercice physique et du zoledronate étaient considérés comme synergiques. Une Anova one-way avec des tests de comparaison par paire, post Hoc, utilisant le test de Fisher PLSD (protected least-significant difference) était alors effectuée en cas d'interaction significative. Dans l'éventualité d'une interaction non significative, l'effet principal de chacune des interventions (zoledronate, exercice) était alors exploré par des tests de Newman-Keuls et les effets des interventions étaient considérés comme additifs. Le niveau de significativité était accepté pour des $p \leq 0.05$. Toutes les analyses statistiques ont été faites avec un logiciel PCSM (OPTIMA-Deltasoft, France).

6. Etudes

6.1 Etude 1

L'exercice modifie-t-il les effets de l'acide zoledronique sur la masse osseuse, les propriétés biomécaniques, la microarchitecture et le remodelage osseux chez les rates ovariectomisées ?

E. Lespessailles, C. Jaffré, H. Beaupied, P. Nanyan, E. Dolléans, CL. Benhamou, D. Courteix

*Does exercise modify the effects of zoledronic acid on bone mass, microarchitecture, biomechanics and turnover in ovariectomized rats ? Soumis à Calcified Tissue International (novembre 2008) **Annexe 1***

6.1.1 But de l'étude

L'objectif de l'étude 1 était d'analyser les effets individuels et combinés de l'exercice physique (course sur tapis roulant) et de l'acide zoledronique sur la masse osseuse, les propriétés biomécaniques, la microarchitecture trabéculaire osseuse, le remodelage osseux chez la rate adulte ovariectomisée.

L'acide zolédronique et l'exercice physique préviennent-ils les modifications osseuses induites par l'ovariectomie ?

Existe-t-il un effet synergique ou additif de l'acide zolédronique et de l'exercice physique sur la masse, la structure, la résistance et le remodelage osseux dans le modèle de la rate ovariectomisée ?

6.1.2 Rationnel de l'étude 1

Du fait de l'augmentation de l'espérance de vie de la population, l'ostéoporose et les fractures ostéoporotiques seront et sont de plus en plus diagnostiquées de part le monde [206]. Les stratégies usuelles de prévention et de traitement de l'ostéoporose ont bénéficié du développement de nouveaux bisphosphonates [207]. Récemment, il a été montré que des perfusions annuelles d'acide zolédronique 5 mg pendant trois ans réduisaient significativement le risque de fracture chez la femme ménopausée [83]. Les bisphosphonates sont de puissants inhibiteurs de la résorption osseuse. Ils agissent principalement sur les ostéoclastes en inhibant leur capacité de résorption osseuse. Les bisphosphonates agissent également en favorisant l'apoptose des ostéoclastes [208].

La ménopause est responsable d'une perte osseuse accélérée, mais de plus, il a également été rapporté que la carence estrogénique pouvait également entraîner une diminution de la masse maigre conduisant à une sarcopénie [209]. Du fait qu'une activité physique régulière pourrait prévenir à la fois la diminution de la masse osseuse et de la masse musculaire [210,211], de nombreuses sociétés savantes et organismes officiels de santé publique recommandent la pratique individuelle d'activité physique

quotidienne [212,213]. Les mécanismes physiologiques précis qui sous tendent les effets de l'activité physique sur l'os sont incomplètement élucidés. Cependant, il apparaît que la triade ostéoblaste, ostéocyte et cellules bordantes a un rôle fondamental dans les mécanismes impliquant les réponses ostéogéniques aux stimuli de l'exercice [214]. Par conséquent, une combinaison d'une thérapeutique antirésorptive comme l'acide zolédronique (dont la cible cellulaire est l'ostéoclaste) et d'une intervention anabolique osseuse induite par la charge mécanique liée à l'exercice (dont les cibles cellulaires sont les ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules bordantes) pourrait être une option thérapeutique très prometteuse. Cette stratégie combinant les effets ostéogéniques de l'exercice et les activités antirésorptives des bisphosphonates ou des estrogènes a déjà été rapportée dans la littérature [215]. Chez l'animal les données supportant la notion d'un effet bénéfique de la combinaison d'une thérapeutique anabolique et d'un traitement antirésorbeur sont controversés [216,217,158,161]. Ainsi, il a été trouvé chez la brebis que les bénéfices anaboliques de la parathormone étaient bloqués par le tiludronate [216]. Chez la rate, il a également été trouvé une interaction entre l'alendronate et des analogues de la PTH car la réponse anabolique de ces analogues était variable selon que les rates avaient ou non été prétraitées par de l'alendronate [217]. En revanche, les deux études qui, à notre connaissance, ont examiné les effets d'une combinaison des potentiels effets ostéogéniques de l'exercice et d'un traitement par les bisphosphonates ont trouvé que cette combinaison pourrait offrir des avantages au-delà de deux que chacune des options thérapeutiques prises séparément [158,161]. Compte tenu de ces arguments, le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité de l'acide zoledronique (une injection unique) et de l'exercice physique (course sur tapis roulant) seuls ou en association pour prévenir la perte osseuse induite par l'ovariectomie chez la rate adulte.

6.1.3 Matériels et méthodes

Cette partie est développée dans le chapitre 4 de ce mémoire.

6.1.4 Résultats

6.1.4.1 Paramètres anthropométriques et densitométriques

Le poids du corps

Les données présentées au **tableau 3** montraient que le poids des rates au démarrage de l'étude ne faisaient pas ressortir de différence statistique concernant le poids, quels que soient les groupes considérés. Cependant, le poids des rates OVX était nettement plus élevé que celui des rates du groupe Sham, 12 semaines après l'intervention 386 ± 33 g vs 333 ± 22 ; $p=0.002$. Il était également observé

une différence significative entre le poids des rates du groupe OVX-Z et celui des deux groupes entraînés (**tableau 3**).

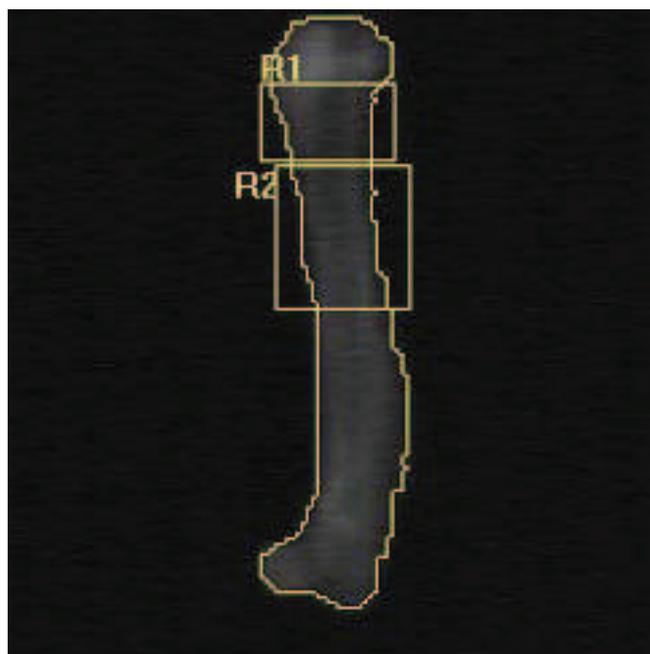
Masse maigre, masse grasse

Le pourcentage de masse grasse était beaucoup plus important dans le groupe OVX-Z que dans les autres groupes OVX (**tableau 3**). Le pourcentage de masse grasse chez le groupe OVX s'élevait à 27 % et celui du groupe SH à 19 % ($p < 0.005$). Il n'était pas trouvé de différences significatives entre les groupes concernant la masse maigre au corps entier.

CMO corps entier et fémurs excisés

Nous avons trouvé une différence significative pour le CMO du corps entier entre le groupe OVX-Z et les groupes OVX, OVX-E et OVX-ZE (**tableau 3**). Alors que nous n'avons pas trouvé de différences significatives pour la DMO et la CMO aux fémurs entiers excisés, nous avons pu observer des différences aux deux sous-régions R1 et R2 (**tableau 4**). L'effet de l'exercice n'était pas significatif mais il existait un effet de l'acide zolédronique avec une DMO dans la région R1 des groupes OVX-ZE et OVX-Z supérieure à celle observée dans les groupes OVX-E et OVX. Dans la sous-région R2, on observait également un effet significatif de l'acide zolédronique sur la CMO dans le groupe traité par acide zolédronique avec des résultats supérieurs à ceux des groupes OVX et OVX-E.

Figure 7 : Les sous-régions fémorales R1 (sub-métaphysaire) et R2 (diaphysaire)



6.1.4.2 Microarchitecture trabéculaire osseuse par analyse 3D μ ct

Les effets de l'ovariectomie

A la fin de l'étude (12 semaines après l'opération), nous avons pu observer des différences significatives de volume trabéculaire osseux (-37.50 %), de l'espacement trabéculaire (+ 31.4 %), et des « structure model index » (+51.6 %) entre les groupes OVX et le groupe SH. La perte osseuse trabéculaire observée au fémur dans les suites de l'ovariectomie était également caractérisée par des changements dans les indices de connectivité avec des valeurs TBPf et BS/TV nettement plus hautes dans le groupe SH (**tableau 5**).

Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé d'interaction additive sur les paramètres d'architecture trabéculaire évaluées par μ CT entre le traitement par l'acide zolédronique et l'exercice sur tapis roulant.

Les effets de l'acide zolédronique

Les effets de l'acide zolédronique seul ainsi que l'acide zolédronique plus exercice protégeaient de la perte osseuse dépendante de la carence en estrogènes. En effet, les rates OVX avaient une réduction de volume de l'os trabéculaire de -37.5 % versus les rates SH, le BV/TV n'était pas statistiquement différent entre les groupes OVX-Z et OVX-ZE et le groupe SH, respectivement 24.9 %, 25.5 % et 26 %. Les valeurs d'espacement inter-trabéculaire étaient nettement plus élevées chez les groupes OVX et OVX-E que chez les groupes OVX-Z et OVX-ZE. On notait également des différences significatives concernant les paramètres suivants Tb.Th, BS/BV, Tb.N, TBPf, DA et SMI entre les groupes OVX-Z et OVX-ZE d'une part et les groupes OVX et OVX-E d'autre part (**tableau 5**).

Les effets de l'exercice

Dans cette étude, l'exercice seul n'a pas empêché la perte osseuse induite par l'ovariectomie puisque les valeurs de BV/TV, BS/BV, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Th et TBPf n'étaient pas statistiquement différentes entre les groupes OVX et OVX-E. Nous avons également observé pour le DA des différences significatives entre les groupes de rates sédentaires et les groupes de rates entraînées (**tableau 5**). Cependant, nous n'avons pas remarqué d'inhibition des effets de l'acide zolédronique en combinaison avec l'exercice sur les paramètres de microarchitecture trabéculaire osseuse. Nous avons seulement pu observer pour DA une

action additive combinant l'exercice et l'acide zolédronique, avec une baisse de DA dans le groupe OVX-ZE par rapport aux groupes OVX-E, OVX-Z et OVX (**tableau 5**).

6.1.4.3 Propriétés biomécaniques

Dans cette étude, l'ovariectomie n'a pas induit une diminution significative des propriétés biomécaniques telles qu'exprimées par le test de compression 3 points au fémur. Au contraire, nous avons pu observer un effet de l'exercice avec une augmentation significative de la force max dans les groupes OVX-E et OVX-ZE par rapport aux rates sédentaires (OVX et OVX-Z). De plus, nous avons observé un effet additif de l'acide zolédronique et de l'exercice avec une force maximale supérieure dans le groupe OVX-ZE en comparaison des groupes OVX et OVX-Z, respectivement 143 N versus 120.4 (p<0.05) et 143 N versus 124.4 (p<0.05). Nous avons trouvé un effet significatif de l'acide zolédronique sur le paramètre énergie maximum (**tableau 6**). Une énergie maximum plus élevée a été observée dans le groupe OVX-Z par rapport aux groupes OVX et OVX-E (p<0.05), de même l'énergie maximum était plus importante dans le groupe OVX-ZE par rapport aux valeurs des groupes OVX-E et OVX (p<0.05).

6.1.4.4 Remodelage osseux

Le taux de CTX était 27,7% plus élevé dans le groupe OVX (23,8 ng/ml) que dans le groupe SH (18,6 ng/ml), p <0,0005. Les taux de CTX étaient nettement plus bas dans les groupes OVX-Z et OVX-E que dans le groupe OVX (p < 0,05). Cependant les taux de CTX dans le groupe OVX-ZE n'étaient pas statistiquement différents du groupe OVX mais nettement plus élevés que dans les groupes OVX-Z et OVX-E (**tableau 7**). A l'inverse, à la fin de l'étude, les taux d'ostéocalcine sérique n'étaient pas différents entre le groupe SH et le groupe OVX. Dans le groupe OVX-ZE on observait un taux nettement plus élevé d'ostéocalcine que dans les groupes OVX, OVX-Z et OVX-E. Le taux d'ostéocalcine était nettement plus élevé dans le groupe OVX-E (178.27 ng/ml) que dans les groupes OVX et OVX-Z (respectivement 117,83 et 139,32 ng/ml) (**tableau 7**). Comme attendu, l'index de découplage variait de - 0,26 en début à - 4,43 en fin d'étude dans le groupe OVX (**figure 14**). Dans le groupe OVX-E l'index de découplage augmentait de - 0,22 en début à 3,42 en fin d'étude. L'index de

découplage passait de $-0,31$ à $+0,45$ entre le début et la fin d'étude dans le groupe OVX-Z et de $-0,01$ à $+2,71$ dans le groupe OVX-ZE.

6.1.5 Discussion

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

Premièrement, nous avons trouvé qu'une injection unique d'acide zolédronique $20\mu\text{g}/\text{kg}$ prévenait la perte osseuse et les détériorations microarchitecturales douze semaines après l'ovariectomie de rates adultes.

Deuxièmement, dans cette étude, un exercice de course à pied sur tapis roulant caractérisé par un exercice 5 jours sur 7, de $60\text{ mn}/\text{jour}$, à la vitesse de $15\text{ m}/\text{mn}$ pendant 12 semaines ne prévenait pas la perte osseuse induite par l'ovariectomie mais avait des effets significatifs sur la force ultime et le remodelage osseux.

Troisièmement, bien que les valeurs les plus élevées des paramètres biomécaniques force ultime et énergie à la force ultime fussent trouvés dans le groupe de rates traitées par l'acide zolédronique et soumises à l'exercice physique, nous n'avons pas observé d'effets synergiques ou additifs significatifs liés à la combinaison simultanée de ces deux interventions.

L'acide zolédronique est un bisphosphonate hétéro-cyclique dont il a été montré qu'il était in vitro l'agent antirésorptif le plus puissant par son action sur l'inhibition de la résorption osseuse due aux ostéoclastes. Une dose unique de $100\mu\text{g}/\text{kg}$ chez des rates ovariectomisées d'espèce Fisher 344 âgées de 18 mois s'est révélée être suffisante pour maintenir à long terme (6 mois) la résistance osseuse en compression des vertèbres et le degré de minéralisation [218]. Dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez des rates d'espèce Sprague-Dawley âgées de 12 semaines, une injection de $30\mu\text{g}/\text{kg}$ prévenait les conséquences osseuses de l'accident vasculaire survenu trois semaines plus tôt en terme de masse osseuse et de résistance biomécanique alors qu'une dose de $6\mu\text{g}/\text{kg}$ n'était pas efficace [219]. L'efficacité d'une dose de $20\mu\text{g}/\text{kg}$ en injection a été évaluée dans une étude in vivo par des examens d'imagerie par μCT [220]. L'injection était faite soit de façon préventive, soit de façon curative en fonction de l'ovariectomie chez des rates Wistar de 30 semaines qui avaient allaité. L'étude à 6 semaines après l'ovariectomie montrait que le traitement préventif préservait les paramètres structuraux mais aucune différence significative ne se dessinait en termes de résistance biomécanique évaluée comme dans notre étude par le test de flexion 3 points [220]. Dans notre étude nous avons trouvé un effet significatif de l'acide zolédronique en ce qui concerne l'énergie à la force ultime en comparaison des groupes de rates OVX et OVX-E. Le test biomécanique en flexion 3 points était cependant effectué au fémur alors qu'il était réalisé au tibia dans l'étude de Browsers [220]. Une amélioration des propriétés

biomécaniques a été trouvée dans l'étude de Gasser et col **[221]**. La dose de 20 µg/kg d'acide zolédronique améliorait la résistance ultime mais pas la dureté chez leurs rates ovariectomisées et ils concluaient que seule la dose de 100 µg/kg prévenait complètement la perte de force induite par l'ovariectomie **[221]**. Notre étude est également en accord avec les données de cette dernière étude puisque nous n'avons pas non plus mis en évidence de différence significative pour les paramètres structuraux entre les groupes de rates traitées par l'aide zolédronique et le groupe Sham. Dans leur étude, Lee et coll **[219]** n'ont pas mis en évidence de variations significatives de l'ostéocalcine dans leur modèle de rates avec AVC (deux groupes de rates étaient traitées par l'acide zolédronique). En revanche, ces auteurs trouvaient qu'une dose de 30 µg/kg d'acide zolédronique inhibait l'augmentation du CTX sérique observé dans leur groupe de rates avec AVC traitées par placebo.

Nous ne pouvons pas strictement comparer ces derniers résultats aux nôtres car dans leur étude les rates étaient deux fois plus jeunes, d'espèce différente, et non ovariectomisées. Cependant, nous avons également trouvé cette capacité de l'acide zolédronique à inhiber l'augmentation du CTX sérique observé dans le groupe OVX, les valeurs de CTX sérique n'étant pas statistiquement différentes dans les groupes traités par acide zolédronique et le groupe Sham. Dans leur travail sur les effets à long terme de l'acide zolédronique chez la rate ovariectomisée, Gasser et coll **[221]** ont trouvé une augmentation des taux plasmatiques d'ostéocalcine après ovariectomie.

Dans notre étude, ce n'était pas le cas mais nous n'avons également pas trouvé de suppression de l'activité de formation puisque le taux d'ostéocalcine n'était pas significativement différent entre le groupe Sham et le groupe de rates ovariectomisées traitées par acide zolédronique. A l'inverse, nous avons bien confirmé les capacités antirésorptives de l'acide zolédronique **[219,221]** puisque l'augmentation des taux sériques du CTX était prévenue.

Dans notre étude, les taux d'ostéocalcine n'ont pas augmenté après ovariectomie. Cependant, l'exercice physique sur tapis roulant a entraîné dans le groupe de rates soumis à cette activité une augmentation significative de l'ostéocalcine. De plus, l'index de découplage a significativement augmenté du début à la fin d'étude exprimant bien le fait que l'exercice de course sur tapis roulant stimulait la formation osseuse. Les résultats sont en accord avec des études précédentes où l'exercice physique consistait en une course sur tapis roulant **[222]** ou d'exercices de saut **[223]**. Nous avons trouvé un effet principal de l'exercice sur la force ultime au fémur et sur la surface de section transversale lors du test de flexion 3 points du fémur. Ceci est concordant avec les données de Fuchs et col **[160,161]** qui ont trouvé chez des rates vierges d'espèce Fisher 344 ovariectomisées un bénéfice de la course sur tapis roulant sur la force ultime, le module d'élasticité et la rigidité.

Le protocole d'exercice physique auquel nous avons soumis nos rates pendant 12 semaines n'a pas permis de préserver le contenu minéral osseux après ovariectomie. En dépit de l'absence de variation significative des effets de l'exercice sur la masse osseuse ou sur la préservation des paramètres microarchitecturaux après ovariectomie, nous avons observé un effet positif sur la surface de section transversale du fémur. Cet effet sur la géométrie du fémur pourrait expliquer en partie le fait que la force ultime en flexion était plus élevée dans les groupes de rates entraînées par rapport aux rates sédentaires. D'autres auteurs ont d'ailleurs insisté sur le fait que les vertus de l'exercice pourraient avoir un impact plus prononcé sur les propriétés géométriques et architecturales de l'os que sur la DMO [224,225].

Dans la plupart des études, l'exercice de course sur tapis roulant s'est révélé bénéfique pour le squelette des rats [140]. Cependant l'adaptation de l'os aux effets de la course sur tapis roulant peut varier selon de nombreux facteurs : l'âge, le sexe, l'espèce, le statut gonadique, les autres modèles d'ostéopénie, la période expérimentale, la fréquence, la durée et l'intensité de l'exercice. Dans notre étude, nous avons choisi des caractéristiques de protocole d'exercice (15m/mn en vitesse de course, 60 mn/jour, 5 jours d'exercice par semaine sur douze semaines) qui d'après d'autres études étaient susceptibles d'entraîner des stimuli ostéogéniques [140,126]. La vitesse de course et la consommation maximale d'oxygène (VO_2 max) [227] ou la vitesse maximale aérobie [228] qui lui sont associés sont des paramètres critiques pour obtenir un effet bénéfique sur le squelette. Il a ainsi été démontré qu'un exercice trop vigoureux VO_2 max >80 % serait moins efficace qu'un exercice plus modéré (50-70 % VO_2 max) [227]. Le nombre de jours par semaine pendant lesquels les animaux s'exercent est une autre variable qui a été étudiée [229]. Une charge de course modérée à une fréquence de 4 à 5 jours par semaine est apparue bénéfique en termes de DMO chez des rates Wistar âgées de 8 semaines [229].

Les résultats des études varient également en fonction des sites osseux étudiés. Dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence d'effet sur le CMO du fémur par l'exercice. En revanche, un effet traitement significatif (acide zolédronique) était observé en terme de DMO et de CMO dans les deux sous régions analysées du fémur, à mettre en perspective des coefficients de variation à ces sites qui oscillent entre 4 et 6 %. Dans de nombreuses études où les effets de la course sur tapis roulant sur l'os étaient étudiés, les résultats étaient bien plus probants sur le tibia que sur le fémur ou les vertèbres [161,228,229,230,142,231,232]. Le gain en CMO était par exemple plus élevé dans la région du tibia distal que dans celle du fémur distal dans une étude d'exercice volontaire chez le rat [231]. Le fémur, parce qu'il est situé chez le rat plus à distance que le tibia vis-à-vis des forces de réaction au sol, pourrait recevoir moins de stimulation avec impact et donc être moins sensible aux stimuli ostéogéniques

[232,144]. Il a même été observé au sein d'un même site osseux des variations régionales en réponse aux effets de l'exercice ou des traitements **[145]**.

Bien que l'idée de combiner deux effets à potentiels bénéfiques sur l'os pour obtenir un effet encore meilleur soit séduisante, dans notre travail nous n'avons pas mis en évidence d'effet synergique ou additif net à cette combinaison acide zolédronique et course sur tapis roulant. Cependant, les valeurs les plus élevées de BV/TV, de l'énergie à la force ultime, de la force ultime et de la section transversale du fémur ont été trouvés dans les groupes associant l'exercice physique et l'acide zolédronique. Une comparaison directe des travaux expérimentaux chez l'animal où des bisphosphonates ont été associés à l'exercice de course sur tapis roulant serait hasardeuse. En effet, à travers ces études, le protocole d'exercice, le schéma de l'étude, les animaux testés, les bisphosphonates utilisés et l'âge à l'ovariectomie diffèrent d'une étude à l'autre **[158,161]**. Tamaki et coll **[158]** ont évalué les effets d'une combinaison d'exercice de course sur tapis roulant et d'etidronate. Dans leur étude, les rates étaient réparties en 5 groupes comme dans la notre. A la lumière des données histomorphométriques, les auteurs rapportaient une interaction entre le traitement par etidronate et les effets de l'exercice physique avec une augmentation de la surface d'os trabéculaire au tibia. Une interaction significative était également observée en termes de DMO au fémur proximal des rates mais pas d'interaction dans les régions diaphysaires et distales du fémur ni dans le nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. L'alendronate et l'exercice de course sur tapis roulant ont été associés pour examiner leurs effets sur la masse et la résistance osseuse **[161]** chez la rate ovariectomisée. Dans cette dernière expérimentation, les auteurs ont utilisé un plan factoriel 2x2 (4 groupes) et un groupe Sham étudié sur le plan statistique à part. Ces auteurs ont trouvé que l'intervention combinée était supérieure à chacune des interventions prises séparément pour préserver les effets de l'ovariectomie sur le CMO du fémur proximal et du corps entier et pour préserver la résistance osseuse au fémur. Dans notre étude, nous n'avons pas démontré d'effets synergiques ou additifs des deux interventions. Cette absence d'effet combiné positif pourrait être expliquée par la puissance de l'effet antirésorptif de l'acide zoledronique. La réponse ostéoformatrice de l'exercice physique a peut être été émoussé par l'effet majeur de l'acide zolédronique. Une telle hypothèse a déjà été formulée pour expliquer le manque d'efficacité de la combinaison hormone parathyroïdienne et alendronate, la capacité du traitement antirésorbeur étant supérieure à la capacité de formation osseuse associée au traitement par PTH **[233]**. Dans leur protocole expérimental, Tamaki et coll **[158]** ont donné l'etidronate avant que le protocole d'exercice de course soit initié chez les rates. Nous proposons que, de façon à permettre une fenêtre anabolique due aux effets ostéogéniques de l'exercice, le bisphosphonate soit donné dans un deuxième temps, la combinaison des effets se faisant plus en

séquence qu'en traitement simultané. Cette idée semble être concordante avec le travail de Rhee et coll qui, dans une étude expérimentale analysant le concept perdre, restaurer, maintenir, a montré que la séquence thérapeutique la plus consistante pour prévenir les effets de l'ovariectomie était celle d'un traitement par PTH puis par acide zolédronique [87].

