



HAL
open science

Étude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique

Yohann Bala

► **To cite this version:**

Yohann Bala. Étude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10118 . tel-00863494

HAL Id: tel-00863494

<https://theses.hal.science/tel-00863494>

Submitted on 19 Sep 2013

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES - SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 28/06/2011

par

Monsieur BALA Yohann Maxime

Etude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique

Directeur de thèse : Monsieur le docteur Georges BOIVIN

JURY : Madame le Docteur L. Vico-Pouget, Rapporteur
Monsieur le Professeur P. Ammann, Rapporteur
Madame le Professeur V. Bousson
Monsieur le Professeur J. Chevalier
Monsieur le Professeur R. Chapurlat
Monsieur le Docteur G. Boivin

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES - SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 28/06/2011

par

Monsieur BALA Yohann Maxime

Etude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique

Directeur de thèse : Monsieur le docteur Georges BOIVIN

JURY : Madame le Docteur L. Vico-Pouget, Rapporteur
Monsieur le Professeur P. Ammann, Rapporteur
Madame le Professeur V. Bousson
Monsieur le Professeur J. Chevalier
Monsieur le Professeur R. Chapurlat
Monsieur le Docteur G. Boivin

- Remerciements -

Initialement arrivé pour un stage de six mois, les opportunités qui m'ont été offertes par le laboratoire, l'ont transformé en une aventure de six ans. Au cours de ces six années, j'ai eu l'occasion de rencontrer des personnes fascinantes qui m'ont donné un gout et une motivation pour une recherche à l'interface de différentes disciplines. Elles m'ont aussi formé dans ce sens et je voudrais leur exprimer ici toute ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Docteur Georges Boivin, directeur de recherche INSERM et directeur de ce travail de thèse. Je remercie ici sa très grande accessibilité, la pertinence et la rapidité de son stylo rouge ainsi que la liberté et la confiance qu'il m'a accordées au cours de mes recherches. D'un point de vue scientifique, le Dr. Boivin a su créer un environnement stimulant, rigoureux et rempli d'opportunités qui a fait de ces six années de recherche, une page extrêmement formatrice sur les plans professionnel et personnel, qui va m'être dure de tourner.

Je remercie Madame le Docteur Laurence Vico, directeur de recherche INSERM à l'université de Saint-Etienne, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteur.

Je remercie Madame le Professeur Valérie Bousson du Service de Radiologie OstéoArticulaire de l'Hôpital Lariboisière, Paris, pour me faire l'honneur de participer à mon Jury de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Roland Chapurlat, directeur de l'unité INSERM 831, pour sa participation à mon jury de thèse. Je vous remercie aussi sincèrement pour votre disponibilité, vos conseils et appuis, au cours de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jérôme Chevalier, responsable du groupe Matériaux Céramiques et Composites du laboratoire Matériaux : Ingénierie et Science (MATEIS) de l'INSA de Lyon, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie aussi pour la facilité et la sympathie avec lesquelles vous nous avez accueillis dans votre structure pour réaliser une partie de ces travaux, et de ceux à venir...

Je remercie Monsieur le Professeur Patrick Ammann, de l'Université de Genève pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et participer à mon jury. Cela aura aussi été un plaisir de discuter d'indentation et de tissu osseux au cours des différents congrès durant lesquels nous nous sommes rencontrés.

Un grand merci au docteur Delphine Farlay, toujours de bonne humeur, souriante et prête à partir dans tous les projets (avec une vitesse parfois difficile à suivre). Son aide et son soutien auront été précieux tout au long de cette thèse mais aussi au cours des travaux antérieurs. J'espère sincèrement que le futur nous apportera d'autres opportunités de projets communs tant il a été agréable de travailler avec toi...!

Je remercie mon Mentor de l'orthographe, Jean Paul Roux, alias la Reine d'Angleterre ou JP the 3rd qui au volant de son ROUTAN[®] m'aura ouvert les voies sacrées des statistiques partielles, de la photographie, de la caféinomanie, du vin résiné, des doubles arbres à came en tête...parmi tant

d'autres, plus ou moins sérieuses. Avoir travaillé avec une personne toujours aussi enthousiaste et disponible aura grandement facilité ce travail de thèse, et pour tout ça je te remercie sincèrement.

Je remercie le docteur Baptiste Dépalle (et oui.. ! il faut te faire à ton récent grade), montagnard, motard, photographe... J'ai réellement apprécié sa disponibilité, sa curiosité et son enthousiasme pour construire des projets de collaborations qui m'ont permis d'apprendre « beaucoup » au sujet de la mécanique osseuse. Je te remercie aussi pour les très bons souvenirs de congrès, comme la traversée de l'ouest américain sans réservations, les courses à pieds à travers Genève et bien d'autres...! Je profite aussi de ces remerciements pour m'excuser officiellement d'avoir fait sensiblement diminuer ta santé cardiaque au pied de Monument Valley... !!!

Un grand merci à Anne-Sophie Bravo-Martin pour la qualité de son travail et sa disponibilité, mais aussi pour avoir assuré la gestion du « Hors-labo » qui a donné lieu à des rencontres bien sympathiques et de multiples rigolades...!!

Mes remerciements vont aussi à messieurs Thierry Douillard, Sylvain Meille et Philippe Clément du laboratoire Matériaux Ingénierie et Sciences (MATEIS, Villeurbanne, France). Grâce à votre accueil, votre disponibilité, vos conseils et votre sympathie vous avez transformé ces essais d'indentation en une découverte fascinante de l'étude des matériaux et des techniques associées. En espérant partager d'autres projets avec vous.

Mes remerciements vont aussi au docteur Hélène Follet dont l'enthousiasme, la persévérance et la franchise ont été une source de motivation dans la réalisation de ces travaux. Je pense sincèrement que les discussions à ton retour de postdoc ont motivé mon gout pour la biomécanique et surtout mon envie de continuer dans cette voie.

Daiva Masanauskaite, Charles Barr et Julien Boidron des laboratoires Hofmann-LaRoche pour leur aide au cours de l'étude portant sur l'ibandronate. Plus généralement je remercie le laboratoire pour leur soutien financier qui a permis ce travail de thèse.

Un grand merci au docteur Pascale Chavassieux qui tout au long de mon passage dans l'unité aura répondu à mes questions avec beaucoup de pédagogie et de précision.

Mes remerciements vont aussi à Nathalie Portero-Muzy, Gaëlle Martin et Marlène Pierre les « histo-women »...mais pas que... !! Avec une mention particulière pour les talents d'imitatrice de Nathalie...

Je remercie aussi les docteurs Stephanie Boutroy (pour m'avoir perdu en tramway à Istanbul), Julien Wegrzyn (pour m'avoir tout appris sur les 3P), Stephanie Viguet-Carrin (pour son rire et son sourire...!!), Nicolas Vilayphiou (attention quand même à tes choix d'hôtel...oui oui.. !! je pense à Montréal... !!). Merci aussi à Audrey Doublier.

Je remercie aussi tous les collègues et ex-collègues « de l'hôpital », Evelyne Gynest, Blandine Merle, Olivier Borel, Jean-Charles Rousseau, Cindy Bertholon, Isabelle Rondy...et bien sur Christine Fourneret pour son aide administrative et logistique mais aussi pour avoir toujours répondu avec le sourire aux questions que j'ai posées de nombreuses fois « C'est quoi un bon de commande ? » « Comment on fait avec le fax ? »...

Je remercie chaleureusement le Professeur Mark Forwood pour sa gentillesse, son humour, son soutien, ses encouragements et son aide inestimable dans chacune de mes tentatives internationales.

Un grand merci au Professeur Deepak Vashishth qui au cours de nos multiples rencontres a toujours su distiller quelques très bon conseils sur la conduite de mes travaux.

Je remercie les docteurs Maria-Grazia Ascenzi (University of California, Los Angeles, CA, USA) et Alesha Castillo (Stanford, Palo-Alto, CA, USA) qui m'ont offert l'opportunité de présenter mes modestes travaux dans leurs prestigieuses institutions. Votre sympathie, votre simplicité et les opportunités que vous m'avez offertes ont largement motivé et affuté mon gout pour la recherche.

Mesdames Catherine Simi et Annie Buffet, qui m'ont appris, à mon arrivé au laboratoire INSERM U403 les différentes techniques avec patience, mais aussi, et surtout, avec le sourire...

Les étudiantes passées par le laboratoire, Livia Cueru, Julie Hémar, Caroline Bolle, Claudine Bessette, Doris Tran...oui, c'est un fait, il y a eu beaucoup plus d'étudiantes que d'étudiants...

Mes remerciements vont aussi aux nouveaux docteurs et étudiants de l'unité 664, Marion David, Anaïs Fradet, Benedicte Eckel (Je n'oublie pas pour mon casque...GGGrrrr..!!) et Vincent Gonin. A défaut d'avoir partagé des projets scientifiques, la création de l'unité INSERM 1033 étant arrivée tardivement...nous avons partagé de bons projets de soirées et un colloque mémorable...!!

Et comme il n'y a pas de thèse sans un soupçon (aussi minime soit-il) de vie personnelle, je remercie ma famille, ma « belle-famille » et mes amis pour leur écoute et leur soutien mais aussi mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes choix en me laissant une immense liberté pour les assumer. J'espère être toujours digne des valeurs qu'ils m'ont enseignées. Pour finir, je remercie de tout cœur Sabrina qui partage ma vie (et mon pessimisme.. !) depuis *quelques années* et qui a supporté mes états « euphoriques, comme apathiques » qui ont jalonné ce projet (et bien d'autres à venir...!!!). Sa motivation inoxydable, sa fougue, son humour, son empathie... et son sourire sont des soutiens essentiels qui me permettent d'avancer en toutes circonstances...

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre »
Aristote

*« La véritable science enseigne, par-dessus tout,
à douter et à être ignorant »*
Miguel de Unamuno
Extrait de *le sentiment tragique de la vie*

- Table des matières -

Liste des abréviations.....	11
-----------------------------	----

Avant-propos.....	13
-------------------	----

Partie 1 - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 - Le tissu osseux humain: un tissu dynamique complexe

1. Fonctions du tissu osseux.....	18
2. Anatomie et organisation macroscopique du tissu osseux.....	18
2.1. Classification des os.....	18
2.2. Anatomie d'un os long.....	19
2.3. Anatomie des os irréguliers.....	20
2.4. Os cortical et os trabéculaire.....	20
3. Organisation microscopique du tissu osseux.....	21
3.1. Textures osseuses.....	21
3.2. Organisation de l'os cortical.....	22
3.3. Organisation de l'os trabéculaire.....	24
4. Composition du tissu osseux.....	24
4.1. Matrice organique osseuse.....	24
4.1.1. Trame collagénique.....	24
4.1.2. Protéines non collagéniques.....	27
4.2. Matrice inorganique osseuse.....	27
4.2.1. Généralités.....	27
4.2.2. Composition et structure du minéral osseux.....	28
4.2.3. Croissance et maturation du cristal d'apatite.....	29
4.2.4. Caractéristiques principales du cristal d'apatite.....	30
4.2.4.1. Substitutions ioniques.....	30
4.2.4.2. Cristallinité.....	31
4.2.5. Minéralisation osseuse.....	31
4.2.5.1. Nucléation cristalline.....	32
4.2.5.2. Minéralisation des unités structurales élémentaires.....	34
4.3. Cellules osseuses.....	36
4.3.1. Ostéoclastes et résorption osseuse.....	36
4.3.1.1. Différenciation et maturation ostéoclastique.....	37
4.3.1.2. Résorption osseuse.....	38
4.3.2. Ostéoblastes et formation osseuse.....	40

4.3.2.1.	Différenciation et maturation ostéoblastique.....	40
4.3.2.2.	Formation osseuse.....	40
4.3.3.	Ostéocytes.....	41
4.3.4.	Cellules bordantes.....	42
4.4.	Remodelage osseux.....	43
4.4.1.	Etapas du remodelage osseux.....	43
4.4.2.	Remodelage osseux cortical et trabéculaire.....	45

Chapitre 2 - Le tissu osseux humain: un tissu mécaniquement compétent

1.	Structure hiérarchisée de l'os.....	48
2.	Généralités sur les tests mécaniques adaptés à l'étude de l'os.....	49
2.1.	Tests adaptés à l'étude de la macrostructure.....	49
2.1.1.	Tests mécaniques.....	49
2.1.2.	Tests ultrasonores.....	51
2.2.	Tests adaptés à l'étude de la microstructure.....	52
2.2.1.	Techniques d'indentation.....	52
2.2.1.1.	Microdurimétrie.....	52
2.2.1.2.	Nanoindentation.....	53
2.2.1.3.	Indentation et os.....	55
2.2.2.	Microscopie acoustique.....	57
2.3.	Etude de la nanostructure par microscopie à force atomique.....	58
3.	Fragilité osseuse et ses déterminants.....	59
3.1.	Concept de fragilité osseuse.....	59
3.2.	Déterminants de la fragilité osseuse.....	60
3.2.1.	Déterminants extrinsèques.....	60
3.2.1.1.	Masse et densité minérale osseuses.....	60
3.2.1.2.	Taille et géométrie des os.....	61
3.2.1.3.	Microarchitecture osseuse.....	63
3.2.2.	Déterminants intrinsèques.....	65
3.2.2.1.	Minéral et minéralisation.....	65
3.2.2.2.	Collagène.....	67
3.2.2.3.	Microfissures et apoptose ostéocytaire.....	68
3.2.2.	Remodelage osseux.....	70

Chapitre 3 - L'ostéoporose et ses traitements

1.	Ostéoporose : définitions et généralités.....	72
1.1.	Problème de santé publique.....	72
1.2.	Définitions de l'ostéoporose.....	73

1.3.	Causes de l'ostéoporose.....	73
1.4.	Ostéoporose ménopausique.....	75
1.4.1.	Généralités.....	75
1.4.2.	Action des œstrogènes sur les cellules osseuses et conséquences de la ménopause.....	76
2.	Traitements de l'ostéoporose ménopausique.....	78
2.1.	Agents anticataboliques.....	78
2.1.1.	Bisphosphonates.....	78
2.1.2.	Modulateurs sélectifs des récepteurs oestrogéniques.....	79
2.1.3.	Inhibiteurs de RANKL.....	79
2.1.4.	Inhibiteurs de la cathepsine K.....	80
2.1.5.	Perspectives de l'inhibition de la résorption osseuse.....	80
2.2.	Agents anaboliques.....	81
2.2.1.	Hormone parathyroïdienne.....	81
2.2.2.	Perspectives des traitements anaboliques.....	82
2.3.	Agent mixte anticatabolique et anabolique.....	82

Chapitre 4 - Les Bisphosphonates

1.	Généralités.....	86
2.	Rôle de la structure chimique des bisphosphonates.....	87
3.	Propriétés pharmacocinétiques des bisphosphonates.....	90
3.1.	Modes d'administration des bisphosphonates.....	90
3.2.	Distribution tissulaire des bisphosphonates.....	91
3.2.1.	Tissus non-calcifiés.....	91
3.2.2.	Tissus calcifiés.....	91
4.	Mécanismes d'action tissulaire.....	92
4.1.	Inhibition de la minéralisation.....	92
4.2.	Inhibition de la résorption osseuse.....	93
5.	Mécanismes d'action cellulaire.....	93
5.1.	Effets sur les ostéoclastes.....	93
5.2.	Effets sur les ostéoblastes.....	94
5.3.	Effets sur les ostéocytes.....	95
6.	Mécanismes d'action moléculaire.....	95
6.1.	Formation d'analogues toxiques de l'ATP par les BPs non-azotés.....	95
6.2.	Inhibition de la voie du mévalonate par les BPs azotés.....	96

7.	Utilisations cliniques des bisphosphonates.....	99
8.	Bisphosphonates impliqués dans les travaux de cette thèse.....	100
8.1.	Alendronate.....	100
8.1.1.	Résultats cliniques.....	100
8.1.2.	Alendronate et qualité du tissu osseux.....	101
8.1.2.1.	Effets sur le remodelage osseux et l'accumulation de micro dommages.....	101
8.1.2.2.	Effets sur la minéralisation osseuse.....	104
8.1.2.3.	Effets sur la matrice organique.....	106
8.1.2.4.	Effets sur les propriétés mécaniques.....	107
8.2.	Ibandronate.....	110
8.2.1.	Résultats pré-cliniques.....	110
8.2.1.1.	Effets sur la masse et la résistance osseuse.....	110
8.2.1.2.	Effets sur la microarchitecture.....	111
8.2.1.3.	Effets sur les déterminants intrinsèques de la qualité osseuse.....	111
8.2.2.	Résultats cliniques : Vers un régime intermittent.....	112
8.2.2.1.	Etudes de phases II.....	112
8.2.2.2.	Etudes de phases III.....	113
	• Etude BONE.....	113
	• Etude MOPS.....	114
	• Etude MOBILE.....	115
	• Etude MOTION.....	116
	• Etudes BALTO I et II.....	116
	• Etudes IRIS et DIVA.....	117
8.2.3.	Ibandronate et qualité du tissu osseux chez la femme ostéoporotique.....	117
9.	Dégradations de la qualité osseuse associées avec l'utilisation prolongée des BPs.....	119
9.1.	Ostéonécrose de la mâchoire.....	119
9.2.	Fractures atypiques sous trochantériennes.....	120
	Objectifs des travaux de thèse.....	13

Partie 2 – Travaux personnels

Chapitre 5 - Etude des effets osseux de l'ibandronate oral continu ou intermittent dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique: résultats de l'étude BONE

1.	Introduction.....	128
-----------	--------------------------	------------

2.	Matériel et méthodes	129
2.1.	Protocole de l'étude BONE et prélèvements osseux.....	129
2.2.	Préparation des échantillons osseux.....	130
2.2.1.	Préparation des coupes pour la microradiographie.....	130
2.2.2.	Préparation des blocs pour la microindentation.....	131
2.3.	Microradiographie quantitative de contact.....	131
2.4.	Microdureté Vickers.....	135
2.5.	Autres variables d'intérêt.....	135
2.6.	Analyse statistique.....	136
3.	Résultats	137
3.1.	Caractéristiques des patientes à l'inclusion dans l'étude BONE.....	137
3.2.	Effets de l'ibandronate sur l'activité du remodelage osseux après deux et trois ans de traitement.....	137
3.3.	Effets de l'ibandronate oral continu ou intermittent sur la minéralisation et la microdureté du tissu osseux (étude globale).....	138
3.3.1.	Résultats après deux ans de traitement.....	138
3.3.2.	Résultats après trois ans de traitement.....	143
3.3.3.	Relations entre le degré de minéralisation, la microdureté et le remodelage osseux.....	147
3.3.4.	Résumé des résultats de l'étude globale.....	147
3.4.	Effets de l'ibandronate oral continu ou intermittent sur la minéralisation et la microdureté des unités structurales élémentaires (étude focale).....	148
3.4.1.	Résultats après deux ans de traitement.....	148
3.4.2.	Résultats après trois ans de traitement.....	150
3.4.3.	Résumé des résultats de l'étude focale.....	152
4.	Discussion	152
5.	Conclusion	155

Chapitre 6 - Etude des effets osseux de l'utilisation prolongée de l'alendronate oral dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique

1.	Introduction	159
2.	Matériel et méthodes	160
2.1.	Sujets analysés et prélèvements osseux.....	160
2.2.	Protocole technique.....	161
2.3.	Indentation instrumentée.....	162
2.3.1.	Protocole expérimental.....	164
2.3.2.	Variables obtenues par indentation instrumentée.....	165

2.4.	Microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIRM).....	169
2.4.1.	Principe.....	169
2.4.2.	Obtention des spectres.....	170
2.4.3.	Variables obtenues par FTIRM.....	171
2.5.	Analyse statistique.....	173
2.5.1.	Etude tissulaire.....	173
2.5.2.	Etude à l'échelle du BSU.....	174
3.	Résultats	174
3.1.	Etude au niveau tissulaire.....	174
3.1.1.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur l'activité du remodelage osseux.....	174
3.1.2.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la minéralisation osseuse.....	175
3.1.3.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la microdureté osseuse.....	178
3.1.4.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur les caractéristiques nanostructurales de la matrice osseuse mesurées par FTIRM.....	179
3.1.5.	Effets de la durée d'un traitement par l'ALN oral.....	181
3.1.6.	Résumé des résultats de l'étude au niveau tissulaire.....	182
3.2.	Etude à l'échelle du BSU.....	183
3.2.1.	Caractérisation des propriétés microstructurales et micromécaniques chez des patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique non traitées.....	183
3.2.1.1.	Rôle du degré de minéralisation dans les propriétés micromécaniques de l'os cortical.....	183
3.2.1.2.	Rôle de la qualité du minéral et du collagène dans le comportement micromécanique.....	189
3.2.2.	Effets d'un traitement prolongé par l'alendronate oral sur les propriétés microstructurales et micromécaniques à l'échelle du BSU.....	193
4.	Discussion	201
5.	Conclusion	214
	Conclusion générale et perspectives	217
	Références bibliographiques	219
	Annexes	261
1.	Publications scientifiques	
1.1.	Articles	
1.2.	Communications orales	
1.3.	Communications affichées	

- Liste des abréviations -

μ CT	Microtomographie assistée par ordinateur
ν	Coefficient de Poisson
3D	Tridimensionnel
A	Aire
Ac.F	Fréquence d'activation du remodelage osseux (Activation Frequency)
ACE	Exposition annuelle cumulée (Annual Cumulative Exposure)
AFM	Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)
AGE	Produit de glycation avancé (Advanced Glycation End product)
Aj.Ar	Taux d'apposition ajusté (Adjusted Apposition Rate)
ALN / ALN _{LT}	Alendronate / traitement par l'alendronate au long cours (Long-Term)
AMP	Adénosine monophosphate
ATP / Appp	Adénosine triphosphate
Ba ²⁺	Ion baryum
BFR	Taux de formation osseuse (Bone Formation Rate)
BMD	Densité minérale osseuse (Bone Mineral Density)
BMU	Unité multicellulaire de base (Basic Multicellular Unit)
BP / pCp	Bisphosphonate
BRC	Compartiment de remodelage osseux (Bone Remodeling Compartment)
BRU	Unité de remodelage osseux (Bone Remodeling Unit)
BS	Surface osseuse (Bone Surface)
BSU	Unité structurale élémentaire (Bone Structural Unit)
BV	Volume osseux (Bone Volume)
Ca ²⁺	Ion calcium
Cd ²⁺	Ion cadmium
Cl ⁻	Ion chlore
CO ₃ ²⁻	Groupe carbonate
CSM	Mesure continue de la raideur (Continue Stiffness Measurement)
CTX / NTX	Peptides C- ou N- terminal du collagène de type I
DXA	Absorption bi-photonique de rayons X (Dual X rays Absorptiometry)
DMB	Degré de minéralisation osseuse (Degree of Mineralization of Bone)
DPD	Déoxyypyridinoline
E	Module élastique
E*	Module de déformation plane
EMA	Agence Européenne du médicament
F ⁻	Ion fluor
FDA	Food and Drug Administration
FEA	Analyse par éléments finis (Finite Element Analysis)
FPP	Farnésyl diphosphate
FTIR -I ou -M	Imagerie ou Microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier
FWHM	Largeur à mi hauteur (Full Width at Half Maximum)
GGPP	Géranylgéranyl diphosphate
H	Dureté vraie / dureté purement plastique
H ⁺	Ion hydrogène
H _c	Dureté de contact
HI	Index d'hétérogénéité de la minéralisation (Heterogeneity Index)
Hv	Dureté Vickers
i.v.	Intra veineuse

IBN	Ibandronate
IL	Interleukine
IPP	Isopentyl pyrophosphate
IR	Infrarouge
ITT	Intention to treat
K ⁺	Ion potassium
MAR	Taux d'apposition minérale (Mineral Apposition Rate)
Mg ²⁺	Ion magnésium
MLT	Délai de minéralisation (Mineralization Lag Time)
MMA	Méthacrylate de méthyle (Methyl Methacrylate)
MMP	Metalloprotéase matricielle (Matrix Metalloprotease)
MS	Surface en cours de minéralisation (Mineralizing Surface)
NH ₂	Groupe amine
O.Th	Épaisseur du tissu ostéoïde (Osteoid Thickness)
OH ⁻	Groupe hydroxyle
OHX	Animaux ovario- hystérectomisés
ONJ	Ostéonécrose de la mâchoire (OsteoNecrosis of the Jaw)
OPG	Ostéoprotégérine
OVX	Animaux ovariectomisés
P1CP / P1NP	Propeptides d'extension C- ou N- terminal du collagène de type I
Pb ²⁺	Ion plomb
P-C-P	Structure stable contenant caractérisant les bisphosphonates
PEN	Pentosidine
PLA	Placebo
PMOP	Ostéoporose ménopausique (PostMenopausal OsteoPorosis)
PO ₄ ³⁻	Groupe phosphate
PP	Per Protocol
PPi / pOp	Pyrophosphate inorganique
PTH	Hormone parathyroïdienne
PYD	Pyridinoline
Ra ²⁺	Ion radon
RANK / RANK-L	Receptor activator of nuclear factor Kappa B / -Ligand
ROI	Région d'intérêt (Region Of Interest)
S	Raideur (Stiffness)
S.c.	Sous cutanée
SMI	Structure Model Index
Sr ²⁺	Ion strontium
Tb.N / Tb.Sp / Tb.Th	Nombre, séparation et épaisseur trabéculaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TV	Volume de tissu osseux (Tissue Volume)
VOI	Volume d'intérêt (Volume Of Interest)
W.Th	Épaisseur du mur ostéonique (Wall Thickness)
W _{tot} / W _e / W _p	Travail d'indentation total / élastique / plastique
Zn ²⁺	Ion zinc

Avant-propos

L'ostéoporose est une maladie diffuse du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et des altérations microarchitecturales du tissu osseux, conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse et du risque de fracture. Cette pathologie touche davantage les femmes que les hommes. Ainsi, en France, 4 femmes sur 10 atteignant l'âge de la ménopause (soit 2 à 3 millions) et 1 homme sur 5 (près de 800 000) auront une ou plusieurs fractures ostéoporotiques après l'âge de 50 ans. La forme d'ostéoporose la plus fréquente est l'ostéoporose ménopausique. Chez la femme, en plus de la perte osseuse liée à l'âge, la chute des œstrogènes, et notamment de 17β -œstradiol liée à l'entrée en ménopause va initier de profondes modifications du métabolisme osseux, conduisant à une perte de masse osseuse fragilisant l'os. Le squelette adulte est le siège d'un perpétuel renouvellement via le mécanisme de remodelage osseux. Il s'agit d'une balance équilibrée entre la résorption d'un tissu osseux ancien voir endommagé et son remplacement par une matrice osseuse nouvelle au cours de la formation osseuse. Ces différentes étapes sont assurées par des populations cellulaires différentes et sensibles au contexte hormonal. Les modifications hormonales observées au cours de la ménopause vont moduler différentes voies conduisant à un remodelage déséquilibré et accéléré en faveur de la résorption osseuse, aboutissant à une perte de masse osseuse à chaque cycle de remodelage.