Il faut se garder de faire des conclusions hâtives en extrapolant les résultats de l'animal à l'être humain. Ainsi, les effets de la course à pied chez l'homme mettent en jeu possiblement d'autres schémas d'adaptation de l'os à ce type d'exercice et avec une sensibilité différente. D'ailleurs, les deux études menées chez l'être humain qui ont testé l'hypothèse d'obtenir de meilleurs résultats en combinant l'exercice physique et des bisphosphonates n'ont pas démontré d'action supérieure de la combinaison en comparaison des bénéfices observés par chacune des actions thérapeutiques prises séparément [159,160]. Chilibeck et coll ont mis en place une étude combinant les effets de l'étidronate (ETI) et de l'exercice E chez des femmes ménopausées [159]. Quarante huit femmes d'âge moyen 57 ans étaient réparties en quatre groupes : ETI+E, ETI seulement, E seulement et un groupe placebo sédentaire. L'étidronate était donné pendant 12 mois à une dose de 400 mg/jour durant quatorze jours tous les 90 jours. Des exercices en résistance étaient effectués 3 fois par semaine pour une durée de 45 mn chacun. Quand les auteurs poolaient les données de tous les groupes ETI, les gains en densité osseuse au rachis et au corps entier étaient significativement supérieurs à ceux observés dans le groupe placebo sédentaire. Cependant, aucune interaction ou effet additif entre l'exercice physique et l'étidronate n'était mis en évidence. Uusi Rasi et coll [160] ont étudié l'association d'un exercice physique et de la prise journalière de 5 mg d'alendronate chez 164 femmes ménopausées âgées de 54 ± 2 ans. Le protocole d'exercice quotidien comprenait 20 minutes d'activité de sauts, et 15 mn d'exercices de stretching et d'autres activités sans impact. Si l'alendronate augmentait la DMO au rachis lombaire et au col du fémur, l'exercice physique lui n'avait aucun effet significatif quand il était appliqué sans alendronate. De plus, aucune interaction ou effet additif n'était observé dans le groupe alendronate et exercice physique [50].

Au total, nos données suggèrent que l'acide zolédronique prévient la perte osseuse et les dégradations microarchitecturales de l'os trabéculaire induite par l'ovariectomie. L'exercice de course sur tapis roulant s'est révélé capable de préserver la résistance osseuse et d'induire un effet sur le remodelage osseux en favorisant l'ostéoformation. Cependant, les effets combinés de l'acide zolédronique et de l'exercice de course appliqués simultanément dans ce modèle de la rate adulte ovariectomisée n'a pas produit d'effet synergique ou additif sur le squelette osseux des rates.

Paramètres anthropométriques et osseux du corps entier	Groupes														
	SH			OVX			OVX-Z			OVX-E			OVX-ZE		
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	
BW (g)	300.3 ± 27.3	333.1 ± 21.7	310.5 ± 20.7	386.4 ± 32.6	320.8 ± 23.9	416.5 ± 40.7	319.9 ± 25.7	370.1 ± 35.5	327.9 ± 30.2	370.8 ± 34.4					
LBM (g)	242.0 ± 13.5	241.1 ± 13.7	245.0 ± 16.6	259.2 ± 10.7	255.1 ± 16.9	260.7 ± 17.2	245.8 ± 16.9	260.6 ± 21.4	248.7 ± 21.1	270.7 ± 25.0					
% FM	17.8 ± 3.5	19.0 ± 4.1	17.3 ± 3.6	27.8 ± 7.3 ^{a,c}	16.6 ± 3.5	28.9 ± 3.8	19.5 ± 4.4	24.0 ± 7.4 ^c	20.3 ± 5.2	23.0 ± 6.0 ^c					
WBBMC (g)	11.4 ± 0.7	12.4 ± 0.8	11.7 ± 0.8	12.9 ± 0.7 ^c	12.1 ± 0.5	13.9 ± 0.9	11.8 ± 0.8	12.2 ± 1.0 ^c	11.9 ± 0.7	13.0 ± 0.8 ^c					
WBBMD (g/cm²)	0.700 ± 0.007	0.172 ± 0.008	0.171 ± 0.007	0.172 ± 0.003	0.172 ± 0.004	0.180 ± 0.007	0.173 ± 0.006	0.171 ± 0.005	0.171 ± 0.007	0.176 ± 0.008					

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

Poids (BW), Masse Maigre (LBM), Masse Grasse (FM), Contenu Minéral Osseux Corps Entier (WBBMC), Densité Minérale Osseuse Corps Entier (WB BMD)

Tableau 3

Evolution des paramètres anthropométriques et osseux du corps entier chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX), traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Paramètres absorptiométriques du fémur	Groupes				
	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
Femur BMC (g)	0.499 ± 0.046	0.469 ± 0.029	0.514 ± 0.055	0.455 ± 0.037	0.521 ± 0.036
Femur BMD (g/cm²)	0.258 ± 0.12	0.242 ± 0.011	0.269 ± 0.016	0.240 ± 0.011	0.267 ± 0.014
R1 BMC (g)	0.061 ± 0.006	0.059 ± 0.010	0.066 ± 0.011	0.055 ± 0.007 ^c	0.068 ± 0.006 ^{b,d}
R1 BMD (g/cm²)	0.226 ± 0.013	0.203 ± 0.014 ^a	0.236 ± 0.026 ^b	0.198 ± 0.018 ^{a,c}	0.234 ± 0.016 ^{b,c,d}
R2 BMC (g)	0.85 ± 0.005	0.079 ± 0.010	0.091 ± 0.007 ^b	0.083 ± 0.007 ^{a,c}	0.093 ± 0.005 ^{b,d}
R2 BMD (g/cm²)	0.207 ± 0.014	0.199 ± 0.008	0.220 ± 0.008 ^{a,b}	0.204 ± 0.010 ^c	0.219 ± 0.013 ^{a,b,d}

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

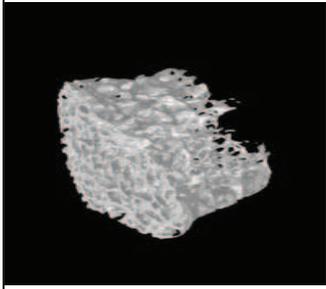
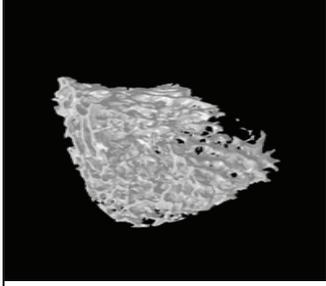
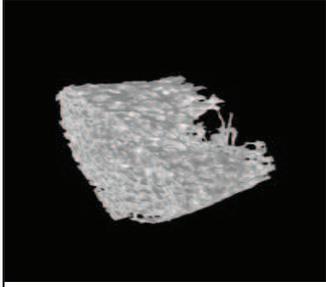
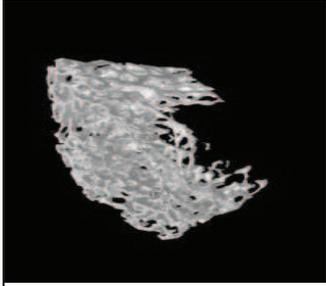
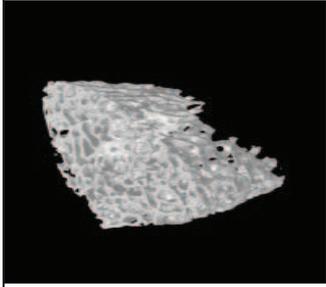
^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

R1 : Région sub-métaphysaire (riche en os trabéculaire) ; R2 : région diaphysaire (riche en os cortical)

Tableau 4

Variations des paramètres densitométriques du fémur chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg). sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Groupes

	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
Paramètres microarchitecturaux					
BV/TV %	26.05 ± 5.64	16.31 ± 6.76 ^a	24.94 ± 8.12 ^b	14.4 ± 5.68 ^c	25.47 ± 6.76 ^{b,d}
BS/BV	0.031 ± 0.002	0.037 ± 0.005 ^a	0.032 ± 0.003	0.039 ± 0.004 ^c	0.034 ± 0.004 ^{b,d}
Tb.Th (µm)	110.74 ± 5.37	97.38 ± 9.83 ^a	107.30 ± 8.33 ^b	96.04 ± 6.20 ^c	104.69 ± 8.23 ^{b,d}
Tb.N (1/mm)	0.002 ± 0.0004	0.002 ± 0.001 ^a	0.002 ± 0.001 ^b	0.001 ± 0.001 ^c	0.002 ± 0.001 ^{b,d}
Tb.Sp (mm)	519.83 ± 224.78	683.56 ± 288.32	539.76 ± 215.30 ^b	704.37 ± 237.77 ^c	502.96 ± 219.06 ^{b,d}
TBP.f	0.001 ± 0.002	0.006 ± 0.004 ^a	0.002 ± 0.003 ^b	0.008 ± 0.003 ^c	0.002 ± 0.003 ^{b,d}
SMI	0.841 ± 0.340	1.275 ± 0.420 ^a	0.974 ± 0.368 ^b	1.610 ± 0.313 ^c	1.033 ± 0.321 ^{b,d}
DA	1.920 ± 0.200	2.290 ± 0.300	2.214 ± 0.258	1.970 ± 0.293	1.911 ± 0.184 ^{b,c,d}

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

Tableau 5

Variations des paramètres microarchitecturaux chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Paramètres biomécaniques	Groupes				
	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
Ultimate force (N)	133.06 ± 20.82	120.39 ± 13.98	124.44 ± 16.95	138.25 ± 16.96 ^{b,c}	143.06 ± 15.94 ^{b,c}
Cross-sectional Area (mm²)	6.69 ± 0.64	6.35 ± 0.54 ^a	6.63 ± 0.61	7.04 ± 0.55 ^{b,c}	7.10 ± 0.63 ^{b,c,d}
Moment of Inertia (mm⁴)	5.64 ± 0.94	5.55 ± 0.80	5.49 ± 0.89	6.06 ± 1.14	6.15 ± 1.43
Stress (N/mm²)	185.83 ± 19.21	172.72 ± 26.72	177.87 ± 22.90	184.75 ± 23.05	189.48 ± 18.61
Energy max (N/mm)	68.66 ± 12.37	55.06 ± 15.57 ^a	64.48 ± 12.22 ^b	56.76 ± 16.16 ^c	67.66 ± 8.56 ^{b,d}
Stiffness (N/mm)	238.76 ± 46.86	257.37 ± 24.78	227.43 ± 35.06	245.68 ± 35.27	262.35 ± 33.43 [*]
Young modulus (MPa)	7176.48	7910.05	7071.23	6925.87	7388.97

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

* Interactions entre le traitement et l'entraînement.

Tableau 6

Variations des paramètres biomécaniques chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Marqueurs du remodelage osseux	Groupes											
	SH		OVX		OVX-Z		OVX-E		OVX-ZE			
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
CTX (ng/ml)	19.39 ± 0.53	18.60 ± 0.43	19.08 ± 0.48	23.76 ± 0.65 ^a	18.66 ± 0.4	19.21 ± 0.66 ^b	18.70 ± 0.41	19.28 ± 0.34 ^b	18.78 ± 0.34	22.43 ± 0.63 ^{c,d,*}		
OC (ng/ml)	13.34 ± 0.34	12.79 ± 0.39	12.80 ± 0.41	11.78 ± 0.46	12.45 ± 0.3	13.93 ± 0.36 ^{a,b}	12.60 ± 0.22	17.82 ± 0.86 ^{a,b,c}	12.90 ± 0.21	12.90 ± 0.21 ^{ab,c,d}		
UI			- 0.27	- 4.43	- 0.31	0.45 ^b	- 0.22	3.42 ^{b,c}	-0.01	2.71 ^{c,*}		

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

* Interactions entre le traitement et l'entraînement.

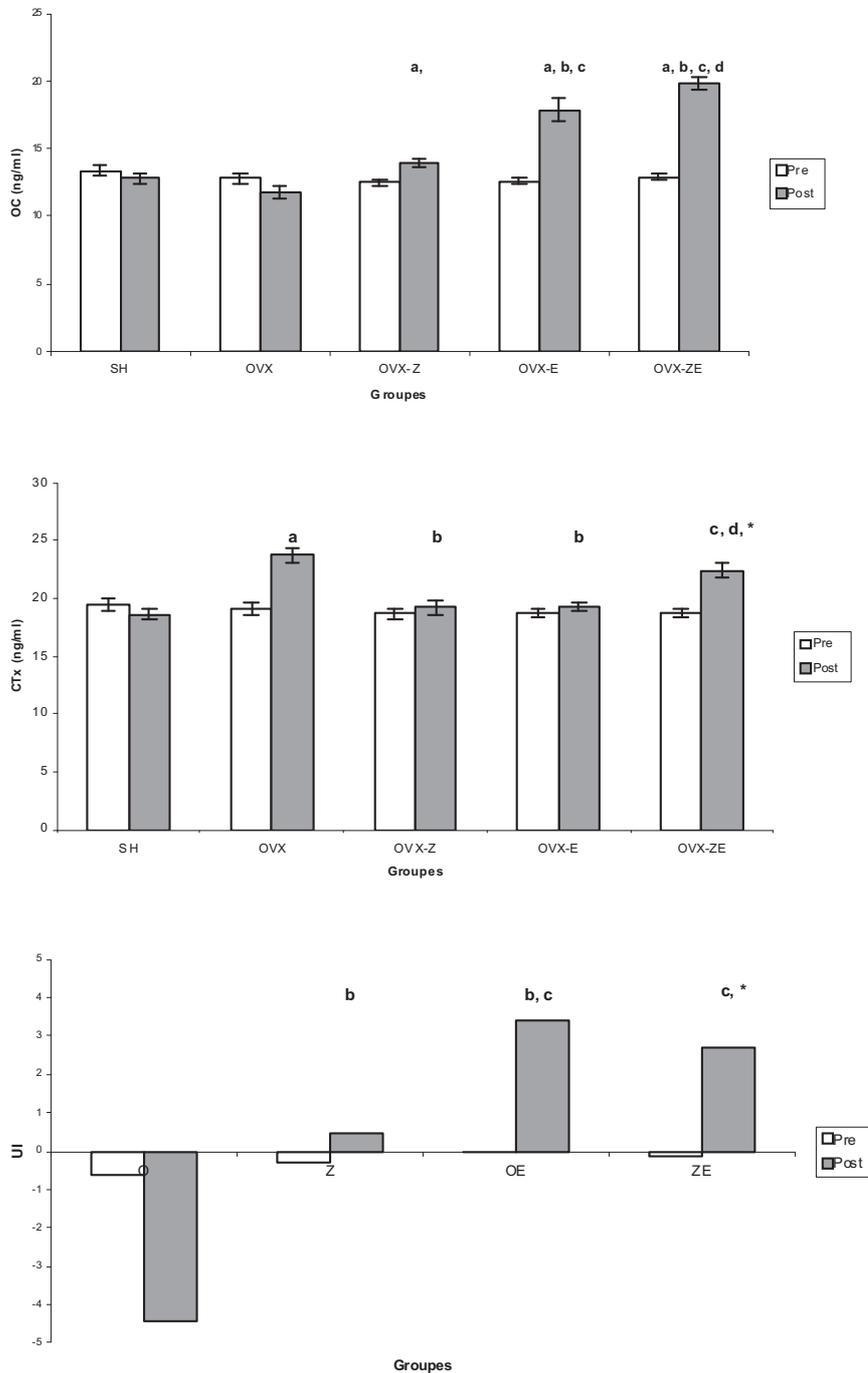
Ostéocalcine (OC), C-terminal collagen cross-links (CTX). Index de découplage (UI)

Tableau 7

Variations des concentrations en OC et CTx et de l'index de découplage chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Figure 14 : Variations des marqueurs du remodelage osseux et de l'index de découplage chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE



6.2 Etude 2

Effets combinés de l'exercice et de l'acide zoledronique sur le profil lipidique et sur le remodelage osseux chez la rate ovariectomisée.

E. Lespessailles, C. Jaffré, E. Dolléans, CL. Benhamou, D. Courteix

Combined effects of exercise and zoledronic acid on lipid profile and bone remodelling in ovariectomized rats.

Soumis à Journal of Lipid Research (novembre 2008). Annexe 2

6.2.1 But de l'étude

L'objectif de l'étude 2 était d'analyser les effets combinés de l'acide zoledronique et de l'exercice physique (course sur tapis roulant) sur le profil lipidique dans le modèle de la rate mature ovariectomisée.

- l'acide zoledronique a-t-il des effets sur le profil lipidique ? Améliore-t-il le profil lipidique dans le sens d'une diminution du risque d'athérosclérose ?
- l'exercice physique et l'acide zoledronique ont-ils un effet combiné synergique ou additif vis-à-vis du profil lipidique ?

6.2.2 Rationnel de l'étude

La déficience en estrogène est le principal facteur étiologique de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées [234,235]. Au-delà de l'ostéoporose, la perte des fonctions ovariennes à la ménopause est associée à d'autres problèmes de santé parmi lesquels figuraient les désordres neuro-endocriniens [236] ou les maladies cardiovasculaires [237]. Le traitement hormonal de substitution (THS) s'est montré efficace pour réduire le risque de fracture [42,238]. Cependant, le bénéfice du THS sur les maladies cardiovasculaires est largement débattu. Trois essais cliniques sur de vastes cohortes de patientes ménopausées suivant un traitement hormonal ont échoué à démontrer un effet cardio-protecteur des estrogènes [239,241]. Ainsi, si l'on considère cliniquement le traitement par THS pour la prévention de l'ostéoporose, la FDA recommande que d'autres traitements que les estrogènes soient d'abord administrés [242] et l'European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis ne recommande pas le THS comme un traitement de base pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose [243].

Chez les femmes ménopausées, les amino-bisphosphonates représentent une des options pharmacologiques dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose [244]. Parmi les bisphosphonates, on peut distinguer ces composants selon leurs mécanismes d'action moléculaire. L'étidronate, le clodronate, le tiludronate inhibent les ostéoclastes et provoquent leur apoptose par incorporation d'analogues intracellulaires. Ces composants n'interfèrent pas dans la biosynthèse du cholestérol

intracellulaire [245]. Les amino-bisphosphonates empêchent la prénylation et le bon mode d'action des protéines porteuses de GTP indispensables pour le fonctionnement des ostéoclastes [246]. Ces derniers composants inhibent la squalène synthase et se sont révélés être susceptibles de diminuer le cholestérol chez les animaux [247]. Il a été démontré récemment que l'acide zolédronique administré à forte dose aux patients atteints de myélome pouvait modifier leur profil lipidique (diminution de 13 % du cholestérol total) [79]. Il était observé en particulier une amélioration de l'index de risque d'athérosclérose avec un accroissement du ratio HDL-C/LDL-C de 36 % et une baisse du ratio TC/HDL-C de 17 %.

Des interventions non médicamenteuses pour prévenir l'ostéoporose comme la pratique d'exercices physiques en charge et ou avec impact sont recommandées [125,242,243]. Les effets de l'exercice régulier sur le profil lipidique ont été étudiés dans de nombreux travaux [248,249,250]. Il a été récemment démontré que faire davantage de marche dans les escaliers pouvait avoir un effet bénéfique sur les lipides sanguins et par conséquent diminuerait le risque de maladie cardiovasculaire [251].

Il est bien établi que les bisphosphonates réduisent le remodelage osseux en freinant notablement la résorption osseuse [70,252], la cellule cible étant l'ostéoclaste. Inversement, il a été démontré que l'activité physique et plus spécifiquement le stress mécanique provoquent un effet ostéogénique médié par les ostéocytes et les ostéoblastes [253,254,255]. A partir de ces constatations, notre étude cherche à démontrer les effets spécifiques et combinés de l'acide zolédronique et de l'entraînement sur tapis roulant sur le remodelage osseux et le profil lipidique chez les rates adultes ovariectomisées.

6.2.3 Matériels et méthodes

Ces points ont été abordés en détail dans le chapitre 5.

6.2.4 Résultats

Toutes les données suivaient une répartition normale. Une interaction significative entre l'exercice et l'acide zolédronique a été trouvée dans les paramètres lipidiques, le CTX sérique et l'index de découplage.

6.2.4.1 Paramètres anthropométriques et densitométriques

Le poids de corps dans le groupe OVX était plus important que chez les rates SHAM douze semaines après l'ovariectomie: 386 ± 33 g vs 333 ± 22 ; $p = 0.002$. Il existait une différence significative dans le poids du corps entre le groupe OVX-Z et les deux groupes entraînés (**tableau 3**). Le pourcentage de masse grasse était significativement plus élevé dans le groupe des OVX-Z que dans les autres groupes OVX (**tableau 3**). Le pourcentage de masse grasse dans le

groupe OVX (27,7%) était significativement plus élevé en comparaison de celui du groupe SH (19%), $p < 0,005$. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes concernant la masse maigre du corps entier. Nous avons remarqué une différence significative pour la CMO du corps entier entre le groupe OVX-Z et les groupes OVX, OVX-E et OVX-ZE (**tableau 3**).

6.2.4.2 Profil lipidique

Le groupe OVX avait un niveau de cholestérol total sérique et LDL-C plus élevé que dans le groupe SH (**tableau 8**). Le groupe OVX-E avait un taux de cholestérol nettement plus bas (127,2 mg/dl) que le groupe OVX (144,8 mg/dl) ($p < 0,05$). Le groupe OVX-Z avait un taux de cholestérol total légèrement plus bas que le groupe OVX ($p \leq 0,05$). nous n'avons pas remarqué de différences statistique entre les groupes ovariectomisés concernant les niveaux de LDL-C (**tableau 8**). En revanche, nous avons observé des niveaux plus élevés de HDL-C dans le groupe OVX-Z (53,6 mg/dl) que dans le groupe OVX (33 mg/dl) ($p < 0,05$). Il est à noter que l'exercice a augmenté de façon significative le HDL-C dans le groupe OVX-E (52.3 mg/dl) par rapport au groupe OVX ($p < 0,05$). Cependant le groupe OVX-ZE affichait des niveaux inférieurs de HDL-C comparé aux groupes OVX-E et OVX-Z (**tableau 8**). Il y avait une tendance à un ratio plus élevé de TC/HDL-C entre le début et la fin de l'étude (2,54 à 3,82) dans le groupe OVX $p = 0,06$ (**figure 15 a**). Cependant ce ratio était nettement plus bas dans les groupes OVX-Z et OVX-E respectivement 2,53 et 2,54 que dans le groupe OVX ($p < 0,05$). Inversement, le ratio TC/HDL-C dans le groupe OVX-ZE n'était pas significativement différent du groupe OVX mais était plus élevé (3,54) que dans les groupes OVX-Z et OVX-E (**tableau 8**). De même, le ratio HDL-C/LDL-C a baissé de façon significative dans les groupes OVX entre le début et la fin de l'étude (0,774 vs 0,416 ; $p < 0,01$) (**figure 15b**). Ce dernier ratio a considérablement augmenté dans les groupes OVX-Z et OVX-E comparativement au groupe OVX. Cependant, à nouveau, il n'y avait pas de différence significative entre les ratios HDL-C / LDL-C entre les groupes OVX-ZE et OVX (**tableau 8**). Ce dernier ratio a augmenté de façon significative dans le groupe OVX-E comparé au groupe OVX ($p < 0,05$) et il existait une tendance à un ratio HDL-C/LDL-C plus élevé dans le groupe OVX-Z que dans le groupe OVX ($p = 0,058$).

6.2.4.3 Cytokine TNF- α plasmatique

L'ovariectomie se caractérisait par une augmentation de TNF- α entre le début et la fin de l'étude ($534,8 \pm 14$ vs $678,9 \pm 9$ pg/ml ; $p < 0,001$). Il y avait une interaction entre l'exercice et l'acide zolédronique concernant les niveaux plasmatiques de TNF- α . Comme indiqué **tableau 8**, nous avons trouvé des valeurs plus élevées de TNF- α à la fin de l'étude dans les groupes OVX-Z, OVX-E, OVX-ZE que dans le groupe OVX. Le plus haut taux de TNF- α a été trouvé dans le groupe OVX-ZE et il était significativement plus haut que dans le groupe OVX-E, respectivement $721,5 \pm 12,5$ vs 697 ± 7 ng/ml ; $p < 0,01$.

6.2.4.4 Remodelage osseux

Le taux de CTX était 27,7% plus élevé dans le groupe OVX (23,8 ng/ml) que dans le groupe SH (18,6 ng/ml), $p < 0,0005$. Les taux de CTX étaient nettement plus bas dans les groupes OVX-Z et OVX-E que dans le groupe OVX ($p < 0,05$). Cependant les taux de CTX dans le groupe OVX-ZE n'étaient pas statistiquement différents du groupe OVX mais nettement plus élevés que dans les groupes OVX-Z et OVX-E (**tableau 7**). A l'inverse, à la fin de l'étude, les taux d'ostéocalcine sérique n'étaient pas différents entre le groupe SH et le groupe OVX. Dans le groupe OVX-ZE on observait un taux nettement plus élevé d'ostéocalcine que dans les groupes OVX, OVX-Z et OVX-E. Le taux d'ostéocalcine était nettement plus élevé dans le groupe OVX-E (178,27 ng/ml) que dans les groupes OVX et OVX-Z (respectivement 117,83 et 139,32 ng/ml) (**tableau 7**). Comme attendu, l'index de découplage variait de - 0,26 en début à - 4,43 en fin d'étude dans le groupe OVX. Dans le groupe OVX-E l'index de découplage augmentait de - 0,22 en début à 3,42 en fin d'étude. L'index de découplage passait de - 0,31 à + 0,45 entre le début et la fin d'étude dans le groupe OVX-Z.

Profil lipidique et concentration en TNF α	Groupes											
	SH		OVX		OVX-Z		OVX-E		OVX-ZE			
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
TC (mg/dl)	118.00 \pm 0.09	128.40 \pm 0.04	104.50 \pm 0.07	144.80 \pm 0.05 ^a	104.52 \pm 0.08	135.30 \pm 0.03	116.10 \pm 0.07	127.20 \pm 0.04 ^b	105.60 \pm 0.05	134.00 \pm 0.04		
HDL-C (mg/dl)	43.40 \pm 0.02	43.50 \pm 0.04	43.30 \pm 0.01	39.00 \pm 0.03	41.80 \pm 0.03	53.60 \pm 0.01 ^b	42.10 \pm 0.01	52.30 \pm 0.03 ^{b,c}	45.20 \pm 0.01	39.20 \pm 0.02 ^{c,d}		
LDL-C (mg/dl)	77.20 \pm 0.03	81.80 \pm 0.04	74.20 \pm 0.04	99.90 \pm 0.06 ^c	74.90 \pm 0.07	96.40 \pm 0.04	74.30 \pm 0.05	89.50 \pm 0.08	76.80 \pm 0.04	103.10 \pm 0.05		
TC/HDL-C	2.77 \pm 0.20	3.14 \pm 0.20	2.54 \pm 0.10	3.82 \pm 0.38	2.57 \pm 0.20	2.52 \pm 0.02 ^b	2.77 \pm 0.20	2.54 \pm 0.20 ^b	2.40 \pm 0.10	3.54 \pm 0.30 ^{c,d}		
HDL-C/LDL-C	0.70 \pm 0.03	0.55 \pm 0.05	0.77 \pm 0.05	0.42 \pm 0.05	0.69 \pm 0.04	0.55 \pm 0.03 ^b	0.74 \pm 0.05	0.64 \pm 0.07 ^b	0.73 \pm 0.05	0.38 \pm 0.02 ^{c,d}		
TNF α (pg/ml)	515.29 \pm 5.20	523.17 \pm 4.91	534.78 \pm 14.10	670.90 \pm 8.96 ^a	515.08 \pm 5.52	713.05 \pm 6.05 ^{a,b}	521.51 \pm 6.05	696.98 \pm 7.01 ^{a,b}	516.48 \pm 7.00	721.49 \pm 12.47 ^{a,b,d,*}		

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD.

^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

* Interactions entre le traitement et l'entraînement.

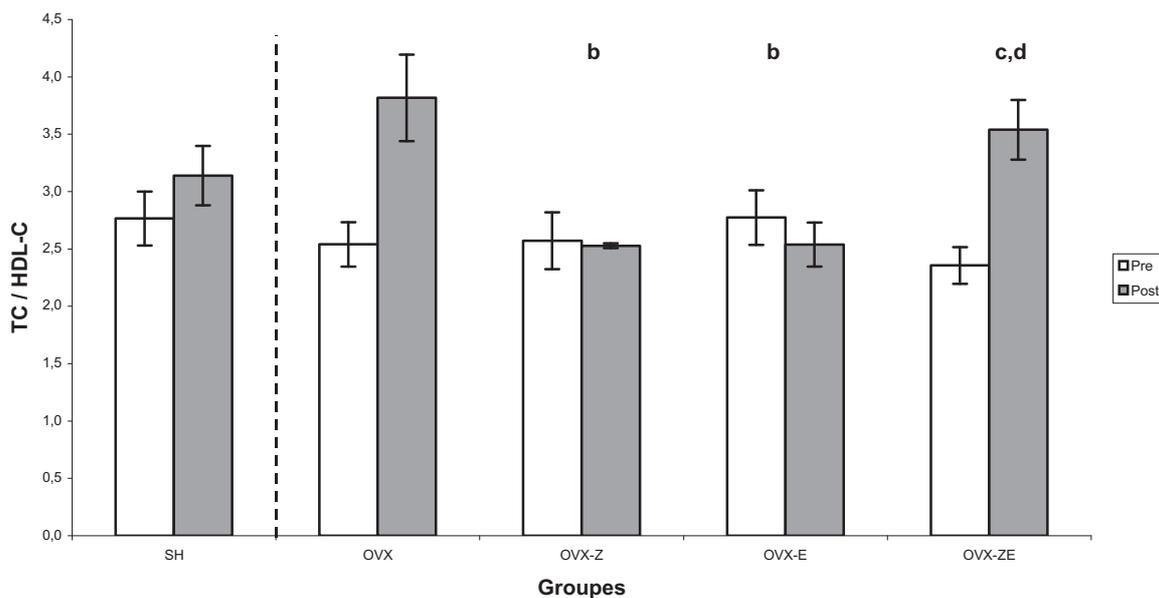
Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C), High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C), Total Cholesterol (TC), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)

Tableau 8

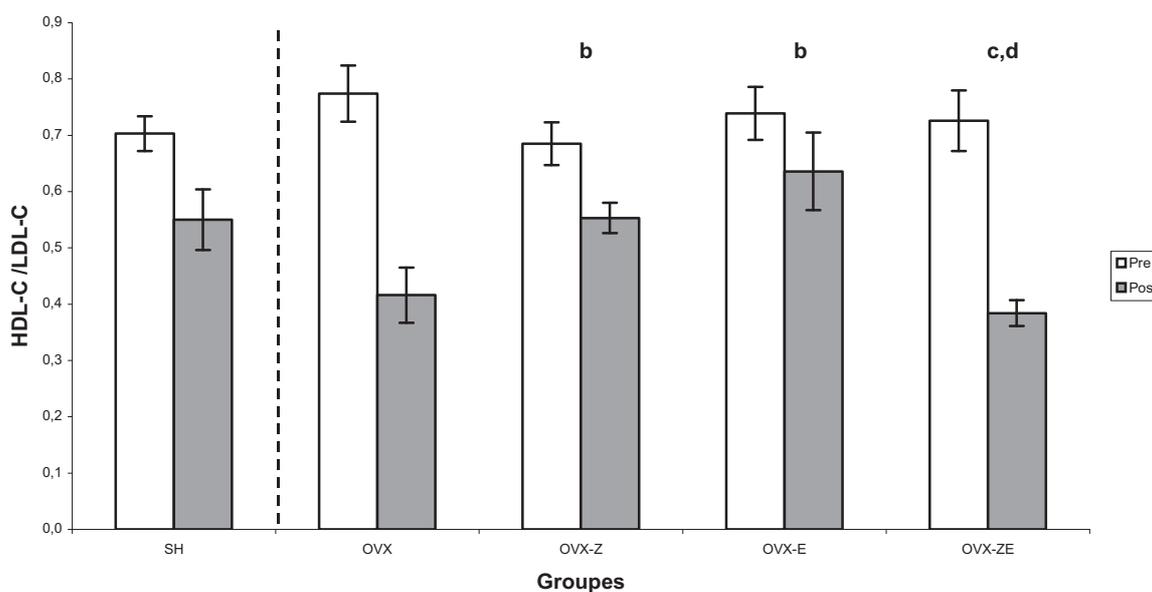
Variations des concentrations en TC, HDL-C, LDL-C, des rapports TC/HDL-C and HDL-C/LDL-C et de la concentration en TNF α chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 μ g/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines.

Figure 15 : Rapports Cholestérol Total (TC) / HDL- Cholestérol (HDL-C) (Fig a) et HDL- Cholestérol (HDL-C) / LDL- Cholestérol (LDL-C) (Fig b) chez les rates contrôles (SH) ou ovariectomisées (OVX) traitées ou non par acide zoledronique (Z) (une injection de 20 µg/kg), sédentaires ou entraînées sur tapis roulant (E) pendant 12 semaines. ^a différences OVX versus SH, ^b différences versus OVX, ^c différences versus OVX-Z, ^d différences versus OVX-E et ^e différences versus OVX-ZE

a)



b)



6.2.5 Discussion

Les principales données de cette étude sont l'augmentation significative (+37.4 %) du taux sérique du HDL cholestérol et une tendance à la baisse du cholestérol total (-5.8 %) chez les rates traitées par une injection unique d'acide zolédronique par rapport aux rates traitées par placebo dans ce modèle de la rate adulte ovariectomisée. De plus, ces variations étaient associées à une diminution significative du ratio TC/HDL-C et à une tendance à l'augmentation du ratio HDL-C/LDL-C. Ces ratios sont des indicateurs reconnus du risque d'athérosclérose. Les résultats observés dans cette étude sur le profil lipidique pourraient avoir un effet positif sur le risque cardiovasculaire si l'on considère leur extrapolation à l'être humain.

Cependant il est à noter que si les effets individuels de l'exercice d'une part et de l'acide zolédronique d'autre part étaient bénéfiques vis-à-vis du risque d'athérosclérose, les effets cumulés de ces deux interventions ont dans ce modèle animal produit un effet néfaste paradoxal.

A notre connaissance, une seule étude s'est auparavant intéressée à ce type de problématique [256]. Dans cette dernière étude, des rates Sprague-Dawley étaient ovariectomisées à 11 semaines et traitées par alendronate, aucun effet sur le taux de cholestérol n'était observé après trois semaines de traitement. Chez la femme ménopausée, des programmes d'exercice physique ont montré qu'ils étaient susceptibles d'entraîner une diminution des taux de lipides [257]. De plus, il a noté que des aminobisphosphonates IV pouvaient induire, chez des femmes ménopausées ayant une ostéoporose modérée à sévère, une augmentation significative des taux d'HDL-C [76]. Dans notre étude chez la rate adulte ovariectomisée, nous avons examiné les effets individuels et combinés de la course sur tapis roulant et de l'acide zolédronique sur le profil lipidique. Les papiers traitant de ce sujet où les bisphosphonates sont utilisés dans le cadre de maladie osseuse métabolique sont rares. Chez l'homme, des travaux récents ont rapporté chez des patients traités pour un myélome multiple asymptomatique par acide zoledronique un effet sur le métabolisme lipidique avec diminution du cholestérol total et du LDL-C [79]. Guney et coll [258] ont rapporté des données suggérant chez 49 patientes ostéoporotiques traitées par alendronate un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique. Deux autres études ont montré respectivement chez des patients pagétiques traitées par pamidronate [77] et chez des femmes ménopausées ostéoporotiques traitées par neridronate [76] une réduction du taux de LDL-C et une augmentation des taux de HDL-C.

Les mécanismes spécifiques conduisant aux effets observés sur les lipides des bisphosphonates sont encore inconnus. Certains bisphosphonates inhibent l'enzyme squalène synthétase et la biosynthèse du cholestérol [247] comme cela a été montré la première fois par Amin et coll [259]. Il faut savoir que cette enzyme est une des enzymes clés de la voie de biosynthèse du cholestérol mais que l'on peut aussi diminuer le cholestérol plasmatique en agissant sur l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoAR) qui est aussi impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Le développement d'inhibiteurs de cette enzyme a d'ailleurs conduit à la famille des statines [260]. Les statines induisant parfois des effets indésirables hépatiques et musculaires, la recherche de nouveaux inhibiteurs de la squalène synthase, n'agissant pas sur la production de mévalonate se poursuit [261]. Des études récentes ont souligné le rôle de la farnesyl pyrophosphate synthétase (FPPS) en termes de cible moléculaire des amino-bisphosphonates [252,70]. La FPPS est une enzyme distale de la voie squalène-mévalonate et la capacité des aminobisphosphonates à inhiber cette enzyme est donc un des mécanismes possibles de la réduction du cholestérol observée sous ces traitements.

Dans notre étude, l'exercice physique a également induit une diminution du cholestérol total (- 12 %) et une augmentation du HDLC (+ 34 %) chez les rates entraînées par rapport à celles qui restaient sédentaires. De plus, les ratios TC/HDL-C et HDL-C/LDL-C étaient respectivement plus bas et plus élevés chez les rates entraînées par rapport aux sédentaires.

Tenant compte du fait que l'exercice physique et l'acide zoledronique pouvaient exercer leurs effets sur le métabolisme lipidique par des actions différentes (augmentation du métabolisme aérobie, augmentation de la consommation d'oxygène et d'acide gras liées à l'énergie musculaire dépendante de l'exercice physique [262] et actions sur la biosynthèse du cholestérol pour l'acide zolédronique, nous avons fait l'hypothèse qu'il serait possible d'observer des effets additifs de l'exercice et de l'acide zoledronique sur le profil lipidique. Ce n'était pas le cas dans notre étude puisque tant pour le cholestérol total que pour le HDL-C, aucune différence significative n'était trouvée entre le groupe OVX et le groupe OVX-ZE. Nous n'avons pas d'explication précise à cette absence d'effet synergique ou additif. Il est possible que l'expression des enzymes antioxydants stimulée par la course à pied sur tapis roulant ait pu être contrecarrée par les effets inflammatoires induits par l'injection d'acide zoledronique. En effet, il a été montré que les bisphosphonates pourraient avoir des effets proinflammatoires. Ces effets sont bien connus du clinicien ; des réactions à la perfusion (fièvre, myalgies, syndrome pseudogrippal, céphalées) survenant parfois dans les trois jours après le traitement chez l'homme. Nous n'avons pas évalué dans cette étude les indicateurs de stress oxydatif ni le statut

oxydant pouvant résulter de notre protocole d'exercice et du traitement par bisphosphonates. De plus, nous n'avons évalué qu'une cytokine proinflammatoire le TNF- α . Dans notre étude, les valeurs les plus élevées de TNF- α en fin d'étude étaient trouvées dans le groupe OVX-ZE et cela peut être une des explications à certains résultats observés dans ce groupe. A l'inverse, il a été également décrit que les bisphosphonates pourraient avoir des effets anti-inflammatoires [263]. Le clodronate inhiberait la production in vitro des radicaux libres superoxydés par les polynucléaires [264]. Ce type d'effet non décrit jusqu'ici dans la littérature pour l'acide zolédronique aurait pu être contrebalancé par certaines caractéristiques de l'exercice physique qui a été imposé à nos rates. L'exercice physique quant à lui réduirait plutôt le TNF- α mais cela n'a pas été montré dans certains types d'exercice physique [251]. Dans cette étude, nous avons trouvé une augmentation modérée bien que significative du taux de TNF- α à la fin du protocole dans le groupe OVX-E par rapport au groupe OVX ($p=0,04$).

En fin d'étude, les taux de CTX étaient respectivement 18,8 % et 19 % plus bas dans les groupes OVX-E et OVX-Z en comparaison du groupe OVX. Cependant, le mode d'action des deux interventions sur le remodelage est plus explicite quand on analyse les résultats de l'index de découplage. En effet, dans le groupe OVX, l'indice est profondément négatif traduisant bien le déséquilibre du remodelage en faveur de la résorption liée à la carence en estrogène, dans le groupe OVX-E l'indice est très positif traduisant bien l'effet ostéogénique de l'exercice avec une balance en faveur de la formation osseuse et dans le groupe OVX-Z des valeurs légèrement positives de l'indice expriment la prévention des effets de l'ovariectomie par l'acide zolédronique. En théorie, il était envisageable compte tenu du fait que les effets de l'exercice physique et de l'acide zolédronique sur le remodelage osseux s'exercent sur des cibles cellulaires différentes que les effets combinés des deux interventions thérapeutiques soient supérieures à ceux de chacune des interventions prises séparément. Dans notre étude, il est possible que l'absence d'un tel résultat en particulier sur le remodelage osseux soit expliquée par la puissance de l'effet antirésorbeur de l'acide zolédronique. En effet, la réponse ostéoformatrice induite par l'exercice a pu être éteinte par l'effet puissant de l'acide zolédronique. Une telle hypothèse a déjà été évoquée pour expliquer l'absence partielle d'efficacité du traitement associant simultanément l'hormone parathyroïdienne et l'alendronate, la capacité antirésorptive du bisphosphonate étant supérieure à la capacité ostéoformatrice du traitement par PTH [265].

A notre connaissance, seules deux études ont eu pour but de combiner les effets des bisphosphonates et de l'exercice physique chez la rate [168,161]. Aucune de ces

deux études ne s'est cependant intéressée au retentissement de cette combinaison sur le remodelage osseux.

De façon surprenante, nous avons observé une augmentation du poids des rates dans le groupe OVX-Z par rapport aux groupes OVX-E et OVX-ZE. Des différences de poids sont souvent retenues comme facteur explicatif d'un meilleur profil lipidique chez les personnes actives par rapport aux personnes sédentaires. Cependant, certaines données supportent l'idée que l'influence de l'activité physique sur le profil lipidique pourrait être indépendante des effets métaboliques associés aux variations de poids [262] ; ceci pourrait également être le cas de l'action de l'acide zoledronique sur le métabolisme des lipides.

Dans cette étude où nous avons pour but d'analyser les effets individuels et combinés de l'acide zoledronique et de la course sur tapis roulant, nos résultats confirment que tant l'acide zoledronique que l'exercice physique préviennent l'augmentation de la résorption osseuse induite par l'ovariectomie. Cependant, nous n'avons trouvé aucun effet additif ou synergique de l'association simultanée des deux interventions thérapeutiques ni sur le remodelage osseux, ni sur le profil lipidique.

Tant l'exercice physique que l'acide zoledronique ont cependant dans ce modèle de la rate ovariectomisée entraîné une amélioration du profil lipidique avec une réduction modérée du cholestérol et une augmentation plus prononcée du HDL-cholestérol dans les groupes OVX-Z et OVX-E. En imaginant une extrapolation de ces résultats à la femme ménopausée, cela pourrait avoir un effet bénéfique cliniquement pertinent sur le risque d'athérosclérose car les bisphosphonates ont également des effets potentiels sur l'athérosclérose indépendamment de leurs effets sur le profil lipidique et sur le taux de cholestérol en particulier [266,267,268].

Annexe 1

Does exercise modify the effects of zoledronic acid on bone mass, microarchitecture, biomechanics and turnover in ovariectomized rats ?

E. Lespessailles, C. Jaffré, H. Beaupied, P. Nanyan, E. Dolléans, C.L Benhamou, D. Courteix

Abstract

Regular activity has effects on bone size, shape and density resulting in an increase in mechanical strength. The mechanism of action that underlies this improvement in bone strength is mainly linked to an increase on bone formation. Zoledronic acid (Z) in contrast may prevent bone strength changes in ovariectomized (OVX) rodents by its potent antiresorptive effects. Based on these assumptions we hypothesized that combined effects of exercise (E) and Z may produce higher prevention of bone changes resulting from estrogen deficiency than either intervention alone. At six-months of age, sixty female Wistar rats were OVX or sham operated (SH) and divided into five groups: SH, OVX, OVX-E, OVX-Z, OVX-ZE. OVX rats were treated with a single I.V injection of Z (20 µg/kg) or vehicle and submitted or not to treadmill exercise (15 m/mn; 60 m/day; 5 days/week) for 12 weeks. Whole body BMD and bone turnover markers were analyzed longitudinally. At sacrifice, femurs were removed. BMD by DXA, three-point bending test and µCT were performed to study trabecular structure and biomechanical parameters. After 12 weeks, bone volume fraction decreased in OVX rats, whereas bone turnover rate, trabecular spacing and structure model index increased compared with SH group ($p < 0.05$). Zoledronic acid prevented the ovariectomized induced trabecular bone loss and its subsequent trabecular microarchitectural deterioration. Treadmill exercise running was shown to preserve the bone strength and to induce bone turnover changes in favour of bone formation. However the combined effects of zoledronic acid and running exercise applied simultaneously did not produce synergetic or additive effects.

Key-words :

- zoledronic acid, treadmill exercise, OVX rats, trabecular microarchitecture, bone strength

Short title :

Combined effects of zoledronic acid and exercise on bone mass and strength

1 Introduction

With increasing life expectancy of the population, osteoporosis and osteoporotic fractures have been more and more diagnosed worldwide [1]. Current strategies for the prevention and treatment of osteoporosis have benefited from the development of new bisphosphonates [2]. Recently, it has been shown that zoledronic acid infusions given at one year interval for three years had a proven efficacy against fractures in post-menopausal women [3]. Bisphosphonates are potent inhibitors of bone resorption. They act mainly on osteoclasts by inhibiting the bone resorptive capacity of mature osteoclasts. They also may induce osteoclast apoptosis [4]. In addition to the accelerate rate of bone loss as a result of menopause, it has been reported that the estrogen deficiency may also involved in the decrease of lean mass, leading to sarcopenia [5] As regular physical activity may prevent the decline in bone and muscle losses associated with menopause [6,7], many public health officials encourage or recommend that individuals must engage in daily exercise [8,9]. The specific physiological mechanisms that underlie the effect of physical activity on bone are uncompletely understood. However, the triad osteoblast, osteocyte and lining cells may have a key role in the mechanisms implicated in the response to osteogenic exercise stimuli [10]. Therefore, a combination of antiresorptive therapy like the zoledronic acid (whose target cell is the osteoclast) and a bone anabolic intervention induced by mechanical loading (whose target cells are resident osteocytes, osteoblasts and bone lining cells) may be a powerfull treatment option for osteoporosis. This strategy of combining the osteogenic effects of exercise and the antiresorptive activity of bisphosphonates or estrogen has already been reported [11]. In animal studies, data to support a beneficial effect of the combination between antiresorptive drugs and anabolic therapy are conflicting [12,13,14,15]. It has been found in ewes that the bone anabolic actions of parathyroid hormone was blocked by tiludronate [12]. In rats there was also an interaction between alendronate and PTH analog as the anabolic response of the latter was different in animals pretreated or not by alendronate [13]. On the other hand, the two studies to our knowledge aiming to combine the potential osteogenic effect of exercise with the antiresorptive effect of bisphosphonates have found that this combination may offer advantages over the treatment with either intervention alone [14,15].

Based on these assumptions, the aim of this study was to assess the efficacy of zoledronic acid a single injection and of treadmill running exercise alone or in combination, for the prevention of ovariectomy-induced bone loss in rats.

Material and Methods

Rat groups and treatment

Sixty 6-month old Wistar female rats (Animal Production Center, Olivet, France) were maintained and acclimatized for two weeks on a 12-h light/12 h dark cycle at $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ during the experiment. Rats were housed in standard cages (two animals by cage) with ad libitum access to food [a commercial standard diet (A04, SAFE, France)] and water. Rats were randomized to either sham-operated (sham; n = 12) or bilateral OVX (n = 48). We did not ration OVX rats in order to mimic real

life conditions in postmenopausal women, knowing that this is usually recommended as obesity induced by OVX may protect against osteopenia [16]. Among the rats randomly selected in OVX group, a second randomisation procedure was done leading to four groups of 12 animals each in addition to the sham-operated group (SH) :OVX sedentary controls (OVX) ; OVX-exercise (OVX-E); OVX-zoledronic acid (OVX-Z) ; OVX- zoledronic acid exercise- (OVX-ZE). Based on previous dose-ranging study [17], we selected a single i.v. dose of 20 µg/kg zoledronic acid, as it has been demonstrated it is the minimum dose required to provide long-term bone protection against the effects of OVX [17]. We injected the drug or a physiological saline solution two days before the OVX surgery. Sham operations were performed by exteriorising the ovaries. Bilateral ovariectomies were performed under ketamine-xylazine anesthesia. This experiment was conducted in conformity with the Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals. The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community Standards on the care and use of the laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Inserm 45-001).