Les sites osseux les plus concernés par une fracture ostéoporotique sont le poignet, les vertèbres et la hanche (extrémité supérieure du fémur ou col du fémur). La fracture de hanche est la forme de complication la plus grave de l'ostéoporose et est associée à une morbidité élevée et une réduction de l'espérance de vie de 12 à 20%. Avec le vieillissement de la population, l'incidence des fractures ostéoporotiques et les coûts associés vont prendre une ampleur grandissante. Ainsi, en 2050 le nombre annuel de fractures de hanche pourrait atteindre 150 000 (contre 48 000 aujourd'hui). Même si depuis 40 ans, les connaissances relatives à l'ostéoporose n'ont cessé d'augmenter et ont permis de mieux la comprendre, de mieux la définir et ainsi de mieux la diagnostiquer et la traiter, l'ostéoporose reste une maladie dite silencieuse. La fragilisation du squelette est un événement indolore mais continu, si bien que le diagnostic de l'ostéoporose intervient souvent suite à sa conséquence principale, la fracture. Il était estimé à la fin des années 1990, qu'aux Etats-Unis 77% des femmes ostéoporotiques étaient ni diagnostiquées, ni traitées ; 14% des femmes ostéoporotiques étaient diagnostiquées mais non traitées et seulement 9% des femmes ostéoporotiques étaient diagnostiquées et traitées.

Les stratégies thérapeutiques actuelles visent soit à ralentir la résorption avec des agents anticataboliques, soit à stimuler la formation en utilisant des agents anaboliques ou encore à moduler les deux processus avec des agents mixtes. Les bisphosphonates sont à ce jour les traitements les plus prescrits dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique. Ces agents anticataboliques sont des analogues stables du pyrophosphate inorganique qui présentent une forte affinité pour le minéral osseux, sur lequel ils se fixent, et inhibent le fonctionnement des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Ce processus va aboutir à un ralentissement global du remodelage osseux et prévenir la perte osseuse, en diminuant donc l'incidence des

fractures ostéoporotiques. Cependant, la diminution du risque de fracture, n'est corrélé que modérément avec l'augmentation de la densité minérale osseuse observée sous traitement. Ces résultats ont conduit à penser que la résistance osseuse n'était certainement pas exclusivement expliquée par la masse osseuse, et ainsi a émergé le concept de « qualité osseuse ». Cette dernière décrit les propriétés qualitatives de l'os influençant sa résistance mécanique globale comme la taille, la géométrie, la microarchitecture des os correspondant aux propriétés extrinsèques du tissu osseux. On note aussi dans ce concept l'importance des propriétés intrinsèques qui définissent la qualité des composantes minérales et organiques de l'os, considéré alors comme un matériau fonctionnel multi-échelles.

Il est aujourd'hui suggéré que l'effet des bisphosphonates pourrait être décomposé en un effet positif à l'échelle de l'organe : augmentation de la densité minérale osseuse conduisant à la diminution du risque de fracture ; mais cet effet prépondérant, pourrait « masquer » des altérations de la qualité osseuse tissulaire et sub-tissulaire. L'utilisation de modèles animaux a mis en évidence que l'utilisation de bisphosphonates conduit à une augmentation de la minéralisation, une modulation de la distribution des composants organiques, une homogénéisation de toutes ces propriétés et une accumulation de microdommages. D'un point de vue mécanique, la capacité de l'os à absorber l'énergie avant de rompre est diminuée. Cependant, les modèles animaux utilisés limitent les inférences directes dans le modèle humain. Ainsi, les effets des bisphosphonates sur la qualité osseuse intrinsèque sont peu connus dans le contexte du traitement de l'ostéoporose ménopausique.

En utilisant une approche à l'interface des sciences biologiques et des sciences de l'ingénieur, le but de ce travail de thèse a été d'étudier les modifications de la qualité osseuse intrinsèque liées au traitement par les bisphosphonates chez des femmes souffrant d'ostéoporose ménopausique. Une première étude a eu pour but d'analyser les effets d'un traitement de deux et trois ans par l'ibandronate, sur la minéralisation osseuse et les propriétés micromécaniques tissulaires. L'ibandronate est un bisphosphonate récent dont l'efficacité a permis de développer un régime d'administration avec un délai supérieur à 2 mois entre chaque prise, améliorant ainsi la compliance des patientes au traitement. La deuxième étude a permis d'analyser les effets d'un traitement prolongé (6,4 ans en moyenne) par l'alendronate sur différentes échelles de la composition du tissu osseux. Cette dernière partie permettra d'étudier les relations existant entre les différentes variables de la qualité osseuse et le comportement mécanique du tissu osseux chez des patientes ostéoporotiques non traitées, mais aussi les modulations de ces relations induites par l'alendronate.

PARTIE 1
- Introduction bibliographique -

Partie 1

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre 1

Le tissu osseux humain: un tissu dynamique complexe

1.	Fonctions du tissu osseux.....	18
2.	Anatomie et organisation macroscopique du tissu osseux.....	18
2.1.	Classification des os.....	18
2.2.	Anatomie d'un os long.....	19
2.3.	Anatomie des os irréguliers.....	20
2.4.	Os cortical et os trabéculaire.....	20
3.	Organisation microscopique du tissu osseux.....	21
3.1.	Textures osseuses.....	21
3.2.	Organisation de l'os cortical.....	22
3.3.	Organisation de l'os trabéculaire.....	24
4.	Composition du tissu osseux.....	24
4.1.	Matrice organique osseuse.....	24
4.1.1.	Trame collagénique.....	24
4.1.2.	Protéines non collagéniques.....	27
4.2.	Matrice inorganique osseuse.....	27
4.2.1.	Généralités.....	27
4.2.2.	Composition et structure du minéral osseux.....	28
4.2.3.	Croissance et maturation du cristal d'apatite.....	29
4.2.4.	Caractéristiques principales du cristal d'apatite.....	30
4.2.4.1.	Substitutions ioniques.....	30
4.2.4.2.	Cristallinité.....	31
4.2.5.	Minéralisation osseuse.....	31

4.2.5.1.	Nucléation cristalline.....	32
4.2.5.2.	Minéralisation des unités structurales élémentaires.....	34
4.3.	Cellules osseuses.....	36
4.3.1.	Ostéoclastes et résorption osseuse.....	36
4.3.1.1.	Différenciation et maturation ostéoclastique.....	37
4.3.1.2.	Résorption osseuse.....	38
4.3.2.	Ostéoblastes et formation osseuse.....	40
4.3.2.1.	Différenciation et maturation ostéoblastique.....	40
4.3.2.2.	Formation osseuse.....	40
4.3.3.	Ostéocytes.....	41
4.3.4.	Cellules bordantes.....	42
4.4.	Remodelage osseux.....	43
4.4.1.	Etapes du remodelage osseux.....	43
4.4.2.	Remodelage osseux cortical et trabéculaire.....	45

Chapitre 1

Le tissu osseux humain: un tissu dynamique complexe

1. Fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé qui compose le squelette. Sa fonction la plus évidente est le modelage de la forme extérieure et le soutien du corps par la structure rigide qu'il forme. L'os se présente aussi comme une structure de protection d'autres tissus, ainsi la boîte crânienne protège l'encéphale, les vertèbres la moelle épinière et la cage thoracique les organes du thorax. L'os est aussi inclus dans un système complexe l'associant aux muscles squelettiques par le biais de tendons et est donc indispensable aux mouvements du corps. En effet, c'est l'agencement des pièces osseuses, des muscles et des structures articulaires qui définit les directions et l'amplitude des mouvements réalisables. De part sa composition chimique, le tissu osseux assure la fonction de stockage des minéraux majoritairement du calcium et du phosphore et a donc un rôle primordiale dans l'homéostasie minérale. Finalement, l'os a aussi un rôle dans l'hématopoïèse dans la mesure où chez l'adulte, la multiplication et la différenciation des cellules sanguines s'effectuent exclusivement dans la moelle osseuse (Drüeke et Lacour 1996; Marieb 1999).

2. Anatomie et organisation macroscopique du tissu osseux

2.1. Classification des os

D'un point de vue anatomique, différents types d'os peuvent être distingués dans le squelette : les os longs (fémur, humérus...), les os plats (mandibule, calvaria...) et les os irréguliers, qui ne rentrent pas dans ces catégories (aile iliaque, vertèbre...). Outre leurs différences morphologiques, ces os diffèrent aussi par leur mécanisme d'ossification au cours du développement. En général, les os plats proviennent d'une ossification membranaire alors que les os longs et irréguliers proviennent d'une combinaison d'ossifications endochondrale et membranaire. L'ossification endochondrale implique que l'os se développe sur une ébauche cartilagineuse qui se calcifie et est progressivement remplacée par du tissu osseux. Dans le cas de l'ossification membranaire, l'ossification se fait directement à partir des tissus mésenchymateux environnants, sans précurseurs cartilagineux. Enfin, les os plats et irréguliers se situent principalement dans le squelette axial alors que les os longs sont localisés dans le squelette appendiculaire.

2.2. Anatomie d'un os long

Un os long présente une forme cylindrique appelée diaphyse qui possède à ses deux extrémités une épiphyse (Fig. 1). La diaphyse est constituée d'un os cortical compact très solide qui entoure le canal médullaire. Les épiphyses présentent une corticale plus fine et un tissu osseux formant un réseau de travées appelé os trabéculaire ou spongieux. L'enveloppe externe de l'os est appelée périoste et correspond à une double couche riche en neurofibres, en vaisseaux sanguins et lymphatiques qui pénètrent l'os (Figs. 1 et 2). Dans les endroits où les ligaments et les tendons sont attachés à l'os, on trouve des fibres de collagènes appelées les fibres de Sharpey, elles s'étendent jusqu'à l'intérieur de la matrice pour se fusionner avec les fibres de collagènes présentes dans la matrice. La surface interne de l'os cortical ainsi que l'os trabéculaire sont tapissés par l'endoste (Figs. 1 et 2). Les métaphyses correspondent aux frontières entre la diaphyse et les épiphyses et comprennent le cartilage de conjugaison, indispensable à la croissance des os. La croissance en longueur est initiée par les cellules cartilagineuses, les chondrocytes qui prolifèrent et se différencient en chondrocytes hypertrophiques. Les chondrocytes hypertrophiques vont permettre via la synthèse de collagène de type X et la sécrétion de phosphatase alcaline, la minéralisation du cartilage. C'est ce « cartilage calcifié » qui va être progressivement remplacé par du tissu osseux lamellaire que nous décrirons plus loin dans ce chapitre. Ce mécanisme s'arrête à la fin de la croissance. En revanche, la croissance en diamètre des os longs se poursuit tout au long de la vie grâce à une résorption endostéale à l'intérieur de la diaphyse et d'une apposition osseuse périostée. Ce phénomène est une adaptation mécanique de la forme de l'os à l'amincissement de la corticale liée au vieillissement.

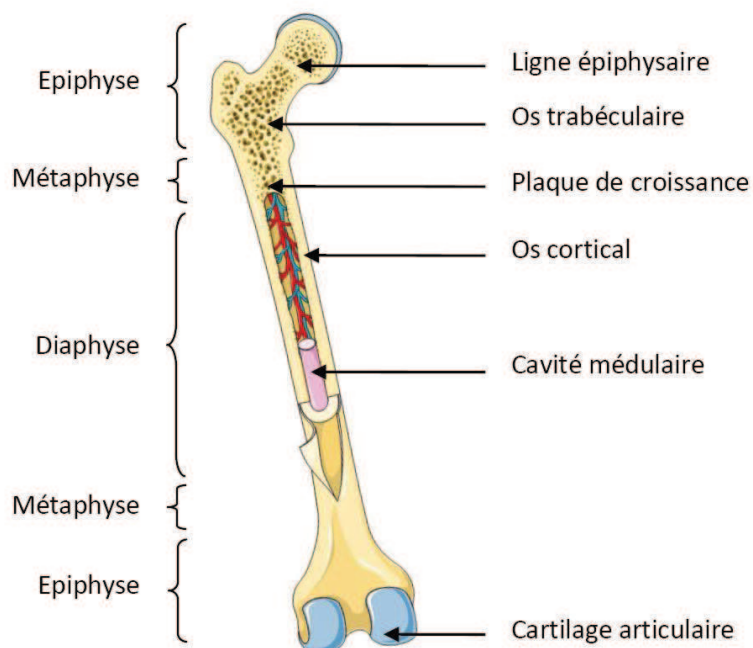


Figure 1 : Schéma d'une portion de coupe longitudinale montrant l'organisation typique d'un os long.

2.3. Anatomie des os irréguliers

Les os irréguliers partagent avec les os plats une anatomie comparable. Ces os sont composés d'une enveloppe corticale compacte renfermant de l'os trabéculaire baigné dans la moelle osseuse. La répartition du périoste et de l'endoste est identique à celle observée dans un os long (Fig. 2).

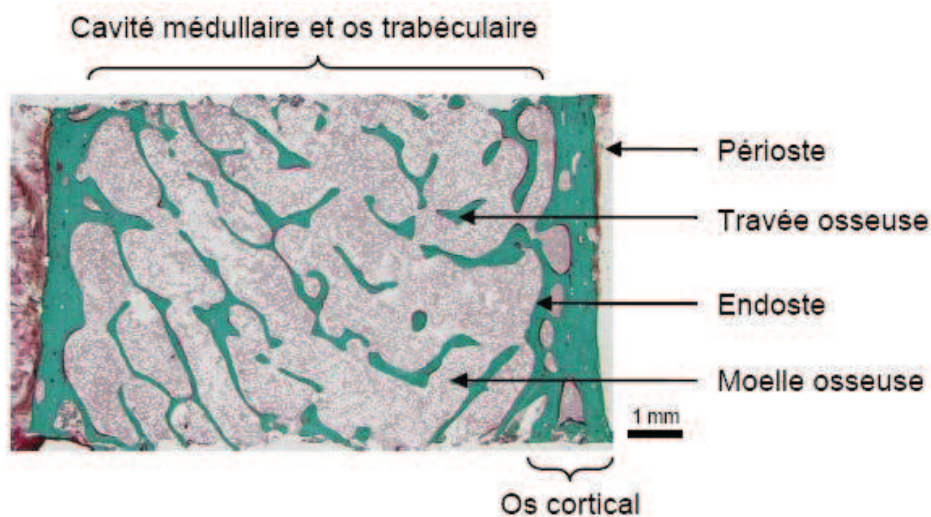


Figure 2 : Coupe d'une biopsie osseuse transiliaque montrant la structure d'un os irrégulier (Coloration : trichrome de Goldner modifié)

2.4. Os cortical et os trabéculaire

L'os cortical est une couche dense et épaisse de tissu minéralisé constituant la partie externe des pièces osseuses. Il entoure la cavité médullaire et l'os trabéculaire. L'os trabéculaire ou spongieux forme un réseau tridimensionnel de travées de tissu osseux qui dans les conditions physiologiques, est dense et bien anastomosé. Les travées osseuses ont une forme de poutre ou de plaque, la proportion de chaque forme diffère selon le site osseux et l'âge de l'individu. Au niveau de la colonne lombaire, chez l'Homme adulte, on note une prédominance de poutres alors que la tête fémorale présente une majorité de plaques (Fig. 3). L'organisation et l'orientation des travées osseuses sont primordiales dans la résistance de l'os et dépendent des contraintes mécaniques auxquelles est soumis l'os (Huiskes *et al.* 2000). Etant donné sa grande surface de contact avec le tissu hématopoïétique et les cellules osseuses, l'os trabéculaire contribue efficacement à l'homéostasie phosphocalcique.

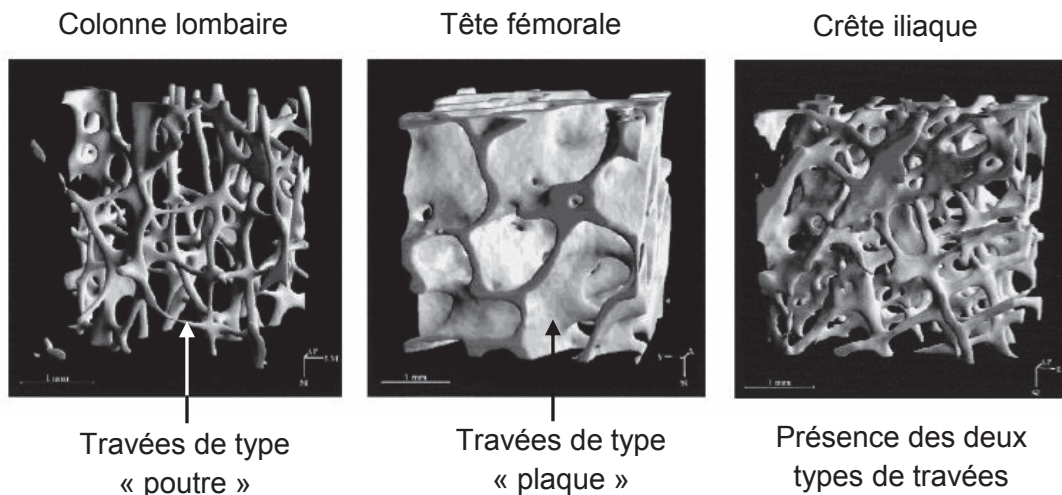


Figure 3 : Répartition des différents types de travées selon les sites osseux à partir de reconstructions 3D obtenues en microtomographie, adapté de (Hildebrand *et al.* 1999).

Chez l'adulte, environ 80% du squelette est composé d'os cortical et 20% d'os trabéculaire. Cependant, la proportion relative de ces deux types d'os varie en fonction des pièces squelettiques, par exemple, le ratio os cortical : os trabéculaire est de 20:75 pour la vertèbre, 50:50 dans la tête fémorale et de 95:5 dans la diaphyse du radius (Dempster 2006).

3. Organisation microscopique du tissu osseux

3.1. Textures osseuses

On distingue deux types de textures osseuses : l'os fibreux ou « woven bone » et l'os lamellaire (Fig. 4). L'os fibreux est constitué de grosses fibres de collagène disposées de manière anarchique. Ce type de tissu est retrouvé au niveau de l'os fœtal. Il est absent chez l'adulte à l'exception des osselets de l'oreille moyenne et dans les cas où la formation de tissu osseux est très rapide, comme dans le cal de réparation d'une fracture ou dans un contexte pathologique comme la maladie osseuse de Paget, ou encore certaines métastases ostéocondensantes. Ce tissu, de faible résistance mécanique est normalement transitoire et est remplacé par de l'os lamellaire mieux organisé.

L'os lamellaire est constitué de fibres de collagène disposées en lamelles. Au sein d'une lamelle, les fibres sont parallèles entre elles mais forment des angles variables proches de 90° avec les fibres des lamelles adjacentes. Cette organisation rend le tissu osseux lamellaire mécaniquement plus résistant et présente un aspect biréfringent caractéristique en microscopie optique sous lumière polarisée (Fig. 4).

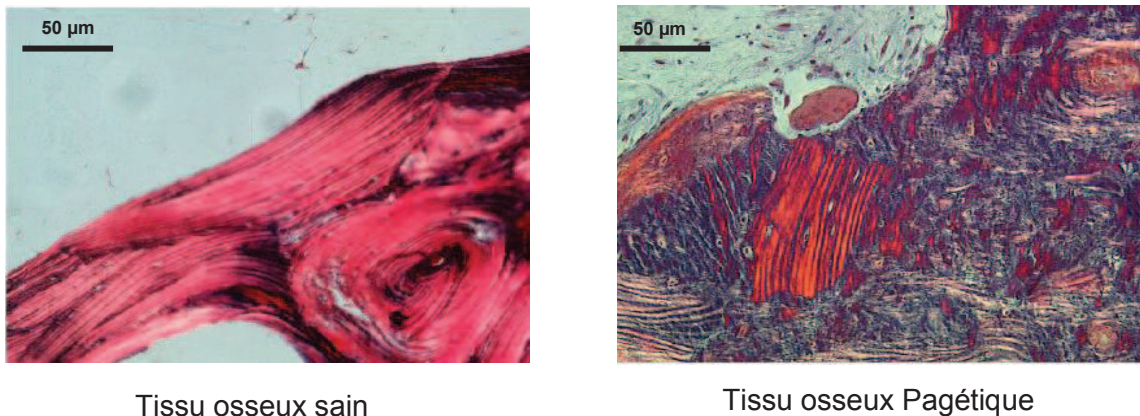


Figure 4 : Observation microscopique des différentes textures osseuses : os lamellaire chez un sujet sain et territoires d'os tissé chez un patient souffrant de la maladie osseuse de Paget (coupes histologiques observées en lumière polarisée / coloration : Solochrome cyanine R).

3.2. Organisation de l'os cortical

L'os cortical est composé à l'échelle microscopique d'un ensemble d'unités structurales élémentaires (BSU pour Bone Structural Units) qui correspondent à des lamelles concentriques de 4 à 10 μm d'épaisseur organisées autour d'un canal de Havers dans lequel circulent des vaisseaux sanguins. Les canaux de Havers sont reliés par d'autres canaux transversaux appelés canaux de Volkman. Une unité constituée d'un canal de Havers et de ses lamelles osseuses est appelé ostéon ou système de Havers et correspond, comme nous le verrons plus loin, au résultat d'un cycle de remodelage. Un système de Havers est donc une structure cylindrique de plusieurs millimètres de long et de 100 à 300 μm de diamètre. Entre les lamelles d'un ostéon, il y a des lacunes ostéocytaires qui correspondent à des logettes dans lesquelles les ostéocytes, un type cellulaire spécifique du tissu osseux, s'emmurent lors de la formation du tissu osseux. De nombreux auteurs ont montré qu'il pouvait exister plusieurs modèles pour décrire l'organisation des différentes lamelles au sein des ostéons (Ascenzi et Bonucci 1967; Giraud-Guille 1988; Ascenzi et Lomovtsev 2006; Skedros *et al.* 2006) rappelant la structure du bois contreplaqué ou « rotative plywood » (Fig. 5).

La lamelle périphérique d'un ostéon est appelée ligne cimentante, son épaisseur est généralement inférieure à 5 μm . Le rôle et la composition de cette structure restent controversés. La ligne cimentante a été décrite comme hyper- (Amprino et Engstrom 1952; Skedros *et al.* 2005) ou hypominéralisée (Schaffler *et al.* 1987; Burr *et al.* 1988). Dans les deux cas, la ligne cimentante est considérée comme une interface aux propriétés mécaniques particulières entre le BSU et le tissu environnant. Elle pourrait avoir un rôle dans la résistance osseuse aux forces de flexion en atténuant ou stoppant la propagation des microfissures (Boyce *et al.* 1998; Yeni et Norman 2000). Dans l'os cortical, les ostéons sont environnés de tissu osseux interstitiel qui correspond à des ostéons rémanents partiellement remodelés (Fig. 6).

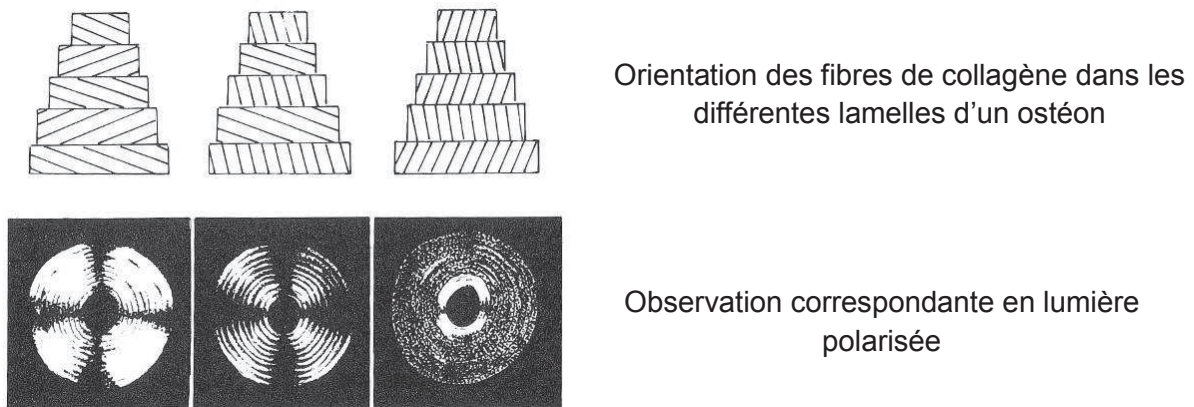


Figure 5 : Description de trois modèles d'organisation des fibres de collagène entre les différentes lamelles d'un ostéon déduite de l'observation microscopique en lumière polarisée, adapté de (Ascenzi et Bonucci 1967; Giraud-Guille 1988; Martin *et al.* 1998).

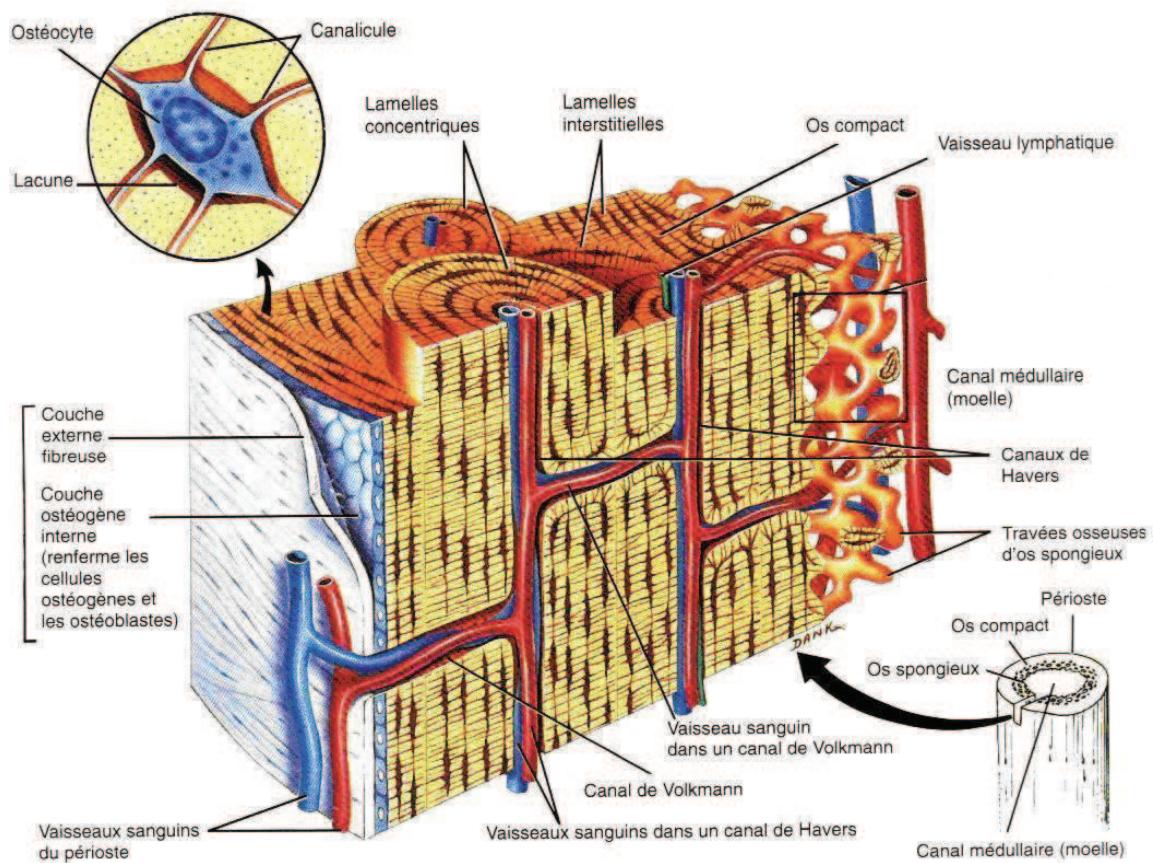


Figure 6 : Schéma représentant la macrostructure et la microstructure de l'os cortical ainsi que l'organisation et la position des ostéocytes dans ce tissu, adapté de (Tortora et Grabowski 2000).