Exercise regimen

The exercise regimen consisted in running in an especially home made motor-driven treadmill, which allowed eight rats to exercise together. The running program was initiated gradually. The exercise regimen consisted in daily training. During the first four weeks, the speed of the treadmill and the duration of each running were gradually increased from 8 m/mn for 3 mn – 30 mn to 12 m/mn for the first two weeks. In the two following weeks, the speed and duration of the running session were gradually increased to 15 m/mn for sixty minutes. This speed and duration were maintained for 5 days per week for the rest of the experiment (8 weeks more).

Bone turnover biomarkers

At baseline and at the end of the study blood was obtained by veinous puncture at the tail. Blood samples were allowed to clot at 4°C for 20 mn before centrifugation at 3000 rpm for 10 mn. Sera were stored at – 20°C during 24 h and then archived at – 80°C until analysis.

Osteocalcin (OC) and C terminal collagen cross-links (CTX) which are respectively biomarkers of bone formation and resorption were assayed in duplicate by ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev Hoved-Gade, Denmark). The within-assay and between assay CV were < 10% in our laboratory. An uncoupling index (UI) was calculated to assess the relative balance of the formation and resorption processes of bone remodelling, as previously described [18]. First, the mean ± SE of the baseline CTX and OC values were determined in each rat. Using the values of the SHAM group, OC and CTX Z-score [rat value – mean baseline) / SD baseline] were calculated by subtracting the Z-score of the resorption marker from the Z-score of the formation marker. A positive UI indicates bone remodelling unbalanced in favor of bone formation, whereas a negative UI reflects an unbalanced favouring bone resorption.

Body weight, fat mass, lean mass and bone mineral content (BMC) measurements

All analyzes were conducted with the Discovery A densitometer (Hologic, Inc, Bedford, MA) calibrated daily in accordance with the manufacturer's recommendations. The rat whole body (WB) module was used to provide WB fat mass and WB lean mass. To perform femur rats in vivo DXA analysis, the anesthetized rat was placed on a thin plastic sheet where the outlines of a typical rat has been drawn for precision purposes. Rats were placed in supine position and its appendages were positioned flat to the table using adhesive plaster.

The regional high resolution mode of the small animal scan protocol was used to assess bone density measurement at excised rat femurs. As a thin plastic sheet was placed beneath the rat for an exam, this was also placed beneath the small animal step phantom during quality control procedure. In addition, as we studied small animals (small region of interest) we have performed and compared step phantom analyses between each rat group measurements in order to detect any potential drift of the instrumentation. Thereafter, the phantom was analysed daily before animal testing for quality control purposes. For scanning, the tail of the rat has been curled upon alongside the animal in order to image it entirely. The default scan width for a rat whole body study is 7.1 inch (17.8 cm). For in vivo and ex vivo analysis of the femur rat, the regional high resolution study was used. The excised femur was placed in the center of a thin-walled plastic container with a smooth uniform bottom. The container as recommended by the manufacturer was sufficiently wide (8.3 cm ; > 3 inch) to allow 1 inch of water on both sides of the excised femurs. The container was filled with 3 cm of water. For all measurements, a constant depth of the water in the container was controlled carefully using a water fill line on the container.

At baseline and at 12 weeks (four weeks of gradually increased exercise and eight weeks at full regimen ie. paragraph exercise regimen described above) lean and fat masses were measured by DXA. The root-mean square CV of in vivo WBBMC, WBBMD and WB fat mass were respectively 1.2%, 0.87%, and 3.8 %. These CVs were determined from two repeated measures with repositioning on thirty animals.

Excised femurs were measured at the end of the study. The left femur was bathed in saline solution during the DXA measurement. In addition to the total femur measurement two sub-regions were determined. The first sub-region (R1) corresponded to the femoral distal metaphysis and excluded the growth plate area. The second sub-region is located more distally and corresponded to a diaphyseal zone (R2) (fig 1) (19). The R1 region is considered to contain more trabecular bone than the R2 one which is richest in cortical bone (19). The root-mean square CVs in vitro of BMC and BMD of the total excised femur and of the two generated sub-regions were 1.15% ; 0.39% for the total excised femur, 5.73 %; 2.64% for R1 sub-region and 4.09 % ; 1.55% for R2 sub-region. These CVs were determined from four repeated measures on nine animals.

Micro-CT of trabecular bone microarchitecture

The microarchitecture of the distal femur was studied using μ CT (Skyscan 1072; Skyscan, Aartselaar, Belgium). The X-ray source was set at 75 kV and 100 μ A, with a pixel size of 11 μ m. Four hundred projections were acquired over an angular range of 180° (angular step of 0.45°). The image slices were reconstructed using the cone-beam reconstruction software version 2.6 based on the Feldkamp algorithm. The registered data sets were segmented into binary images. Because of the low noise and relatively good resolutions of the data sets, simple global thresholding methods were used [20]. On the femur, 250 slices were selected from the distal growth plate to the shaft proximally. The trabecular bone was extracted by drawing ellipsoid contours with “CT analyzer” software (Skyscan). The following parameters were measured for each sample in the three experimental processes: The bone volume/tissue volume BV/TV (%) corresponding to the bone proportion,

- The ratio between bone surface and bone volume BS/BV (mm^{-1}) was measured based on a faceted surface of the marching cubes volume model (21),
- The trabecular thickness Tb.Th (μm) and the trabecular spacing Tb.Sp (μm) were measured from 3D μ CT images by the sphere method developed by Hildebrand and Ruegsegger (22).

In addition to morphological parameters, the following parameters were calculated for each sample:

- The trabecular number Tb.N (mm^{-1}) was calculated from the following equation considering the parallel plate model, but using a direct 3D measurement of thickness (23):

$$\text{Tb.N} = \frac{\text{BV/TV}}{\text{Tb.Th}}$$

- The degree of anisotropy DA (no unit) was calculated using the mean intercept length (MIL) and eigen analysis. An ellipsoid is fitted to the 3D distribution of MILs measured from 128 random 3D directions of a spherical volume of interest. Values from DA vary from 1 (fully isotropic) to infinity (fully anisotropic)
- The structure model index SMI (no unit) indicated the relative proportion of rods and plates in the sample. SMI was calculated by a differential analysis of the triangulated surface of trabecular bone (24).

Trabecular bone pattern factor (TBPf) was calculated. This parameter is used to indicate the connectivity of trabecular bone [25]. The TBPf is an indicator of concavo-convex structure of the structure of the surface of trabecular bone. A higher TBPf value implies a poorly connected state of trabeculae.

Biomechanical testing

Mechanical properties of the left femur were assessed by three-point bending tests. Four hours before mechanical testing, the bones were thawed at room temperature. Each bone was secured on the two lower supports on the anvil of an Universal Testing Machine (Instron 4501; Instron, Canton, MA, USA). The diameter of these supports was 4mm and the distance between the two

supports was 20 mm. The cross-head speed for all tests was 1 mm/minute. Load-displacement curves were recorded using specialized software (Instron 4501 software). Biomechanical properties were calculated from these curves: ultimate force (the maximum force supported by the bone before fracture, F_{ult} N); energy to ultimate force (work energy required to fracture the bone, U, N.m); and stiffness (extrinsic rigidity of the femur, S, N.m). Because of the irregular shape of the femoral diaphysis, the femoral diameter used in the calculation was the mean of mediolateral and the antero-posterior femoral mid-diaphysis diameters. Ultimate stress (σ_U , MPa) and Young's modulus (E, MPa, modulus of elasticity) were determined by the equations previously described by Turner and Burr [26]. To ensure good reproducibility between measurements, the femur was always mounted so that the cross-head could be applied just in the middle of the bone (26).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) for body weight and body mass ; they are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for serum chemistry. Normal distribution (Gaussian) of the data were assessed by a Kolmogorov Smirnov test. The effect of ovariectomy was determined by comparing the sham-OVX and OVX groups using Student's t tests. To compare the main and combined effects of exercise and zoledronate between the OVX groups for longitudinal data, a two-way ANOVA with repeated measures was performed. In the event of a significant interaction, exercise and zoledronate effects were considered synergistic. A one-way ANOVA with post hoc, pairwise comparisons using Fisher's protected least-significant difference [27] was used in case of significant interactions. In the event of a non-significant interaction, the main effect for each intervention (zoledronate, exercise) was explored by Newman-Keuls test and intervention effects were considered additive. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed with software PCSM (OPTIMA-Deltasoft, France).

Results

Anthropometrics and densitometry parameters

Body weight

The data presented in table 1 showed that the initial body weight of all the groups were not statistically different. However, after twelve weeks, body weight in OVX group was significantly higher than in sham operated rats twelve weeks post-surgery 386 ± 33 g vs 333 ± 22 ; $p = 0.002$. There was a significant difference in body weight between OVX-Z group and the two exercised groups (table 1).

Lean and fat mass

Percentage of fat mass was found significantly higher in OVX-Z group compared to other OVX groups (table 1). There was a higher percentage of fat mass in OVX group (27.7%) as compared to the one in the SH group (19%), $p < 0,005$. There were no significant differences observed between the groups for WB lean mass.

Whole body and excised femurs BMC

We have found a significant difference for whole body BMC between OVX-Z group and OVX, OVX-E and OVX-ZE groups (table 1). Whereas we did not find any significant differences for BMD or BMC at the total excised femurs we observed statistical differences at the two sub-regions as indicated in table 2. There was no significant effect of exercise but an effect of the zoledronic acid with higher BMD in the R1 region of OVX-ZE and OVX-Z groups than in OVX-E and OVX groups. In the R2 sub-region there was also a significant effect of the zoledronic acid on BMC with higher results in the group treated by zoledronic acid than in OVX or OVX-E groups.

3D μ CT trabecular bone microarchitecture

Effects of ovariectomy: at the end of the study (twelve weeks after ovarian removal) we observed significant differences in bone volume fraction (- 37.50%), trabecular spacing (+ 31.4%), and structure model index (+ 51.6%) in OVX groups as compared to SH group. The femoral cancellous bone osteopenia induced by the ovariectomy was also characterized by changes in connectivity indices with significantly higher TBPf and BS/TV values in OVX group than in SH group as reported in table 3.

In this study we did not find any additive interaction between the zoledronic acid treatment and treadmill running exercise on trabecular bone microarchitecture parameters assessed by μ CT.

Effects of zoledronic acid :

Both zoledronic acid and zoledronic acid plus exercise were fully protective from estrogen-dependent bone loss. Indeed, OVX animals showed a - 37.5% overall reduction of trabecular bone volume fraction versus SH animals whereas the BV/TV was not significantly different in OVX-Z and OVX-ZE groups versus SH group respectively 24.9%; 25.5% and 26%. Trabecular spacing values were significantly higher in OVX and OVX-E groups than in OVX-Z and OVX-ZE groups. There were significant differences concerning Tb.Th, BS/BV, Tb.N, TBPf, DA and SMI between OVX-Z and OVX-ZE groups on one hand and OVX and OVX-E groups on the other hand as indicated in table 3.

Effects of exercise : The exercise alone did not permit to prevent the loss of cancellous bone induced by ovariectomy in this study as BV/TV, BS/BV, Tb.Sp, Tb.N, Tb.Th and TBPf, values were not statistically different between OVX and OVX-E groups. We observed only for DA significant differences between sedentary rat groups and exercise rat groups (table 2). However, we did not find any significant inhibition of the effect of zoledronic acid by the effect of exercise on trabecular bone parameters and we observed only for DA a positive action with the combination of exercise and zoledronic acid, with a lower DA in OVX-ZE group as compared to the DA values in OVX-E, OVX-Z, and OVX groups (table 3).

Biomechanics

In this study, ovariectomy did not induce significant decrease in biomechanical properties showed by the bending test at the femur. In contrast, we observed an effect of exercise with a

significantly higher ultimate force in the OVX-E and OVX-ZE groups than in the sedentary rat groups (OVX and OVX-Z). In addition, there was an additive effect of zoledronic acid and exercise with a significantly higher ultimate force in the OVX-ZE group than in the OVX and OVX-Z groups, respectively 143 N versus 120.4 ($p < 0.05$) and 143 N versus 124.4 ($p < 0.05$). We have found a statistically significant effect of zoledronic acid in the energy to ultimate force (table 4). A higher energy to ultimate force was observed in the OVX-Z group compared to the OVX and OVX-E groups ($p < 0.05$) and a higher energy to ultimate force in the OVE-ZE group compared to the OVX-E and OVX groups ($p < 0.05$).

Bone turnover

The CTx level was 27.7% higher in OVX group (23.8 ng/ml) than in SH group (18.6 ng/ml), $p < 0.0005$. The CTx levels were significantly lower in OVX-Z and OVX-E groups as compared to the OVX group ($p < 0.05$). However the CTX levels in the OVX-ZE were not statistically different from those in the OVX group but were significantly higher than in the OVX-Z and OVX-E groups (fig 2). In contrast, at the end of the study, serum osteocalcin levels were not significantly different between the SH group and the OVX group. The OVX-ZE group displayed higher osteocalcin level than in the OVX, the OVX-Z and the OVX-E groups. The osteocalcin level was significantly higher in OVX-E group (178.27 ng/ml) versus the OVX and OVX-Z groups (respectively 117.83 and 139.32 ng/ml) (fig 2). As expected the uncoupling index moved from $- 0.26$ at baseline to $- 4.43$ at the end of the study in OVX group. In OVX-E group the UI increased from $- 0.22$ at baseline to $+ 3.42$ at the end of the study. The uncoupling index moved from $- 0.31$ to $+ 0.45$ in OVX-Z group.

Discussion

The salient findings of the present study are the following :

First, we have found that zoledronic acid a single I.V injection 20 µg/kg protected from estrogen-dependent trabecular bone loss and from microarchitectural deterioration after twelve weeks in ovariectomized mature rats.

Second, in the present study, the running exercise which was characterized by a daily sixty minutes exercise on a treadmill with a speed of 15 m/mn for 12 weeks, did not prevent the trabecular bone loss induced by ovariectomy but had significant effect on the ultimate force and on bone remodelling.

Third, although the higher values for ultimate force and energy to ultimate force were found in rats treated with zoledronic acid and practicing the running exercise, we did not observe synergetic interaction between zoledronic acid and exercise.

Zoledronic acid is an heterocyclic bisphosphonate which has been found in vitro assays to be the most potent antiresorptive agent acting by inhibition of osteoclast-mediated bone resorption. It has been shown that zoledronic acid a single dose of I.V 100 µg/kg was able to maintain for 180 days the compressive bone strength at the vertebrae and the degree of bone mineralization in old (18 months age) Fisher 344 ovariectomized rats (28). In a model of acute stroke in twelve-week-old female Sprague-Dawley rats a 30 µg/kg I.V injection of zoledronic acid preserved the bone mass and biomechanical bone strength at 3 weeks after stroke meanwhile a 6 µg/kg I.V injection did not (29). In vivo, µCT examination has been used to assess the efficacy of zoledronic acid a single s.c 20 µg/kg injection either as a preventive (early) or as a recovering treatment of OVX induced bone loss (30). In the latter experiment, 30 weeks-old retired breeding Wistar rats were ovariectomized and studied at 16 weeks. Although the early treatment of OVX rats led to a preservation of structural parameters, no significant differences between groups merged from the three-point bending test (30). Improvement in biomechanical parameters was found in the bending strength of the femoral shaft in the study by Gasser et al (31). The 20 µg/kg dose was shown to improve the ultimate strength but not the toughness in their OVX rats and they concluded that only a 100 µg/kg dose of zoledronic acid fully prevent the loss of bone strength induced by OVX (31). In our study we have found a significant effect of the zoledronic acid in the energy to ultimate force as compared to OVX and OVX-E groups at the femur whether it was assessed at the tibia in the study by Browers et al (30). Our study is also in agreement with the latter experiment, indeed, we did not found any significant differences between SH group and the zoledronic acid treated groups for all 3D structural parameters. In their experiment Lee et al (29) did not found any statistical significant differences three weeks after inducing stroke in osteocalcin levels among their groups of rats (two groups were treated with zoledronic acid). In contrast zoledronic acid (30µg/k) inhibited the increase of the CTX value observed in their stroke vehicle group.

We cannot strictly compare these last results to our study as their rats were two-fold younger, of different species, and above all not ovariectomized. However we have also found an inhibition by the zoledronic acid of the elevation of the CTX levels observed in OVX group with no statistical difference

between OVX-Z and SH groups. Gasser et al (31) in their long term assessment of zoledronic acid effects on ovariectomized rats have found an increase of plasma osteocalcin levels after OVX. In our study this was not the case but we also not found a suppression of the bone formation activity as the plasma osteocalcin levels was not significantly different between SHAM-operated rats and OVX animals treated with zoledronic acid. In contrast, we confirmed the antiresorptive effects of the zoledronic acid (29, 31) as the elevated osteoclast activity reflected by the rise in CTX levels in OVX rats was prevented.

In the present study, serum osteocalcin levels did not raise after OVX, in contrast running exercise significantly increased serum osteocalcin. In addition, the uncoupling index increased from baseline to the end of the study confirming that treadmill running exercise stimulated bone formation. These results are in accordance with previous studies where exercise regimen implicated treadmill running (32) or jumping training (33). We have found significant main effect for exercise on femoral ultimate force and cross-sectional area as assessed by three-point bending test at the femur. This is in line with the data of Fuchs et al (14) who found in seven months old virgin female Fisher 344 ovariectomized rats a beneficial effect of treadmill running for ultimate force, modulus and stiffness. The exercise protocol regimen applied to our rats did not result in preservation of BMC after OVX during the 12-week study period. Despite the lack of change in BMC and any significant improvement or preservation in trabecular bone parameters assessed by 3D μ CT produced by our running exercise experiment, exercise training had a positive effect on cross-sectional area at the femur. This effect on geometry might explain in part the higher ultimate force observed in the exercised rats compared to the sedentary ones.

Moreover it has been reported that exercise may have a greater impact on architectural and geometric properties of bone rather than on BMD (34,35).

In most of the reports, treadmill exercise running was shown to be beneficial for the rat skeleton (36). However bone adaptation to treadmill exercise might vary according to several factors : age, gender, species of animal, gonadal status (ovariectomized or not), other models of osteopenia, experimental period, frequency, duration, intensity of exercise. In our study we chose the exercise regimen in line with previous studies indicating that a 15 m/mn running speed, 60 mn/day, 5 days/week for twelve weeks would be osteogenic in ovariectomized mature rats (36,37). The running speed and the corresponding (maximum oxygen consumption) VO_{2max} (38) or maximal aerobic speed (39) are critical to obtain a beneficial effect in the skeleton. It has been demonstrated that a too vigorous exercise ($VO_{2max} > 80\%$) would be less effective than a more moderate one (50-70 % VO_{2max}) (38). The numbers of days per week during the rats undergo running exercise is another variable (40). A moderate running load at frequencies of 4 and 5 days per week has been shown to be beneficial in female Wistar rats, 8 weeks old, for BMD (40).

The bone site where the experiment is assessed might also produce different results. In our study, we did not evidenced an effect of exercise on BMC at the femur. In numerous studies running exercises

produced more significant effects on specific bone site at the tibia more than at the femur or vertebrae (15, 39-42). For instance gain in BMC was shown to be higher at the distal tibia versus the distal femur in a voluntary exercise in rats (43). The femur is likely to receive less impact (mechanical loading) than the tibia as it is located more distally from the ground (44,45). Regional differences in the response to exercise protocol and treatment may be observed (46).

Whereas it was an attractive hypothesis that a concurrent combination of exercise and zoledronic acid would be superior to either intervention alone, we have found that this intervention did not produce any significant synergistic interaction. However, highest values of BV/TV, energy to ultimate force, ultimate force and cross-sectional area, although non significant statistically, were found in OVX-ZE group.

Direct comparison between rat experiment protocols where bisphosphonates and exercise have been combined (14, 15) might be hazardous because exercise regimen, experimental animals, age at ovariectomy and bisphosphonates tested were different across studies. Tamaki et al. (14) assessed the effect of combining treadmill running exercise and etidronate in ovariectomized rats. In the latter study, rats were split into five groups like in our study. Using histomorphometry, the results showed an interaction between etidronate treatment and subsequent physical exercise, as evidenced by increased trabecular bone area of the proximal tibia. A significant interaction was also observed in BMD at the proximal femur of rats but there were no interaction dependence at the mid and distal region of the femur nor in the measurement of osteoclast and osteoblast numbers. Alendronate and treadmill running exercise have been associated to examine their effects on bone mass and strength (15) in ovariectomized rats. In this latter experiment using a 2 x 2 factorial design, the authors have found the combined intervention of alendronate and treadmill running exercise to be superior in preserving the whole body and proximal femur BMC and maintaining bone strength at the hip than either intervention alone. In our study we failed to demonstrate synergistic interaction or significant additive effect when combining zoledronic acid and treadmill exercise running. This lack of additive effect of the combination exercise and zoledronic acid on BMC trabecular bone microarchitecture and bone strength might be explained by the potency of the antiresorptive effect of zoledronic acid. The response to the osteogenic effects of exercise might have been blunted by the powerful effect of zoledronic acid. Such an hypothesis has been mentioned to explain the lack of efficacy in combining parathyroid hormone with alendronate, the capacity of the antiresorptive drug being superior to the capacity of formation associated with the PTH treatment (47). In their experimental protocol, Tamaki et al (14) gave the etidronate before the exercise training of the rat. We propose that, in order to permit an anabolic window due to the osteogenic effects of exercise, the bisphosphonate would be given in a second time in order to obtain rather an in sequence treatment than a simultaneous one. This is an agreement with the study of Rhee et al (48) who have found in an experiment studying the lose, restore and maintain concept that a sequential therapy with zoledronic acid after rhPTH (1-84) was consistently effective to treat the ovariectomy-induced bone loss.

Any conclusions with regard to human should be drawn with caution as the running exercise in rats and humans may give different loading pattern and responsiveness. Besides in human, both studies

which have tested such an hypothesis to obtain additive effects by combining a bisphosphonate and exercise training failed to demonstrate a superior action of the combined interventions than either separate treatment (49,50).

Chilibeck et al set up a randomized trial to study the combined effects of etidronate (ETI) and exercise (E) in post-menopausal women (49). Forty-eight women, with a mean age of fifty-seven years were divided into four groups : ETI + E, ETI only, E only and placebo without E. Etidronate was taken over twelve months at a dose of 400 mg/day during fourteen days, every ninety days. Resistance training was carried out three times a week, for forty-five minutes. When pooling the data of all ETI groups, bone density gains at the lumbar spine and whole body significantly outreached those of the placebo group. However, no interaction or additive effect between ETI and exercise emerged. Uusi Rasi et al (50) studied the association of physical exercise with a daily intake of 5 mg alendronate in 164 postmenopausal women (age : 54 ± 2 years). Daily exercise protocol comprised 20 minutes of jumping activities, 15 minutes of stretching and other non impact activities. It appeared that alendronate treatment increased BMD at the lumbar spine and femoral neck, but that exercise alone had no effect. Besides, no interaction or additive effect between alendronate and exercise could be evidenced.

Overall, our findings suggest that in the present study zoledronic acid prevented the ovariectomized induced trabecular bone loss and its subsequent trabecular microarchitectural deterioration. Treadmill exercise running was shown to preserve the bone strength and to induce bone turnover changes in favour of bone formation. However the combined effects of zoledronic acid and running exercise applied simultaneously did not produce synergetic or additive effects.

Aknowledgments

This work was supported by grant from Novartis France.