3.3. Organisation de l'os trabéculaire

L'os trabéculaire est organisé en un réseau tridimensionnel dense de travées osseuses bien anastomosées. A l'échelle microscopique le fruit du remodelage osseux trabéculaire est appelé paquet osseux et correspond à des lamelles de tissu osseux superposées en arc de cercle et séparées de l'os interstitiel par une ligne cimentante. La structure d'un paquet osseux rappelle celle d'un ostéon cortical mais « ouvert » sur la moelle osseuse (Fig. 7).

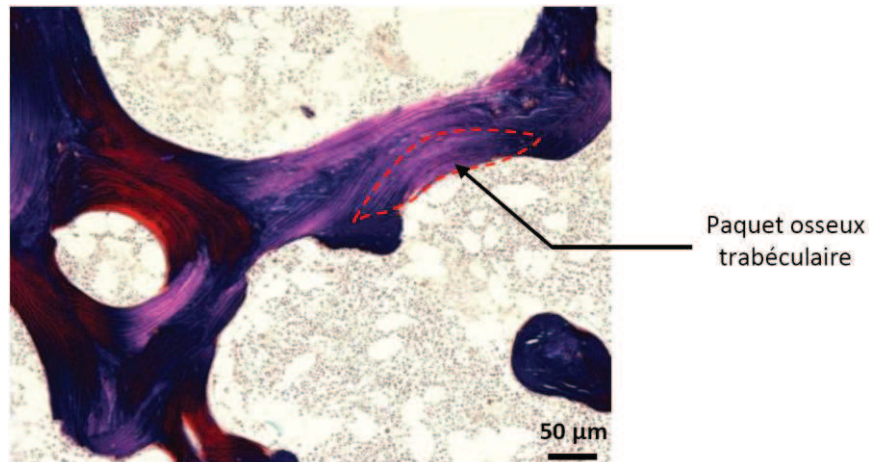


Figure 7 : Coupe d'une biopsie osseuse transiliaque montrant l'organisation de l'os trabéculaire (coupe histologique observée en lumière polarisée / Coloration : solochrome cyanine R).

4. Composition du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé, décrit comme un matériau composite dont la matrice extra cellulaire est composée d'une matrice organique (30-35%) majoritairement collagénique, d'une phase inorganique ou minérale (65%) et d'eau (5-10%). Ces composantes confèrent au tissu osseux des fonctions mécaniques et métaboliques propres.

4.1. Matrice organique osseuse

4.1.1. Trame collagénique

Le collagène représente 90% de la matrice organique du tissu osseux, et confère au tissu osseux sa ductilité, autrement dit sa capacité à absorber de l'énergie sans rompre. Dans l'os, le collagène de type I est le plus largement représenté. Appelé aussi collagène fibrillaire, le collagène de type I est un hétérotrimère composé de trois Chaînes polypeptidiques, 2 chaînes de type $\alpha(1)$ et une chaîne $\alpha(2)$ (Van der Rest et Garrone 1991). Chaque chaîne porte la répétition du

triplet d'acides aminés (Gly-X-Y)_n ou X correspond fréquemment à la proline et Y à l'hydroxyproline. Cet assemblage de trois chaînes est appelé procollagène et possède une structure en triple hélice dont les dimensions sont approximativement de 300 nm de longueur et de 1,5 nm de diamètre. Le procollagène est assemblé à partir de l'enroulement des trois chaînes α de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale dans le réticulum endoplasmique granuleux de cellules osseuses spécialisées appelées ostéoblastes. Les molécules de procollagène sont ensuite excrétées dans le milieu extracellulaire par des vésicules de sécrétion dans lesquelles vont débiter des modifications post-traductionnelles. Une fois excrétées, les propeptides C et N terminaux sont excisés par des protéinases, le procollagène est alors appelé tropocollagène. Le propeptide N-terminal du collagène de type I ou P1NP est relargué dans la circulation et peut être dosé dans le sérum comme marqueur biologique de la formation osseuse. Ces fibrilles de tropocollagène s'associent ensuite pour former les fibres de collagène avec une périodicité axiale de 67 nm (Fig. 8). Cette périodicité donne aux fibres de collagène l'apparence de bandes claires et sombres en microscopie électronique, d'où le nom de « bandes à trous » (Fig. 9). Les fibres de collagène sont stabilisées par des molécules de pontage intra- et interfibrillaires appelées « crosslinks » ou liaisons croisées du collagène qui contribuent à la résistance mécanique de ces fibres.

L'étape initiale de formation de ces liaisons covalentes est catalysée par l'action de la lysyl oxydase (Smith-Mungo et Kagan 1998). Cette réaction conduit dans le tissu osseux à la formation de résidus allysine et hydroxyallysine au niveau des télépeptides. Ce sont ces résidus qui vont réagir pour former des molécules de pontage divalentes immature qui sont l'hydroxylysino-norleucine (HLNL) et dihydroxylysino-norleucine (DHLNL). Les précurseurs de l'HLNL et de la DHLNL peuvent aussi réagir pour former des molécules de pontage trivalentes plus stables comme la pyridinoline (PYD) et la désoxypyridinoline (DPD) (Viguet-Carrin *et al.* 2006a). La matrice organique du tissu osseux contient aussi en faible quantité d'autres types de collagène, notamment de types III et V qui pourraient moduler le diamètre des fibrilles (Gehron Robey et Boskey 2006).

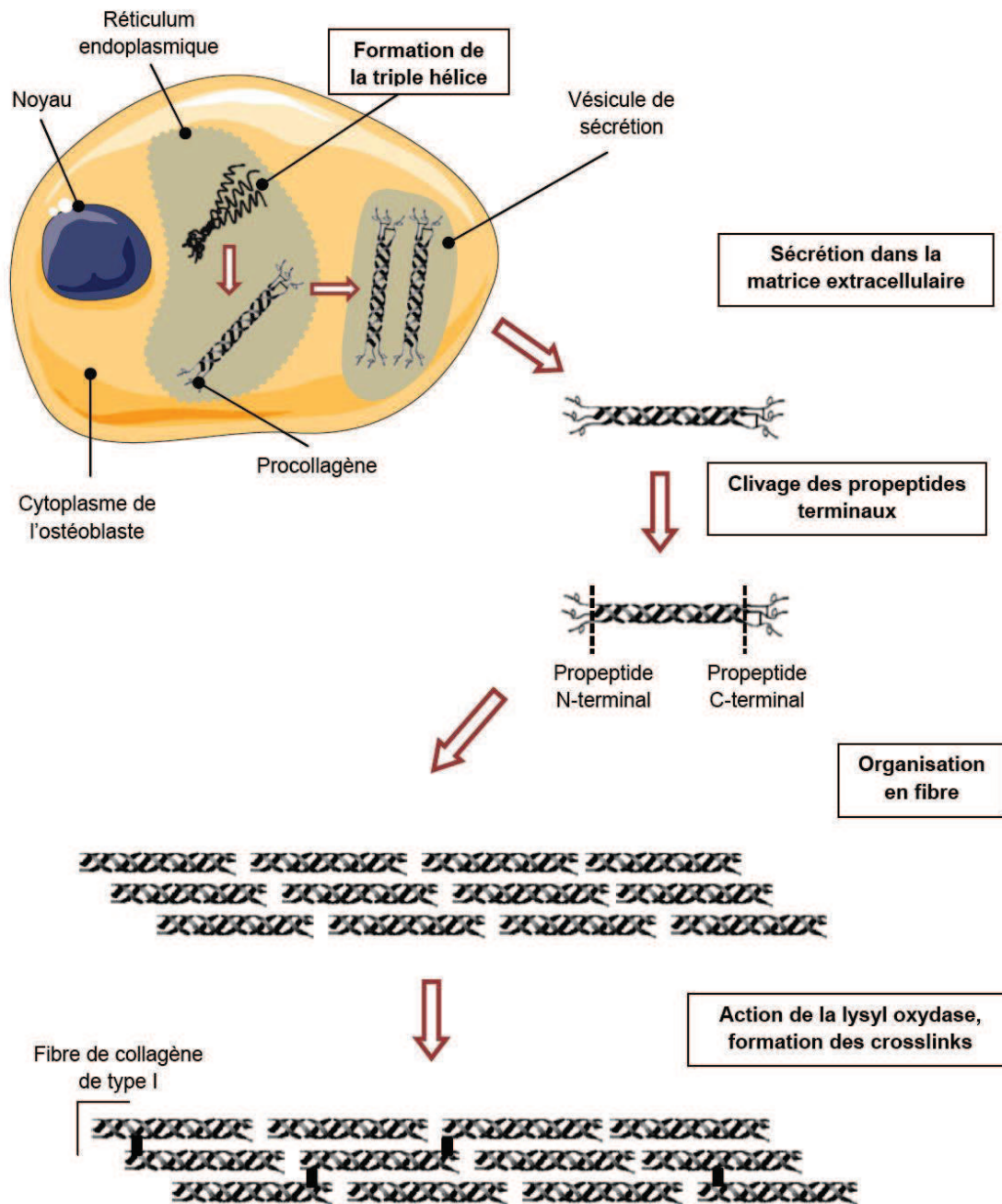


Figure 8 : Schéma représentant les différentes modifications post traductionnelles et l'assemblage des fibres de collagène de type I, adapté de (Myllyharju et Kivirikko 2004).

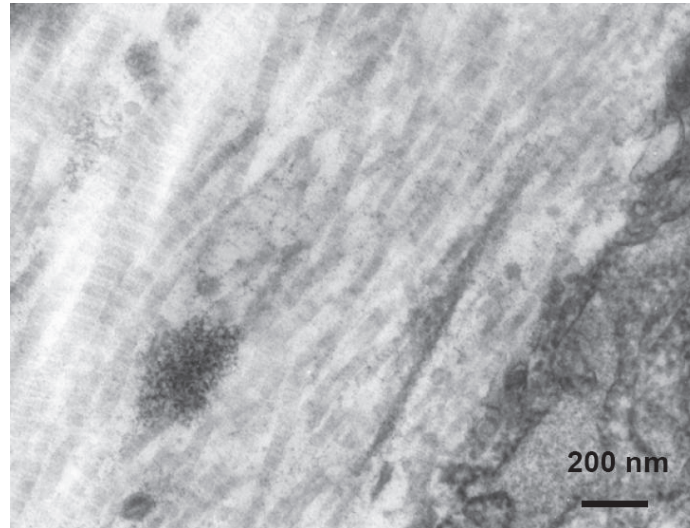


Figure 9 : Striation périodique des fibres de collagène observée en microscopie électronique à transmission (prélèvement de tibia de rat).

4.1.2. Protéines non collagéniques

La matrice organique osseuse est aussi composée de protéines non collagéniques, principalement l'ostéocalcine (Ducy *et al.* 1996) et l'ostéonectine (Delany *et al.* 2000). L'ostéocalcine appartient à la famille des Gla-protéines (résidus glutamates carboxylés en position γ) et régule l'activité des ostéoclastes et de leurs précurseurs. L'ostéocalcine pourrait aussi avoir un rôle dans le contrôle du passage de la phase de résorption à la phase de formation au cours du remodelage osseux. L'ostéonectine est une glycoprotéine impliquée dans la régulation de la genèse des fibres de collagène et c'est un régulateur positif de la formation osseuse. Cependant d'autres protéines comme l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse (Ogata 2008), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycannes (Lamoureux *et al.* 2007), des cytokines et des facteurs de croissance (Canalis 2009) sont incorporés dans la matrice osseuse. Ces protéines font de la matrice organique une structure dynamique et fonctionnelle (Malaval 2008).

4.2. Matrice inorganique osseuse

4.2.1. Généralités

La matrice inorganique est un déterminant majeur de la résistance mécanique osseuse mais aussi de la fonction protectrice de l'os en rigidifiant le tissu osseux. De plus, la minéralisation osseuse possède un rôle prépondérant dans l'homéostasie minérale de l'organisme.

La matrice inorganique constitue une banque de minéraux concentrant 99% du calcium, 85% du phosphore, 80% des carbonates et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium de l'organisme (Glimcher 1990). Cette activité métabolique intense est aussi rendue possible par la grande surface spécifique du minéral osseux de l'ordre de 100 à 200 m²/g. Les premières descriptions de la structure du minéral osseux datent de la première moitié du XX^e siècle (DeJong 1926; Roseberry *et al.* 1931). Ces auteurs ont mis en évidence grâce à des techniques de diffraction des rayons X que la matrice osseuse inorganique correspondait à des composés phosphocalciques cristallisés sous forme d'apatite. Il a été ensuite montré que l'apatite osseuse pouvait se présenter sous des formes diverses telle que des plaques, des filaments ou encore des aiguilles. De plus, leur taille aussi peut être d'une grande variabilité : de 20-50 Å d'épaisseur, 100-200 Å de largeur et 200 à 600 Å de longueur. Contrairement aux apatites parfaites, l'apatite osseuse est faiblement cristalline et non stœchiométrique, caractérisée par la présence de nombreux ions « étrangers » à la formule théorique. Ainsi, l'apatite osseuse peut renfermer des ions comme le fluor, le strontium, le magnésium, le plomb ou encore le baryum... L'apatite osseuse étant non stœchiométrique, des substitutions sont possibles entre les éléments de sa structure et de son environnement, un mécanisme essentiel dans son processus de maturation.

4.2.2. Composition et structure du minéral osseux

L'apatite osseuse est généralement représentée par la formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Un cristal de minéral osseux est constitué de la répétition d'une unité de base appelée maille élémentaire. La maille élémentaire est formée d'une quarantaine d'atomes et sa répétition dans les trois dimensions constitue un réseau cristallin agencé dans un système hexagonal (Fig. 10). Les 10 atomes de calcium occupent des sites distincts notés Ca I et Ca II qui forment des structures géométriques particulières autour des ions hydroxydes, un triangle pour les Ca II et un hexagone pour les Ca I (Fig. 10). Ces deux types de sites peuvent accueillir par incorporation différents ions, des petits au niveau des Ca I (Cd^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+}) et des plus gros au niveau des Ca II (Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+}) (Li *et al.* 2007).

L'observation *in vitro* de cristaux d'apatite synthétiques en suspension a permis de caractériser quatre compartiments. Le premier est le fluide environnant dans lequel baigne le cristal. Le second correspond à la couche hydratée qui constitue la partie non apatitique du cristal, indissociable du cristal d'apatite, elle contient de nombreux ions très labiles et réactifs. Sur le plan théorique, tous les ions du fluide environnant sont susceptibles de pénétrer la couche hydratée mais avec des profondeurs différentes qui vont définir la possibilité de s'échanger avec la surface du cristal. Le troisième compartiment correspond à la surface du cristal et le quatrième au cœur apatitique. Ce sont les échanges d'ions entre ces différents compartiments qui rendent possibles la maturation et la croissance des cristaux du minéral osseux (Boivin 2007).

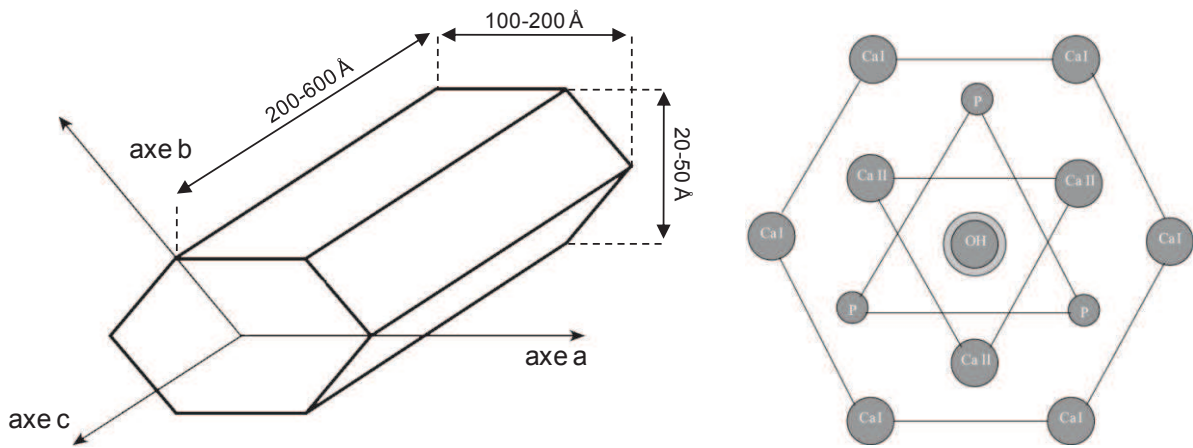


Figure 10 : Représentation et dimensions du cristal d'apatite avec ses trois axes de croissance (à gauche, adaptée de (Boivin 2007)). Structure cristalline de l'hydroxyapatite montrant les deux sites de fixation du calcium (à droite, adapté de (Li *et al.* 2007)).

4.2.3. Croissance et maturation du cristal d'apatite

La croissance d'un cristal d'apatite est tout d'abord liée à la présence d'eau dans la matrice osseuse. En effet, pour augmenter sa taille, le cristal est tributaire de la diffusion des ions constitutifs du milieu. Si le contenu en eau est trop bas, les ions ne diffusent plus, les échanges ioniques sont alors impossibles et la croissance du cristal cesse. La conséquence de cette nécessité en eau est un arrêt de la minéralisation à 95% de son niveau maximal théorique. L'espace restant étant occupé par l'eau résiduelle dont la quantité est insuffisante pour que les cristaux poursuivent leur croissance (Boivin 2007).

Le mécanisme de croissance du cristal d'apatite osseuse implique des échanges d'ions et de groupements protéiques chargés entre les différents compartiments du cristal. Les premiers échanges se font entre le fluide environnant et la couche hydratée du cristal. La couche hydratée contient de nombreux ions labiles, facilement échangeables et permet de maintenir l'électroneutralité entre le cœur apatitique et le fluide environnant qui favorise la nucléation. La présence d'environnements labiles est une caractéristique propre des apatites faiblement cristalline (biologique ou de synthèse) qui n'est pas retrouvée dans les apatites bien cristallisées (Rey *et al.* 1990; Rey *et al.* 1991a; Rey *et al.* 1991b; Cazalbou *et al.* 2004; Cazalbou *et al.* 2005). Ce sont ensuite les échanges d'ions entre la couche hydratée et le cœur apatitique qui vont permettre la croissance du cristal dans ses axes a, b et c (Cazalbou *et al.* 2004; Rey *et al.* 2009; Farlay *et al.* 2010) (Fig. 11). Ainsi, au cours de la maturation physiologique, le domaine apatitique va croître au dépend du domaine non apatitique, ce phénomène peut être quantifié en mesurant le rapport d'un élément comme le PO_4 , dans ces deux domaines par microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (ou FTIRM pour Fourier Transform Infrared Microspectroscopy) (Farlay *et al.* 2010). Un os nouvellement formé ou jeune présentera un

rapport PO_4 du domaine apatitique / PO_4 du domaine non apatitique faible mais qui va augmenter avec la maturation. Finalement, au cours de la maturation du minéral, le domaine non apatitique (*i.e.*, la couche hydratée) décroît, la réactivité de surface du cristal et les échanges ioniques diminuent.

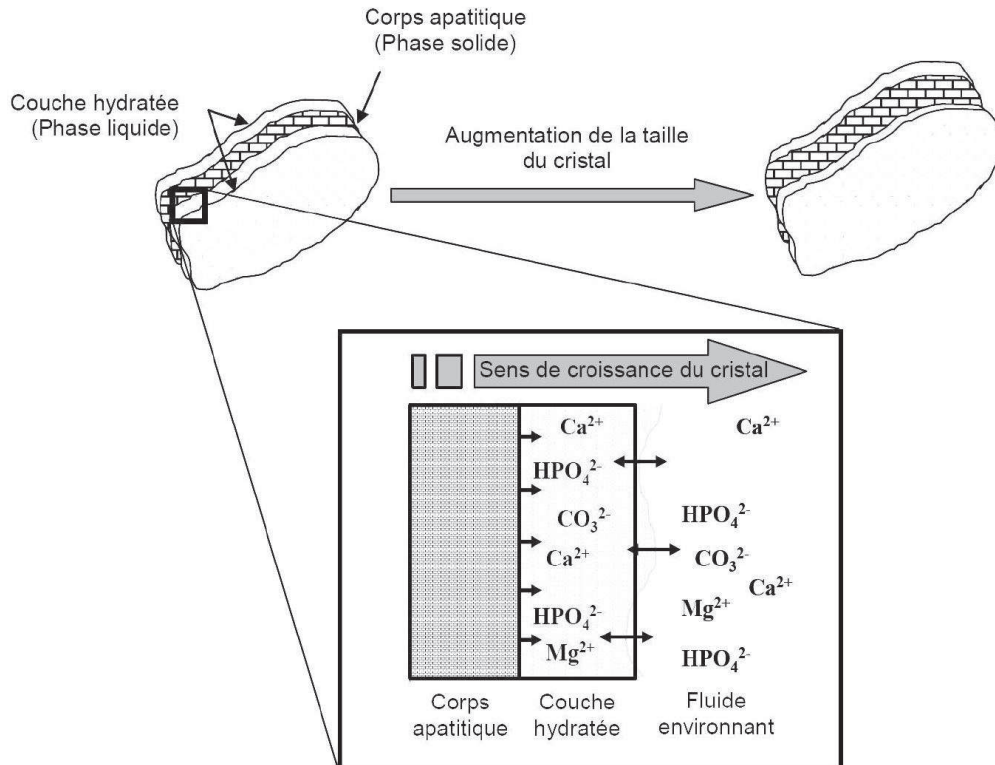


Figure 11 : Schéma représentant les échanges ioniques intervenant entre les différents compartiments du cristal au cours de sa maturation, adapté de (Rey *et al.* 2009; Farlay *et al.* 2010).

4.2.4. Caractéristiques principales du cristal d'apatite

4.2.4.1. Substitutions ioniques

Des ions constituant la substance minérale peuvent être remplacés par d'autres de rayon comparables. Ces ions n'induisent que des modifications mineures de la forme des cristaux et n'affectent pas leur structure. Comme nous l'avons précédemment vu, ces échanges interviennent au cours de la croissance et de la maturation du cristal au sein de la couche hydratée. Ils peuvent aussi se produire dans des cristaux matures existants, que ce soit à leur surface ou, au niveau du cœur apatitique. Certains cations de charge ou de taille comparables à celle du Ca^{2+} comme le Sr^{2+} ou le Na^+ peuvent lui être substitués. D'autres, qui ne sont pas substituables au Ca^{2+} dans le domaine apatitique, comme le Ra^{2+} , Mg^{2+} ou encore le K^+ le sont facilement avec les Ca^{2+} de la surface des cristaux (Posner 1985). De telles substitutions conduisent à des modifications des axes *a* et *c* de la maille élémentaire. Les substitutions impliquant des ions de plus petite taille que

celle du Ca^{2+} , comme le Mg^{2+} , ne sont que partielles. Plus généralement, le Ca^{2+} peut être plus facilement substitué par des ions de rayon ionique supérieur et moins fréquemment par des ions plus petits (Blumenthal 1990). Il existe aussi autour de la surface des cristaux des substitutions anioniques bien caractérisées. Certaines de ces substitutions peuvent être irréversibles, comme dans le cas de la substitution d'un OH^- par un F^- qui aboutit à la formation d'un composé plus stable. En effet, les ions F^- sont d'avantages comparables aux ions Ca^{2+} que ne le sont les ions OH^- et les liaisons électrostatiques sont plus fortes entre les ions Ca^{2+} et F^- qu'entre les ions Ca^{2+} et OH^- . L'apatite osseuse peut aussi contenir des carbonates sous la forme de CO_3^{2-} qui peuvent se substituer aux PO_4^{3-} ou aux OH^- . Il a été montré que l'incorporation de CO_3^{2-} modifiait les paramètres de la maille cristalline (Boivin 2007).

4.2.4.2. Cristallinité

La cristallinité est un paramètre qui décrit le degré d'organisation d'un cristal, *i.e.*, l'arrangement des ions dans la maille cristalline. Ce paramètre peut être apprécié par des techniques classiques de cristallographie comme la diffraction des rayons X, mais aussi par des techniques de spectroscopie vibrationnelle comme la FTIRM (Paschalis *et al.* 1996; Farlay *et al.* 2010). Même si ce paramètre augmente au cours de la maturation physiologique du minéral osseux, maturation et cristallinité sont à distinguer (Bala *et al.* 2010b; Farlay *et al.* 2010). Dans un cristal jeune, le domaine apatitique réduit et mal organisé conduit à une cristallinité faible qui va augmenter conjointement avec la maturation du minéral. Cependant, la cristallinité peut être modifiée par la présence d'ions étrangers comme les carbonates, qui conduisent à sa diminution (Blumenthal *et al.* 1975; Legeros 1981), ou le fluor qui l'augmente (Fratzl *et al.* 1994; Farlay *et al.* 2010). Une cristallinité élevée n'est pas automatiquement associée à une amélioration de la qualité de l'os. Il a été montré qu'une cristallinité élevée pouvait être associée à un os « cassant », favorable à l'initiation de microfissures (Burr 2003).

4.2.5. Minéralisation osseuse

La minéralisation du tissu osseux représente le dépôt d'une substance minérale au sein d'une matrice organique extracellulaire. Chez l'Homme, il s'agit généralement d'une calcification, c'est-à-dire du dépôt de phosphate de calcium dans la matrice organique, encore appelée tissu ostéoïde. Au cours de l'ostéogenèse, cette calcification conduit à la formation d'os à partir d'une matrice protéique aux formes et dimensions spécifiques. Le terme minéralisation regroupe différents mécanismes intervenant à différents stades du développement du tissu osseux depuis les premières étapes de la nucléation cristalline jusqu'à la minéralisation progressive des unités structurales élémentaires formées au cours du remodelage osseux.

4.2.5.1. Nucléation cristalline

La nucléation d'un cristal se produit grâce à l'énergie dérivée de la saturation des réseaux ioniques dans une solution. Lorsque cette énergie est totalement dérivée de la saturation ionique,

on parle de nucléation homogène. Dans le cas du minéral osseux la nucléation est hétérogène, autrement dit, la formation du premier germe de cristallisation se fait à la surface de particules étrangères (Glimcher 1984). Dans l'os, deux sites de nucléation hétérogène ont été décrits: les vésicules matricielles et les bandes à trous des fibres de collagène. Les meilleurs agents de nucléation étant les cristaux eux-mêmes, ils induisent alors la formation de nouveaux cristaux par un mécanisme appelé nucléation secondaire. Dès que le mécanisme de nucléation est réalisé, les cristaux vont croître jusqu'à ce qu'ils atteignent leur taille et leur forme définitives.

Les vésicules matricielles sont des petites structures extracellulaires, issues du bourgeonnement des chondrocytes ou des ostéoblastes (0,1 à 0,2 μm de diamètre) et délimitées par une membrane trilaminaire classique (bicouche phospholipidique). Dans le système osseux, elles sont retrouvées dans les zones qui se minéralisent comme la plaque de croissance, l'os en cours de développement et les cals de fractures. Elles contiennent une solution métastable d'ions phosphate et calcium ainsi que de nombreuses protéines, lipides et enzymes qui permettent l'initiation de la minéralisation (phosphatases alcalines, pyrophosphatases, peptidases et protéases). Les premiers cristaux d'apatite sont observés à l'intérieur des vésicules matricielles, en association avec la face interne de la membrane qui contient des éléments organiques favorisant le passage de la phase liquide à la phase solide (Fig. 12). A proximité du front de minéralisation, l'augmentation du nombre et de la taille des cristaux produisent la rupture de la vésicule. Les cristaux vont alors envahir les interstices de la trame collagénique. Suite à ce dépôt initial, la calcification va se propager par nucléation secondaire, où les premiers cristaux servent de site de nucléation pour les suivants.

Le deuxième site de nucléation hétérogène correspond aux bandes à trous des fibres de collagène. Le terme « bande à trous » décrit une partie moins riche en acides aminés liée au décalage des fibrilles de collagène les unes par rapport aux autres (voir Fig. 8). Dans ce cas, la calcification des vésicules matricielles n'est pas une étape préalable indispensable. Dans ce site de nucléation ce sont les interstices de la « bande à trous » et la distribution stéréochimique et électrochimique des groupes des Chaînes latérales qui favorisent la nucléation à partir d'une solution métastable de phosphate et de calcium. Les cristaux vont envahir ces « trous » puis les espaces longitudinaux inter fibrillaires et finalement recouvrir l'intégralité des fibres de collagène (Fig. 13). Suite à cette nucléation initiale, la propagation de la minéralisation se fait ensuite par nucléation secondaire.

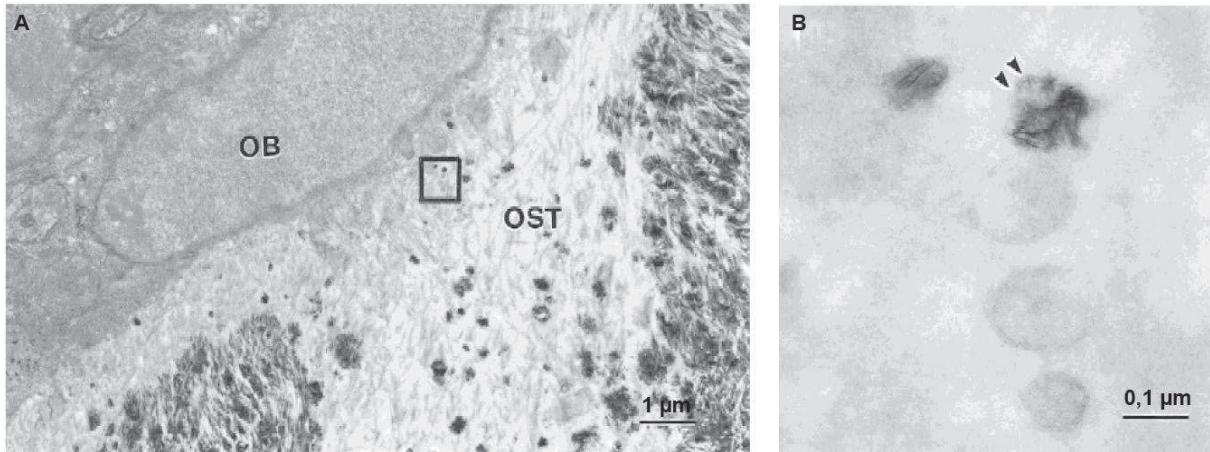


Figure 12 : Micrographies électroniques de tissu osseux montrant A) un ostéoblaste (OB) synthétisant une matrice ostéoïde (OST) et la présence de vésicules matricielles contenant des cristaux d'apatite osseuse (B=agrandissement du champ encadré en A, adapté de (Hoshi et Ozawa 2000)).

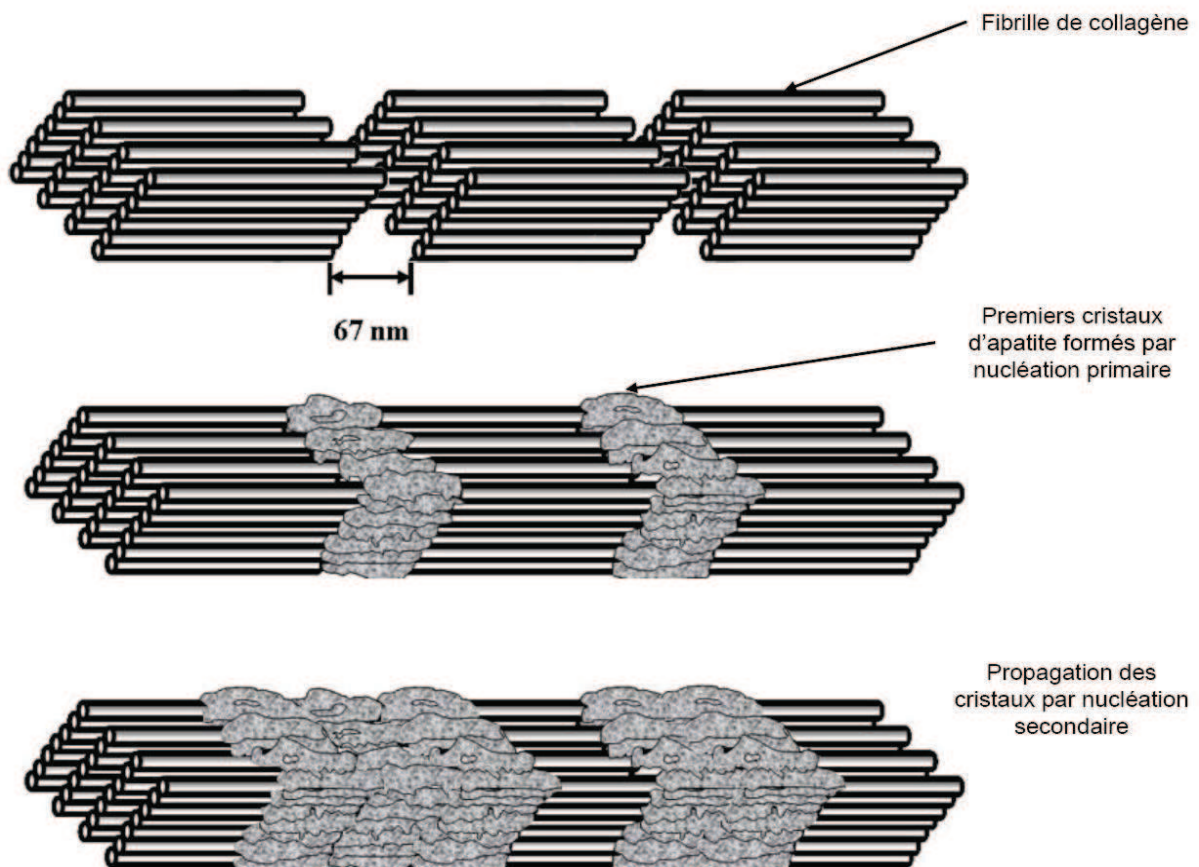


Figure 13: Schéma représentant la nucléation et la propagation du minéral osseux dans les bandes à trous du collagène, adapté de (Landis 1979)

4.2.5.2. Minéralisation des unités structurales élémentaires

Les mécanismes de nucléations initiales décrits dans le paragraphe précédent concernent la formation des premiers cristaux de minéral au cours de l'ossification primaire. Faisant suite au modelage qui se poursuit jusqu'à la fin de la croissance. Le tissu osseux, chez l'adulte est le siège d'un remodelage permanent. Ce mécanisme de remodelage implique différents types de cellules spécifiques du tissu osseux et consiste à résorber une matrice osseuse « ancienne » et à combler cette résorption avec une étape de formation. La formation osseuse se réalise en deux temps, tout d'abord, l'espace résorbé est comblé par une matrice organique néosynthétisée. Ensuite, cette matrice se minéralise par nucléation secondaire où les nouveaux cristaux se forment au contact de ceux de la matrice calcifiée sous-jacente. Le remodelage osseux sera développé dans un paragraphe suivant.

La minéralisation du tissu ostéoïde synthétisé au cours d'un cycle de remodelage osseux est un phénomène biphasique. Elle débute par le dépôt rapide (< à 100 jours) de minéral par nucléation secondaire au niveau du front de minéralisation, c'est la minéralisation primaire qui correspond au dépôt de 50 à 60% de la charge minérale maximale du tissu osseux. Le front de minéralisation peut être identifié par des marqueurs vitaux qui se fixent spécifiquement au minéral en cours de formation, et qui émettent une fluorescence sous illumination ultraviolette (tétracyclines, calcéïne, alizarine...). Le traitement séquentiel avec un marqueur vital est à la base de l'histomorphométrie dynamique et permet de calculer le taux de remodelage osseux, mais aussi la vitesse de la minéralisation (Fig. 14).

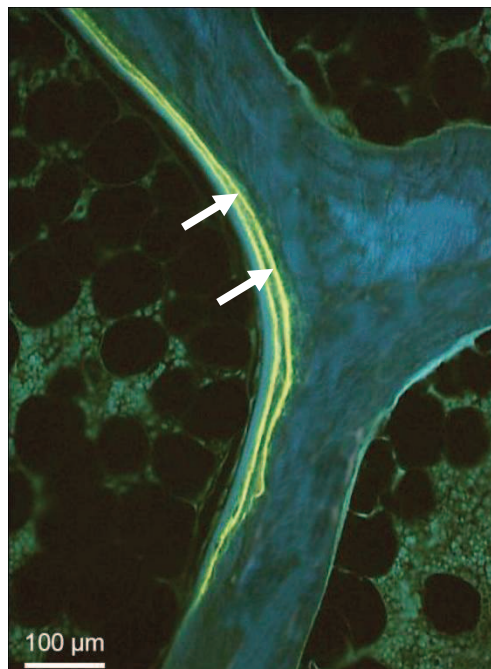


Figure 14: Coupe histologique de tissu osseux observée sous lumière ultraviolette permettant la visualisation d'un double marquage par les tétracyclines (flèches blanches). Chaque marque fluorescente révèle le front de minéralisation actif au moment où la dose de tétracycline a été administrée.

Suite à la minéralisation primaire, la phase de minéralisation secondaire débute. Il s'agit d'une étape lente et progressive d'augmentation du nombre, de la taille et de la perfection des cristaux (Fig. 15). La durée précise de la minéralisation secondaire n'est pas connue chez l'homme mais l'utilisation de modèles mathématiques prédictifs décrit une étape pouvant durer de quelques mois à plusieurs années. L'activité du remodelage osseux est un déterminant majeur de la charge minérale maximale que peut atteindre le tissu osseux. En effet, un taux de remodelage élevé augmente la probabilité qu'une unité de remodelage soit résorbée avant qu'elle ait complété sa minéralisation et inversement.

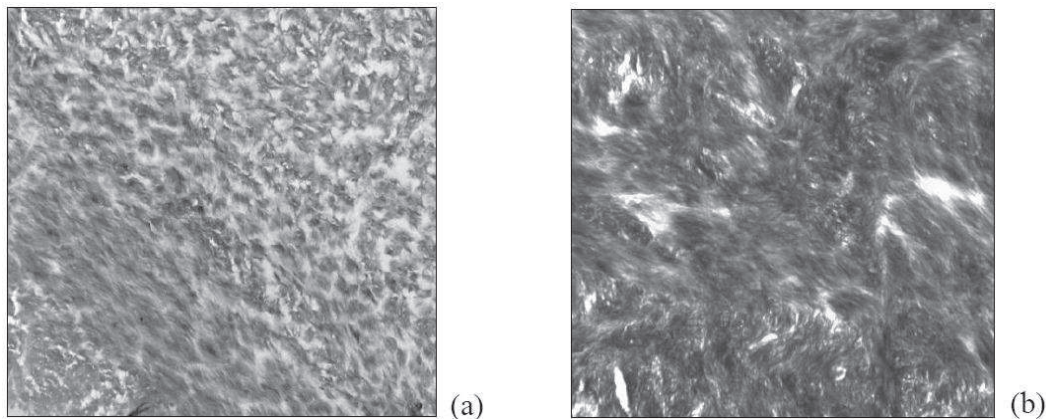


Figure 15: Micrographies électroniques d'un champ de tissu osseux de même dimension observé au cours des minéralisations primaire (a) et secondaire (b) illustrant l'augmentation du nombre et de la taille des cristaux (Georges Boivin, INSERM U1033 équipe « Qualité Osseuse et Marqueurs Biologiques », Lyon, France).

Si la durée de la minéralisation secondaire n'est pas connue chez l'homme, elle a été récemment étudiée chez la brebis âgée (Bala *et al.* 2010b). Le tissu osseux de ce modèle animal présente de nombreuses similitudes histologiques et métaboliques avec le tissu osseux humain. Les deux espèces partagent le même mécanisme de remodelage osseux avec une fréquence d'activation comparable. De plus, la brebis répond de manière similaire à certains traitements connus pour modifier l'activité du remodelage osseux chez l'homme. L'utilisation d'un protocole d'injections semestrielles de différents marqueurs vitaux sur 30 mois a permis de « dater » l'âge des BSUs et d'en déduire la chronologie de la minéralisation. Ce travail a permis de mettre en évidence que le degré de minéralisation osseux, c'est-à-dire la densité minérale tissulaire, atteignait un plateau dès 18 mois de minéralisation (Fig. 16) (Bala *et al.* 2010b). Cette augmentation du degré de minéralisation était aussi associée avec une amélioration de la maturité, de la taille et de la perfection du cristal de minéral osseux. Comparativement, pour les autres modèles animaux, la minéralisation secondaire semble achevée après 3 mois chez le rat (Busa *et al.* 2005), 8 mois chez le chien (Marotti *et al.* 1972), 12 mois chez le lapin (Fuchs *et al.* 2008) et chez le singe (Huang *et al.* 2003).

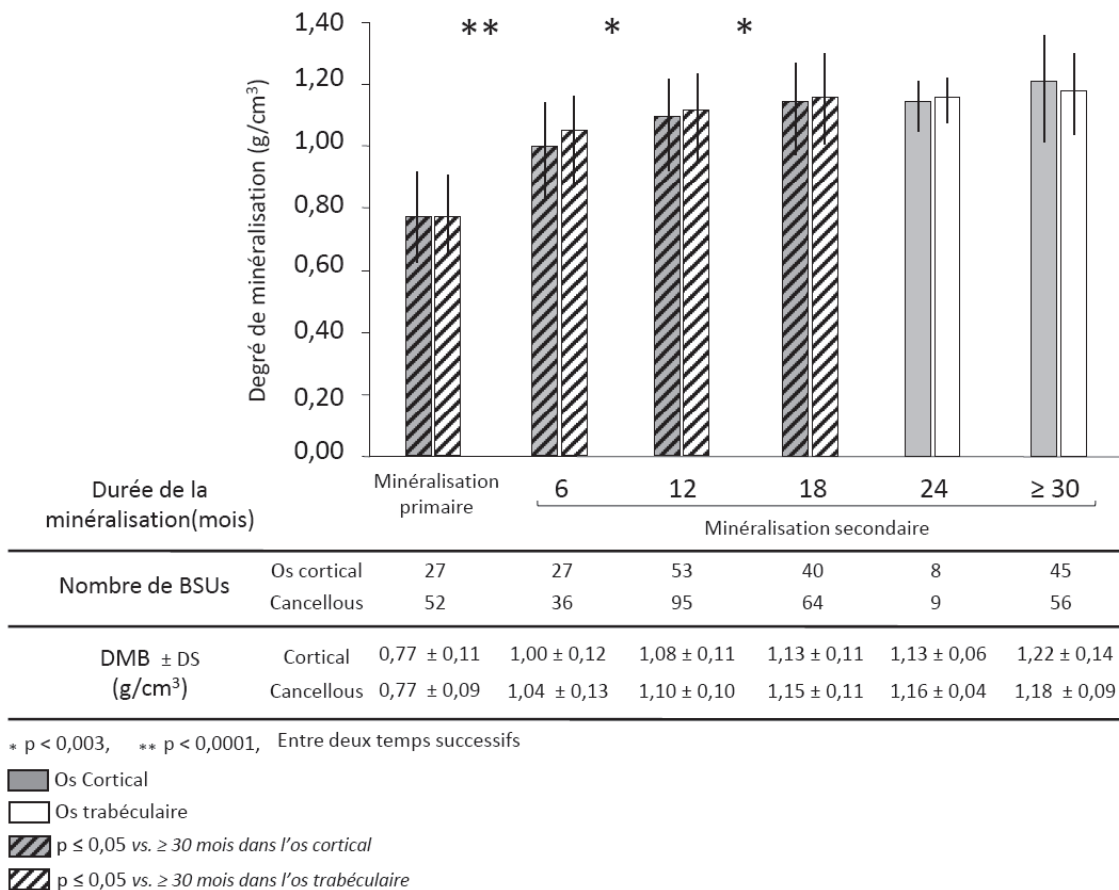


Figure 16: Histogramme représentant l'augmentation significative du degré de minéralisation osseuse (DMB) jusqu'à 18 mois de minéralisation pour l'os cortical et trabéculaire de brebis, adapté de (Bala *et al.* 2010b).

4.3. Cellules osseuses

Le tissu osseux présente des cellules différenciées et fonctionnalisées qui lui sont propres. Ces différents types cellulaires impliqués lors du modelage osseux sont ainsi engagés dans un processus physiologique appelé remodelage osseux qui assure, chez l'adulte, la pérennité des propriétés physico-chimiques de la matrice osseuse. Les différentes cellules osseuses vont, au cours du remodelage, avoir des fonctions propres et organiser leur action dans un ordre chronologique immuable.

4.3.1. Ostéoclastes et résorption osseuse

Les ostéoclastes sont les cellules qui assurent la résorption de la matrice osseuse. Les ostéoclastes matures et actifs sont des cellules volumineuses (20 à 100 µm) multinucléées (10 à 20 noyaux en moyenne) riches en mitochondries, et présentant un appareil de Golgi développé témoignant d'une activité de synthèse protéique intense (Gothlin et Ericsson 1976). L'ostéoclaste actif est une cellule polarisée, caractérisée par la présence d'une bordure plissée en regard de la

matrice osseuse. L'attachement de l'ostéoclaste et la formation de la bordure plissée délimitent un microenvironnement dans lequel se déroule la résorption osseuse.

4.3.1.1. Différenciation et maturation ostéoclastique

Les précurseurs ostéoclastiques dérivent de la lignée des monocytes-macrophages. A partir des cellules souches CFU-GM (pour Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage), les précurseurs ostéoclastiques mononucléés prolifèrent puis fusionnent pour donner des ostéoclastes matures (Teitelbaum 2000). La différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures a été largement étudiée et a permis de mettre en évidence un mécanisme clef de la biologie du remodelage osseux.

Il a été montré que la différenciation ostéoclastique à partir de macrophages nécessitait la présence de cellules stromales médullaires (précurseurs ostéoblastiques) ou d'ostéoblastes (Udagawa *et al.* 1990). En effet, ces cellules expriment les deux protéines nécessaires et suffisantes à promouvoir l'ostéoclastogenèse : le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et le RANK-L [Receptor for Activation of Nuclear factor kappa B (NF- κ B) - Ligand]. Le M-CSF est sécrété par les précurseurs ostéoblastiques et se fixe sur le récepteur membranaire c-fms des précurseurs ostéoclastiques précoces. Cette interaction met en jeu une voie de signalisation aboutissant à la survie et à la prolifération des précurseurs ostéoclastiques. Il a aussi été montré que la différenciation en ostéoclaste nécessitait un contact avec les précurseurs ostéoblastiques. Cette nécessité de contact est liée à la présence du récepteur RANK qui est un récepteur membranaire présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques (Lacey *et al.* 1998). Les préostéoblastes sont aussi capables de synthétiser un facteur soluble, l'ostéoprotégérine (OPG) qui peut se fixer de manière compétitive avec RANK sur RANK-L et donc inhiber l'ostéoclastogenèse (Simonet *et al.* 1997; Lacey *et al.* 1998) (Fig. 17). De plus, il a été montré que la balance RANKL / OPG déterminait la quantité d'os résorbé, faisant de ces facteurs des cibles thérapeutiques dans les pathologies liées au remodelage osseux (Hofbauer *et al.* 1999a; Hofbauer *et al.* 1999b). Outre le système RANK / RANK-L / OPG, la différenciation et la maturation des ostéoclastes sont aussi modulées par d'autres facteurs sécrétés par les ostéoblastes, qui peuvent aussi avoir une action paracrine sur ces mêmes ostéoblastes (Manolagas 2000) (Fig. 17).

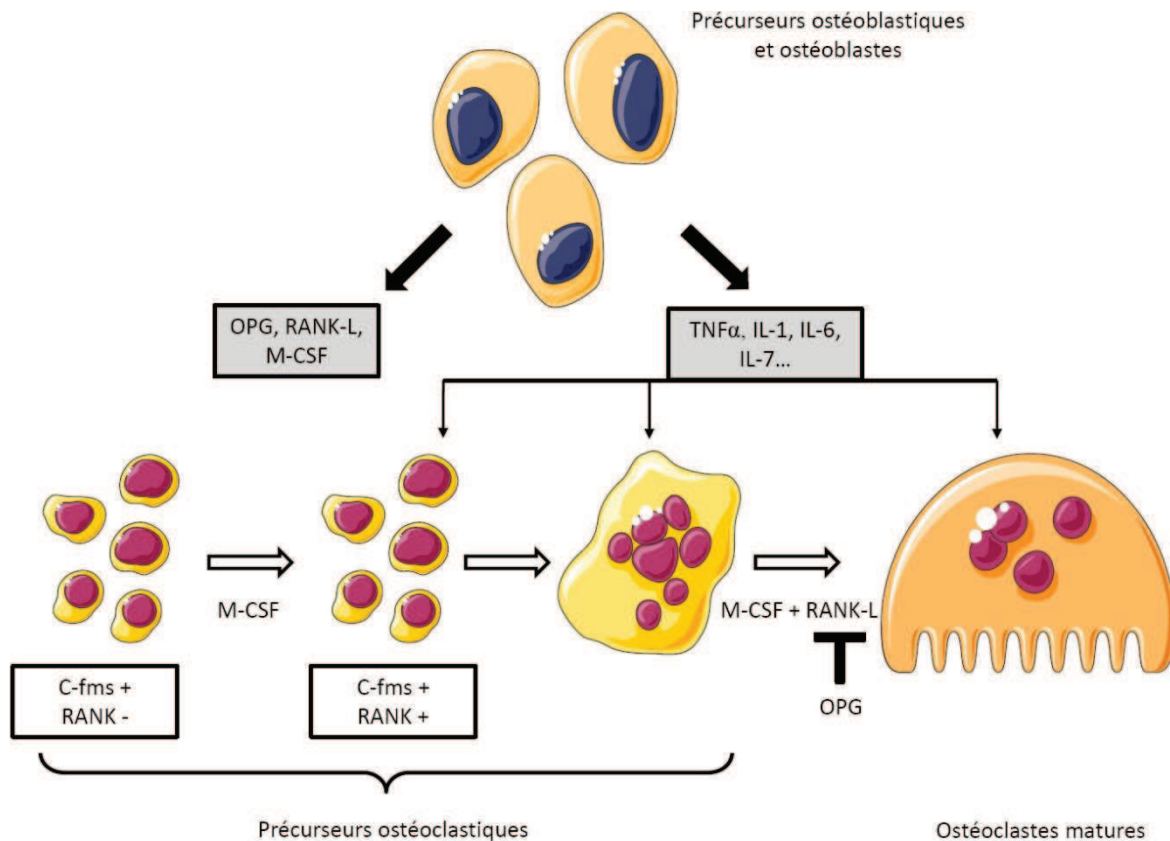


Figure 17: Schéma représentant la différenciation ostéoclastique impliquant le système RANK / RANK-L, OPG et M-CSF.

4.3.1.2. Résorption osseuse

La résorption osseuse se réalise en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ostéoclast se fixe à la matrice osseuse à résorber. La fixation est rendue possible par la présence de protéines d'adhésion, les intégrines, à la surface des ostéoclastes. L'intégrine $\beta 1$ participe à l'attachement aux fibres de collagène de type I (Teitelbaum 2000) mais l'intégrine primordiale dans l'adhésion, et plus largement dans le mécanisme de résorption est l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ (McHugh *et al.* 2000; Ross et Teitelbaum 2005). C'est un médiateur de nombreuses voies de signalisation impliquant le cytosquelette et qui entre en jeu dans la polarisation de l'ostéoclaste et la formation de la bordure plissée. L'intégrine $\alpha_v \beta_3$ est aussi impliquée dans la formation de la ceinture d'actine fibrillaire dense ou « zone de scellement » qui isole le microenvironnement créé entre la bordure plissée de l'ostéoclaste mature et la matrice à résorber (Jurdic *et al.* 2006). Il a en effet été montré que des souris mutantes n'exprimant pas l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ présentaient des ostéoclastes avec une bordure plissée anormale, une absence de zone de scellement, un cytosquelette modifié et étaient incapables de résorber la dentine in-vitro (McHugh *et al.* 2000).

La résorption de la matrice osseuse par l'ostéoclaste activé comporte deux phases étroitement liées : 1) l'acidification du microenvironnement extracellulaire permettant la

dissolution du minéral, suivie 2) d'une digestion enzymatique de la phase organique. L'acidification du microenvironnement est réalisée grâce à la présence de pompes à protons vacuolaires ATP dépendantes présentes au niveau de la bordure plissée. Les protons excrétés sont produits dans la cellule grâce à une anhydrase carbonique cytoplasmique (CALL) qui permet la production d'ions CO_3H^- et H^+ à partir de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (Fig. 18) (De Vernejoul et Marie 1996). Le résultat de ces échanges ioniques se traduit par la sécrétion d'HCL dans le microenvironnement, faisant chuter le pH à une valeur proche de 4,5 (Silver *et al.* 1988), ce qui permet la dissolution du minéral osseux. La matrice collagénique déminéralisée est ensuite dégradée par différentes classes de protéases lysosomiales comme des cathepsines B, D, L et K, ou encore des métalloprotéases matricielles (MMP 2, 9, 12, 13 et 14) (Delaisse *et al.* 2003). Les protéoglycannes et autres protéines non-collagéniques sont dégradées par différentes hydrolases, β -glucuronidases ou des phosphatases acides tartrate-résistantes (TRAP). La lyse de la matrice organique génère plusieurs produits de dégradation qui sont éliminés de la lacune de résorption (ou lacune de Howship) par transcytose, sécrétés dans l'espace extracellulaire, et rejoindront la circulation. Certains produits de dégradation du collagène comme le C-télopeptide (CTX) ou le N-télopeptide (NTX) du collagène de type I peuvent être dosés dans le sang ou l'urine et utilisés comme indicateurs de l'activité de résorption ostéoclastique (Garnero et Delmas 1996). Une fois la phase de résorption achevée, soit l'ostéoclaste migre et commence une nouvelle étape de résorption sur un autre site, soit l'ostéoclaste entre en apoptose.