References

1. Johnell O, Kanis JA (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* **17**:1726-1733.
2. Boonen S (2007). Bisphosphonate efficacy and clinical trials for postmenopausal osteoporosis: Similarities and differences. *Bone* **40**:S26-S31.
3. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cayley JA, Cosman F, Lakatos P, Chung Leung P, Man Z, Mautalen C, Mesenbrick P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Fink Eriksen E, Cummings SR (2007). Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **356**:1809-22.
4. Hugues DE, Wright KR, Ui HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res.* **10**:1478-1487.
5. Walsh MC, Hunter GR, Livingstone MB (2006). Sarcopenia in premenopausal and postmenopausal women with osteopenia, osteoporosis and normal bone mineral density. *Osteoporos Int.* **17**:(1) 61-67.
6. Wallace BA, Cummings RG (2000). Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* **67**:10-18.
7. Bonaiuti D et al (2003). Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* **3**:CD000333. Review.
8. NOF. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis (2008).
9. Bone Health and osteoporosis: a report of the surgeon general (2004).
10. Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* **405** (8):704-706.
11. Lespessailles E, Prouteau S (2006) Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis? *Clin Exp Rheumatol.* **24**:191-195.
12. Delmas PD, Vergnaud P, Arlot ME, Pastoureau P, Meunier PJ, Nilsson MJL (1995). The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate – is activated resorption a prerequisite for the *in vivo* effect of PTH on formation in a remodelling system? *Bone* **16**:603-610.
13. Gasser JA, Kneissel M, Thomsen JS, Mosekilde L (2000). PTH and interactions with bisphosphonates. *J Musculoskel Neuron Interact* **1**:53-56.
14. Fuchs RK, Shea M, Durski SL, Winters-Stone KM, Widrick J, Snow CM (2007). Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* **41**:290-296.
15. Tamaki H, Akamine T, Kurata H, Sakou T. (1998). Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone* **23**:147-153.
16. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M., Walsh CC (1987). Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue.* **40**:155-9.
17. Gasser JA., Green JR, Novartis Pharma AG. (2002). Long-term protective effect of a single IV injection of zoledronic acid on cancellous bone structure and cortical bone in ovariectomized rats. *Bone.* **30** (3 suppl): 41S.

18. Eastell R., Robins S.P, Colwell T., Assiri A.M., Riggs B.L., Russell R.G. (1993). Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int.* **3**:255-60.
19. Pastoureau P, Chomel A, Bonnet J (1995). Specific evaluation of localized bone mass and bone loss in the rat using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis. *Osteoporos Int* **5**:143-149
20. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Ruegsegger P (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies:a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* **23**:59-66.
21. Lorensen WE, Cline HE (1987). Marching cubes:a high resolution 3D surface construction algorithm *ACM SIGGRAPH* **21**:1249-52.
22. Hildebrand T and Ruegsegger P (1997a). A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images. *J Microsc.* **185**:67-75.
23. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987). Bone histomorphometry:standardization of nomenclature,symbols and units. *J Bone Miner. Res.* **2**:595-610.
24. Hildebrand T, Ruegsegger P (1997b). Quantification of bone microarchitecture with the structure model index *Comput. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **1**:15-23.
25. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G (1992). Trabecular bone pattern factor:a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* **13**:327-30.
26. Turner CH, Burr DB (1993). Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* **14**:595-608.
27. Neter J, Wasserman W, Ahitmore GA 51982; *Applied Statistics*. Boston : Allyn and Bacon 544-572.
28. Yao W, Cheng Z, Koester KJ, Ager JW, Balooch M, Pham A, Chefo S, Busse C, Ritchie R, Lane NE (2007). The degree of bone mineralization is maintained with single intravenous bisphosphonates in aged estrogen-deficient rats and is a strong predictor of bone strength. *Bone* **41**:804-812.
29. Lee JI, Kim HW, Rhee WI, Park JH, Lim SH, Im S, Ko YJ (2006). The beneficial effect of intravenous zoledronic acid therapy following an acute stroke in rats. *Bone* **39**:377-382.
30. Browsers JEM, Lambers FM, Gasser JA, van Rietbergen B, Huiskes R (2008). Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized Wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int.* **82**:202-211.
31. Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR (2008). Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* **23**:544-551.
32. Bonnet N, Laroche N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. (2007). Doping dose of salbutamol and exercise training:impact on the skeleton of ovariectomized rats. *J Appl Physiol* **103**:524-533.
33. Honda A, Umemura Y, Nagasawa S (2001). Effect of high-impact and low-repetition training on bones in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* **16**:1688-1693.
34. Adami S, Gatti D, Braga V, Bianchini V, Rossini M (1999). Site-specific effects of strength training on bone structure and geometry of ultradistal radius in post-menopausal women. *J Bone Miner Res* **14**:120-124. Jarvinen TLN, Kannus P, Sievanen H, Jolma P, Heinonen A,

35. Jarvinen M (1998). Randomized controlled study of effects of sudden impact loading on rat femur. *J Bone Miner Res.* **13**:1475-1482.
36. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y (2005). Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim* **54**:1-6.
37. Fukuda S, Lida H, Hyakutake S, Yan X (2002). Preventive effects of running exercise on bones in heavy ion particle irradiated rats. *J Radiat Res* **43** (suppl:S233-S238).
38. Bonnet N., Beaupied H, Vico L., Dolléans E., Laroche L., Courteix D., Benhamou CL. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats (2007). *J Bone Miner Res.* **22**(4):578-88.
39. Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre C (1995). Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J Bone Miner Res* **10**:820-828.
40. Hagihara Y, Fukuda S, Goto S, Lida H, Yamazaki M, Moriya H (2005). How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD ? *J Bone Miner Metab* **23**:289-294.
41. Li CY, Jee SS, Chen JL, Mo A, Setterberg RB, Su M, Tian XY, Ling F, Yao W (2003). Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int* **72**:42-49.
42. Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF (1999). Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* **24**:163-169.
43. Joo YI, Sone T, Fukunaga M, Lim SG, Onodera S (2003). Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* **33**:485-493.
44. Newhall KM, Rodnick KJ, van der Meulen MC, Carter DR, Marcus RT (1991). Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. *J Bone Miner Res* **6**:289-296.
45. Yeh JK, Aloia JF, Chen MM, Tierney JM, Sprintz S. Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J Bone Miner Res* **8**:117-1125.
46. Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, Abe H, Ichimura S, Sato Y, Toyama Y (2004). Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young rats. *J Bone Miner Metab* **22**:26-31.
47. Black BL, Greenspan FL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ, PaTH Study Investigators (2003). The effect of parathyroid hormones and alendronate alone or in combination in post-menopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **349**:1207-1215.
48. Rhee Y, Won YY, Baek MY, Lim SK (2004). Maintenance of increased bone mass after recombinant human parathyroid hormone (1-84) with sequential zoledronate treatment in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* **19**:931-937.
49. Chilibeck PD, Davison KS, Whiting SJ, Suzuki Y, Janzen CL, Peloso P (2002). Effect of strength training combined with bisphosphonate (etidronate) therapy on bone mineral, lean tissue, and fat mass in postmenopausal women. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**:941-950.
50. Uusi-Rasi K, Kannus P, Cheng S, Sievänen H, Pasanen M, Heinonen A, Nenoren A, Halleen J, Fuerst T, Genant H, Vuori I. (2003). Effect of alendronate and exercise on bone and physical performance of postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Bone* **33**:132-143.

Whole body Anthropometric and bone parameters	Groups											
	SH		OVX		OVX-Z		OVX-E		OVX-ZE		OVX-ZE	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
BW (g)	300.3 ± 27.3	333.1 ± 21.7	310.5 ± 20.7	386.4 ± 32.6 ^a	320.8 ± 23.9	416.5 ± 40.7	319.9 ± 25.7	370.1 ± 35.5 ^c	327.9 ± 30.2	370.8 ± 34.4 ^c		
LBM (g)	242.0 ± 13.5	241.1 ± 13.7	245.0 ± 16.6	259.2 ± 10.7 ^a	255.1 ± 16.9	260.7 ± 17.2	245.8 ± 16.9	260.6 ± 21.4	248.7 ± 21.1	270.7 ± 25.0		
% FM	17.8 ± 3.5	19.0 ± 4.1	17.3 ± 3.6	27.8 ± 7.3 ^{a,c}	16.6 ± 3.5	28.9 ± 3.8	19.5 ± 4.4	24.0 ± 7.4 ^c	20.3 ± 5.2	23.0 ± 6.0 ^c		
WBBMC (g)	11.4 ± 0.7	12.4 ± 0.8	11.7 ± 0.8	12.9 ± 0.7 ^c	12.1 ± 0.5	13.9 ± 0.9	11.8 ± 0.8	12.2 ± 1.0 ^c	11.9 ± 0.7	13.0 ± 0.8 ^c		
WBBMD (g/cm²)	0.700 ± 0.007	0.172 ± 0.008	0.171 ± 0.007	0.172 ± 0.003	0.172 ± 0.004	0.180 ± 0.007	0.173 ± 0.006	0.171 ± 0.005	0.171 ± 0.007	0.176 ± 0.008		

Results are expressed in mean ± SD.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE
Body Weight (BW), Lean Body Mass (LBM), Fat Mass (FM), Whole Body Bone Mineral Content (WBBMC), Whole Body Mineral Density (WB BMD)

Table 1

Changes in whole body anthropometric and bone DXA parameters in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.

DXA parameters	Groups				
	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
Femur BMC (g)	0.499 ± 0.046	0.469 ± 0.029	0.514 ± 0.055	0.455 ± 0.037	0.521 ± 0.036
Femur BMD (g/cm ²)	0.258 ± 0.12	0.242 ± 0.011	0.269 ± 0.016	0.240 ± 0.011	0.267 ± 0.014
R1 BMC (g)	0.061 ± 0.006	0.059 ± 0.010	0.066 ± 0.011	0.055 ± 0.007 ^c	0.068 ± 0.006 ^{b,d}
R1 BMD (g/cm ²)	0.226 ± 0.013	0.203 ± 0.014 ^a	0.236 ± 0.026 ^b	0.198 ± 0.018 ^{a,c}	0.234 ± 0.016 ^{b,c,d}
R2 BMC (g)	0.85 ± 0.005	0.079 ± 0.010	0.091 ± 0.007 ^b	0.083 ± 0.007 ^{a,c}	0.093 ± 0.005 ^{b,d}
R2 BMD (g/cm ²)	0.207 ± 0.014	0.199 ± 0.008	0.220 ± 0.008 ^{a,b}	0.204 ± 0.010 ^c	0.219 ± 0.013 ^{a,b,d}

Results are expressed in mean ± SD.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE
R1 : sub-metaphyseal area (richest in trabecular bone) ; R2 : diaphyseal area (richest in cortical bone)

Table 2 Changes in bone densitometric parameters at the femur and at the subregions R1 and R2 in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.

Microarchitecture parameters	Groups				
	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
BV/TV %	26.05 ± 5.64	16.31 ± 6.76 ^a	24.94 ± 8.12 ^b	14.4 ± 5.68 ^c	25.47 ± 6.76 ^{b,d}
BS/BV	0.031 ± 0.002	0.037 ± 0.005 ^a	0.032 ± 0.003	0.039 ± 0.004 ^c	0.034 ± 0.004 ^{b,d}
Tb.Th (µm)	110.74 ± 5.37	97.38 ± 9.83 ^a	107.30 ± 8.33 ^b	96.04 ± 6.20 ^c	104.69 ± 8.23 ^{b,d}
Tb.N (1/mm)	0.002 ± 0.0004	0.002 ± 0.001 ^a	0.002 ± 0.001 ^b	0.001 ± 0.001 ^c	0.002 ± 0.001 ^{b,d}
Tb.Sp (mm)	519.83 ± 224.78	683.56 ± 288.32	539.76 ± 215.30 ^b	704.37 ± 237.77 ^c	502.96 ± 219.06 ^{b,d}
TBP.f	0.001 ± 0.002	0.006 ± 0.004 ^a	0.002 ± 0.003 ^b	0.008 ± 0.003 ^c	0.002 ± 0.003 ^{b,d}
SMI	0.841 ± 0.340	1.275 ± 0.420 ^a	0.974 ± 0.368 ^b	1.610 ± 0.313 ^c	1.033 ± 0.321 ^{b,d}
DA	1.920 ± 0.200	2.290 ± 0.300	2.214 ± 0.258	1.970 ± 0.293	1.911 ± 0.184 ^{b,c,d}

Results are expressed in mean ± SD.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

Table 3

Changes in microarchitecture parameters in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.

Biomechanic parameters	Groups				
	SH	OVX	OVX-Z	OVX-E	OVX-ZE
Ultimate force (N)	133.06 ± 20.82	120.39 ± 13.98	124.44 ± 16.95	138.25 ± 16.96 ^{b,c}	143.06 ± 15.94 ^{b,c}
Cross-sectional Area (mm²)	6.69 ± 0.64	6.35 ± 0.54 ^a	6.63 ± 0.61	7.04 ± 0.55 ^{b,c}	7.10 ± 0.63 ^{b,c,d}
Moment of Inertia (mm⁴)	5.64 ± 0.94	5.55 ± 0.80	5.49 ± 0.89	6.06 ± 1.14	6.15 ± 1.43
Stress (N/mm²)	185.83 ± 19.21	172.72 ± 26.72	177.87 ± 22.90	184.75 ± 23.05	189.48 ± 18.61
Energy max (N/mm)	68.66 ± 12.37	55.06 ± 15.57 ^a	64.48 ± 12.22 ^b	56.76 ± 16.16 ^c	67.66 ± 8.56 ^{b,d}
Stiffness (N/mm)	238.76 ± 46.86	257.37 ± 24.78	227.43 ± 35.06	245.68 ± 35.27	262.35 ± 33.43 *
Young modulus (MPa)	7176.48	7910.05	7071.23	6925.87	7388.97

Results are expressed in mean ± SD.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

* Interactions between treatment and exercise

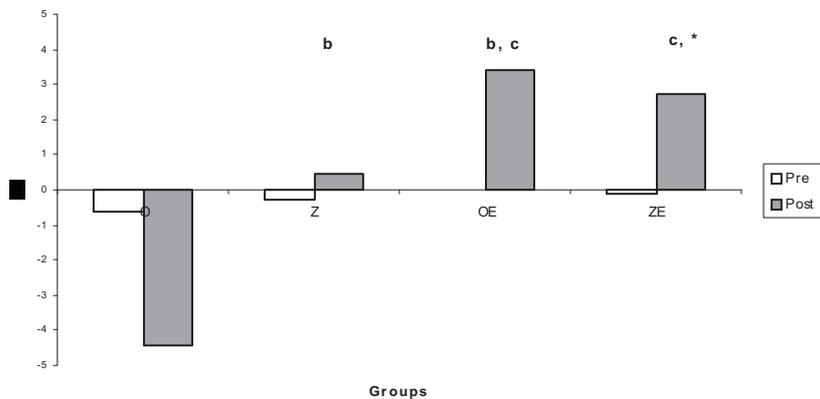
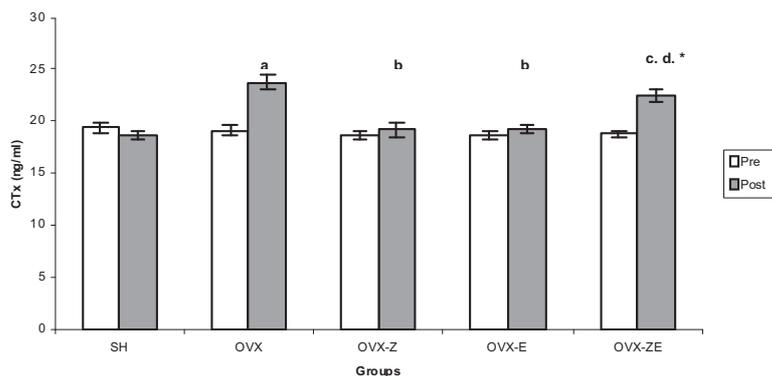
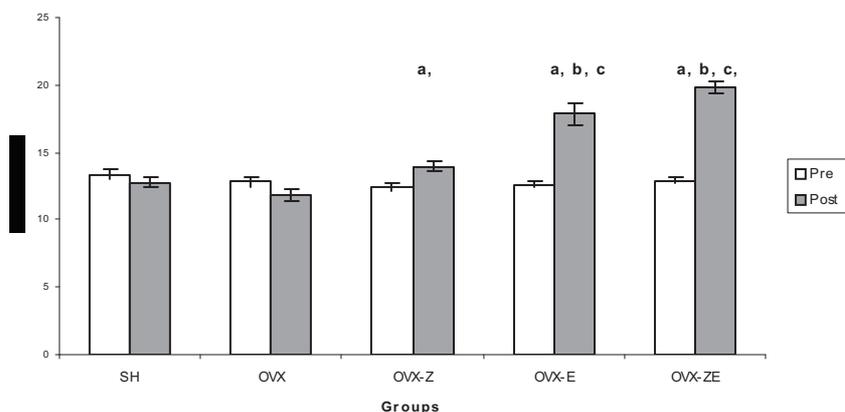
Table 4

Changes in biomechanical properties in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 week

Figure 1 : The two sub-regions in femur. The first sub-region (R1) corresponded to the femoral distal metaphysis and excluded the growth plate area. The second sub-region is located more distally and corresponded to a diaphyseal zone (R2)



Figure 2 : Changes in bone turnover parameters and uncoupling index in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.
^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE



Annexe 2

Combined effects of exercise and zoledronic acid on lipid profile and bone remodelling in ovariectomized rats

E. Lespessailles¹, C. Jaffré¹, E. Dolléans¹, C.L Benhamou¹, D. Courteix²,

Abstract

Exercise (E) and amino-bisphosphonates (BP) are both considered as useful strategies in the prevention of post-menopausal bone loss. Exercise reduces lipid levels, and BP may induce an increase in HDL-C. We studied the specific and combined effects of zoledronic acid (Z) and E on lipid profile and bone remodelling in mature ovariectomized (OVX) rats. The exercise regimen consisted in running on a treadmill, for 12 weeks. Six-month old female rats were randomly assigned to either a sham-ovx group (n=12) or one of four OVX groups (n=12): vehicle-treated sedentary (OVX); OVX plus E (OVX-E); OVX plus Z (i.v. injection 20 µg/kg), (OVX-Z); OVX plus Z and E (OVX-ZE). Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and bone remodelling markers were measured at baseline and at the end of the study. We confirmed that both Z and E prevented the increase in bone resorption resulting from OVX. In addition, both exercise and zoledronic acid were shown to individually improve the atherosclerotic risk index. Therapy with Z resulted in a significant increase (+ 37.4%) in serum concentration of HDL-C and a trend toward lower TC (- 5.8%) in the OVX-Z group as compared to the OVX group. These data might be clinically relevant in menopausal women as some BP could also have beneficial effects on atherosclerosis without affecting the lipid profile.

Key words

Physical activity – rodent – bisphosphonates – atherosclerotic risk index – bone turnover

Introduction

Estrogen deficiency is the major factor in the aetiology of postmenopausal osteoporosis (25, 28). Besides osteoporosis, the loss of ovarian function at menopause is associated with other clinical conditions including neuro-endocrine disorders (24) or cardiovascular diseases (22). Hormonal Replacement Therapy (HRT) has been shown to be efficient in reducing the risk of fracture (11, 45). However, the benefits of HRT on cardiovascular disease are widely debated, three large trials of postmenopausal treatment with hormones subsequently failed to show a cardio-protective effect of estrogen (4, 27, 39). Thus, when considering HRT use solely for prevention of osteoporosis “the Food and Drug Administration recommends that approved non-estrogen treatments should first be carefully envisaged” (1) and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis does not recommend HRT as a first-line treatment for its prevention and treatment (29).

In post-menopausal women, Amino-bisphosphonates represent one of the pharmacologic options for the prevention and treatment of osteoporosis (15). Among bisphosphonates one can distinguish medication by their molecular mechanisms of action. Etidronate, clodronate, tiludronate inhibit osteoclast function and induce osteoclast apoptosis by incorporation into intracellular analogs. These compounds do not interfere with intracellular sterol biosynthesis (17). Amino-bisphosphonates inhibit the prenylation and function of GTP-binding proteins required for osteoclast function (10). These last compounds inhibit squalene synthase and hence may be cholesterol lowering agents in animal (12). Recently, it has been shown that high doses of zoledronic acid given in patients with smoldering myeloma may modify their lipid profile (21). There was an improvement of the atherosclerotic risk index with an increase of the HDL-C / LDL-C ratio and a decrease of the TC / HDL-C ratio.

Non pharmacological prevention of osteoporosis fracture by physical activity and particularly regular exercises characterized by impact or loading is currently recommended (1, 8, 29). The effects of regular exercise on lipid profile has been developed in a lot of studies (30, 31, 46). It has been recently demonstrated that increasing steps walked may have beneficial effects on serum lipids and thus may decrease the cardio vascular disease risks (38).

There is a large body of evidence that bisphosphonates reduce the bone turnover and particularly inhibit bone resorption (5, 14), the target cell being the osteoclast. Conversely, physical activity, and more specifically mechanical stress, has been shown to induce an osteogenic effect mediated by osteocytes and osteoblasts (9, 36, 40). Based on these assumptions, the present study aims to investigate both specific and combined effects of zoledronic acid and treadmill exercise on bone turnover and lipid profile in mature ovariectomized (OVX) rats.

Materials and Methods

Rat groups and treatment

Sixty 6-month old Wistar female rats (Animal Production Center, Olivet, France) were maintained and acclimatized for two weeks on a 12-h light/12 h dark cycle at $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ during the experiment. Rats were housed in standard cages (two animals by cage) with ad libitum access to food [a commercial standard diet (A04, SAFE, France)] and water. Rats were randomized to either sham-operated (sham; n = 12) or bilateral OVX (n = 48). We did not ration OVX rats in order to mimic real life conditions in postmenopausal women, knowing that this is usually recommended as obesity induced by OVX may protect against osteopenia (47).

Among the rats randomly selected in OVX group, a second randomisation procedure was done leading to four groups of 12 animals each in addition to the sham-operated group (SH) :OVX sedentary controls (OVX) ; OVX-exercise (OVX-E); OVX-zoledronic acid (OVX-Z) ; OVX- zoledronic acid exercise- (OVX-ZE).

Based on previous dose-ranging study, we selected a single i.v. dose of 20 µg/kg zoledronic acid, as it has been demonstrated it is the minimum dose required to provide long-term bone protection against the effects of OVX (20). We injected the drug or a physiological saline solution two days before the OVX surgery. Sham operations were performed by exteriorising the ovaries. Bilateral ovariectomies were performed under ketamine-xylazine anesthesia. This experiment was conducted in conformity with the Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals. The procedure for the care and killing of the animals was in accordance with the European Community Standards on the care and use of the laboratory animals (Ministère de l'Agriculture, France, Authorization Inserm 45-001).

Exercise regimen

The exercise regimen consisted in running in an especially home made motor-driven treadmill, which allowed eight rats to exercise together. The running program was initiated gradually. The exercise regimen consisted in daily training. During the first four weeks, the speed of the treadmill and the duration of each running were gradually increased from 8 m/mn for 3 mn – 30 mn to 12 m/mn for the first two weeks. In the two following weeks, the speed and duration of the running session were gradually increased to 15 m/mn for sixty minutes. This speed and duration were maintained for 5 days per week for the rest of the experiment (8 weeks more).

Lipids and bone turnover biomarkers

At baseline and at the end of the study blood was obtained by veinous puncture at the tail. Blood samples were allowed to clot at 4°C for 20 mn before centrifugation at 3000 rpm for 10 mn. Sera were stored at – 20°C during 24 h and then archived at – 80°C until analysis. Analyses of total serum cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were determined using a high performance cholesterol colorimetric assay (Hitachi). The inter and intra-assays were in our laboratory < 10%

Osteocalcin (OC) and C terminal collagen cross-links (CTX) which are respectively biomarkers of bone formation and resorption were assayed in duplicate by ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev Hoved-Gade, Denmark). The within-assay and between assay CV were < 10% in our laboratory. The intra-assays CV were 5.5% and 5.6 % respectively for OC and CTx. The inter-assays CV were 5.0 and 5.6 % respectively for OC and CTx.

An uncoupling index (UI) was calculated to assess the relative balance of the formation and resorption processes of bone remodelling, as previously described (16). First, the mean ± SE of the

baseline CTx and OC values were determined in each rat. Using the values of the SHAM group, OC and CTx Z-score [(rat value – mean baseline) / SD baseline] were calculated by subtracting the Z-score of the resorption marker from the Z-score of the formation marker. A positive UI indicates bone remodelling unbalanced in favor of bone formation, whereas a negative UI reflects an unbalanced favouring bone resorption.

Plasma Cytokine TNF- α

In order to assess the expression of proinflammatory cytokines potentially induced by the zoledronic acid or the exercise regimen, cytokine TNF- α was measured using immuno assay ELISA (IBL Hamburg, Deutschland). The intra-essays CV and inter-essays were respectively < 5% and < 10%.