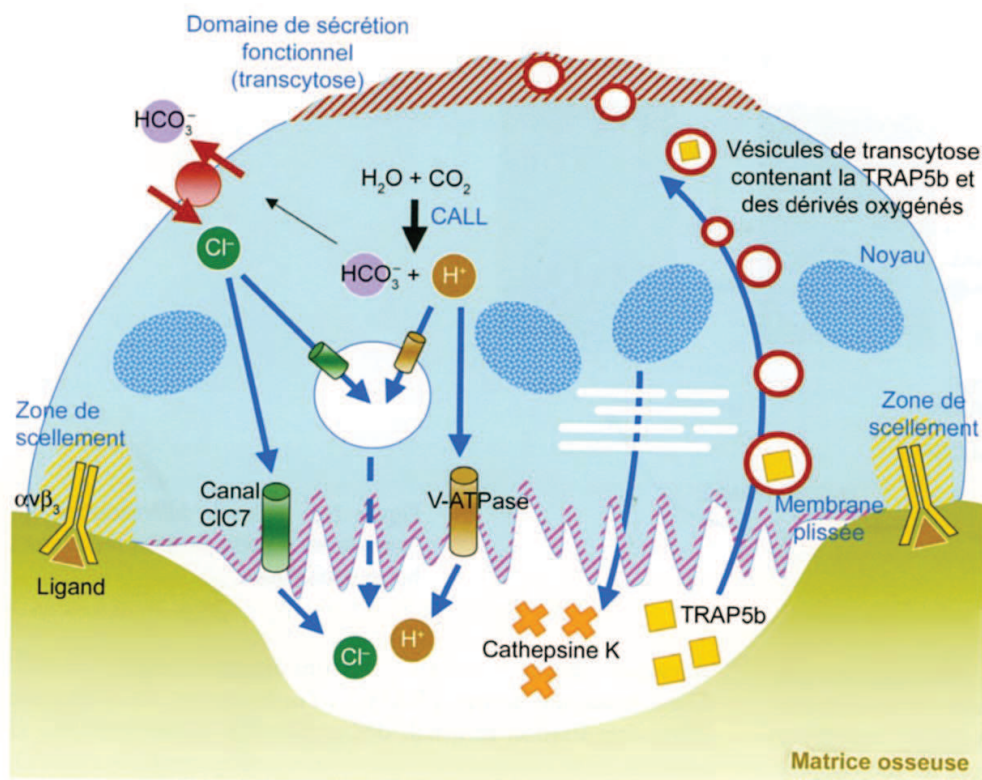


Figure 18: Schéma d'un ostéoclaste polarisé résorbant l'os, adapté de (Anginot *et al.* 2008)

4.3.2. Ostéoblastes et formation osseuse

4.3.2.1. Différenciation et maturation ostéoblastique

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdales qui assurent la formation osseuse et proviennent de la différenciation de cellules souches stromales mésenchymateuses pluripotentes. Au cours du développement squelettique embryonnaire, la différenciation ostéoblastique peut se produire à travers deux voies bien distinctes. Dans le cas de l'ossification endochondrale, les ostéoblastes apparaissent suite à la vascularisation de la trame cartilagineuse et à l'apoptose des chondrocytes hypertrophiés. Dans le cas d'une ossification dite membranaire, les cellules progénitrices mésenchymateuses sont directement différenciées en ostéoblastes. En culture, les ostéoblastes ont une morphologie semblable à celle des fibroblastes et partagent aussi les mêmes gènes exprimés. Seuls deux gènes sont spécifiquement exprimés dans les ostéoblastes et non dans les fibroblastes, le premier encodant pour le facteur de transcription Cbfa1 (appelé aussi Runx2), le second codant pour l'ostéocalcine (Ducy *et al.* 2000). Cbfa1 est un facteur suffisant à induire l'expression des gènes spécifiques aux ostéoblastes dans des fibroblastes (Ducy *et al.* 1997). De plus, il a été montré pour un modèle murin déficient en Cbfa1 que le squelette était exclusivement cartilagineux avec une absence de différenciation ostéoblastique (Komori *et al.* 1997). Cbfa1 est un facteur de transcription agissant dans la régulation de l'expression de l'ostéocalcine dans les ostéoblastes matures. Cbfa1 est donc nécessaire à la différenciation des ostéoblastes, mais il a aussi été montré qu'il était indispensable au maintien du phénotype ostéoblastique au cours de la vie de l'ostéoblaste (Ducy *et al.* 1999; Karsenty *et al.* 1999). La différenciation et la fonction des ostéoblastes, est aussi contrôlée par d'autres facteurs comme le facteur de croissance Indian hedgehog (Ihh) ou la leptine, une hormone synthétisée par les adipocytes (Ducy *et al.* 2000).

Récemment, l'importance de la voie canonique Wingless Type (Wnt) dans la maturation et la fonction des ostéoblastes a été mise en évidence. La fixation de Wnt sur son récepteur Frz (Frizzled) couplé à une G-protéine et un corécepteur LRP5/6 entraîne la stabilisation de la β -caténine. La β -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme, facilitant son transport vers le noyau dans lequel elle joue le rôle de régulateur de l'expression de gènes qui favorisent l'expansion ostéoblastique et leur fonction (Glass et Karsenty 2006).

4.3.2.2. Formation osseuse

La fonction principale de l'ostéoblaste mature est la synthèse de la matrice organique osseuse. En effet, l'ostéoblaste est capable de synthétiser et sécréter dans le milieu extracellulaire des molécules de tropocollagène qui vont s'associer pour former des fibres de collagène de type I mécaniquement compétentes. Outre la synthèse du collagène de type I, l'ostéoblaste synthétise aussi une partie des protéines non collagéniques comme la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine, l'ostéocalcine ou encore la phosphatase alcaline osseuse. A noter que ces deux dernières protéines peuvent être dosées dans le sérum et sont des indicateurs de l'activité de formation osseuse. Au cours du remodelage osseux, suite à l'étape de résorption, l'ostéoblaste synthétise un tissu

ostéoïde qui comble la lacune de Howship. Après 5 à 10 jours, la matrice organique nouvellement déposée commence à se minéraliser par nucléation secondaire. Une fois la formation terminée, l'ostéoblaste peut soit entrer en apoptose, soit s'emmurir dans la matrice et devient alors un ostéocyte.

4.3.3. Ostéocytes

Les ostéocytes représentent 90% des cellules du tissu osseux et proviennent des 10 à 20% d'ostéoblastes qui vont être emmurés dans la matrice au cours de la formation. Bien que provenant d'une différenciation à partir d'un ostéoblaste mature, l'ostéocyte possède des caractéristiques morphologiques et phénotypiques propres ainsi qu'une durée de vie plus longue (Manolagas 2000). L'ostéocyte perd en effet la forme cuboïde propre de l'ostéoblaste et présente de nombreux prolongements cytoplasmiques encore appelés canalicules (Fig. 19). L'activité de synthèse est très fortement diminuée et les ostéocytes expriment des gènes spécifiques différents de ceux exprimés par les ostéoblastes. La différenciation d'un ostéoblaste en un ostéocyte a longtemps été considéré comme un phénomène passif « d'enterrement » dans la matrice nouvellement formée. Aujourd'hui, il est admis que cette différenciation est un mécanisme actif au cours duquel, la cellule va acquérir des caractéristiques propres (Dallas et Bonewald 2010). L'ostéocyte mature est enfermé dans une lacune ostéocytaire mais reste cependant en contact avec les autres ostéocytes et les cellules à la surface de l'os. Ces contacts se font via les prolongements cellulaires qui forment un réseau tri dimensionnel dense et des jonctions de type « gap » qui permettent l'échange de nutriments et d'autres éléments d'une cellule à l'autre (Civitelli 2008).

Si le rôle de l'ostéocyte est resté longtemps énigmatique, on note désormais un consensus autour de son rôle de mécanosenseur (Noble et Reeve 2000). En effet, il a été montré que l'ostéocyte était capable d'enregistrer un stimulus mécanique. Lorsque l'os est soumis à une force, il se crée un gradient hydrostatique de pression dans le réseau canaliculaire. Comme ces gradients sont équilibrés par l'intermédiaire du mouvement du fluide extracellulaire des régions de haute pression vers les régions de basse pression, des forces de cisaillement agissent sur la membrane plasmique des ostéocytes (Duncan et Turner 1995). Dans les minutes qui suivent ces stimuli, les ostéocytes vont synthétiser des facteurs solubles qui peuvent atteindre via les canalicules la surface de l'os et agir directement sur les ostéoblastes et les ostéoclastes. Il a aussi été montré que la présence de fractures ou de microfissures ainsi que l'exercice d'une force élevée pouvait induire l'apoptose des ostéocytes. L'apoptose, à l'origine du déversement des produits cytoplasmique dans le milieu extracellulaire comme des chimiokines pourrait induire un remodelage « ciblé » permettant la réparation des microdommages (Mori et Burr 1993; Plotkin *et al.* 1999; Noble et Reeve 2000).

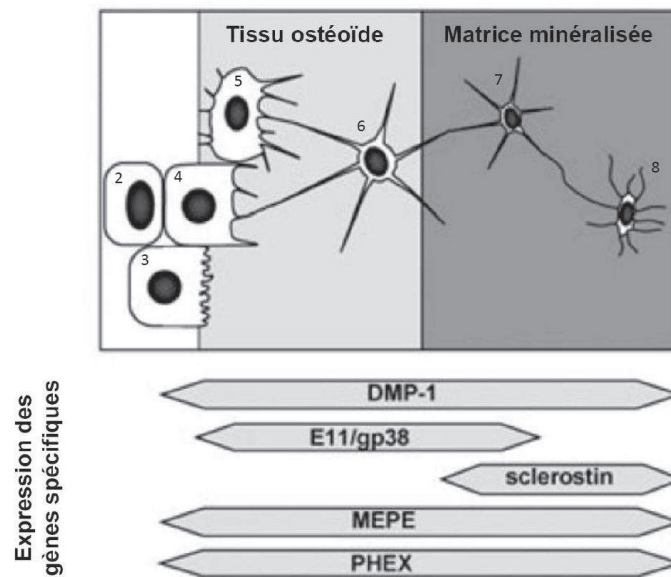


Figure 19: Schéma représentant la différenciation d'un ostéocyte à partir d'un ostéoblaste ainsi que les changements concernant l'expression des gènes spécifiques majeurs des ostéocytes. La différenciation d'un ostéocyte mature passe par les stades suivants : 2) préostéoblaste, 3) ostéoblaste, 4 - 6) préostéocyte de type I, II et III, 7) ostéocyte jeune et 8) ostéocyte âgé, adapté de (Franz-Odendaal *et al.* 2006).

4.3.4. Cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes qui, progressivement, adoptent une forme aplatie et vont former une couche cellulaire à la surface de l'os inactif (Fig. 20). Leur cytoplasme pauvre en organites traduit une activité métabolique faible. Les cellules bordantes sont capables de communiquer entre elles et avec les ostéocytes par l'intermédiaire de jonctions de type « gap ». Les cellules bordantes pourraient avoir un rôle dans le recrutement des préostéoclastes et dans la préparation de la surface osseuse à la résorption (Hauge *et al.* 2001). D'un point de vue fonctionnel, les cellules bordantes forment aussi une barrière qui isole le site osseux à remodeler de la moelle en formant une structure appelée BRC pour Bone Remodeling Compartment (Hauge *et al.* 2001). Cette structure rappelle celle d'une canopée, perfusée par un vaisseau sanguin qui permettrait l'arrivée continue des progéniteurs des cellules osseuses au site de remodelage (Eriksen 2010). La canopée forme un microenvironnement favorisant les échanges entre cellules et pourrait être à l'origine du couplage entre les ostéoclastes et les ostéoblastes (Eriksen 2010). Les cellules bordantes pourraient aussi avoir un rôle dans le « nettoyage » des lacunes de Howship et l'initiation de la formation osseuse (Everts *et al.* 2002). Plus récemment, il a été montré que les cellules bordantes pouvaient sécréter de nombreuses métalloprotéases capables de dégrader la matrice osseuse, et ainsi, pourraient aussi être impliquées dans la perte osseuse physiologique liée à l'âge (Dierkes *et al.* 2009).

4.4. Remodelage osseux

Le remodelage est un mécanisme central du tissu osseux de certains vertébrés dont l'Homme. Ce mécanisme dynamique consiste à remplacer un tissu osseux ancien ou endommagé par une matrice nouvellement synthétisée. Ce processus permet donc de pérenniser, la masse et la compétence mécanique de l'os, de manière physiologique ou en réponse à une contrainte mécanique spécifique ou encore à un endommagement. On parlera alors de remodelage de fond (ou non ciblé) ou de remodelage ciblé, ce dernier pourrait représenter de 10 à 20% du remodelage totale (Parfitt 1996; Burr 2002). En outre, ce processus est un acteur majeur de l'homéostasie phosphocalcique permettant à la fois le stockage de ces éléments (formation et minéralisation) mais aussi leur distribution dans le système circulatoire (résorption osseuse). De nombreux facteurs peuvent moduler spécifiquement la formation ou la résorption, mais ces deux étapes étant liées, une action sur l'une aura une conséquence sur l'autre (Fig. 20). Le remodelage osseux étant asynchrone dans l'espace et le temps, il est à l'origine, au niveau tissulaire, d'une hétérogénéité des propriétés de la matrice osseuse.

4.4.1. Etapes du remodelage osseux

Toutes les cellules du tissu osseux précédemment décrites vont avoir un rôle coopératif au sein d'une unité dynamique appelée « unité multicellulaire de base » (BMU pour Basic Multicellular Unit) ou « unité de remodelage osseux » (BRU pour Bone Remodeling Unit) (Frost 1983). Dans les conditions physiologiques, la quantité de matrice formée comble la quantité résorbée. Le résultat d'un cycle de remodelage correspond à la formation d'une nouvelle unité structurale élémentaire (ostéon cortical ou paquet osseux trabéculaire). La chronologie d'un cycle de remodelage osseux est une séquence immuable qui contient quatre étapes: la résorption par les ostéoclastes, l'inversion, la formation par les ostéoblastes et la phase de quiescence (Fig. 20).

Les signaux induisant le recrutement des ostéoclastes sont encore mal connus mais pourraient impliquer l'apoptose ostéocytaire induite par des macro- ou micro-endommagements (Ham et Harris 1956; Plotkin *et al.* 1999; Cardoso *et al.* 2009). En effet, les corps apoptotiques des ostéocytes sont capables d'induire la résorption ostéoclastique (Noble et Reeve 2000; Kogianni *et al.* 2008). L'étape de résorption pourrait aussi être induite par des facteurs contenus dans la matrice et déposé par les ostéoblastes au cours du précédent cycle de remodelage (Malone *et al.* 1982). La surface osseuse est ensuite « préparée » pour les ostéoclastes par les cellules bordantes. En effet, les cellules bordantes sécrètent des enzymes lytiques qui vont dégrader la fine couche de collagène qui les isole de la surface de l'os et ainsi exposer la surface minéralisée aux ostéoclastes (Chambers et Fuller 1985).

Une fois la résorption terminée, la phase d'inversion débute. Au cours de cette étape, d'autres cellules de la lignée ostéoblastique vont compléter la résorption en lysant les molécules de collagène laissées par les ostéoclastes (Everts *et al.* 2002). Ces mêmes cellules synthétisent une fine matrice riche en ostéopontine et pauvre en collagène de type I et appelée « ligne cimentante » (Skedros *et al.* 2005). Cette couche, indispensable à la formation d'une structure

osseuse lamellaire bien organisée (Everts *et al.* 2002), est propice à l'adhésion cellulaire et pourrait favoriser l'adhésion des ostéoblastes (Bernards *et al.* 2008). Au cours de la phase d'inversion, le BRC se retire partiellement, recouvrant ainsi les deux tiers de la matrice ostéoïde non encore minéralisée (Hauge *et al.*, 2001). Les cellules ostéoformatrices vont pouvoir débiter la phase de formation.

Au cours de la formation, les ostéoblastes vont synthétiser la matrice collagénique, ainsi que les protéines non collagéniques et combler les lacunes laissées par la résorption ostéoclastique. De 5 à 10 jours après le dépôt de cette matrice néosynthétisée, la minéralisation va débiter pour former une matrice osseuse minéralisée mécaniquement résistante (Meunier et Boivin 1997; Boivin et Meunier 2003b; Follet *et al.* 2004).

A la fin de la formation du nouveau BSU, les ostéoblastes vont soit se différencier en cellules bordantes en prenant une forme aplatie et en réduisant leur activité de synthèse, soit mourir par apoptose, soit se différencier en ostéocytes emmurés dans la matrice. L'os entre alors dans une phase dite de quiescence jusqu'au prochain cycle de remodelage.

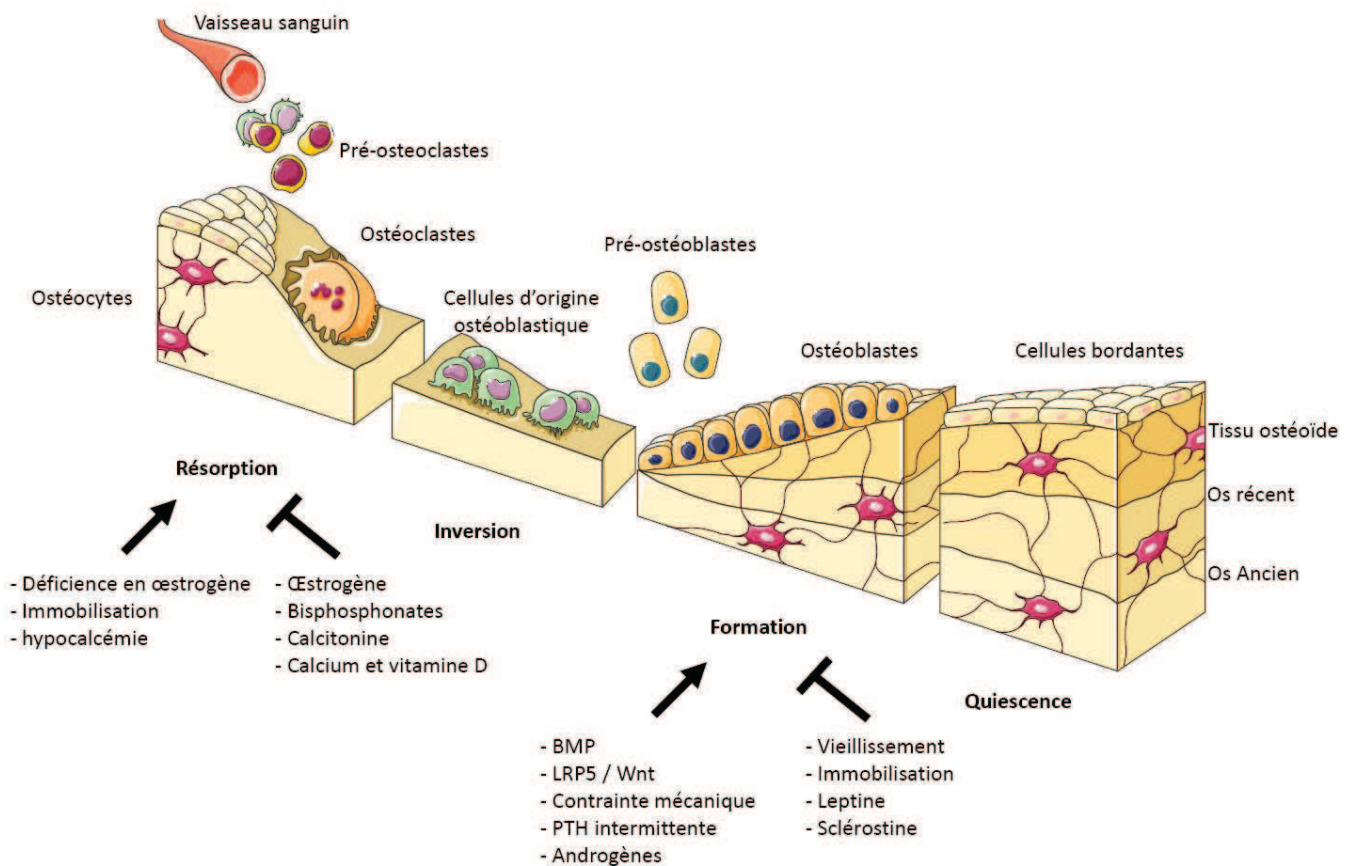


Figure 20: Schéma représentant la séquence d'un cycle de remodelage osseux ainsi que les différents facteurs stimulant ou inhibant la résorption et la formation osseuses.

4.4.2. Remodelage osseux cortical et trabéculaire

Que se soit dans l'os cortical ou dans l'os trabéculaire, la séquence du remodelage osseux ainsi que les acteurs cellulaires sont les mêmes. Cependant, les différences morphologiques existantes entre les deux enveloppes du tissu osseux impliquent des variations concernant l'organisation des BMU (Fig. 21). Dans l'os cortical le BMU se déplace le long d'un axe parallèle aux canaux de Havers des autres ostéons, les ostéoclastes résorbent de manière centrifuge formant ainsi un cône de résorption ou « cutting cone » (Parfitt 1994a). L'arrière du BMU est composé des ostéoblastes qui synthétisent la nouvelle matrice de manière centripète formant un cône qui « ferme » le canal nouvellement résorbé ou « closing cone » (Parfitt 1994a). La matrice nouvellement déposée va ensuite se minéraliser de manière centripète.

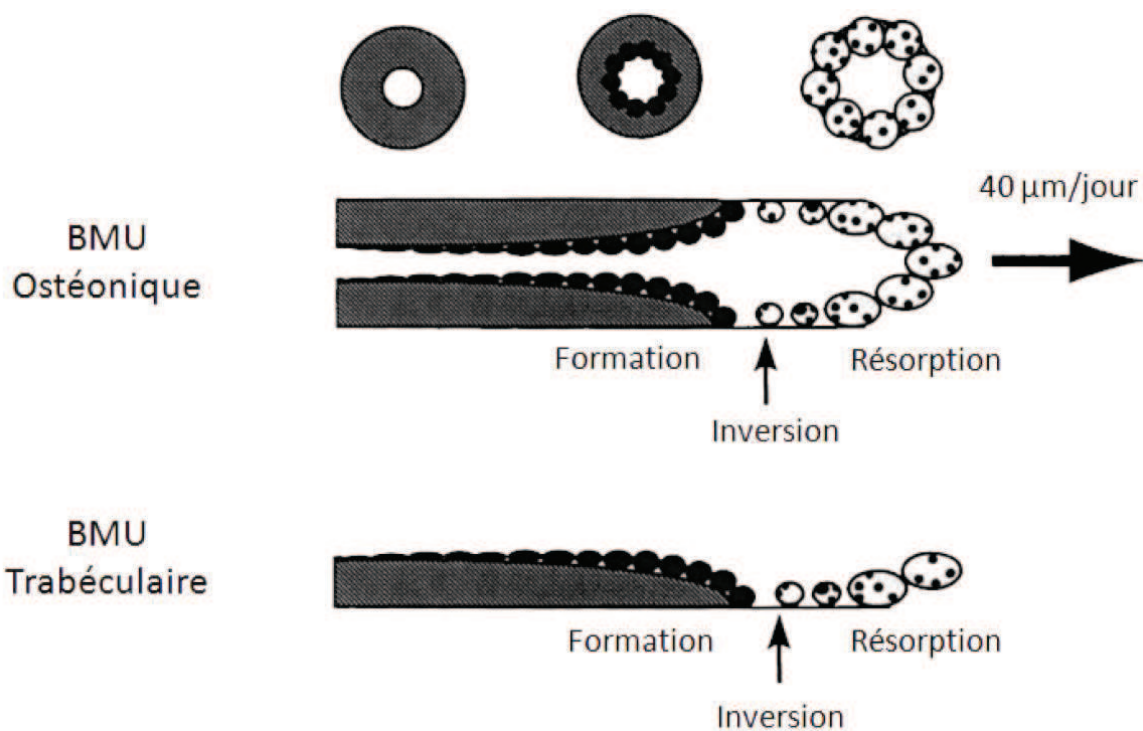


Figure 21: Schéma représentant le remodelage au sein d'unité de remodelage ostéonique et trabéculaire, adapté de (Parfitt 1983; Eriksen 1986; Martin *et al.* 1998).

Pour l'os trabéculaire, le remodelage est un mécanisme de surface au cours duquel les ostéoclastes résorbent l'os, formant ainsi une lacune de résorption. Cette lacune est ensuite comblée par les ostéoblastes qui forment une nouvelle matrice ostéoïde qui va se minéraliser (Fig 21). Il est à noter que pour un même volume de tissu osseux, le nombre de BMU actives est 20 fois supérieur dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical, bien que ce dernier représente 80% de la masse osseuse totale de l'adulte (Libouban 2008). Il en résulte un renouvellement global de 25% par an de l'os trabéculaire et de 4% de l'os cortical. Cette différence de fréquence d'activation, explique le fait que les répercussions des pathologies osseuses impliquant un

dérèglement du remodelage osseux soient plus importantes dans le compartiment trabéculaire par rapport au compartiment cortical (Libouban 2008).

Le remodelage osseux étant asynchrone dans le temps et l'espace, il en résulte au niveau tissulaire une hétérogénéité de la minéralisation corticale et trabéculaire (Fig. 22). Il semble évident que l'activité du remodelage osseux est un facteur majeur du niveau de minéralisation que peut atteindre un BSU. En effet, une fréquence d'activation du remodelage élevée aura pour conséquence d'augmenter la probabilité qu'un BSU soit résorbé avant qu'il atteigne un degré de minéralisation maximal et inversement. Ainsi, dans le cas d'un remodelage rapide le degré de minéralisation moyen du tissu osseux aura tendance à rester faible et inversement.

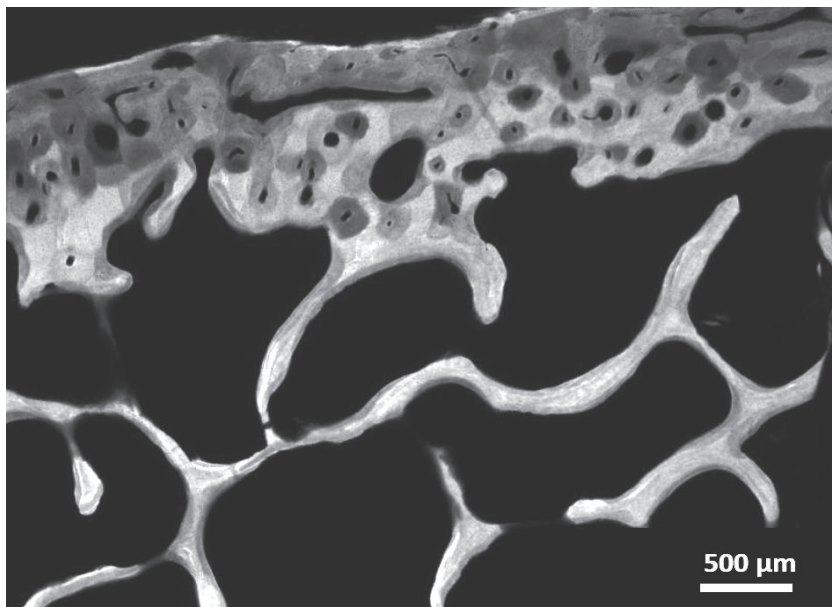


Figure 22: Microradiographie d'une coupe de tissu osseux iliaque montrant l'hétérogénéité de la minéralisation aux niveaux cortical et trabéculaire. Les faibles niveaux de gris reflètent un faible degré de minéralisation et inversement.

Partie 1

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre 2

Le tissu osseux humain: un tissu mécaniquement compétent

1.	Structure hiérarchisée de l'os.....	48
2.	Généralités sur les tests mécaniques adaptés à l'étude de l'os.....	49
2.1.	Tests adaptés à l'étude de la macrostructure.....	49
2.1.1.	Tests mécaniques.....	49
2.1.2.	Tests ultrasonores.....	51
2.2.	Tests adaptés à l'étude de la microstructure.....	52
2.2.1.	Techniques d'indentation.....	52
2.2.1.1.	Microdurimétrie.....	52
2.2.1.2.	Nanoindentation.....	53
2.2.1.3.	Indentation et os.....	55
2.2.2.	Microscopie acoustique.....	57
2.3.	Etude de la nanostructure par microscopie à force atomique.....	58
3.	Fragilité osseuse et ses déterminants.....	59
3.1.	Concept de fragilité osseuse.....	59
3.2.	Déterminants de la fragilité osseuse.....	60
3.2.1.	Déterminants extrinsèques.....	60
3.2.1.1.	Masse et densité minérale osseuses.....	60
3.2.1.2.	Taille et géométrie des os.....	61
3.2.1.3.	Microarchitecture osseuse.....	63
3.2.2.	Déterminants intrinsèques.....	65
3.2.2.1.	Minéral et minéralisation.....	65
3.2.2.2.	Collagène.....	67
3.2.2.3.	Microfissures et apoptose ostéocytaire.....	68
3.2.2.	Remodelage osseux.....	70

Chapitre 2

Le tissu osseux humain: un tissu mécaniquement compétent

1. Structure hiérarchisée de l'os

L'os est un tissu qui peut être décrit à de nombreux niveaux d'organisation, chaque niveau ayant sa propre réponse aux sollicitations mécaniques et une influence sur la réponse du niveau supérieur (Rho *et al.* 1998). La corrélation entre la structure et la fonction a été initialement décrite par Wolff à la fin du XIX^e siècle. En effet, la loi de Wolff décrit une orientation des travées osseuses corrélée avec l'orientation des principales contraintes mécaniques appliquées à l'os (Wolff 1892). Cette organisation complexe est aussi à l'origine du haut degré d'anisotropie observé pour l'os, autrement dit, l'os présente différentes propriétés selon la direction dans laquelle il est sollicité (Turner 1995; Turner *et al.* 1995). Les différents niveaux d'organisation de l'os sont classiquement résumés en trois catégories : 1) la macrostructure où l'os est considéré à l'échelle de l'organe, 2) la microstructure qui décrit le tissu osseux à l'échelle de l'unité structurale élémentaire corticale et trabéculaire, ainsi qu'à l'échelle de la lamelle osseuse, et 3) la nanostructure qui reflète l'os à l'échelle sub-microscopique, autrement dit au niveau de la fibre de collagène et du cristal du minéral osseux (Fig. 23). Il convient donc pour traiter d'une description mécanique de l'os, de préciser le niveau d'organisation décrit ainsi que d'utiliser les tests mécaniques adaptés à l'étude de ce niveau d'organisation.

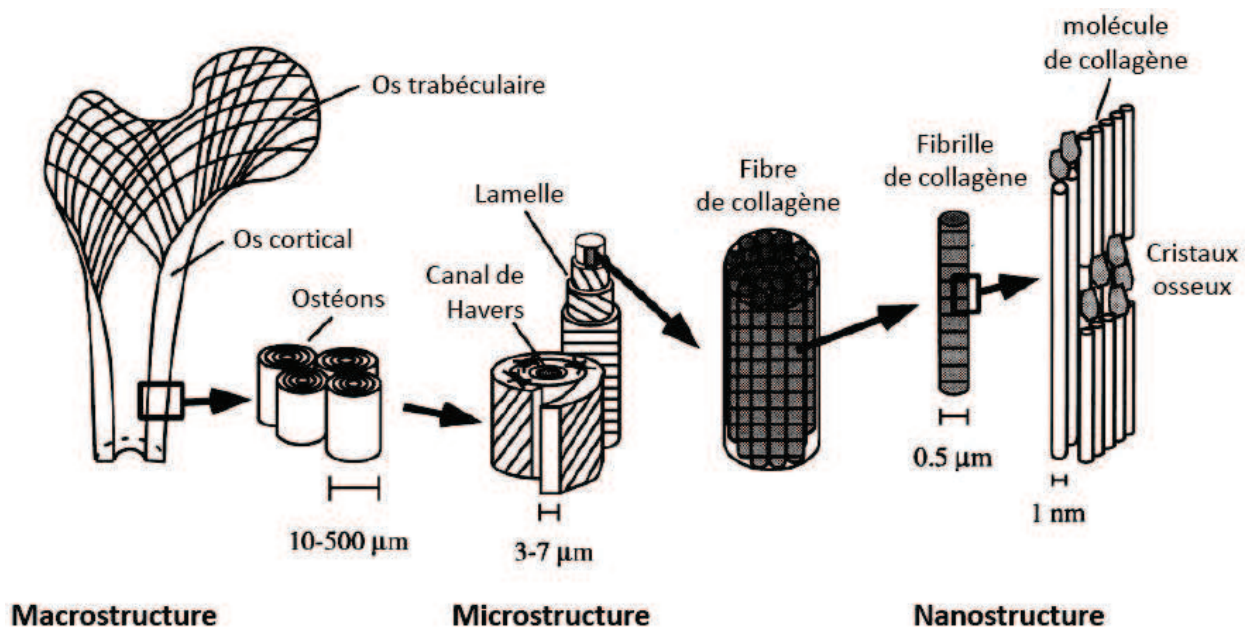


Figure 23: Schéma décrivant les différents niveaux d'organisation du tissu osseux, adapté de (Rho *et al.* 1998).

2. Généralités sur les tests mécaniques adaptés à l'étude de l'os

Le système squelettique est quotidiennement soumis à un ensemble de forces qui vont provoquer des déformations microscopiques. L'amplitude de ses déformations dépend de l'intensité de la contrainte, de la géométrie, de la masse osseuse et des propriétés du tissu osseux. Si la contrainte est supérieure à la résistance de l'os, une fracture survient. Le terme résistance osseuse fait habituellement référence à la charge ou à la contrainte maximale entraînant une fracture. Le comportement mécanique de l'os peut donc être étudié à deux niveaux. Le premier, en réalisant des essais mécaniques standardisés sur des échantillons osseux considérés uniformes, ainsi les propriétés mesurées seront indépendantes de la structure et de la géométrie des échantillons. Le second, en examinant le comportement mécanique d'une pièce osseuse anatomique, ainsi, les contributions des propriétés structurales et géométriques pourront être analysées (Turner et Burr 1993; Einhorn 1996). Le terme « propriété mécanique » définit les paramètres décrivant la manière dont l'os va répondre à une sollicitation.

2.1. Tests adaptés à l'étude de la macrostructure

2.1.1. Tests mécaniques

Il existe, en fonction des pièces osseuses et des propriétés analysées, différents types d'essais mécaniques : en traction, compression, flexion ou encore en torsion. Plus généralement, un test mécanique consiste à soumettre l'échantillon à une charge contrôlée et à mesurer le déplacement induit jusqu'à un niveau fixé ou à la rupture de l'échantillon. La relation entre la charge (ou effort) en Newton et le déplacement (courbe « Load (F) - displacement ») en mm est alors reliée aux propriétés mécaniques de l'os testé. Pour s'affranchir des propriétés extrinsèques de l'os, cette courbe peut aussi être normalisée sous la forme d'une courbe contrainte-déformation (courbe « Stress (notée δ) - strain (notée ϵ)»). La contrainte correspond à la charge rapportée à la surface et est exprimée en MPa ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$). La déformation, par rapport au déplacement, tient compte de l'état initial de l'échantillon analysé et est habituellement exprimé en pourcentage.

Si on considère la courbe contrainte-déformation de l'os (Fig. 24), on observe une première partie linéaire qui décrit la propriété élastique de l'os. Autrement dit, la déformation est proportionnelle à la contrainte et si la contrainte n'est pas maintenue, l'os retrouve son état initial. La pente de la partie linéaire de la courbe est une constante appelée constante d'élasticité ou module de Young (E), caractéristique de la raideur du matériau. A partir d'une certaine valeur de contrainte, la pente de la courbe va décroître, le matériau évolue dans sa région plastique. Toute contrainte exercée après ce point théorique appelé limite élastique (ou « yield point ») entraîne une déformation qui n'est plus intégralement réversible. L'augmentation de la contrainte dans cette région conduit à la formation de dommages qui vont se propager jusqu'au point de rupture du matériau. La contrainte entraînant la rupture du matériau et appelée contrainte maximale (ou

« ultimate stress »). La déformation à la rupture est appelée ductilité et caractérise la capacité du matériau à se déformer jusqu'à la rupture (Fig. 24). L'intégration de la courbe contrainte-déformation donne accès à des calculs d'énergie dissipée dans le domaine élastique (ou résilience) ou jusqu'à rupture (énergie à rupture).

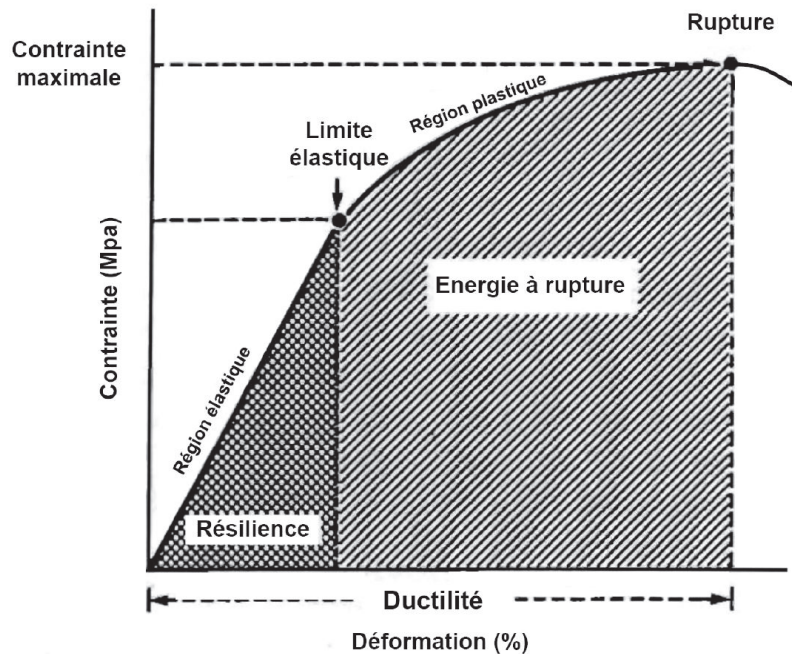


Figure 24: Courbe contrainte déformation d'un matériau comme le tissu osseux, adapté de (Einhorn 1996).

Pour l'os trabéculaire, les valeurs de contrainte maximale sont comprises entre 0,15 et 13 MPa pour des valeurs de module de Young comprises entre 12 et 900 MPa (Kopperdahl et Keaveny 1998; Athanasiou *et al.* 2000; Banse *et al.* 2002; Morgan *et al.* 2004). Cette grande variabilité est expliquée par la forte dépendance de ces variables avec la porosité, l'architecture et le site anatomique des échantillons.

Pour l'os cortical, les propriétés mécaniques sont généralement plus faibles dans la direction perpendiculaire à l'axe de l'os que dans l'axe longitudinale. La contrainte maximale rapportée dans la littérature varie entre 51 et 56 MPa en tension et 106 et 133 MPa en compression dans la direction transversale. Dans la direction longitudinale, elle varie entre 79 et 151 MPa en tension et 131 et 224 MPa en compression. Dans ces deux types de test, le module de Young est compris entre 6 et 13 GPa dans la direction transverse et entre 17 et 20 GPa suivant l'axe longitudinal (Athanasiou *et al.* 2000; Currey 2006). L'os cortical étant moins poreux que l'os trabéculaire, on note une hétérogénéité moins importante des valeurs de contrainte maximale et de module de Young. La différence entre les valeurs mesurées en tension et en compression est cohérente avec les charges naturellement exercées sur un os porteur comme le fémur par exemple. En effet, un fémur subit d'avantage un chargement en compression qu'en tension.

2.1.2. Tests ultrasonores

Dans un solide, les modes de propagation des ultrasons (Fig. 25) correspondent soit à de la propagation d'ondes longitudinales (vibration des particules solides dans une direction parallèle à la direction de propagation de l'onde), soit à de la propagation transversale (vibration des particules solides dans une direction perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde). De plus, si la dimension transversale de l'échantillon est petite devant la longueur d'onde, l'onde est guidée avec des vitesses directement reliées aux modules élastiques. Ces principes sont utilisés dans l'étude de l'os en plaçant un échantillon osseux entre un émetteur et un récepteur d'ultrasons, la mesure de la vitesse de propagation dans le matériau permet alors de remonter aux propriétés élastiques de ce dernier (Turner et Burr 1993).

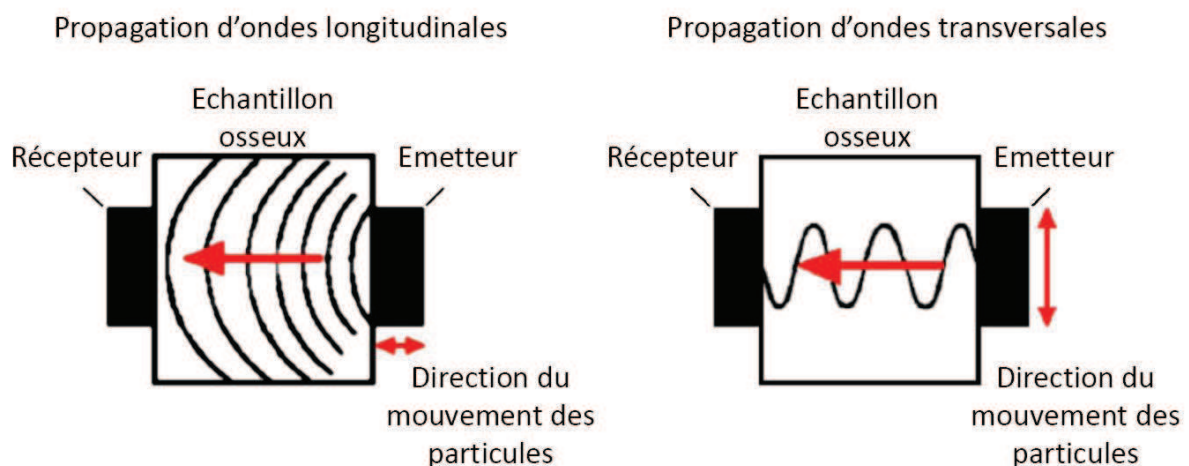


Figure 25: Schéma représentant les deux modes de propagation des ondes ultrasonores à travers l'os, adapté de (Turner et Burr 1993).

L'étude des propriétés élastiques de l'os par des tests ultrasonores montre, comme pour les tests mécaniques, des valeurs de module de Young acoustique plus élevées dans l'axe longitudinal que dans l'axe transversal (Turner *et al.* 1999). Le module de Young acoustique varie dans l'os cortical de 20 à 22 GPa le long de l'axe longitudinal et entre 12 et 14 GPa selon l'axe transverse (Ashman *et al.* 1984; Katz *et al.* 1984). Plus récemment, il a été montré une corrélation ($r^2=0,14 - 0,2$) entre le module élastique mesuré par microscopie acoustique et par simulation numérique (Haiat *et al.* 2009). L'avantage des techniques acoustiques réside dans leur caractère non invasif qui permet d'effectuer plusieurs tests sur un même échantillon sans en altérer les propriétés.

2.2. Tests adaptés à l'étude de la microstructure

2.2.1. Techniques d'indentation

Les techniques d'indentation consistent à appliquer une pointe dure (typiquement en diamant) dans demi-espace semi-infini, avec une force connue et à mesurer directement ou indirectement l'aire de contact entre le matériau et la pointe (Zysset 2009). Dans les tests classiques de microdurimétrie réalisés à l'échelle macro ou microscopique, l'aire de contact est évaluée de manière optique par la mesure du diamètre de l'empreinte (ou indent) laissée à la surface du matériau testé. Les indenteurs les plus communs sont sphériques (Brinell, Rockwell) ou pyramidaux (Vickers, Knoop). La géométrie de l'indenteur définit le champ de contrainte appliqué à la surface de l'échantillon. Un indenteur sphérique par exemple réduira les déformations plastiques, alors qu'un indenteur plus plat tendra à augmenter la concentration de contraintes. Plus récemment, le développement de senseurs de haute précision a permis la mesure du déplacement au cours de l'essai d'indentation. Il est donc possible d'obtenir une courbe charge-déplacement caractéristique du comportement mécanique du matériau testé. L'indentation instrumentée est actuellement la seule technique permettant d'accéder directement aux propriétés mécaniques à ces échelles (Fischer-Cripps 2005). Suivant la théorie des contacts de Hertz, le volume du matériau participant à la réponse mécanique correspond, dans l'axe de la charge, à neuf fois la profondeur de l'empreinte et à sept fois suivant l'axe radial (Hengsberger *et al.* 2002).

2.2.1.1. Microdurimétrie

Dans cette technique, une charge connue (P en g) exerçant une force (F en N) est appliquée à la surface du matériau. La mesure directe des dimensions de l'empreinte résiduelle permet ensuite d'évaluer l'aire de contact. Chaque type d'indenteur possède une géométrie caractéristique et une formule mathématique qui relie la charge, la taille de l'empreinte résiduelle et la dureté. Par exemple, pour un indenteur Vickers qui est un diamant pyramidal à base carrée et dont l'angle entre les faces est égal à 136° , la dureté Vickers (H_v en kg/mm^2) est donnée par la formule suivante :

$$H_v = \frac{2F \sin\left(\frac{136^\circ}{2}\right)}{g d^2} = \frac{1854,4 P}{d^2}$$

Où d correspond à la moyenne des deux diagonales de l'empreinte résiduelle (en μm) et g à la constante de gravité terrestre.

Cette technique permet rapidement et simplement d'obtenir un paramètre reflétant la résistance mécanique au niveau tissulaire, comme au niveau du BSU. Même si la dureté est une variable davantage lié au régime de déformation plastique d'un matériau, en microdurimétrie,

l'absence de courbe permettant de caractériser le comportement du matériau rend l'interprétation des résultats compliquée.

2.2.1.2. Nanoindentation

La possibilité d'obtenir une courbe charge-déplacement (Fig. 26) en indentation instrumentée permet de mesurer la dureté (H en GPa) et le module de Young réduit (E_r en GPa). En effet, en faisant l'hypothèse d'un matériau homogène et isotrope, E et H sont reliés à la raideur de contact (S en GPa) mesurée au point de décharge ainsi qu'à l'aire de contact entre la pointe et la surface (A_c) par les relations suivantes :

$$S = \frac{2\beta}{\sqrt{\pi}} \sqrt{A_c E_r}$$

et

$$H = \frac{P_{max}}{A_c}$$

P_{max} correspond à la charge maximale et β à un facteur de correction lié à la forme de l'indenteur. Le module d'élasticité réduit E_r , encore appelé module d'indentation, tient compte des propriétés mécaniques de l'échantillon et de celles de l'indenteur et est exprimé par :

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu_s^2)}{E_s} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i}$$

Où l'indice s fait référence à l'échantillon, i à l'indenteur et ν au coefficient de Poisson. La mesure de la raideur de contact et de l'aire de contact est donc essentielle. La méthode la plus utilisée pour remonter à ces deux paramètres a été proposée en 1992 par Oliver & Pharr puis actualisée en 2004 (Oliver et Pharr 1992; Oliver et Pharr 2004). Dans cette approche, la courbe de décharge est considérée comme purement élastique et propose, pour la représenter, le modèle suivant :

$$P = B(h - h_f)^m$$

Où h_f représente la profondeur de l'empreinte résiduelle (Fig. 26), B et m étant des constantes déterminées expérimentalement. Ainsi, au début de la décharge, où la profondeur est maximale, nous avons :

$$S_{h_{max}} = \frac{dP}{dh} = Bm(h - h_f)h_{max}^{m-1}$$

Pour déterminer l'aire de contact, Oliver & Pharr déterminent un enfoncement total noté h correspondant à tout moment à la somme de deux enfoncements : h_c correspondant à la hauteur du contact entre l'indenteur et le matériau, et h_s correspondant au déplacement de la surface autour de l'indenteur. En tout point nous avons donc :

$$h = h_c + h_s$$

Avant la décharge, la charge et le déplacement correspondent respectivement à P_{max} et h_{max} et le rayon du cercle de contact est égal à a. Connaissant la forme de l'indenteur, il devient donc possible de remonter à l'aire de contact (Fig. 26).

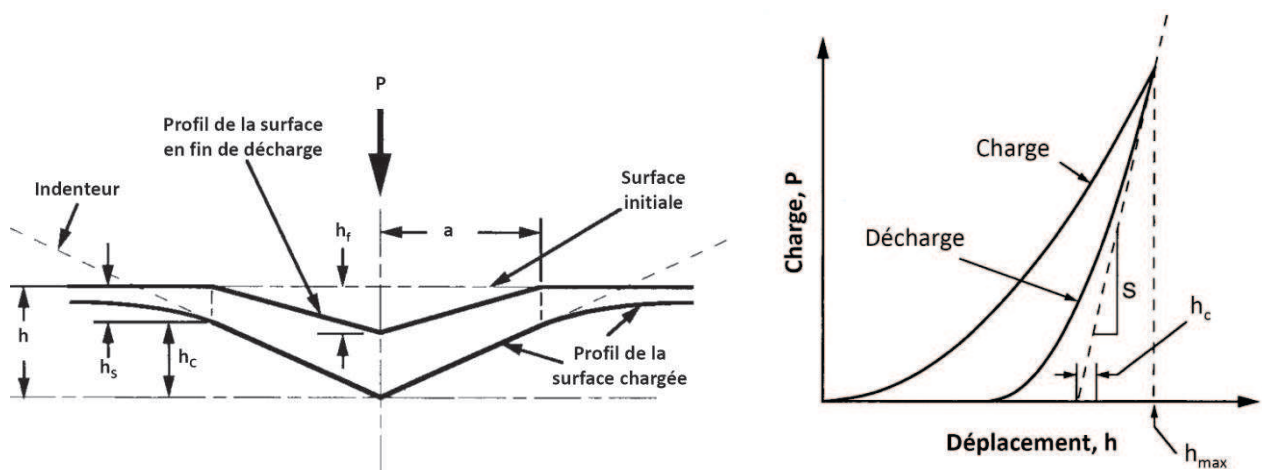


Figure 26: Principe de l'indentation instrumentée (gauche) et exemple de courbe charge-déplacement (droite), adapté de (Oliver et Pharr 1992; Oliver et Pharr 2004).

2.2.1.3. Indentation et os

Les différentes techniques d'indentation proposent des gammes de charges allant de quelques μN à plusieurs N. Ainsi il est possible d'obtenir des résultats de dureté et de module au niveau du tissu osseux, du BSU mais aussi de la lamelle osseuse. L'analyse au niveau tissulaire correspond le plus souvent à la moyenne d'essais réalisés à l'échelle du BSU. Au niveau tissulaire, la microdureté Vickers varie de 20 à 60 kg/mm^2 chez l'homme. Il a été montré pour les os longs de différents modèles animaux, que la microdureté tendait à être plus élevée au niveau de la diaphyse qu'au niveau des méta- et épiphyses mettant ainsi en évidence l'anisotropie au niveau tissulaire (Weaver 1966; Bonser 1995; Riches *et al.* 1997). La microdureté de l'os trabéculaire a été décrite comme étant plus basse de 10 à 15% que celle de l'os cortical interstitiel (Weaver 1966; Hodgkinson *et al.* 1989). Si la microdureté ne semble pas variée avec l'âge de l'individu (Weaver 1966), de nombreux auteurs ont mis en évidence une variation dans certaines conditions pathologiques. En effet, la microdureté est abaissée dans l'os sous chondral de patients souffrant d'arthrose (Lereim *et al.* 1974; Coats *et al.* 2003). Dans le cas de l'ostéoporose il a été montré une absence de modification de la microdureté chez les femmes (Weaver 1966; Boivin *et al.* 2008). Dans le cas de l'ostéoporose masculine, certains travaux montrent une diminution de la microdureté (Boivin *et al.* 2008), tandis que d'autres montrent une absence de modifications (Weaver 1966).

La microdureté est largement corrélée avec le niveau de minéralisation (Carlstrom 1954; Amprino 1958; Weaver 1966; Hodgkinson *et al.* 1989; Boivin *et al.* 2008) mais il a aussi été montré l'importance de la phase organique dans la définition de la microdureté. La microdureté est par exemple de 20 à 25% plus élevée dans l'axe des fibres de collagène que dans l'axe perpendiculaire à ces dernières (Amprino 1958). Par la suite, il a été mis en évidence une variation de la microdureté avec l'arrangement des fibres de collagène liée au modèle d'organisation « rotative plywood » des BSU (Stea *et al.* 1995; Ziv *et al.* 1996). Plus récemment, des essais de microdurimétrie sur le tissu ostéoïde de patients ostéomalaciques suggèrent que la dureté propre à la matrice organique pourrait expliquer près d'un tiers de la microdureté de l'os minéralisé (Boivin *et al.* 2008).

Les techniques d'indentation instrumentée montrent des valeurs de module d'élasticité comprises entre 7 et 35 GPa à l'échelle du BSU ou de la lamelle osseuse (Tableaux 1 et 2). A l'échelle du BSU, le module dépend comme dans le cas de la dureté, du degré de minéralisation mais aussi de l'orientation du collagène (Zysset 2009). Ainsi, l'os interstitiel présente un module élastique plus élevé que celui d'un ostéon ou d'un paquet osseux trabéculaire (Tableau 1). A noter, que les paramètres mesurés par indentation sont sensibles à la préparation des échantillons. En effet, l'hydratation, la fixation, l'inclusion et la rugosité des échantillons pouvait modifier les résultats obtenus (Rho et Pharr 1999; Xu *et al.* 2003; Donnelly *et al.* 2006a; Mittra *et al.* 2006; Ferguson 2009; Zysset 2009). Les essais d'indentation sont aussi sensibles à la charge utilisée, la distance entre deux essais successifs et la proximité d'un pore (canal de Havers ou bord d'un échantillon) (Johnson et Rapoff 2007).