Body weight, fat mass, lean mass and bone mineral content (BMC) measurements

All analyzes were conducted with the Discovery A densitometer (Hologic, Inc, Bedford, MA) calibrated daily in accordance with the manufacturer's recommendations. The rat whole body (WB) module was used to provide WB fat mass and WB lean mass. At baseline and at 12 weeks (four weeks of gradually increased exercise and eight weeks at full regimen ie. paragraph exercise regimen described above) lean and fat masses were measured by DXA. The root-mean square CV of in vivo WBBMC, WBBMD and WB fat mass were respectively 1.2%, 0.87%, and 3.8 %. These CVs were determined from two repeated measures with repositioning on thirty animals.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) for body weight and body mass ; they are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for serum chemistry. Normal distribution (Gaussian) of the data were assessed by a Kolmogorov Smirnov test,. The effect of ovariectomy was determined by comparing the sham-OVX and OVX groups using t test. To compare the main and combined effects of exercise and zoledronate between the OVX groups for longitudinal data, a two-way ANOVA with repeated measures was performed. In the event of a significant interaction, exercise and zoledronate effects were considered synergistic. A one-way ANOVA with post hoc, pair-wise comparisons using Fisher's protected least-significant difference⁽³⁵⁾ was used in case of significant interactions. In the event of a non-significant interaction, the main effect for each intervention (zoledronate, exercise) was explored by Newman-Keuls test and intervention effects were considered additive. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed with software PCSM (OPTIMA-Deltasoft, France).

RESULTS

All the data followed a normal distribution. Significant interaction were found in lipid parameters, serum CTX and uncoupling index between exercise and zoledronic acid.

Anthropometrics and densitometry parameters

Body weight in the OVX group was significantly greater than in sham operated rats twelve weeks post-surgery 386 ± 33 g vs 333 ± 22 ; $p = 0.002$. There was a significant difference in body weight between the OVX-Z group and the two exercised groups (table 1). Percentage of fat mass was found significantly higher in the OVX-Z group compared to all the OVX groups (table 1). There was a higher percentage of fat mass in the OVX group (27.7%) as compared to the one in the SH group (19%), $p < 0.005$. There were no significant differences observed between the groups for WB lean mass. We have found a significant difference for whole body BMC between the OVX-Z group and the OVX, OVX-E and OVX-ZE groups (table 1).

Lipid profile

The OVX group had a higher serum total cholesterol and LDC-C levels compared with the SH group (table 2). The OVE-E group displayed a significantly lower TC (127.2 mg/dl) than in the OVX group (144.8 mg/dl)($p < 0.05$). The OVX-Z group had a tendency toward slightly lower TC than the OVX group ($p \leq 0.05$). There were no statistical differences between the ovariectomized groups concerning the LDL-C levels (table 2). In contrast, we observed a higher HDL-C levels in the OVX-Z group (53.6 mg/dl) than in the OVX group (33 mg/dl) ($p < 0.05$). Exercise also markedly increased the HDL-C (52.3 mg/dl) in the OVX-E group as compared to the OVX group ($p < 0.05$). However the OVX-ZE group displayed lower levels of HDL-C than in the OVX-E and OVX-Z groups (table 2). There was a trend to a higher TC/HDL-C ratio between baseline and the end of the study (2.54 to 3.82) in the OVX-group $p = 0.06$ (figure 1A). However this Ratio was significantly lower in the OVX-Z and the OVX-E groups respectively 2.53 and 2.54 than in the OVX group ($p < 0.05$). Conversely, the TC/HDL-C ratio in the OVX-ZE group was not significantly different from in the OVX-group and was higher (3.54) than in the OVX-Z and the OVX-E groups (table 2 and figure 1A). Likewise, the HDL-C/LDL-C ratio decreased significantly in the OVX groups between baseline and the end of the study (0.774 vs 0.416 ; $p < 0.01$) (figure 1B). This latter ratio significantly increased the OVX-Z and OVX-E versus the OVX group. However, again, there was no significant difference in the HDL-C / LDL-C ratio between OVX-ZE and the OVX group (table 2, figure 1B). This latter ratio significantly increased in the OVX-E groups as compared to the OVX group ($p < 0.05$) and there was a trend to a higher HDL-C/LDL-C ratio in the OVX-Z group than in the OVX group ($p = 0.058$) (figure 1B).

Plasma Cytokine TNF- α

Ovariectomy was characterized by an increase in TNF- α between baseline and the end of the study (534.8 ± 14 vs 678.9 ± 9 pg/ml ; $p < 0.001$). There was an interaction between exercise and zoledronic acid concerning the levels of plasma TNF- α . As indicated in table 2 we have found higher values of TNF- α at the end of the study in the OVX-Z, OVX-E and OVX-ZE groups than in the OVX group ones. The highest level of the TNF- α was found in the OVX-ZE group and it was significantly higher than in the OVX-E group, respectively 721.5 ± 12.5 vs 697 ± 7 pg/ml ; $p < 0.01$.

Bone turnover

The CTx level was 27.7% higher in OVX group (23.8 ng/ml) than in SH group (18.6 ng/ml), $p < 0.0005$. The CTx levels were significantly lower in OVX-Z and OVX-E groups as compared to the OVX group ($p < 0.05$). However the CTx levels in the OVX-ZE were not statistically different from those in the OVX group but were significantly higher than in the OVX-Z and OVX-E groups (table 3). In contrast, at the end of the study, serum osteocalcin levels were not significantly different between the SH group and the OVX group. The OVX-ZE group displayed higher osteocalcin level than in the OVX, the OVX-Z and the OVX-E groups. The osteocalcin level was significantly higher in OVX-E group (178.27 ng/ml) versus the OVX and OVX-Z groups (respectively 117.83 and 139.32 ng/ml) (table 3). As expected the uncoupling index moved from $- 0.26$ at baseline to $- 4.43$ at the end of the study in OVX group. In OVX-E group the UI increased from $- 0.22$ at baseline to $+ 3.42$ at the end of the study. Results of the UI in OVX-Z groups are indicated in table 3.

DISCUSSION

The main findings of the present study was that the therapy with zoledronic acid (a single injection) resulted in a significant increase (+ 37.4 %) in serum concentration of HDL-C and a trend toward lower TC (- 5.8%) as compared to the vehicle treated ovariectomized mature rats. Moreover, these changes were associated with a significant decrease of the TC/HDL-C ratio and a trend toward an increase of the HDL-C/LDL-C ratio. Such parameters are recognized indicators of atherosclerosis risks. These last results on the lipid profile might have a positive effect on cardiovascular risk if one considers their extrapolation to human.

However, it is noteworthy that, if specific effects of exercise and zoledronic acid were beneficial for atherosclerotic risk, the additive effects of these two interventions had produced a paradoxically negative impact.

To our knowledge, there is only one study in rats with such consideration, i.e. assessment of blood lipids rodent treated with bisphosphonates (18). In the latter study, female Sprague-Dawley rats ovariectomized at 11 weeks were treated by alendronate and the authors did not observed any effect on the serum cholesterol levels after 3 weeks of treatment.

In early postmenopausal women, exercise programs may reduce lipid levels (32). In addition, it has been noticed that IV amino-bisphosphonates induced, in post-menopausal women with moderate to severe osteoporosis, significant increase in HDL-C (2). In our study in mature ovariectomized rats, we investigated the separate and combined effects of treadmill running exercise and zoledronic acid on the lipid profiles. Papers aiming to describe the lipid profile when using bisphosphonates for metabolic bone disorders are scarce and sometimes conflicting. In human it has been recently reported that in smoldering multiple myeloma patients zoledronic acid may have an effect on lipid metabolism with a decrease in both TC and LDL-C (21). Guney et al (23) have also recently reported data suggesting in 49 patients treated for osteoporosis with alendronate a beneficial effect on lipid metabolism. Two other studies have shown respectively in patients treated by IV pamidronate for Paget's bone disease (34) and in postmenopausal women with osteoporosis treated by IV neridronate (2) a reduction in LDL-C and an increase of HDL-C. Specific mechanisms leading to the effects of bisphosphonates on lipid

metabolism are still unknown. However some bisphosphonates inhibit the squalene synthase enzyme and cholesterol biosynthesis (12) as it has been demonstrated for the first time in vivo by Amin et al (3). Indeed squalene synthase is one of the key enzyme in cholesterol biosynthetic pathway but reduction of plasma cholesterol can also be achieved by inhibiting hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoAR); which is also a key rate-limiting enzyme involved in the cholesterol biosynthesis and the development of such inhibitors of the HMG-CoAR has led to the family of statins (44). As statins sometimes induce adverse effects in muscle and liver, researchs of new squalene synthase inhibitors, which do not suppress the production of mevalonate are still ongoing (26). Recent studies have highlighted the role of the farnesyl pyrophosphate synthetase (FPPS) as the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates (5, 14). The FPPS is a distal enzyme of the mevalonate-squalene pathway and the ability of aminobisphosphonates to inhibit this enzyme is also a possible mechanism in lowering cholesterol.

Physical exercise was also able in our study to significantly decrease TC (-12%) and increase HDL-C (+34%) in trained rats as compared to the ovariectomized sedentary rats. Consequently, the TC/HDL-C and HDL-C/LDL-C ratios were respectively lower and higher in exercised rats than in sedentary rats as expected (32, 43).

Because exercise and zoledronic acid may have different ways of producing an action on lipid metabolism (ie increase in aerobic metabolism, oxygen uptake and fatty acid use for muscular energy supply during exercise (43) and actions on cholesterol biosynthesis with zoledronic acid), we hypothesized in this study that, , it was possible to observe additive effects of exercise and zoledronic acid on the lipid profile. This was not the case in our study as we noticed both for TC and HDL-C no statistical differences between ovariectomized rats treated with vehicle and ovariectomized rats practicing exercise treated with zoledronic acid. We cannot explain this effect, it is possible that the expression of certain antioxidant enzyme stimulated by the treadmill running exercise may have been counteracted by the inflammatory effects induced by the injection of zoledronic acid (42). Indeed it has been shown that bisphosphonates may have pro inflammatory effects and clinicians do know the acute-phase response following the first injection of IV aminobisphosphonates in human. We do not assess in this study the oxydative stress indicators and oxydant status resulting of the exercise regimen and the biphosphonate therapy. Furthermore we only assess the plasma inflammatory cytokine TNF- α . In the present study the highest value of TNF- α at the end of the study was found in OVX-ZE group and this might be a possible explanation of our results in this group. Conversely, bisphosphonates are also described to have anti-inflammatory effects (13) and clodronate has been shown to inhibit the in vitro production of super oxide free radicals by polynuclear cells (33). In turn these last effects may have been counterbalanced by some characteristics of the exercise regimen applied to the animals. Exercise training may rather reduce TNF- α but it has been shown sometimes that TNF- α level was not altered by exercise (38). We have found a mild but significant increase in the TNF- α level at the end of the study in OVX-E group as compared to OVX group ($p = 0.04$).

At the end of the experiment the CTx levels were respectively 18.8% and 19,1% lower in OVX-E and OVX-Z groups as compared to OVX group. But we can easily distinguish the effects of exercise and zoledronic acid on the bone turnover as there was a strong negative UI indicating an imbalance favoring resorption in OVX group, a strong positive UI in OVX-E group indicating that bone remodeling was unbalanced in favour of formation and a mild positive UI in OVX-Z group indicating that zoledronic acid effects in this ovariectomized mature rats study prevented the deleterious effects of OVX ie (increase of bone resorption parameters). Theoretically, it is an attractive hypothesis that a concurrent combination of exercise and zoledronic acid would be superior to either intervention alone as they act on different target sites. In the present study the lack of additive effect of the combination exercise and zoledronic acid on the bone turnover might be explained by the potency of the antiresorptive effect of the zoledronic acid. The response to the osteogenic effects of exercise might be blunted by the powerful effect of zoledronic acid. Such an hypothesis has been mentioned to explain the lack of efficacy in combining parathyroid hormone with alendronate, the capacity of the antiresorptive drug being superior to a capacity of formation associated with the PTH treatment (7) To our knowledge there were two studies aiming to combine a bisphosphonate therapy with exercise in rats (19, 41). Unfortunately none of them have investigated the effects on bone turnover markers.

Surprisingly we observed an increase in weight in OVX-Z group as compared to OVX-E and OVX-ZE groups. However it has been demonstrated that although differences in body weight are often cited as the reason for a better lipid profile between active and inactive persons, some data support an influence of physical activity on lipid profiles independently of the metabolic effect of weight variations (43) and this may be also the case with the action of zoledronic acid on lipid metabolism.

In this study, we aimed to analyse the individual and combined effects of zoledronic acid and treadmill exercise on lipid profile and bone remodelling ovariectomized rats. The present results confirmed that both zoledronic acid and physical exercise prevent the increase in bone resorption resulting from the ovariectomy. However we did not find any positive additive effect when combining these two interventions despite the different mechanisms involved and pathways of action.

Both exercise and zoledronic acid were shown to individually improve the atherosclerotic risk index. The mild reduction in TC and the large increase in HDL-C we observed in OVX-Z and OVX-E groups may be clinically relevant in menopausal women as some bisphosphonates could also have beneficial effects on atherosclerosis without affecting serum cholesterol or lipid profile (6, 37, 48)

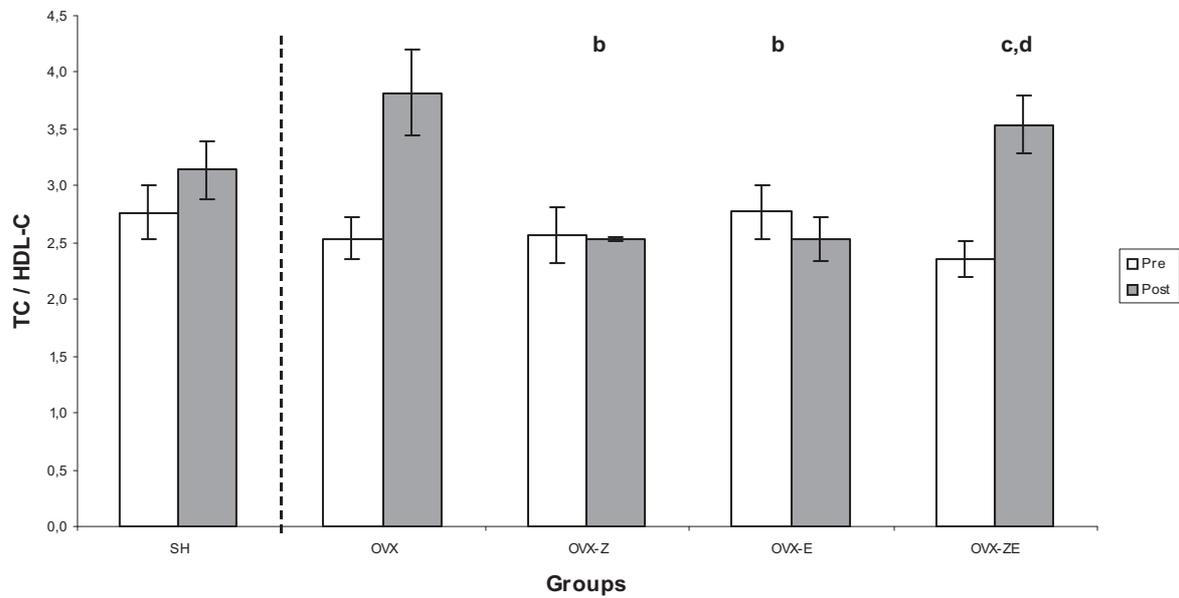
Aknowledgments

This work was supported by grant from Novartis France.

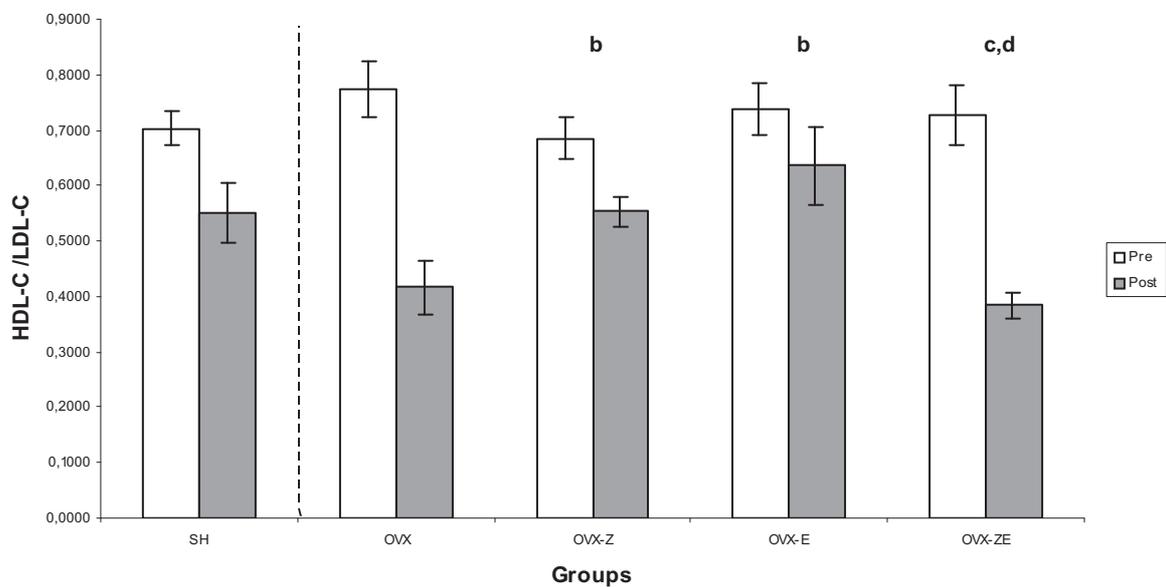
Figure 1 : Total Cholesterol (TC) / HDL-Cholesterol (HDL-C) ratio (Fig A) and HDL-Cholesterol (HDL-C) / LDL-Cholesterol (LDL-C) ratio (Fig B) in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

A)



B)



Anthropometric and densitometric parameters	Groups														
	SH			OVX			OVX-Z			OVX-E			OVX-ZE		
	Pre	Post		Pre	Post		Pre	Post		Pre	Post		Pre	Post	
BW (g)	300.3 ± 27.3	333.1 ± 21.7	310.5 ± 20.7	386.4 ± 32.6 ^a	320.8 ± 23.9	416.5 ± 40.7	319.9 ± 25.7	370.1 ± 35.5 ^c	327.9 ± 30.2	370.8 ± 34.4 ^c					
LBM (g)	242.0 ± 13.5	241.1 ± 13.7	245.0 ± 16.6	259.2 ± 10.7 ^a	255.1 ± 16.9	260.7 ± 17.2	245.8 ± 16.9	260.6 ± 21.4	248.7 ± 21.1	270.7 ± 25.0					
% FM	17.8 ± 3.5	19.0 ± 4.1	17.3 ± 3.6	27.8 ± 7.3 ^{a,c}	16.6 ± 3.5	28.9 ± 3.8	19.5 ± 4.4	24.0 ± 7.4 ^c	20.3 ± 5.2	23.0 ± 6.0 ^c					
WBBMC (g)	11.4 ± 0.7	12.4 ± 0.8	11.7 ± 0.8	12.9 ± 0.7 ^c	12.1 ± 0.5	13.9 ± 0.9	11.8 ± 0.8	12.2 ± 1.0 ^c	11.9 ± 0.7	13.0 ± 0.8 ^c					

Data are in mean ± SD.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

* Interactions between treatment and exercise

Body Weight (BW), Lean Body Mass (LBM), % Fat Mass (% FM), Whole Body Bone Mineral Content (WBBMC)

Table 1

Changes in anthropometric and bone parameters in WBBMC in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.

Lipid profile and TNF α concentration	Groups											
	SH		OVX		OVX-Z		OVX-E		OVX-ZE			
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
TC (mg/dl)	118.00 \pm 0.09	128.40 \pm 0.04	104.50 \pm 0.07	144.80 \pm 0.05 ^a	104.52 \pm 0.08	135.30 \pm 0.03	116.10 \pm 0.07	127.20 \pm 0.04 ^b	105.60 \pm 0.05	134.00 \pm 0.04		
HDL-C (mg/dl)	43.40 \pm 0.02	43.50 \pm 0.04	43.30 \pm 0.01	39.00 \pm 0.03	41.80 \pm 0.03	53.60 \pm 0.01 ^b	42.10 \pm 0.01	52.30 \pm 0.03 ^{b,c}	45.20 \pm 0.01	39.20 \pm 0.02 ^{c,d}		
LDL-C (mg/dl)	77.20 \pm 0.03	81.80 \pm 0.04	74.20 \pm 0.04	99.90 \pm 0.06 ^a	74.90 \pm 0.07	96.40 \pm 0.04	74.30 \pm 0.05	89.50 \pm 0.08	76.80 \pm 0.04	103.10 \pm 0.05		
TC/HDL-C	2.77 \pm 0.2	3.14 \pm 0.2	2.54 \pm 0.1	3.82 \pm 0.38	2.57 \pm 0.2	2.52 \pm 0.02 ^b	2.77 \pm 0.2	2.54 \pm 0.20 ^b	2.40 \pm 0.1	3.54 \pm 0.30 ^{c,d}		
HDL-C/LDL-C	0.70 \pm 0.03	0.55 \pm 0.05	0.77 \pm 0.05	0.42 \pm 0.05	0.69 \pm 0.04	0.55 \pm 0.03 ^b	0.74 \pm 0.05	0.64 \pm 0.07 ^b	0.73 \pm 0.05	0.38 \pm 0.02 ^{c,d}		
TNF α (pg/ml)	515.29 \pm 5.20	523.17 \pm 4.91	534.78 \pm 14.10	670.90 \pm 8.96 ^a	515.08 \pm 5.52	713.05 \pm 6.05 ^{a,b}	521.51 \pm 6.05	696.98 \pm 7.01 ^{a,b}	516.48 \pm 7.00	721.49 \pm 12.47 ^{a,b,d,*}		

Data are in mean \pm SEM.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

* Interactions between treatment and exercise

Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C), High-Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C), Total Cholesterol (TC), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)

Table 2

Changes in TC, HDL-C, LDL-C, TC/HDL-C and HDL-C/LDL-C ratios and TNF α in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 μ g/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks.

Bone turnover parameters	Groups											
	SH		OVX		OVX-Z		OVX-E		OVX-ZE			
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
CTX (ng/ml)	19.39 ± 0.53	18.60 ± 0.43	19.08 ± 0.48	23.76 ± 0.65 ^a	18.66 ± 0.4	19.21 ± 0.66 _b	18.70 ± 0.41	19.28 ± 0.34 _b	18.78 ± 0.34	18.78 ± 0.34	22.43 ± 0.63 _{c,d,*}	22.43 ± 0.63
OC (ng/ml)	13.34 ± 0.34	12.79 ± 0.39	12.80 ± 0.41	11.78 ± 0.46	12.45 ± 0.3	13.93 ± 0.36 _{a,b}	12.60 ± 0.22	17.82 ± 0.86 _{a,b,c}	12.90 ± 0.21	12.90 ± 0.21	12.90 ± 0.21 _{a,b,c,d}	12.90 ± 0.21
UI			-0.27	-4.43	-0.31	0.45 ^b	-0.22	3.42 ^{b,c}	-0.015	2.71 ^{c,*}		

Data are in mean ± SEM.