Site osseux	BSU	Préparation	E (GPa)	Référence
Tibia (diaphyse)	O	Fixé	24,7 ± 1,4	(Rho <i>et al.</i> 1997)
Tibia (diaphyse)	I	Fixé	28,4 ± 0,8	
Fémur (diaphyse)	O + I	Fixé	25,8 ± 0,2	(Turner <i>et al.</i> 1999)
Fémur (diaphyse)	T	Fixé	19,9 ± 1,9	
Fémur (diaphyse)	O	Hydraté	21,0 ± 5,9	(Zysset <i>et al.</i> 1999)
Fémur (diaphyse)	I	Hydraté	23,3 ± 5,8	
Fémur (col)	O	Hydraté	17,4 ± 5,8	
Fémur (col)	I	Hydraté	19,2 ± 5,8	
Fémur (col)	T	Hydraté	12,5 ± 6,2	
Radius (distal)	O	Hydraté	17,8 ± 2,2	
Radius (distal)	I	Hydraté	18,3 ± 2,0	
Radius (distal)	T	Hydraté	15,0 ± 1,8	
Vertèbre (L2)	T	Hydraté	8,9 ± 1,4	
Vertèbre (L2)	T	Fixé	21,3 ± 2,5	(Rho <i>et al.</i> 1999)
Vertèbre (L2)	T	Fixé	22,9 ± 1,8	(Donnelly <i>et al.</i> 2006b)
			32,3 ± 2,7	

Tableau 1: Modules élastiques obtenus par indentation instrumentée à l'échelle de l'unité structurale élémentaire chez l'Homme (O : ostéon, I : os interstitiel cortical et T : paquet osseux trabéculaire).

A l'échelle de la lamelle osseuse, la dureté et le module d'élasticité varient avec le type de lamelle. En effet, l'observation de la surface du tissu osseux montre deux types de lamelles : les lamelles épaisses qui apparaissent brillantes et les lamelles fines qui apparaissent sombres (Fig. 27). La dureté et le module d'élasticité mesurés par indentation instrumentée sont plus élevés dans les lamelles épaisses que dans les lamelles fines (Tableau 2).

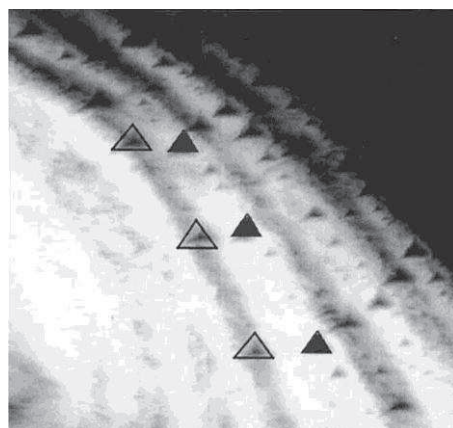


Figure 27: Topographie réalisée en microscopie par force atomique montrant les indents résiduels sur des lamelles fines (triangles transparents) et épaisses (triangles sombres) sur un champ de 50x50 µm, adapté de (Hengsberger *et al.* 2002).

Site osseux	BSU	Préparation	E (GPa)		Référence
			lamelles épaisses	lamelles fines	
Fémur (col)	T	Déshydraté	27,2 ± 3,3	24,8 ± 3,6	(Hengsberger <i>et al.</i> 2002)
Fémur (col)	O	Déshydraté	23,6 ± 3,6	18,2 ± 2,4	
Fémur (col)	T	Hydraté	12,7 ± 2,4	8,0 ± 0,7	
Fémur (col)	O	Hydraté	15,8 ± 4,8	12,0 ± 5,4	
Fémur (diaphyse)	O	Déshydraté	23,3 ± 2,2	21,9 ± 2,7	(Xu <i>et al.</i> 2003)

Tableau 2: Modules élastiques obtenus par indentation instrumentée à l'échelle de la lamelle osseuse chez l'Homme (O : ostéon et T : paquet osseux trabéculaire).

2.2.2. Microscopie acoustique

Cette technique initiée dans les années 1970 dispose de deux modes d'exécutions : en transmission ou en réflexion. En réflexion, on parle de microscopie acoustique à balayage ou SAM (pour Scanning Acoustic Microscopy). Les images obtenues en SAM représentent la distribution spatiale d'une combinaison de propriétés mécaniques locales (densité, élasticité, anisotropie...) qui définissent le coefficient de réflexion de l'échantillon. Le coefficient de réflexion est obtenu en déplaçant à la surface de l'échantillon une sonde capable d'émettre et de recevoir une onde acoustique focalisée. La continuité entre la sonde et l'échantillon est assurée par un milieu couplant qui est souvent l'eau. Le coefficient de réflexion mesuré peut alors être décomposé en fonction de l'impédance acoustique des matériaux mis en jeu dans la propagation et la réflexion de l'onde ultrasonore ainsi que de l'angle d'incidence du rayon acoustique. Connaissant l'impédance acoustique du milieu de couplage, il est alors possible de remonter à celle de l'échantillon. L'impédance acoustique permet le calcul du coefficient élastique, ce dernier étant lié à l'impédance multipliée par la vitesse de propagation de l'onde dans l'échantillon (Ashman *et al.* 1984). Cette technique permet de réaliser des mesures à l'échelle du BSU (Fig. 28) ou de la lamelle osseuse (Rupin *et al.* 2009). La microscopie acoustique a permis de montrer, comme en indentation, un module d'élasticité plus élevé dans les lamelles épaisses que dans les lamelles fines (Hofmann *et al.* 2006). Finalement, l'impédance acoustique a été corrélée ($R^2=0,85$, $p<0,01$) au module élastique mesuré par test de traction classique sur des échantillons osseux bovin (Kotha *et al.* 2008).

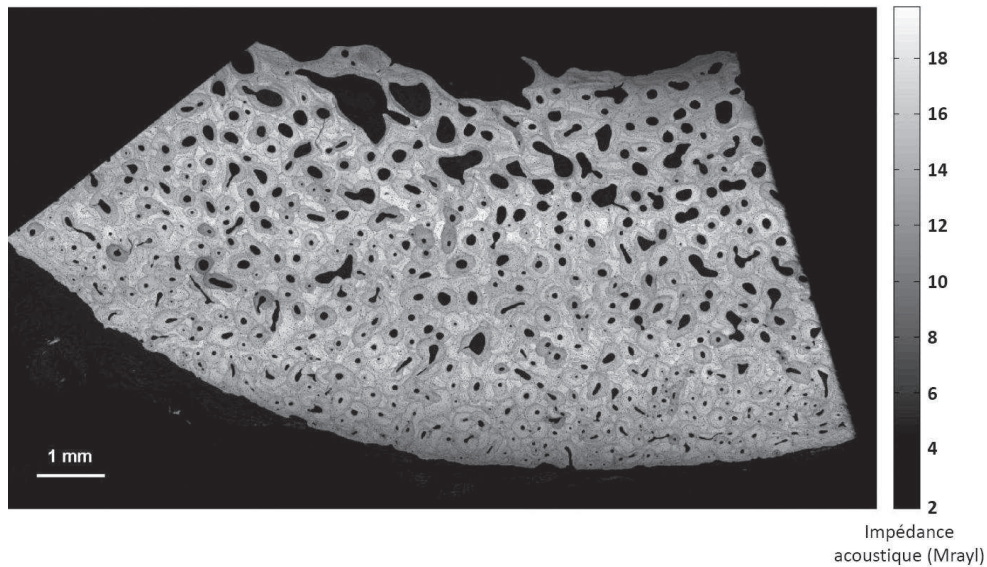


Figure 28: Cartographie d'impédance acoustique obtenue en microscopie acoustique à balayage sur un quadrant cortical de fémur humain. Le niveau de gris est corrélé à la fois au module d'élasticité et au degré de minéralisation (Mathilde Mouchet, Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, Université Paris 6, France)

2.3. Etude de la nanostructure par microscopie à force atomique

L'approche mécanique de la nanostructure, de part les dimensions d'investigation, est complexe et limitée. Actuellement, la seule technique permettant de mesurer de manière directe les propriétés mécaniques de la nanostructure est la microscopie par force atomique ou AFM (pour Atomic Force Microscopy) utilisée comme indenteur. Cette technique consiste à mesurer les différentes forces d'interaction (forces de répulsion ionique, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces de friction...) entre une pointe idéalement atomique fixée sur un levier mécaniquement caractérisé et les atomes de surface d'un échantillon. La déflexion du levier est suivie en positionnant un faisceau laser sur le levier, ce dernier va se réfléchir sur un miroir qui dirige le faisceau réfléchi sur un photodétecteur qui va enregistrer le signal lumineux. Ce système a pu être utilisé pour obtenir des courbes charge-déplacement à très haute résolution permettant de remonter aux propriétés élastiques de fibres de collagène isolées (Balooch *et al.* 2008). Ces auteurs ont montré que le long de la fibre de collagène de type I, la valeur du module d'élasticité variait avec la périodicité axiale de 67 nm, le module étant plus élevé au niveau des zones de chevauchement des fibrilles. Cette étude a aussi mis en évidence un module compris entre 1,5 GPa pour une fibre isolée minéralisée et 50 MPa pour une fibre déminéralisée, mettant ainsi en évidence l'importance de la minéralisation intrafibrillaire dans la résistance mécanique des tissus minéralisés (Balooch *et al.* 2008).

3. Fragilité osseuse et ses déterminants

3.1. Concept de fragilité osseuse

L'os est un matériau composite complexe, mécaniquement compétent est unique dans son comportement. En effet, dans les conditions physiologiques l'os est une structure hautement hiérarchisée présentant des propriétés souvent perçues comme contradictoires : l'os est raide mais flexible et léger mais résistant (Seeman et Delmas 2006). Ces caractéristiques lui confèrent la capacité de résister à la fracture. Initialement, cette résistance à la fracture a été largement attribuée à la quantité d'os, autrement dit à la masse osseuse. Par la suite, l'étude et la compréhension de l'ostéoporose et de ses traitements a remis en question ce paradigme et à apporter de nouvelles hypothèses. L'ostéoporose est une ostéopathie multi causale impliquant un hyper remodelage qui aboutit à une raréfaction osseuse et à une augmentation du risque fracturaire (l'ostéoporose sera spécifiquement développée dans le prochain chapitre). Actuellement, au niveau international, la méthode standard pour le diagnostic de l'ostéoporose est l'absorptiométrie biphotonique aux rayons X (DEXA). Cette technique permet de mesurer la densité minérale osseuse (BMD) autrement dit, la masse osseuse minéralisée. Cette variable est ensuite comparée à une valeur moyenne issue d'une population de référence pour poser le diagnostic.

Par la suite, de nombreux travaux ont soulevé les limites du paradigme de l'ostéoporose et de la perte osseuse (Heaney 2003). Il a été rapporté dans différentes études, que la BMD n'expliquait que 60 à 75% de la résistance à fracture (Hansson *et al.* 1980; Lespessailles *et al.* 1998). En outre, l'âge (Hui *et al.* 1988) et l'activité du remodelage osseux (Garnero 2000) sont des facteurs prédictifs de la fragilité osseuse indépendants de la BMD. De plus, des analyses *post-hoc* des données obtenues au cours d'études cliniques, ont montré que la diminution du risque fracturaire était modestement expliquée par l'augmentation de la BMD observée sous traitement antirésorptif (Cefalu 2004; Delmas et Seeman 2004). Ainsi, la proportion de la diminution du risque de fracture imputable à l'augmentation de la BMD est de 16%, 28% et 4% respectivement pour un traitement avec l'alendronate, le risédronate et le raloxifène (Cummings *et al.* 2002; Sarkar *et al.* 2002). Finalement, la variation de BMD sous traitement n'est pas liée de manière linéaire avec la réduction du risque de fracture, une diminution d'un écart-type de la BMD conduit à un doublement du risque fracturaire (Cefalu 2004).

Ces résultats montraient donc que si la quantité de tissu osseux était un déterminant de la résistance osseuse, une partie importante de sa variance restait à expliquer. Par la suite, de nombreux facteurs, moins évidents à quantifier, ont été rapportés comme ayant un rôle dans la résistance osseuse. L'ensemble de ces facteurs est regroupé sous l'appellation « déterminants de la fragilité osseuse » définissant ainsi la « qualité osseuse ». Ceci a abouti au développement de nombreuses études visant à caractériser les paramètres pertinents de la qualité osseuse, et à en étudier l'influence sur la résistance mécanique de l'os (Bouxsein 2003; Seeman et Delmas 2006).

3.2. Déterminants de la fragilité osseuse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'os est un tissu hautement hiérarchisé et chaque niveau de son organisation (de l'organe au cristal de minéral osseux et à la fibre de collagène) influence le niveau d'organisation supérieur. De plus, l'os est un tissu en perpétuel remodelage ce qui lui permet de s'adapter aux sollicitations mécaniques en modifiant sa taille, sa géométrie ou encore la composition de sa matrice constituante. Les déterminants de la fragilité osseuse appartiennent à deux catégories principales : les déterminants extrinsèques liés à la structure de l'os et les déterminants intrinsèques liés au matériau. Tous ces déterminants sont modulés par l'activité du remodelage osseux (Fig. 29) (Bouxsein 2005; Compston 2006; Davison *et al.* 2006; Seeman et Delmas 2006). Au-delà de ces déterminants étudiés individuellement, l'interaction entre ces derniers est classiquement illustrée par la formule « le tout est supérieur à la somme de ses parties » (Davison *et al.* 2006).

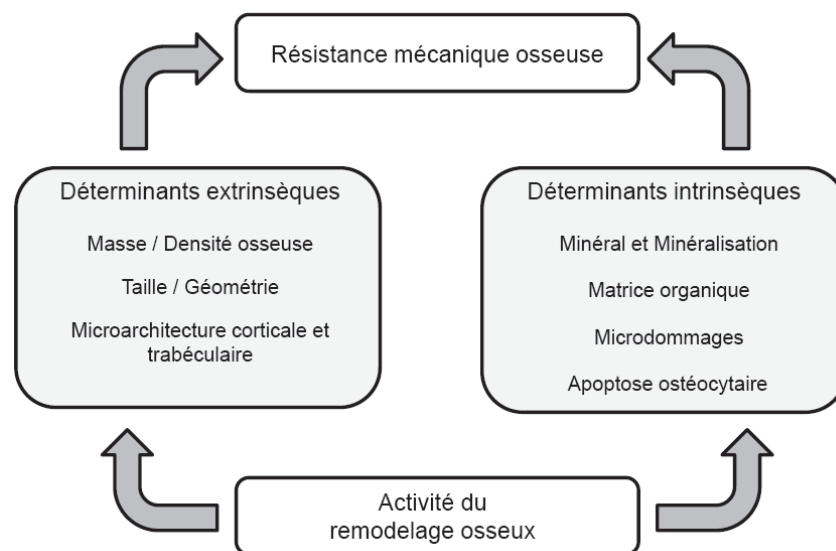


Figure 29: Les déterminants de la fragilité osseuse, adapté de (Bouxsein 2005; Compston 2006; Davison *et al.* 2006; Seeman et Delmas 2006).

3.2.1. Déterminants extrinsèques

3.2.1.1. Masse et densité minérale osseuses

La masse osseuse est le déterminant le plus simple à appréhender dans la résistance mécanique osseuse. En effet, comme pour tout matériau, un os massif est associé logiquement à un os plus résistant (Davison *et al.* 2006). Au cours de la vie, 3 processus majeurs déterminent la masse et la densité osseuse : la croissance, le modelage osseux et le remodelage. Au cours de la croissance, il est observé une augmentation de la longueur des os long et du modelage osseux

conduisant à une accumulation de la masse osseuse. Ainsi, il a été montré qu'environ un tiers de la masse osseuse de l'adulte était accumulée sur une période de quatre ans autour de l'adolescence (Bailey 1997). Cependant, une croissance trop rapide est associée avec un degré de minéralisation plus bas et un risque fracturaire plus élevé (Parfitt 1994b; Rauch et Schoenau 2001). Le remodelage osseux est un déterminant capable de moduler aussi bien la densité minérale de l'os que sa masse puisque un déséquilibre de la balance entre la résorption et la formation va avoir une conséquence directe sur la quantité de tissu osseux. Ce dernier point est directement illustré par la raréfaction osseuse liée à l'âge. Il a en effet été montré dans l'os trabéculaire une diminution de la quantité de matrice déposée au cours de la formation osseuse avec le vieillissement (Lips *et al.* 1978). Chez la femme, cette raréfaction osseuse physiologique est amplifiée au cours de la ménopause par une augmentation de l'activité du remodelage osseux liée à la carence oestrogénique. Ce phénomène peut conduire à des contextes ostéopéniques voir ostéoporotiques largement associés à une fragilité osseuse (Chapurlat et Chappard 2009).

Comme nous l'avons évoqué, la densité minérale osseuse ou BMD, mesurée par DEXA est un indicateur de la résistance osseuse couramment utilisé. Cette mesure qui reflète la quantité de tissu minéralisé (exprimée en g/cm^2) joue un rôle important dans la biomécanique osseuse et le risque fracturaire (Hui *et al.* 1988; Ritchie 2010). La BMD est aussi un outil diagnostique de la raréfaction osseuse, elle peut être mesurée au niveau du rachis lombaire, de la hanche, de l'avant bras. Le résultat est ensuite comparé par l'écart à la valeur mesurée dans une population d'adulte jeune au même site. Le résultat est exprimé en T-score et l'Organisation Mondiale de la Santé a défini le seuil ostéoporotique pour un T-score $\leq -2,5$. Il a été décrit de l'observation clinique qu'une diminution d'un écart-type de la BMD correspondait à un doublement du risque de fracture (Chapurlat et Chappard 2009). Si la DEXA reste aujourd'hui le standard dans la mesure de la BMD, elle ne permet ni une mesure de densité volumique ni d'accéder à la microstructure osseuse, or, ces paramètres améliorent la prédiction des fractures (Melton *et al.* 2007).

3.2.1.2. Taille et la géométrie des os

Les facteurs relatifs à la taille (masse totale de l'os) et à la géométrie (distribution de la masse dans l'espace) entrent aussi en jeu dans la définition de la résistance mécanique osseuse. Il a été montré que plus une pièce osseuse était volumineuse, plus elle était résistante aux contraintes mécaniques (Lochmuller *et al.* 2002). La géométrie de l'os cortical des os longs possède aussi un rôle majeur dans leur résistance mécanique indépendamment de la BMD (Fig. 30). La résistance d'un os long aux forces exercées en torsion ou en flexion est proportionnelle à son moment d'inertie. Le moment d'inertie reflète la répartition des masses d'un solide autour d'un axe. Ainsi, pour une BMD donnée, un os de plus grand diamètre, bien qu'ayant une corticale plus fine, aura un moment d'inertie plus grand et sera plus résistant aux contraintes, aussi bien en compression qu'en flexion (Bouxsein 2005).

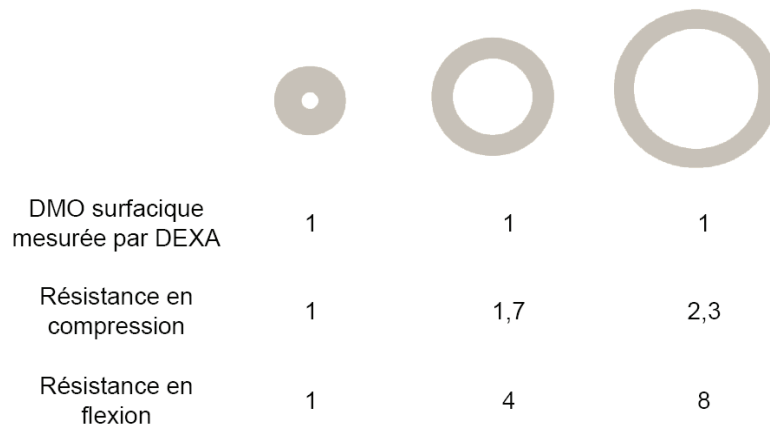


Figure 30: Influence de la géométrie d'un os long sur sa résistance mécanique, adapté de (Van der Meulen *et al.* 2001; Bouxsein 2005).

Ce principe est illustré dans la physiologie osseuse par l'apposition périostée. Il a été montré que la perte osseuse liée à la ménopause était aussi associée à une apposition d'os au niveau du périoste, induisant une augmentation du diamètre des os. Cette apposition périostée est un mécanisme qui permet de compenser, au moins partiellement la fragilité associée à la perte osseuse observée après la ménopause (Ahlborg *et al.* 2003). Plus généralement, l'apposition périostée permet de compenser la résorption endostéale qui augmente avec l'âge. Elle pourrait expliquer en partie la différence de risque de fracture liée à l'âge observée entre les hommes et les femmes. En effet, l'apposition périostée est plus importante chez l'homme que chez la femme (Seeman 2001). L'effet de l'apposition périostée seule a été simulé et montre qu'une augmentation de 10% du diamètre externe, sans changement du diamètre interne, conduisait à une augmentation de 42% de la résistance en flexion et de 28% en compression (Fig. 31).

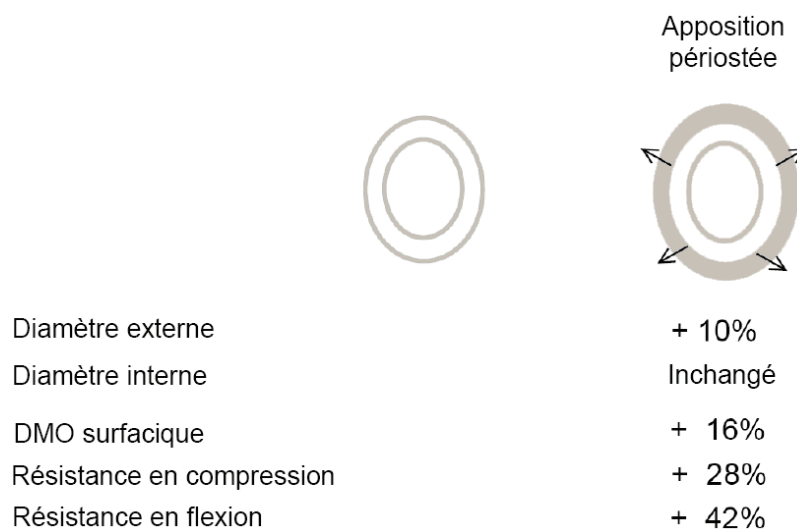


Figure 31: Effet de l'apposition périostée sur la résistance mécanique osseuse, adapté de (Bouxsein 2005).

Outre le diamètre, la longueur des os a aussi une importance dans la résistance mécanique. En effet, il a été décrit qu'une augmentation d'un écart type de la longueur du col du fémur doublait le risque de fracture (Faulkner *et al.* 1993).

3.2.1.3. Microarchitecture osseuse

On sait que la répartition des masses de tissu dans l'espace est un indicateur pertinent de la résistance osseuse. Par ailleurs, l'organisation de ces masses ou microarchitecture, joue aussi un rôle dans la résistance aux sollicitations mécaniques au niveau cortical comme trabéculaire. Au niveau cortical, outre leur épaisseur, leur porosité influence directement la résistance de l'os (Davison *et al.* 2006). En effet, Il a été montré qu'une augmentation modérée de la porosité corticale conduisait à une dégradation disproportionnée de la résistance mécanique (Turner 2002). La porosité endocorticale a cependant un impact plus modéré sur la résistance que la porosité de la région du périoste. Avec le vieillissement, le nombre de pores tend à diminuer alors que leur taille augmente, ce qui est expliqué par une fusion des pores grandissants (Bousson *et al.* 2001). Plus récemment, il a été montré que cette fusion amenait à une « trabécularisation » de la région endocorticale, réduisant l'épaisseur de la corticale d'aspect compact (Zebaze *et al.* 2010). Après 70 ans, les femmes présentent une porosité corticale supérieure à celle mesurée chez des hommes de même âge (McCalden *et al.* 1993). Finalement, l'association de la porosité corticale et de la minéralisation explique plus de 80% de la variance de la raideur, montrant ainsi l'importance de ces variables (Currey 1999).

La microarchitecture trabéculaire a été fréquemment décrite et des techniques telles que l'imagerie par résonance magnétique ou l'imagerie par tomographie quantitative à rayon X (QCT) ont permis de l'étudier directement en trois dimensions (Majumdar *et al.* 1998; Boutroy *et al.* 2005; Vico *et al.* 2008). Initialement, la microarchitecture trabéculaire a été étudiée en deux dimensions par histomorphométrie quantitative sur des biopsies osseuses iliaques (Meunier *et al.* 1976; Parfitt *et al.* 1987). Si cette technique est invasive, elle reste aujourd'hui la seule à pouvoir permettre sur un unique prélèvement, l'analyse du tissu osseux minéralisé, de la matrice organique, des populations cellulaires, de la moelle et aussi de la dynamique du remodelage osseux (Frost *et al.* 1969; Parfitt *et al.* 1987). La microarchitecture trabéculaire est habituellement décrite par l'épaisseur des travées, leur nombre, leur séparation, le degré de connectivité mais aussi du degré d'anisotropie et la nature poutre ou plaque de la structure (ou SMI pour Structural Model Index, il varie entre 0 et 3, 0=plaque et 3=poutre). Le degré d'anisotropie traduit l'alignement préférentiel des travées suivant un axe, il est compris entre 0 et 1 (0=structure isotrope et 1=structure anisotrope).

La résistance mécanique de l'os trabéculaire est directement liée à l'épaisseur des travées. En effet, la rupture d'une travée osseuse est généralement causée par du flambage et/ou de la flexion et la résistance d'une travée est proportionnelle au carré de son diamètre (Bell *et al.* 1967; Davison *et al.* 2006). Cependant, la perte de connectivité trabéculaire est plus délétère pour la résistance mécanique, qu'un simple amincissement des travées. Pour une perte osseuse donnée, la perforation ou la disparition de travées diminuait la résistance mécanique 2 à 3 fois plus que si la

perte était due à un amincissement trabéculaire (Silva et Gibson 1997). L'os trabéculaire est d'autant plus résistant lorsque son orientation principale suit l'axe des contraintes mécaniques et que sa connectivité est élevée (Goulet *et al.* 1994). D'une manière générale, l'augmentation de la connectivité trabéculaire réduit la longueur non soutenue des travées en augmentant la résistance mécanique de l'ensemble. Récemment, une série d'études portant sur l'os trabéculaire vertébrale a mis en évidence l'importance de la nature morphologique des travées, en montrant une corrélation négative significative entre le SMI et l'énergie à rupture (Roux *et al.* 2010; Wegrzyn *et al.* 2010). Autrement dit, les travées de type plaque procurent une résistance osseuse supérieure aux travées de type poutre.

L'analyse de la microarchitecture trabéculaire permet aussi de comprendre la fragilité osseuse liée à l'âge et le fait qu'elle soit plus importante chez la femme que chez l'homme. Avec le vieillissement, la perte osseuse augmente le risque de fracture dans les deux sexes (Fig. 32). Cependant, chez la femme, après la ménopause, l'accélération du remodelage osseux conduit à une perte osseuse par perforation des travées. Tandis que chez l'homme, la perte osseuse est davantage liée à un amincissement des travées dû à un déséquilibre du remodelage osseux en faveur de la résorption (Seeman 2001).

La microarchitecture osseuse corticale et trabéculaire est donc un déterminant majeur de la résistance mécanique osseuse indépendante de la masse.

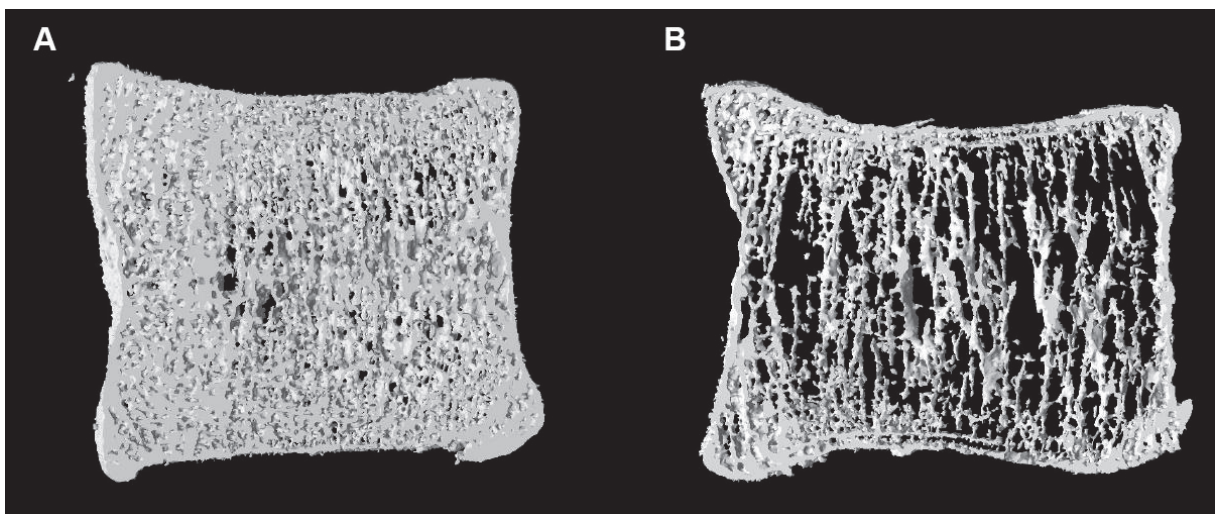


Figure 32: Détérioration de la microarchitecture liée à l'âge au niveau de vertèbres lombaires L3 issues d'hommes âgés de 26 ans (A) et de 83 ans (B). Ces images correspondent à des reconstructions partielles de volumes obtenus par microtomographie à une résolution de 35 μm (Jean-Paul Roux, INSERM U1033 équipe « Qualité Osseuse et Marqueurs Biologiques », Lyon, France).

3.2.2. Déterminants intrinsèques

3.2.2.1. Minéral et minéralisation

La minéralisation de la matrice osseuse est largement admise comme étant un déterminant majeur de la qualité osseuse intrinsèque. Que ce soit à l'échelle de l'organe, du tissu ou du BSU, il existe de nombreux travaux montrant la corrélation positive entre la quantité de minéral et la résistance mécanique (Currey 1984; Follet *et al.* 2004; Boivin *et al.* 2008). Initialement, la minéralisation était mesurée en pourcentage de poids de cendres après incinération de l'échantillon. Cette technique détruisant l'échantillon procure une information globale sur le contenu minéral mais pas d'information sur sa distribution au niveau tissulaire. Par rapport à une population normale, un os hypo- ou hyperminéralisé va être associé à une fragilité osseuse augmentée mais avec des comportements mécaniques distincts (Fig. 33). Ainsi, dans le cas de l'ostéomalacie (forme adulte du rachitisme), une pathologie osseuse qui se traduit par un défaut de minéralisation primaire, l'os est moins rigide et plus ductile. Autrement dit, il peut absorber plus d'énergie avant de se fracturer (Pettifor 2003; Chavassieux *et al.* 2007). A l'inverse, l'ostéopétrose est une ostéocondensation liée à un défaut de résorption osseuse. Cette pathologie est aussi associée à un risque de fracture élevé mais l'os va être plus rigide, moins flexible et donc moins ductile (Whyte 2003; Chavassieux *et al.* 2007).

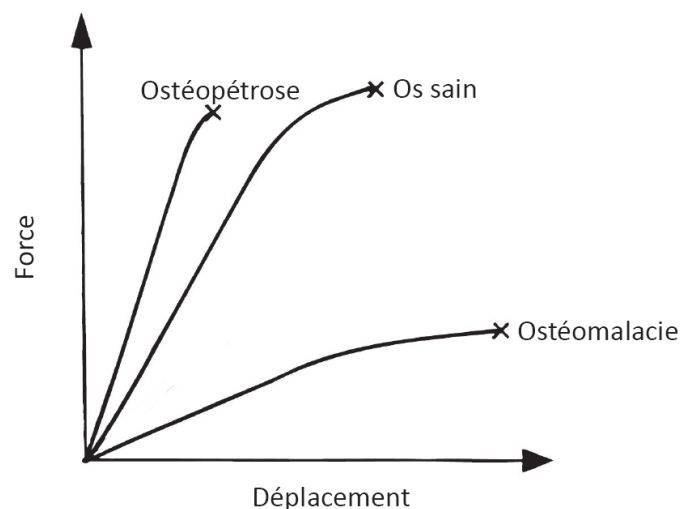


Figure 33: Courbe force/déplacement obtenue sur des os sain, ostéomalacique (hypominéralisé) et ostéopétrotique (hyperminéralisé), adapté de (Sato *et al.* 1999).

La minéralisation au niveau tissulaire ou degré de minéralisation, peut être mesurée par différentes techniques. L'avantage d'analyser la densité minérale à cette échelle est l'information obtenue sur la distribution de la minéralisation. Comme nous l'avons précédemment mentionné (paragraphe 4.4.2.), le remodelage osseux étant asynchrone dans le temps et l'espace, il en résulte

une hétérogénéité de la minéralisation entre des BSUs d'âges différents. Le degré de minéralisation osseuse et son hétérogénéité peuvent être mesurés par microradiographie quantitative (Boivin et Meunier 2002a; Boivin *et al.* 2008), par imagerie quantitative en électrons rétrodiffusés (qBEI pour quantitative Backscattering Electron Imaging) (Reid et Boyde 1987; Roschger *et al.* 1995) ou encore par microtomographie (μ CT) par radiation Synchrotron (Nuzzo *et al.* 2002). Ces méthodes présentent des résolutions surfaciques et volumiques différentes mais donnent accès à des informations et des résultats comparables (Boivin et Meunier 2003a). En effet, ces techniques ont une résolution telle, qu'il est possible d'obtenir précisément la fréquence de distribution des valeurs de niveaux de gris (directement corrélés au degré de minéralisation) avec un pas de quelques mg de minéral par cm^3 de tissu osseux. Et ainsi, à partir des courbes ou histogrammes de distribution, d'en mesurer l'hétérogénéité au niveau cortical, trabéculaire ou total (trabéculaire + cortical). Une étude réalisée au niveau du calcaneum, a montré une corrélation significative entre la contrainte maximale à rupture, le module de Young, l'énergie à rupture mesurés par compression uniaxiale et le degré de minéralisation mesuré sur la coupe adjacente par microradiographie quantitative (Follet *et al.* 2004). Ainsi, dans un contexte physiologique, une matrice osseuse plus minéralisée est plus résistante.

En ce qui concerne l'influence de l'hétérogénéité de la minéralisation dans la résistance osseuse, l'étude de modèles prédictifs utilisant des techniques en éléments finis tendent à montrer que l'introduction d'une hétérogénéité de la minéralisation réduit les propriétés mécaniques du modèle en question (van der Linden *et al.* 2001; Renders *et al.* 2008). Dans des conditions physiologiques, l'hétérogénéité de la minéralisation permet une résistance optimale aux sollicitations mécaniques. En effet, les pathologies qui modifient cette hétérogénéité dans un sens ou dans l'autre sont associées à une augmentation de la fragilité osseuse (Boivin *et al.* 2009).

La densité minérale mesurée à l'échelle du tissu osseux (degré de minéralisation) ainsi que sa distribution jouent donc un rôle essentiel dans la fragilité osseuse. En outre, la qualité même du minéral, à l'échelle du cristal entre aussi dans la définition de la résistance mécanique. Au cours de la minéralisation osseuse, le nombre de cristaux augmente ainsi que leur taille et leur degré de cristallinité (Boivin et Meunier 2003a; Davison *et al.* 2006; Bala *et al.* 2010b). Le degré de cristallinité, qui correspond à la perfection de l'arrangement des éléments constituant la maille cristalline, est associé à la qualité de l'os (Yerramshetty et Akkus 2008). En effet, une augmentation de la taille des cristaux et/ou de la cristallinité entraîne une diminution de la déformation maximale à fracture (Freeman *et al.* 2001). Cette condition favoriserait aussi l'initiation de microdommages (Burr 2003). Plus généralement, la cristallinité peut être modifiée par la présence d'ions étrangers inclus dans la maille cristalline par des mécanismes de substitution. En fonction des éléments substitués, la cristallinité va soit être diminuée, comme dans le cas de la présence de carbonates (Blumenthal *et al.* 1975; Legeros 1981), soit être augmentée comme dans le cas de la présence de fluor (Legeros 1981; Fratzl *et al.* 1994; Farlay *et al.* 2010). Dans ces deux cas, la qualité de l'os est altérée en association avec une augmentation de sa fragilité. Certains auteurs suggèrent aussi que la distribution de la taille des cristaux est impliquée dans la résistance mécanique osseuse. Ainsi, une distribution homogène de la taille des cristaux augmenterait le risque de fracture (Boskey 2003).

L'ensemble de ces données montre que le minéral est impliqué dans la qualité osseuse tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Une hétérogénéité du degré de minéralisation mais aussi de la taille des cristaux, ainsi qu'un degré de cristallinité maintenu sont donc des éléments associés à une qualité osseuse optimale.

3.2.2.2. Collagène

L'os est un matériau composite constitué de phases minérale et organique. Dans les conditions physiologiques, il est décrit schématiquement que la phase minérale contribue à la raideur et la résistance alors que la matrice organique assure sa ductilité. L'un des exemples pathologiques impliquant spécifiquement le collagène et étant lié à un risque de fracture élevé est l'ostéogenèse imparfaite. En effet, cette pathologie est associée à une mutation (200 mutations différentes ont été rapportées à ce jour) des gènes COL1A1 et COL1A2 codant pour le procollagène de type I (Byers *et al.* 1991). Elle se traduit au niveau de la matrice osseuse par une diminution de la quantité et de la qualité du collagène et est associée à un risque de fracture élevé (Rauch et Glorieux 2004). De plus, la trame collagénique servant de support au dépôt initial du minéral et au processus de minéralisation en générale, les patients souffrant d'ostéogenèse imparfaite présentent une minéralisation anormale.

Au cours de la maturation du collagène, un ensemble de modifications post traductionnelles enzymatiques ou non vont aboutir à la formation de molécules de pontage inter- et intrafibrillaires appelées liaisons croisées du collagène ou crosslinks (Viguet-Carrin *et al.* 2006a). Le processus enzymatique implique l'action de la lysyl oxydase qui conduit à la formation de liaisons croisées immatures divalentes (Lysino-5-ketonorleucine et Hydroxylysino-5-ketonorleucine) qui stabilisent les fibres de collagène immatures. Ces deux liaisons croisées immatures vont ensuite être transformées par condensation avec l'allysine en liaisons croisées trivalentes matures que sont la pyridoline (PYD) et la déoxypyridoline (DPD). La PYD et la DPD sont retrouvées majoritairement dans le collagène de tissus matures. Il existe deux modes de maturation non enzymatiques : la production de produits de glycation avancée (ou AGE pour Advanced Glycation End-products) dont le plus étudié est la pentosidine (PEN) et l'isomérisation /racémisation des télopeptides du collagène.

Chez l'homme, une étude menée sur des corps vertébraux testés en compression a montré une corrélation entre la contrainte maximale et le ratio PYD/DPD, indépendamment de la BMD. En revanche, cette corrélation n'était pas observée avec la PYD et la DPD prises séparément (Banse *et al.* 2002). Différentes études menées sur des fémurs humains (Zioupou *et al.* 1999) ou sur des échantillons trabéculaires vertébraux (Follet *et al.* 2011) n'ont pas montré de liaisons significatives entre les paramètres mécaniques classiques et la quantité de PYD et de DPD. Si la contribution des liaisons croisées issues d'un processus enzymatique dans la résistance osseuse reste controversée, celle des AGEs semble établie. En effet, plusieurs études ont montré que les quantités d'AGEs totales ou de pentosidine seule étaient corrélées négativement avec la résistance mécanique (Viguet-Carrin *et al.* 2006b; Tang *et al.* 2007). L'isomérisation de type β du télopeptide C-terminal, qui augmente avec l'âge, a aussi été corrélé négativement avec la

résistance mécanique osseuse mesurée sur des corps vertébraux lombaires (Viguet-Carrin *et al.* 2006b).

Un nouveau type de liaison a été découvert plus récemment au cours d'une étude portant sur des polymères de collagène (Thompson *et al.* 2001). L'utilisation de l'AFM, a permis de mettre en évidence que l'énergie dissipée pour étirer une fibre de collagène différait en fonction de l'environnement ionique, et qu'une fois allongée, la fibre de collagène pouvait retrouver sa forme initiale. Ainsi, des liaisons dites « sacrificielles », se « sacrifieraient » pour permettre d'absorber l'énergie en évitant la rupture de la fibre de collagène. De plus, le délai de reformation de ces liaisons est corrélé avec le temps de recouvrement élastique observé après une indentation réalisée sur l'os (Thompson *et al.* 2001). L'existence de ces liaisons qui pourraient inclure des ponts ioniques entre les résidus chargés du collagène a été confirmée plus récemment (Yeni *et al.* 2006). Cette dernière étude a montré que ces liaisons modifiaient le module élastique dynamique (i.e., module de conservation) à hauteur de 4%. Cependant, ni la résistance ni la ductilité n'étaient modifiées en fonction des solutions ioniques d'incubation, limitant ainsi le rôle des liaisons sacrificielles dans le comportement mécanique à l'échelle macroscopique (Yeni *et al.* 2006).

Ces résultats pris ensemble montrent une contribution importante de la nature et de la proportion des liaisons croisées du collagène dans la qualité osseuse.

3.2.2.3. Microfissures et apoptose ostéocytaire

L'activité journalière soumet l'os cortical et trabéculaire à des contraintes mécaniques cycliques. L'os est adapté à ces contraintes de part sa structure et son architecture à différents niveaux d'organisation. Cependant, l'accumulation de ces contraintes peut aboutir à la formation de microfissures. Elles correspondent à des ruptures de continuité dans le tissu osseux qui servent à dissiper l'énergie brutalement et donc à prévenir un endommagement plus conséquent. Ces fissures sont mises en évidence histologiquement par coloration en bloc avec des fluorochromes tels que la fuchsine basique ou la calcéïne (Lee *et al.* 2003). Les microfissures peuvent être linéaires ou diffuses (Fig. 34), chaque type ayant un effet différent sur les propriétés mécaniques de l'os (Diab et Vashishth 2005). De nombreuses études ont montré que l'accumulation de microfissures fragilisait l'os (Burr *et al.* 1996; Fazzalari *et al.* 1998; Schaffler 2003), plus spécifiquement l'accumulation de microfissures diminue la raideur de l'os (Schaffler 2003). Il a aussi été observé une accumulation exponentielle des microfissures avec l'âge (Fazzalari *et al.* 1998; Arlot *et al.* 2008) qui pourrait être un déterminant de la fragilité osseuse liée à l'âge. La cause de cette accumulation avec l'âge n'est pas clairement établie à ce jour, mais pourrait être liée au remodelage osseux ciblé. En effet, le remodelage osseux ciblé est associé à la réparation des microfissures (Burr *et al.* 1985; Mori et Burr 1993). Une étude plus récente suggère chez le rat que la réparation des microfissures par le remodelage ciblé est diminuée avec l'âge de l'animal (Waldorff *et al.* 2007).

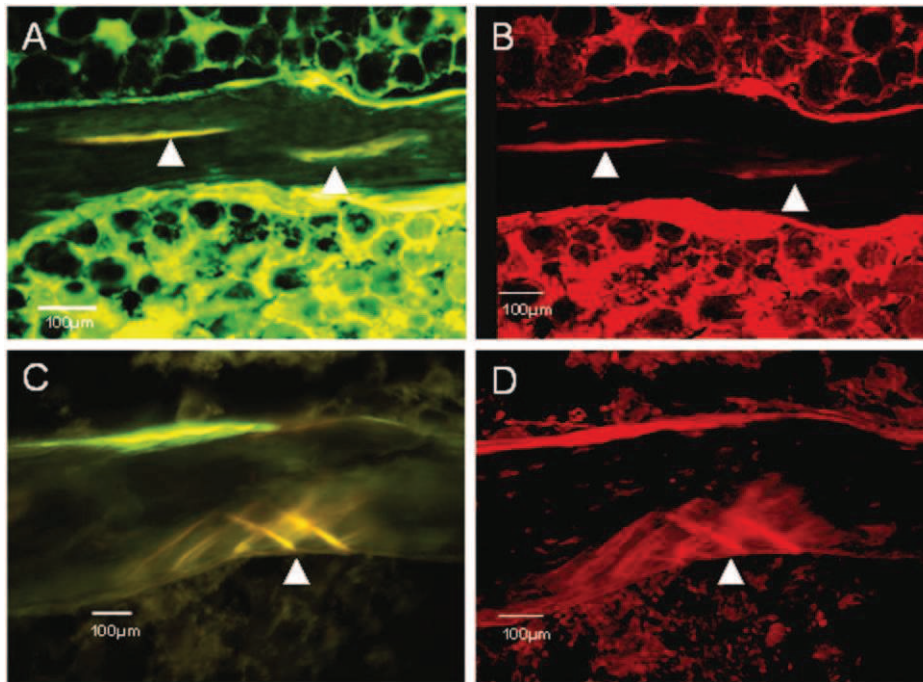


Figure 34: Micrographies de microfissures linéaires (A, B) et diffuses (C, D) colorées par la calcéine et observées en microscopie optique sous illumination ultraviolette (A, C) et en microscopie confocale (B, D), adapté de (Arlot *et al.* 2008).

La présence de microfissures a été plusieurs fois reliée à une densité de lacunes ostéocytaires basse et/ou à une activité de remodelage élevé (Mori et Burr 1993; Vashishth *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2005). Plus précisément, des modèles mathématiques ont montré que la distribution de ces trois événements suivait des lois de probabilité similaires (Vashishth *et al.* 2000), suggérant ainsi que la densité de microfissures, la densité de lacunes ostéocytaires et le remodelage osseux sont impliqués dans le même phénomène biologique. D'autres travaux ont permis de préciser ce phénomène et sa chronologie. En effet, outre une densité de lacunes ostéocytaires basse, la présence de microfissures est aussi liée au taux d'apoptose ostéocyttaire. Ainsi, chez le rat, l'apoptose ostéocyttaire est colocalisée avec les zones contenant des microfissures. Ces mêmes zones coïncidaient aussi avec un remodelage osseux subséquent (Verborgt *et al.* 2000). L'utilisation d'inhibiteurs des caspases (enzymes clefs de l'apoptose) a confirmé chez le rat, que l'apoptose ostéocyttaire est une étape indispensable à l'initiation du remodelage ciblé (Cardoso *et al.* 2009). L'ensemble de ces résultats supportent l'hypothèse que les microfissures induiraient l'apoptose des ostéocytes responsable de l'initiation d'un remodelage osseux ciblé pour remplacer la matrice endommagée (Burr *et al.* 1985).

3.2.2. Remodelage osseux

Le remodelage osseux tient une place centrale dans la résistance mécanique osseuse (Weinstein 2000; Heaney 2003). Il permet à l'os de se renouveler et assure ainsi la pérennité de ses propriétés physico-chimiques. De plus, son activité agit directement sur la majorité des autres déterminants de la fragilité osseuse. Comme nous l'avons vu ci-dessus, le remodelage osseux va pouvoir agir sur la taille et la géométrie des os et ainsi moduler le moment d'inertie des os longs. Un remodelage osseux accéléré va favoriser une augmentation de la porosité corticale, une diminution de l'épaisseur des travées, voir une perte de connectivité modifiant ainsi la microarchitecture.

L'activité du remodelage influence aussi les déterminants de la qualité osseuse intrinsèque, il assure au tissu osseux un degré de minéralisation et une hétérogénéité optimale. Une activité de remodelage élevée aura tendance à réduire la durée de la minéralisation secondaire et donc le degré de minéralisation mais aussi à augmenter son hétérogénéité. A l'inverse, une faible activité de remodelage osseux va permettre aux différents BSU de compléter leur minéralisation avant d'être résorbés par un nouveau cycle de remodelage. Ainsi, au niveau tissulaire, le degré de minéralisation va être augmenté et l'hétérogénéité diminuée, favorisant l'initiation de microfissures (Bousson *et al.*; Boivin et Meunier 2002b; Boivin et Meunier 2002a; Bergot *et al.* 2009; Boivin *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009). L'importance du remodelage est aussi illustrée dans le contexte du remodelage osseux ciblé et de la réparation des microfissures. Il a en effet été montré chez le chien que l'utilisation de fortes doses de bisphosphonate (agent inhibiteur de la résorption) conduisait à une accumulation de microfissures et à une diminution de la résistance osseuse (Mashiba *et al.* 2000). Cependant, l'accumulation de microfissures associée à un traitement par les bisphosphonates chez l'homme n'a, à ce jour, jamais été mise en évidence (Chapurlat *et al.* 2007; Stepan *et al.* 2007). La relation entre l'activité du remodelage osseux et la résistance osseuse peut donc être schématisée par une courbe en U inversé (Fig. 35). Cette représentation montre une diminution rapide de la résistance osseuse dès que l'activité du remodelage varie autour de la valeur optimale, ce qui souligne l'importance du remodelage dans la qualité osseuse (Weinstein 2000).

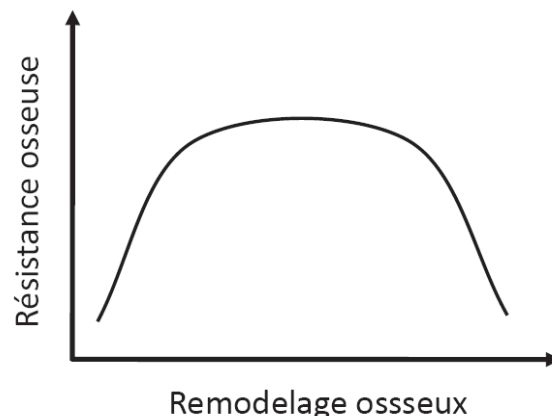


Figure 35: Relation entre la résistance osseuse et l'activité du remodelage osseux, adapté de (Weinstein 2000).

Partie 1

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre 3

L'ostéoporose et ses traitements

1.	Ostéoporose : définitions et généralités.....	72
1.1.	Problème de santé publique.....	72
1.2.	Définitions de l'ostéoporose.....	73
1.3.	Causes de l'ostéoporose.....	73
1.4.	Ostéoporose ménopausique.....	75
1.4.1.	Généralités.....	75
1.4.2.	Action des œstrogènes sur les cellules osseuses et conséquences de la ménopause.....	76
2.	Traitements de l'ostéoporose ménopausique.....	78
2.1.	Agents anticataboliques.....	78
2.1.1.	Bisphosphonates.....	78
2.1.2.	Modulateurs sélectifs des récepteurs oestrogéniques.....	79
2.1.3.	Inhibiteurs de RANKL.....	79
2.1.4.	Inhibiteurs de la cathepsine K.....	80
2.1.5.	Perspectives de l'inhibition de la résorption osseuse.....	80
2.2.	Agents anaboliques.....	81
2.2.1.	Hormone parathyroïdienne.....	81
2.2.2.	Perspectives des traitements anaboliques.....	82
2.3.	Agent mixte anticatabolique et anabolique.....	82

Chapitre 3

L'ostéoporose et ses traitements

1. Ostéoporose : définitions et généralités

L'ostéoporose est une pathologie osseuse systémique responsable de fractures par fragilité, c'est-à-dire, suite à un traumatisme minime (équivalent à une chute d'un individu de sa hauteur ou moins). Hormis les os du crâne, tous les os peuvent être concernés par l'ostéoporose. Cette maladie a longtemps été considérée uniquement comme une conséquence directe du vieillissement. Depuis quarante ans, les connaissances relatives à l'ostéoporose n'ont cessé d'augmenter et ont permis de mieux la comprendre, mieux la définir et ainsi mieux la diagnostiquer et la traiter.

1.1. Problème de santé publique

L'ostéoporose est plus fréquente chez la femme durant la ménopause mais elle existe aussi chez l'homme. Chez la femme âgée de 80 ans, 70% d'entre elles sont ostéoporotiques (sur des critères densitométriques : T-score < -2,5). Soixante pourcent de ces femmes ostéoporotiques auront au moins une fracture par fragilité osseuse. Ainsi, selon la définition utilisée, de 10 à 25% des femmes de plus de 50 ans présentent au moins une fracture vertébrale. De plus, en Europe, 1 femme sur 8 de plus de 50 ans aura une telle fracture. Les sites osseux les plus concernés par une fracture ostéoporotique sont le poignet, les vertèbres et la hanche (extrémité supérieur du fémur ou col du fémur). La fracture de hanche est la forme de complication la plus grave de l'ostéoporose et est associée à une morbidité élevée et une réduction de l'espérance de vie de 12 à 20% (Chapurlat et Chappard 2009). La fracture de la hanche est aussi souvent associée avec une institutionnalisation des personnes âgées suite à une perte d'autonomie irréversible. Aux Etats-Unis, il a été montré que l'ostéoporose était plus importante, en termes de journées d'hospitalisation que certaines pathologies comme le diabète, le cancer du sein ou encore l'infarctus du myocarde.

L'ostéoporose étant liée au vieillissement, il est estimé qu'en France, le nombre de fracture de hanche et les coûts associés pourraient être triplés d'ici à 2040. Ainsi, en 2050, le nombre de fracture de hanche annuel pourrait atteindre 150 000 (contre 48 000 aujourd'hui) (Baudoin *et al.* 1996). Le risque tout au long de la vie de développer une fracture ostéoporotique peut être calculé à partir de la probabilité de fracture et de l'espérance de vie. Ce risque a été estimé aux Etats-Unis à près de 40% pour les femmes et à 13% pour les hommes (