^a OVX differences versus SH, ^b differences versus OVX, ^c differences versus OVX-Z, ^d differences versus OVX-E and ^e differences versus OVX-ZE

* Interactions between treatment and exercise

Osteocalcin (OC); C-terminal collagen cross-links (CTX). Uncoupling index (UI) (a positive UI indicates bone remodelling unbalanced in favour of bone formation, whereas a negative UI reflects an unbalanced favouring bone resorption)

Table 3

Changes in OC, CTX and uncoupling index (UI) in sham-operated (SH) or ovariectomized (OVX) mature rats treated or not by zoledronic acid (Z) (a single injection 20 µg/kg), practicing or not a running treadmill exercise (E) for 12 weeks

References

1. 2008. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *National Osteoporosis Foundation (NOF)*
2. Adami S, Braga V, Guidi G, Gatti D, Gerardi D, Fracassi E. 2000. Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. *J Bone Miner Res* 15: 599-604
3. Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, et al. 1992. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 33: 1657-63
4. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, et al. 2004. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 291: 1701-12
5. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. 2001. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 28: 465-73
6. Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. 2006. Bisphosphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 14: 773-9
7. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, et al. 2003. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 349: 1207-15
8. Bonaiuti D, Shea B, Iovine R, Negrini S, Robinson V, et al. 2002. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000333
9. Boppart MD, Kimmel DB, Yee JA, Cullen DM. 1998. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. *Bone* 23: 409-15
10. Buhaescu I, Izzedine H. 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem* 40: 575-84
11. Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, et al. 2003. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama* 290: 1729-38
12. Ciosek CP, Jr., Magnin DR, Harrity TW, Logan JV, Dickson JK, Jr., et al. 1993. Lipophilic 1,1-bisphosphonates are potent squalene synthase inhibitors and orally active cholesterol lowering agents in vivo. *J Biol Chem* 268: 24832-7
13. Corrado A, Santoro N, Cantatore FP. 2007. Extra-skeletal effects of bisphosphonates. *Joint Bone Spine* 74: 32-8
14. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, et al. 2000. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 15: 1467-76
15. Delmas PD. 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359: 2018-26
16. Eastell R, Robins SP, Colwell T, Assiri AM, Riggs BL, Russell RG. 1993. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int* 3: 255-60
17. Fleisch H. 1998. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 19: 80-100
18. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. *Bone* 18: 621-7
19. Fuchs RK, Shea M, Durski SL, Winters-Stone KM, Widrick J, Snow CM. 2007. Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* 41: 290-6

20. Gasser JA, Green JR, Novartis Pharma AG. 2002. Long-term protective effect of a single IV injection of zoledronic acid on cancellous bone structure and cortical bone in ovariectomized rats. *Bone* 30: 41 S
21. Gozzetti A, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, De Paola V, et al. 2008. The effects of zoledronic acid on serum lipids in multiple myeloma patients. *Calcif Tissue Int* 82: 258-62
22. Grodstein F, Stampfer MJ. 1998. Estrogen for women at varying risk of coronary disease. *Maturitas* 30: 19-26
23. Guney E, Kisakol G, Ozgen AG, Yilmaz C, Kabalak T. 2008. Effects of bisphosphonates on lipid metabolism. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 252-5
24. Halbreich U. 1997. Role of estrogen in postmenopausal depression. *Neurology* 48: S16-9
25. Hammond CB. 1996. Menopause and hormone replacement therapy: an overview. *Obstet Gynecol* 87: 2S-15S
26. Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Ohtsuka I, Yoshida I, et al. 2000. Effect of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in rhesus monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors. *J Lipid Res* 41: 1136-44
27. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, et al. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280: 605-13
28. Kanis JA. 1996. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. *Bone* 19: 185S-90S
29. Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, et al. 2008. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19: 399-428
30. Kelley GA, Kelley KS. 2008. Efficacy of aerobic exercise on coronary heart disease risk factors. *Prev Cardiol* 11: 71-5
31. Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV. 2005. Walking and Non-HDL-C in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Prev Cardiol* 8: 102-7
32. Kemmler W, Lauber D, Weineck J, Hensen J, Kalender W, Engelke K. 2004. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: results of the Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Arch Intern Med* 164: 1084-91
33. Makkonen N, Salminen A, Rogers MJ, Frith JC, Urtti A, et al. 1999. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* 8: 109-18
34. Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, Campagna MS, Franci MB, et al. 2003. Changes in serum HDL and LDL cholesterol in patients with Paget's bone disease treated with pamidronate. *Bone* 32: 15-9
35. Neter J, Wasserman W, Ahitmore GA. 1982. Applied statistics. 544-72
36. Pead MJ, Skerry TM, Lanyon LE. 1988. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J Bone Miner Res* 3: 647-56
37. Persy V, De Broe M, Ketteler M. 2006. Bisphosphonates prevent experimental vascular calcification: Treat the bone to cure the vessels? *Kidney Int* 70: 1537-8
38. Puglisi MJ, Vaishnav U, Shrestha S, Torres-Gonzalez M, Wood RJ, et al. 2008. Raisins and additional walking have distinct effects on plasma lipids and inflammatory cytokines. *Lipids Health Dis* 7: 14
39. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, et al. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women:

- principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288: 321-33
40. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. 1989. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 4: 783-8
 41. Tamaki H, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T. 1998. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone* 23: 147-53
 42. Thiebaud D, Sauty A, Burckhardt P, Leuenberger P, Sitzler L, et al. 1997. An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 61: 386-92
 43. Thune I, Njolstad I, Lochen ML, Forde OH. 1998. Physical activity improves the metabolic risk profiles in men and women: the Tromso Study. *Arch Intern Med* 158: 1633-40
 44. Tobert JA. 1987. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation* 76: 534-8
 45. Torgerson DJ, Bell-Syer SE. 2001. Hormone replacement therapy and prevention of vertebral fractures: a meta-analysis of randomised trials. *BMC Musculoskelet Disord* 2: 7
 46. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Ahotupa M. 1998. Reduced oxidized LDL levels after a 10-month exercise program. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1496-501
 47. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, Walsh CC. 1987. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40: 155-9
 48. Ylitalo R. 2002. Biphosphonates and atherosclerosis. *General Pharmacology* 35: 287-96

7 - Conclusions et perspectives

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés spécifiquement à l'intérêt potentiel d'associer deux types d'interventions thérapeutiques pour prévenir la perte osseuse, la dégradation microarchitecturale trabéculaire, la diminution de résistance osseuse et l'excès de résorption osseuse induit par l'ovariectomie de rates adultes. Nous avons été séduits par l'hypothèse d'une possible interaction positive ou d'un effet additif de ces deux interventions combinées car l'une des actions thérapeutiques (l'acide zolédronique) était susceptible d'agir sur le remodelage et la minéralisation en freinant fortement la résorption osseuse et en reminéralisant l'os, l'autre, l'activité physique, était susceptible d'agir également sur le remodelage osseux en augmentant, elle, la formation osseuse et en agissant sur des paramètres architecturaux. Les modes d'action de ces deux interventions faisant intervenir des cibles cellulaires différentes (ostéoclastes pour l'une, triade ostéocyte, ostéoblaste et cellule bordante pour l'autre) nous paraissaient être un atout supplémentaire. Si chacune des interventions prises individuellement s'est révélée conforme à nos attentes (prévention de la perte osseuse, prévention des dégradations microarchitecturales, freinage de la résorption osseuse pour l'acide zolédronique et induction d'une augmentation de la formation osseuse, maintien des propriétés biomécaniques pour l'exercice physique), la combinaison des deux interventions thérapeutiques n'a apporté aucun bénéfice additionnel ou synergique.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence dans le groupe de rates ovariectomisées traitées par acide zolédronique, une augmentation du HDL cholestérol et une amélioration du profil lipidique dans le sens d'une diminution du risque d'athérosclérose. Il pourrait être intéressant de confirmer ces données et d'approfondir les investigations en mesurant :

- le LDL oxydé (inducteur de la libération de chimiokines et de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales ayant un rôle pathogène dans l'athérome).
- les fractions d'HDL pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (dosage avec technique de mesure d'intensité de fluorescence),
- la composition protéique du HDL dont la myéloperoxydase qui est associée au stress oxydatif,
- la lipoprotéine Apo A-1 qui est associée à la fonction anti-inflammatoire du HDL,
- l'anti-TNF α et l'IL6,

de façon à mieux caractériser l'action de l'acide zolédronique sur le profil lipidique chez des rates ovariectomisées ou non et traitées ou non par l'acide zolédronique.

8 Bibliographie

- 1- Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:344-58
- 2- Robling AG, Burr DB, Turner CH. Skeletal loading in animals. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 1:249-62
- 3- Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* 1998; 23:399-407
- 4- Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1996; 11(2):150-9
- 5- Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:375-88
- 6- Fleish H. Bisphosphonates : mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998; 19(1):80-100
- 7- Consensus development panel on osteoporosis prevention. D.A.T (2001) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*, 285, 785-95
- 8- World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series 843. Geneva : WHO, 1994
- 9- Dennison E, Cooper C. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Horm Res* 2000 ; 54 (suppl. 1) : 58-63
- 10- Direction Générale de la Santé en collaboration avec l'Inserm. Rapport du groupe technique national de définition des objectifs. www.sante.gouv.fr
- 11- Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002 ; 359 : 1761-1767
- 12- Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos. Int.* 2000, 11 : 556-561
- 13- Jalava T, Sarna S, Pykkänen L, Mawer B, Kanis JA, Selby P, Davies M, Adams J, Francis RM, Robinson J, McCloskey E. Association between vertebral fracture and increased mortality in osteoporotic patients. *J Bone Miner Res* 2003 ; 18 : 1254-1260
- 14- Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int* 2005 ; 16 : S3-S7
- 15- European Commission. Report on osteoporosis in the European Community. Action for prevention. Luxembourg : European Commission ; 1998

- 16-** Baudoin C, Fardellone P, Thelot B, Juvin R, Potard V, Bean K, Sebert JL. Hip fractures in France : the magnitude and perspective of the problem. *Osteoporos int (Suppl)* 3 – 1996 ;1-10
- 17-** Maravic M, Le Bihan C, Landais P, Fardellone P. Incidence and cost of osteoporotic fractures in France during 2001. A methodological approach by the national hospital database. *Osteoporos Int* 2005 ;16 :1475-80
- 18-** Rapport « Pour une politique nutritionnelle de santé publique en France » HCSP, juin 2000
- 19-** Grados F, Marcelli C, Dargent Molina P et al. Prevalence of vertebral fractures in French women older than 75 years from the EPIDOS study. *Bone*. 2004 ; 34 : 362-7
- 20-** Kanis J, Johnell O. Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporos Int* 2005; 16:229-38
- 21-** Ray NF, Chan JK, Thamer M et al. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995 : report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res* 1997; 12:24-35
- 22-** Jee WSS. Integrated bone tissue physiology : anatomy and physiology. *Bone Mechanics Hand book* 2001; 1-68
- 23-** Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K et al. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9:2249-58
- 24-** Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, Lomri A, Lasmoles F, Marie PJ. Bone morphogenic protein-2 promotes human calvaria cell aggregation and osteoblast differentiation by increasing N-and E-cadherin expression. *J Cell Physiol* 2000; 183:117-28
- 25-** Cheng SI, Shin CS, Towler DA, Civitelli R. A dominant negative cadherin inhibits osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2000; 15:2362-70
- 26-** Miller JC, Jee WSS. The bone lining cell : a distinct phenotype ? *Calcif Tissue Int* 1992; 41
- 27-** Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodelling after fatigue damage in vivo. *J bone miner Res* 2000; 15:60-67
- 28-** Seeman E. Osteocytes-martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos int* 2006; 17:1443-48
- 29-** Hazenberg JG, Freeley M, Foran M, Lee TC, Taylor D. Microdamage : a cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes. *J Biomechanics* 2006; 39:2096-2103
- 30-** Taylor D. Bone maintenance and remodelling : a control system based on fatigue damage. *J Orthop Res* 1997; 15:601-6
- 31-** Teitelbaum S. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289:1504-8
- 32-** Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Med/Sciences* 2001; 17:1260-9

- 33-** Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996; 2:1132-6
- 34-** Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PF, Rodan GA. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 1999; 274:34967-73
- 35-** Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption : a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res* 1982; 4:1-6
- 36-** Hattner R, Epker BN, Frost HM. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 1965; 206:489-90
- 37-** Rodan GA. Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. *J Bone Miner Res* 1991; 6:527-30
- 38-** Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women : The OFELY study. *J Bone Miner RES* 2000. 15/1526-36
- 39-** Ravn P, Thompson DE, Ross PD, Christiansen C. Biochemical markers for prediction of 4-year response in bone mass during bisphosphonate treatment for prevention of post-menopausal osteoporosis. *Bone* 2003; 33:150-58
- 40-** HAS. Prévention, diagnostic et traitement de l'ostéoporose. Juillet 2006
AFFSSAPS. Traitement médicamenteux de l'ostéoporose post-ménopausique .
Recommandations. Actualisation 2006.
- 41-** NOF. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. 2008
- 42-** Cauley JA, Robbins J, Chen Z et al. Women's Health Initiative Investigators. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density : the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 2003; 290:1729-38
- 43-** Women's Health Initiative Steering Committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy : the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1701-12
- 44-** Beral V. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362:419-27
- 45-** Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL et al. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-33
- 46-** Selby P. Postmenopausal osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2004; 2:101-6
- 47-** US Preventive Services Task Force. Postmenopausal hormone replacement therapy for primary prevention of chronic conditions : recommendations and rationale. *Ann Intern med* 2002 ; 137:834-9

- 48-** Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348:618-29
- 49-** Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickensen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene : results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) investigators. *JAMA* 1999; 282:637-45
- 50-** Cumming SR, Eckert S, Krueger KA et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women : results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* 1999; 281:2189-97
- 51-** Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial. *JAMA EXPRESS* 2006; 295
- 52-** Delmas PD, Genant HK, Crans GG et al. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures : results from the MORE trial. *Bone* 2003; 33:522-32
- 53-** Chesnut CH III, Silverman S, Andriano K et al. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis : the Prevent Recurrence of Osteoporotic Fractures study. *Am J Med* 2000; 109:267-76
- 54-** Silverman SL, Azria M. The analgesic role of calcitonin following osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 2002; 13:858-67
- 55-** Shea B, Wells G, Cranney A et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VII. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of post-menopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002; 23:552-9
- 56-** Office of the Surgeon General. Bone health and osteoporosis : a report of the Surgeon General. Rockville, Md. : Department of Health and Human Services. 2004; 436
- 57-** LeBoff MS, Kohlmeier I, Hurwitz S, Franklin J, Wright J, Glowacki J. Occult vitamin D deficiency in post-menopausal US women with acute hip fracture. *JAMA* 1999; 281:1505-11
- 58-** Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al. Vitamin D and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med* 1992; 327:1367-42
- 59-** Trivedi DP, Doll R, Khaw KT. Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community : randomised double blind controlled trial. *BMJ* 2003; 326-469
- 60-** Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997; 337:670-6

- 61- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC et al. Effect of vitamin D on falls : a meta-analysis. *JAMA* 2004; 291:1999-2006
- 62- Fleish H, Russel RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1996; 212:901-3
- 63- Fleish H, Russel RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969; 165:1261-4
- 64- Takenchi M, Sakamoto S, Yoshida M, Aloa T, Isomura Y. Studies on novel bone resorption inhibitors. *Chem Pharm Bull* 1993; 41:688-693
- 65- Fleisch HA. Bisphosphonates : preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* 1997; 29:55-62
- 66- Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003; 9:2643-58
- 67- Fleish HA. Bisphosphonates in bone disease. From the Laboratory to the Patient. Academic Press. Fourth Edition. 2000; 2.3:34-55
- 68- Fischer JE, Rodan GA, Reszka AA. In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. *Endocrinology* 2000; 141:4793-96
- 69- Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003; 9:2643-58
- 70- Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R; Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, Rogers MJ. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1467-76
- 71- Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ulrich JW, Bilder GE, Perrone MH. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J. Lipid Res* 1992; 33:1657-63
- 72- Cremers S, Pillar G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates. Use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44(6): 551-70
- 73- Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Napankangas JP et al. Further insight into mechanism of action of clodronate : inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a non-hydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* 2002 ; 61:1255-62
- 74- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990 ; 9:2643-58
- 75- Russel RGG, Watts NB, Ebetino Fh, Rogers MJ. Mechanism of action of bisphosphonates : similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008 ; Jan 24
- 76- Adami S, Braga V, Guidi G, Gatti D, Gerardi D, Fracassi E. Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. *J Bone Miner Res* 2000 ; 15:569-604

- 77-** Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, Campagna MS, Franci MB, Pacini S, Gennari C. Changes in serum HDL and LDL cholesterol in patients with Paget's bone disease treated with pamidronate. *Bone* 2003 ; 32:15-19
- 78-** Goffinet M, Thoulouzan M, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Weinbaun C, Faye JC, Seronie-Vivien S. Zoledronic acid treatment impairs protein geranyl-geranylation for biological effects in prostatic cells. *BMC Cancer* 2006 ; 6:60
- 79-** Gozzetti A, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, De Paola V, Avanzati A, Franci B, Marchini E, Tozzi M, Campagna MS, Nuti R, Lauria F, Martini G. The effects of zoledronic acid on serum lipids in multiple myeloma patients. *Calcif Tissue Int* 2008 ; 82:258-62
- 80-** Green JR, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of GGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994; 9:745-51
- 81-** Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:235-42
- 82-** Reid IR, Brown JP, Burckhardt P et al. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002; 346:653-61
- 83-** Black MD, Delmars PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Chung Leung P, Man Z et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1809-22
- 84-** Lyles K, Colon-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 2007; 357
- 85-** Glatt M, Pataki A, Evans GP, Hornby SB, Green JR. Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term administration of zoledronic acid. *Osteoporos Int* 2004; 15:707-715
- 86-** Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adult rats. *Calcif Tissue Int* 2003; 72:519-27
- 87-** Rhee Y, Won YY, Back MH, Lim SK. Maintenance of increased bone mass after recombinant human parathyroid hormone (1-84) with sequential zoledronate treatment in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2004; 19:931-37
- 88-** Neer RM, Arnaud CL, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344, n°19

- 89-** Turner CH, Wang T, Hirano T et al. In primates, treatment with PTH (1-34), LY333334, increases bone strength at trabecular bone sites without compromising the strength of cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999 ; 14:suppl 1:S414
- 90-** Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, Tsouderos Y. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner RES* 1993 ; vol 8, 5
- 91-** Reginster JY, Meunier PJ. Strontium ranelate phase 2 dose-ranging studies : PREVOS and STRATOS studies. *Osteoporos Int* 2003 ; 14:S56-S65
- 92-** Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski J, Spector T, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N England J Med* 2004 ; 350:459-68
- 93-** Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Diaz Curiel M, Sawicki A, Goemaere S, Sorensen OH, Felsenberg D, Meunier JP. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis : treatment of peripheral osteoporosis (TROPOS) study. *J Clinical Endocr Metab* 2005 ; 90(5):2816-22
- 94-** Deprez X, Fardellone P. Prévention non pharmacologique des fractures ostéoporotiques. *Rev Rhum* 2003 ; 70 :818-28
- 95-** Standing Committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington, D.C.:National Academy Press ; 1997
- 96-** Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, Gamble GD, Grey A, Reid IR. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation : randomised controlled trial. *BMJ* 2008 ; 336:262-66
- 97-** Rizzoli R, Bonjour JP. Dietary protein and bone health. *J Bone Miner RES* 2004 . 19/527-31
- 98-** Tinetti ME, Baker DI, McAvay G et al. A multifactorial intervention to reduce the risk of falling among elderly people living in the community. *N Engl J Med* 1994 ; 33:821-27
- 99-** Kannus P, Sievanen H, Palvanen M, Jarvinen T, Parkkari J. Prevention of falls and consequent injuries in elderly people. *Lancet* 2005 ; 366:1885-93
- 100-** Oliver D, Connelly JB, Victor CR, Shaw FE, Whitehead A, Genc Y et al. Strategies to prevent falls and fractures in hospitals and care homes and effect of cognitive impairment : systematic review and meta-analyses. *BMJ* 2007 ; 334:82
- 101-** Sawka AM, Boulos P, Beattie K, Thabane L, Papaioannou A, Gafni A et al. Do hip protectors decrease the risk of hip fracture in institutional and community-dwelling elderly ? A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Osteoporos Int* 2005 ; 16:1461-74

- 102-** Parker MJ, Gillespie WJ, Gillespie LD. Effectiveness of hip protectors for preventing hip fractures in elderly people : systematic review. *BMJ* 2006; 332:571-74
- 103-** Kiel DP, Magaziner J, Zimmerman S, Ball L, Barton BA, Brown KM et al. Efficacy of a hip protector to prevent hip fracture in nursing home residents : the HIP PRO randomised controlled trial. *JAMA* 2007 ; 298:413-22
- 104-** Harwiid RG, Foss AJE, Osborn F, Gregson RM, Zaman A, Masud T. Falls and health status in elderly women following first eye cataract surgery : a randomised controlled trial. *Br J Ophtalmol* 2005 ; 89:53-59
- 105-** Marais R. Mechanisms of exercise effects in principles of bone biology (second edition) edited by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Academic Press 1477-88
- 106-** Courteix D, Lespessailles E, Peres SL et al. Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls : a comparative study between impact loading and non-impact loading sports. *Osteoporos Int* 1998 ; 8:152-8
- 107-** Dalshy GS, Stocke KS and Ehsani AA. Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women. *Ann. Int Med.* 1998 ; 108:824-28
- 108-** Schuit SC, Van der Klift M, Weel AE et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women : the Rotterdam Study. *Bone* 2004 ; 34:195-202
- 109-** Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud KE et al. Study of osteoporotic fractures research groupe. Hip fracture in women without osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90:2787-93
- 110-** Krolner B, Toft B (1983) Vertebral bone loss : an unheeded side effect of therapeutic bed rest. *Clin. Sci.* 64:537-540.
- 111-** Collet, Vico L, Alexandre C (1997). Effects of a 1 and 6 months space flight on bone mass and biochemistry in two humans. *Bone*, 20:547-551.
- 112-** Suominen H. (1993) Bone mineral density and long-term exercise : an overview of cross-sectional athlete studies. *Sports Med.* 16:316-330.
- 113-** Chow R, Harrison JE, Notarius C (1984). Effect of two randomized exercise programmes on bone mass in healthy post-menopausal women. *BMJ*, 295:1441-1444
- 114-** Nelson ME, Fiatarone MA, Morganti et al. (1994) Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. *JAMA*, 272:1909-1914.
- 115-** Prince RL, Smith M, Dick IM et al (1991). Prevention of post-menopausal osteoporosis : a comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone replacement therapy. *N. Engl. J. Med*, 325:1189-1191.
- 116-** Smidt GL, Lin SY, O'Dwyer KD et al. (1992) The effect of high-intensity trunk exercise on bone mineral density of post-menopausal women. *Spine*, 17:280-285.

- 117-** Lohman T, Going S, Pamentier R et al. (1995). Effects of resistance training on regional and total bone mineral density in premenopausal women : randomized prospective study. *J Bone Miner Res*, 10:1015-1024.
- 118-** Snow-Harter C, Bonxsein MC, Lewis BT et al. (1992). Effects of resistance exercise on bone mineral status of young women : randomized exercise intervention trial. *J Bone Miner Res*, 7:761-769.
- 119-** Berard A, Bravo G, Gauthier P (1999) : meta-analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporosis Int*. 7:331-337.
- 120-** Wolff I. et al (1999) The effect of exercise training programs on bone mass : a meta-analysis of published controlled trials in pre- and postmenopausal women. *Osteoporosis Int*. 9:1-2.
- 121-** Kelley GA (1998) Exercise and regional bone mineral density in postmenopausal women. *Am J Phys Med Rehabil*. vol 77, 1:76-87.
- 122-** Wallace BA, Cummings RG. (2000) Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre-and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 67:10-18.
- 123-** Pollock NK, Laing EM, Modlesky CM et al. Former college artistic gymnasts maintain higher BMD : a nine-year follow-up. *Osteoporosis Int* 2006 ; 17:1691-7
- 124-** Daly RM, Bass SL, Lifetime sport and leisure activity participation is associated with greater bone size, quality and strength in older men. *Osteoporosis Int* 2006 ; 17:1258-67
- 125-** Bonaiuti D. et al (2003) Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(3):CD000333. Review.
- 126-** Wolf SL, Barnhart MX, Kutner NG et al (1996). Reducing frailty and falls in older person ; an investigation of Tai Chi and computerized balance training. *J. AM. Geriatr Soc*. 44:489-497
- 127-** Qin L, Au S, Choy W et al (2002). Regular Tai Chi Chuan exercise may retard bone loss in postmenopausal women : a case-control study. *Arch Phys Med Rehabil*. 83:1355-1359
- 128-** Eisman JA (2001). Good, good, good vibrations : the best option for better bones ? *Lancet*, 358:1924-1925
- 129-** Torvinen S. et al. (2003) Effect of 8-month vertical whole body vibration on bone, muscle performance, and body balance : a randomized controlled study. *J Bone Miner Res*, 18, 5:876-884
- 130-** Lafage-Proust MH (2000). Métabolisme phosphocalcique, tissu osseux et contraintes mécaniques. *Rev Rhum*, 67, suppl 2 :64-71
- 131-** Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. (2001) Effect of exercise training and detraining on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Orthop Sci*., 6:128-132

- 132-** Kontulainen S. et al (2004) Former exercisers of an 18-month intervention display residual aBMD benefits compared with control women 3.5 years post-intervention : a follow-up of a randomized controlled high-impact trial. *Osteoporos Int.* 15:248-251
- 133-** Sinaki M. et al (2002) Stronger back muscles reduce the incidence of vertebral fractures : a prospective 10 year follow-up of postmenopausal women. *Bone*, vol 30, 6:836-841
- 134-** Sinaki M, Wahner HW, Offord KP et al (1989). Efficacy of nonloading exercises in prevention of vertebral bone loss in postmenopausal women : a controlled trial. *Mayon Clin. Proc.*, 64:762-76
- 135-** Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 2001;22:66-81
- 136-** Saville PD, Whyte MP. Muscle and bone hypertrophy. Positive effect of running exercise in the rat. *Clin Orthop.* 1969;65:81-8
- 137-** Steinberg ME, Trueta J. Effects of activity on bone growth and development in the rat. *Clin Orthop.* 1981;156:52-60
- 138-** Kimmel DB, Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. *Osteoporosis.* Academic Press, San Diego, 1996:33
- 139-** Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992;18:227-236
- 140-** Iwamoto J, Tadeka T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp. Anim.* 2005;51:1-6
- 141-** Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. *J. Bone Miner. Res.* 1998; 13:1308-17
- 142-** Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone.* 1999;24:163-69
- 143-** Yeh JK, ZAloia JF, Tierney JM, Sprintz S. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat : determined by dual energyX-ray absorptiometry. *Calcif. Tissue Int.* 1993;52:234-38
- 144-** Yeh JK, Aloia JF, Chen MM, Tierny JM, Sprintz S. Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8:1117-25
- 145-** Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, Abe H, Ichimura S, Sato Y, Toyama Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J. Bone Miner. Metab.* 2004;22:26-31
- 146-** Yeh JK, Liu CC, Aloia JF. Effects of exercise and immobilization on bone formation and resorption in young rats. *Am. J. Physiol.* 1993;264:182-89
- 147-** Chen MM, Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintz S. Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats : a histomorphometry and dual energy x-ray absorptiometry study. *Bone.* 1994;15:313-19

- 148-** Yamazaki I, Yamaguchi H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J. Bone Miner. Res.* 1989;4:13-22
- 149-** Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8:937-42
- 150-** Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner.* 1994;6:133-40
- 151-** Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC. Effects of two non-endurance exercise protocols on established bone loss in ovariectomized adult rats. *Calcif. Tissue Int.* 1993;52:239-43
- 152-** Yeh JK, Liu CC, Aloia JF. Additive effect of treadmill exercise and 17 β -estradiol replacement on prevention of tibial bone loss in adult ovariectomized rat. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8:677-83
- 153-** Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of 17 β -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. *Bone Miner* 1994 ; 24:223-34
- 154-** Medecine-Sciences Flammarion, Eds. Plan factoriel 2 x 2. Laplanche. A, Com Noug  , Flamant R. in : Méthodes statistiques appliquées    la recherche clinique.. Paris. 1987 ; 33-43
- 155-** Block JE. Interpreting studies of exercise and osteoporosis : a call for rigor. *Controlled clinical trials.*1997; 18:54-57
- 156-** Bisphosphonates in bone diseases. 2000. 4th edition Academic press – Herbert Fleish
- 157-** Lips P, Hesp R, Reeve J, Wootton R, Green JR , Klenerman L. High indices of remodelling in iliac trabecular bone predict reduced forearm cortical bone mass indices in patients with proximal femoral fractures. *Bone Miner* 1990 ; 11 : 93 -100
- 158-** Tamaki H, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone* 1998; 23 : 147-153
- 159-** Chillbeck PD, Davison KS, Whiting SJ, Suzuki Y, Janzen CL, Peloso P. Effect of strength training combined with bisphosphonate (etidronate) therapy on bone mineral, lean tissue and and fast mass in postmenopausal women. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002;80 : 941-950
- 160-** Uusi Rasi K, Kannus P, Cheng S, Siev  nen H, Pasanen M, Heinonen A et al. Effect of alendronate and exercise on bone and physical performance of post-menopausal women : a randomised controlled trial. *Bone* 2003 ; 33 : 132 – 143
- 161-** Fuchs RK, Shea M, Durski SL, Winters-Stone KM, Widrick J, Snow CM. Individual and combined effects of exercise and alendronate on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* 41 2007 ; 290-96

- 162-** Van Heideken Wagert P, Littbrand H, Johansson A, Nordström P, Gustafson Y. Jumping exercises with and without raloxifene treatment in healthy elderly women. *J Bone Miner Metab* 2002 ; 20 : 376 – 382
- 163-** Notoya K, Yoshida K, Tsukada R et al. Effect of ipriflavone on expression of markers characteristic of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture . *J Bone Miner Res* 1994 ; 9:395-400
- 164-** Adami S, Bufalini L, Cervetti R et al. Ipriflavone prevents radial bone loss in post menopausal women with low bone mass over two years. *Osteoporos Int.* 1997;7:119-125
- 165-** Wu J, Wang XX, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized. *Nice. J Bone Mer Res* 2001 ; 16 : 1829-36
- 166-** Nakajima D, Kine CS, Oh TW, Yang CX, Naka T, Igawa S et al. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J. Physiol. Anthropol.* 2001; 20:285-291
- 167-** Kelly PJ, Eisman JA, Sambrook PN. Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. *Osteoporosis Int* 1990; 1: 56-60
- 168-** Specker BL. Evidence for an interaction between calcium intake and physical activity on changes in bone mineral density. *J Bone Miner Res* 1996 ; 11:1539-1544
- 169-** Kelley GA. Aerobic exercise and bone density at the hip in post-menopausal women : a meta analysis. *Preventive Medicine* 1998; 27: 798-807
- 170-** Lanyon LE, Rubin CJ, Boust G. Modulation of bone loss during calcium insufficiency by controlled dynamic loading. *Calcif Tissue Int* 1986;38:209-216
- 171-** Specker B, Binkley T. Randomized trial of physical activity and calcium supplementation on bone mineral content in 3 to 5 year old children. *J. Bone Miner Res* 2003 ; 18:885-892
- 172-** Iulano-Burns S, Saxon L, Naughton G, Gibbons K, Bass SL. Regional specificity of exercise and calcium during skeletal growth in girls : a randomised controlled trials. *Bone Miner Res* 2003 ; 18:156-162
- 173-** Uusi-Rasi K, Sievanen H, Pasanen M, Oja P, Kuori I. Association of calcium intake and physical activity with bone density and size in premenopausal and postmenopausal : a peripheral quantitative computed tomography study. 2002 . *J Bone Miner Res* 17 : 544-552
- 174-** Courteix D, Jaffré C, Lespessailles E, Benhamou CL. Cumulative effects of calcium supplementation and physical activity on bone accretion in premenarchal children : a double-blind randomised placebo-controlled trial. *Int. J. Sports Med.* 2004 . 25 : 1-7
- 175-** Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med* 1998 ; 338:736-746

- 176-** Lanyon LE. Using functional loading to influence bone mass and architecture : objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptative process in bone. *Bone* 1996 ; 18 : 37 S – 43 S.
- 177-** Cheng MZ, Zaman G, Rawlinson SCF, Susnillo RFC, Lanyon LE; Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures rat ulna. *J Bone Miner Res.* 1996. 11:502-511
- 178-** Damien E, Price JS, Lanyon LE. The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptative response to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1275-1282
- 179-** Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in male as well as females. *J. Bone Miner Res* 2000; 15 : 2169-2177
- 180-** Jessop HL, Goberg M, Cheng MZ et al. Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1045-1055
- 181-** Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Endocrinology : bone adaptation requires estrogen receptor-alpha. *Nature* 2003; 424:389
- 182-** Suuriniemi M, Mahonen A, Kovanen V et al. Association between exercise and pubertal BMD is modulated by estrogen receptor and genotype. *J. Bone Miner Res.* 2004; 19:1758-1765
- 183-** Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, Birge SJ. Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res.* 1995; 10:1303-1311
- 184-** Notelovitz M, Martin D, Tesar et al. Estrogen therapy and variable-resistance weight training increase bone mineral in surgically menopausal women. *J Bone Miner Res* 1991 ; 6:583-589
- 185-** Li Cy, Jee W.SS, Chen JL et al. Estrogen and « exercise » have a synergistic effect in preventing bone loss – in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif. Tissue Int.* 2003 ; 72 : 42-49
- 186-** Prince RL, Smith M, Dick IM et al. Prevention of post-menopausal osteoporosis. A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormonal replacement therapy. 1991; *N Engl. J Med*
- 187-** Heikkinen J, Kurtti La, Matero E, Kyllonen E et al. Moderate exercise does not enhance the positive effect of estrogen on bone mineral density in post-menopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 1991 ; 49 (suppl) : S83-S84
- 188-** Cheng S, Sipila S, Taaffe DR, Puolakka J and Suominen H. Change in bone mass distribution induced by hormone replacement therapy and high-impact physical exercise in post-menopausal women. *Bone* 2002; 31:126-135
- 189-** Going S, Lohman T, Houtkooper C et al. Effects of exercise on bone mineral density in calcium replete postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Osteoporos Int.* 2003; 14:637-643.

- 190-** Maddalozzo GF, Widrick JJ, Cardinal BJ, Winter-Stone KM, Hoffman MA, Snow CM. The effects of hormone replacement therapy and resistance training on spine bone mineral density in early postmenopausal women. *Bone* 40.2007;1244-51
- 191-** Benhamou CL, Ducher G. Architecture osseuse et exercice physique. Os, activité physique et ostéoporose, sous la direction de Herisson C et Fardellone P. Ed Masson. P60-68
- 192-** Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:171-92
- 193-** Jee WSS, Yao W. Overview : animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(3):193-207
- 194-** Rubin CT, Lanyon L. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A:397-403
- 195-** Woo SLY, Kuel SC, Amiel D, Gomez MA, Hayes W, White FC, Akeson WH. The effect of prolonged physical training on the properties of long bone : a study of Wolff's law. *Bone Joint Surg* 1981; 63A:780-787
- 196-** US Department of Health and Human Services : Physical activity and Health : a report of the Surgeon general. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 1996
- 197-** NIH Consensus Development Panel on Physical Activity and Cardiovascular Health : Physical activity and cardiovascular health. *JAMA* 1996; 276:241-46
- 198-** Barou O, Valentin D, Tirode C, Barbier A, Alexandre C, Lafage-Proust MH. High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early : comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disease osteoporosis. *Invest Radiol* 2002; 37:40-46
- 199-** Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K, Fazzalari N. Longitudinal micro-CT examination detects bone changes in ovariectomized, zoledronic acid treated and sham operated rats. *Calcified Tissue International* 2008 ; Supplément 1, vol 82, S 242.
- 200-** Hildebrand T and Ruegsegger P (1997a). A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images. *J Microsc.* 185:67-75.
- 201-** Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G (1992). Trabecular bone pattern factor : a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 13:327-30
- 202-** Hildebrand T, Ruegsegger P (1997b). Quantification of bone microarchitecture with the structure model index *Comput. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* 1:15-23
- 203-** Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Ruegseffer P (1999). The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 25:55-60

- 204-** Thèse de Bonnet N. βagonistes et antagonistes, exercice physique et tissu osseux : modifications architecturales densitométriques, biomécaniques et métaboliques de l'os chez la rate ovariectomisée ou non. 2006
- 205-** Eastell R., Robins S.P, Colwell T., Assiri A.M., Riggs B.L., Russell R.G. (1993). Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos Int.* 3:255-60.
- 206-** Johnell O, Kanis JA (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 17:1726-1733
- 207-** Boonen S (2007). Bisphosphonate efficacy and clinical trials for postmenopausal osteoporosis: Similarities and differences. *Bone* 40:S26-S31
- 208-** Hugues DE, Wright KR, Ui HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res.* 10:1478-1487
- 209-** Walsh MC, Hunter GR, Livingstone MB (2006). Sarcopenia in premenopausal and postmenopausal women with osteopenia, osteoporosis and normal bone mineral density. *Osteoporos Int.* 17:(1) 61-67
- 210-** Wallace BA, Cummings RG (2000). Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 67:10-18
- 211-** Bonaiuti D et al (2003). Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD000333. Review
- 212-** NOF. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis (2008)
- 213-** Bone Health and osteoporosis: a report of the surgeon general (2004)
- 214-** Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405 (8):704-706
- 215-** Lespessailles E, Prouteau S (2006) Is there a synergy between physical exercise and drug therapies for osteoporosis ? *Clin Exp Rheumatol* . 24:191-195
- 216-** Delmas PD, Vergnaud P, Arlot ME, Pastoureau P, Meunier PJ, Nilssen MJL (1995). The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate – is activated resorption a prerequisite for the *in vivo* effect of PTH on formation in a remodelling system ? *Bone* 16:603-610
- 217-** Gasser JA, Kneissel M, Thomsen JS, Mosekilde L (2000). PTH and interactions with bisphosphonates. *J Musculoskel Neuron Interact* 1:53-56
- 218-** Yao W, Cheng Z, Koester KJ, Ager JW, Balooch M, Pham A, Chefo S, Busse C, Ritchie R, Lane NE (2007). The degree of bone mineralization is maintained with single intravenous bisphosphonates in aged estrogen-deficient rats and is a strong predictor of bone strength. *Bone* 41:804-812

- 219-** Lee JI, Kim HW, Rhee WI, Park JH, Lim SH, Im S, Ko YJ (2006). The beneficial effect of intravenous zoledronic acid therapy following an acute stroke in rats. *Bone* 39:377-382
- 220-** Browsers JEM, Lambers FM, Gasser JA, van Rietbergen B, Huiskes R (2008). Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized Wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int.* 82:202-211
- 221-** Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR (2008). Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 23:544-551
- 222-** Bonnet N, Laroche N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. (2007). Doping dose of salbutamol and exercise training: impact on the skeleton of ovariectomized rats. *J Appl Physiol* 103:524-533
- 223-** Honda A, Umemura Y, Nagasawa S (2001). Effect of high-impact and low-repetition training on bones in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 16:1688-1693
- 224-** Adami S, Gatti D, Braga V, Bianchini V, Rossini M (1999). Site-specific effects of strength training on bone structure and geometry of ultradistal radius in post-menopausal women. *J Bone Miner Res* 14:120-124
- 225-** Jarvinen TLN, Kannus P, Sievanen H, Jolma P, Heinonen A, Jarvinen M (1998). Randomized controlled study of effects of sudden impact loading on rat femur. *J Bone Miner Res.* 13:1475-1482
- 226-** Fukuda S, Lida H, Hyakutake S, Yan X (2002). Preventive effects of running exercise on bones in heavy ion particle irradiated rats. *J Radiat Res* 43 (suppl):S233-S238
- 227-** Bonnet N., Beaupied H, Vico L., Dolléans E., Laroche L., Courteix D., Benhamou CL. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats (2007). *J Bone Miner Res.* 22(4):578-88
- 228-** Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre C (1995). Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J Bone Miner Res* 10:820-828
- 229-** Hagihara Y, Fukuda S, Goto S, Lida H, Yamazaki M, Moriya H (2005). How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD ? *J Bone Miner Metab* 23:289-294
- 230-** Li CY, Jee SS, Chen JL, Mo A, Setterberg RB, Su M, Tian XY, Ling F, Yao W (2003). Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int* 72:42-49
- 231-** Joo YI, Sone T, Fukunaga M, Lim SG, Onodera S (2003). Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* 33:485-493
- 232-** Newhall KM, Rodnick KJ, van der Meulen MC, Carter DR, Marcus RT (1991). Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. *J Bone Miner Res* 6:289-296

- 233-** Black BL, Greenspan FL, Ensrud KE, Palermo L, Mc Gowan JA, Lang TF, Garner P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ, PaTH Study Investigators (2003). The effect of parathyroid hormones and alendronate alone or in combination in post-menopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 349:1207-1215
- 234-** Hammond CB. 1996. Menopause and hormone replacement therapy: an overview. *Obstet Gynecol* 87: 2S-15S
- 235-** Kanis JA. 1996. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. *Bone* 19: 185S-90S
- 236-** Halbreich U. 1997. Role of estrogen in postmenopausal depression. *Neurology* 48: S16-9
- 237-** Grodstein F, Stampfer MJ. 1998. Estrogen for women at varying risk of coronary disease. *Maturitas* 30: 19-26
- 238-** Torgerson DJ, Bell-Syer SE. 2001. Hormone replacement therapy and prevention of vertebral fractures: a meta-analysis of randomised trials. *BMC Musculoskelet Disord* 2: 7
- 239-** Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, et al. 2004. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 291: 1701-12
- 240-** Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, et al. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280: 605-13
- 241-** Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, et al. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288: 321-33
- 242-** 2008. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *National Osteoporosis Foundation (NOF)*
- 243-** Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, et al. 2008. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 19: 399-428
- 244-** Delmas PD. 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359: 2018-26
- 245-** Fleisch H. 1998. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 19: 80-100
- 246-** Buhaescu I, Izzedine H. 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem* 40: 575-84
- 247-** Ciosek CP, Jr., Magnin DR, Harrity TW, Logan JV, Dickson JK, Jr., et al. 1993. Lipophilic 1,1-bisphosphonates are potent squalene synthase inhibitors and orally active cholesterol lowering agents in vivo. *J Biol Chem* 268: 24832-7
- 248-** Kelley GA, Kelley KS. 2008. Efficacy of aerobic exercise on coronary heart disease risk factors. *Prev Cardiol* 11: 71-5

- 249-** Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV. 2005. Walking and Non-HDL-C in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Prev Cardiol* 8: 102-7
- 250-** Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Ahotupa M. 1998. Reduced oxidized LDL levels after a 10-month exercise program. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1496-501
- 251-**
- 252-** Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. 2001. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 28: 465-73
- 253-** Boppart MD, Kimmel DB, Yee JA, Cullen DM. 1998. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. *Bone* 23: 409-15
- 254-** Pead MJ, Skerry TM, Lanyon LE. 1988. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J Bone Miner Res* 3: 647-56
- 255-** Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. 1989. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 4: 783-8
- 256-** Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. *Bone* 18: 621-7
- 257-** Kemmler W, Lauber D, Weineck J, Hensen J, Kalender W, Engelke K. 2004. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: results of the Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Arch Intern Med* 164: 1084-91
- 258-** Guney E, Kisakol G, Ozgen AG, Yilmaz C, Kabalak T. 2008. Effects of bisphosphonates on lipid metabolism. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 252-5
- 259-** Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, et al. 1992. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 33: 1657-63
- 260-** Tobert JA. 1987. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation* 76: 534-8
- 261-** Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Ohtsuka I, Yoshida I, et al. 2000. Effect of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in rhesus monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors. *J Lipid Res* 41: 1136-44
- 262-** Thune I, Njolstad I, Lochen ML, Forde OH. 1998. Physical activity improves the metabolic risk profiles in men and women: the Tromso Study. *Arch Intern Med* 158: 1633-40
- 263-**

- 264-** Makkonen N, Salminen A, Rogers MJ, Frith JC, Urtti A, et al. 1999. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* 8: 109-18
- 265-** Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, et al. 2003. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 349: 1207-15
- 266-** Bevilacqua M, Dominguez LJ, Rosini S, Barbagallo M. 2006. Bisphosphonates and atherosclerosis: why? *Lupus* 14: 773-9
- 267-** Persy V, De Broe M, Ketteler M. 2006. Bisphosphonates prevent experimental vascular calcification: Treat the bone to cure the vessels? *Kidney Int* 70: 1537-8
- 268-** Ylitalo R. 2002. Bisphosphonates and atherosclerosis. *General Pharmacology* 35: 287-96

Eric Lespessailles

Effets sur le tissu osseux (microarchitecture, densitométrie, biomécanique et remodelage) et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique chez la rate ovariectomisée

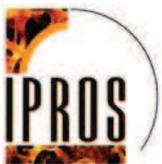
L'objectif de ce travail était d'examiner chez la rate adulte ovariectomisée les effets osseux et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique. Dans une première étude, les effets individuels et combinés de l'acide zolédronique 20 µg/kg une injection unique et de l'exercice physique (course sur tapis roulant pendant 12 semaines) ont été examinés sur la densité osseuse au corps entier et au fémur, l'analyse de la microarchitecture trabéculaires, les propriétés biomécaniques et le remodelage osseux. Les résultats montrent globalement que l'acide zolédronique prévient la dégradation microarchitecturale et l'hyperresorption induite par l'ovariectomie, que l'exercice physique maintient partiellement les propriétés biomécaniques et agit sur le remodelage osseux en augmentant la formation osseuse mais qu'aucun bénéfice additionnel ou synergique n'est trouvé sur le squelette osseux de la combinaison des deux interventions. La deuxième étude s'est intéressée aux effets sur le profil lipidique de l'action spécifique et combinée des deux interventions ci-dessus mentionnées. Si l'acide zolédronique et l'exercice de course sur tapis roulant modifient les taux de cholestérol total et de HDL cholestérol dans le sens d'une amélioration du risque d'athérosclérose, leurs effets associés ne sont pas synergiques et ont eu un effet paradoxal inverse possiblement expliqué par un effet pro-inflammatoire de la combinaison des deux interventions.

Mots clés : Acide zolédronique – Exercice Physique – Ostéoporose – Profil Lipidique – Microarchitecture Osseuse – Densité Minérale Osseuse – Propriétés Biomécaniques - Rats

Specific and combined effects of zoledronic acid and physical exercise in ovariectomized rats

The aim of this study was to investigate in mature ovariectomized rats the effects on bone tissue and on the lipids metabolism of zoledronic acid and physical exercise. In this first study, the individual and combined effects of zoledronic acid (20 µg/kg a single injection) and physical exercise (treadmill running exercise during twelve week) have been examined on whole body and femur bone mineral density, on trabecular microarchitecture analysis, on bone strength parameters and on bone turnover. Results showed globally that zoledronic acid prevented the trabecular microarchitectural changes and the increase in resorption induced by ovariectomy. Treadmill running exercise particularly maintained the bone strength and exerted its action by an increase in bone formation. However we did not find any additive or synergistic effect of the two interventions combined on the rat skeletal status. The second study aimed to assess the specific and combined effects of zoledronic acid and treadmill running exercise on the lipid profile in this model of ovariectomized mature rats. If both zoledronic acid and treadmill running exercise modified total cholesterol and HDL cholesterol with an improvement of the atherosclerosis risk, their combined effects were not synergistic and furthermore they produced a paradoxical inverse effect possibly explained by a pro-inflammatory effect of the two interventions combined.

Keywords: Zoledonic acid – Exercise – Osteoporosis – Lipid profil – Bone microarchitecture – Bone Mineral Density – Mechanical properties - Rats



UMR-S658- IPROS- CHR d'Orléans

1 Rue Porte Madeleine, BP 2439, 45032 Orléans Cedex 1



Eric Lespessailles

Effets sur le tissu osseux (microarchitecture, densitométrie, biomécanique et remodelage) et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique chez la rate ovariectomisée

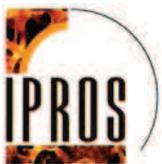
L'objectif de ce travail était d'examiner chez la rate adulte ovariectomisée les effets osseux et sur le métabolisme lipidique de l'acide zolédronique et de l'exercice physique. Dans une première étude, les effets individuels et combinés de l'acide zolédronique 20 µg/kg une injection unique et de l'exercice physique (course sur tapis roulant pendant 12 semaines) ont été examinés sur la densité osseuse au corps entier et au fémur, l'analyse de la microarchitecture trabéculaires, les propriétés biomécaniques et le remodelage osseux. Les résultats montrent globalement que l'acide zolédronique prévient la dégradation microarchitecturale et l'hyperresorption induite par l'ovariectomie, que l'exercice physique maintient partiellement les propriétés biomécaniques et agit sur le remodelage osseux en augmentant la formation osseuse mais qu'aucun bénéfice additionnel ou synergique n'est trouvé sur le squelette osseux de la combinaison des deux interventions. La deuxième étude s'est intéressée aux effets sur le profil lipidique de l'action spécifique et combinée des deux interventions ci-dessus mentionnées. Si l'acide zolédronique et l'exercice de course sur tapis roulant modifient les taux de cholestérol total et de HDL cholestérol dans le sens d'une amélioration du risque d'athérosclérose, leurs effets associés ne sont pas synergiques et ont eu un effet paradoxal inverse possiblement expliqué par un effet pro-inflammatoire de la combinaison des deux interventions.

Mots clés : Acide zolédronique – Exercice Physique – Ostéoporose – Profil Lipidique – Microarchitecture Osseuse – Densité Minérale Osseuse – Propriétés Biomécaniques - Rats

Specific and combined effects of zoledronic acid and physical exercise in ovariectomized rats

The aim of this study was to investigate in mature ovariectomized rats the effects on bone tissue and on the lipids metabolism of zoledronic acid and physical exercise. In this first study, the individual and combined effects of zoledronic acid (20 µg/kg a single injection) and physical exercise (treadmill running exercise during twelve week) have been examined on whole body and femur bone mineral density, on trabecular microarchitecture analysis, on bone strength parameters and on bone turnover. Results showed globally that zoledronic acid prevented the trabecular microarchitectural changes and the increase in resorption induced by ovariectomy. Treadmill running exercise particularly maintained the bone strength and exerted its action by an increase in bone formation. However we did not find any additive or synergistic effect of the two interventions combined on the rat skeletal status. The second study aimed to assess the specific and combined effects of zoledronic acid and treadmill running exercise on the lipid profile in this model of ovariectomized mature rats. If both zoledronic acid and treadmill running exercise modified total cholesterol and HDL cholesterol with an improvement of the atherosclerosis risk, their combined effects were not synergistic and furthermore they produced a paradoxical inverse effect possibly explained by a pro-inflammatory effect of the two interventions combined.

Keywords: Zoledonic acid – Exercise – Osteoporosis – Lipid profil – Bone microarchitecture – Bone Mineral Density – Mechanical properties - Rats



UMR-S658- IPROS- CHR d'Orléans

1 Rue Porte Madeleine, BP 2439, 45032 Orléans Cedex 1

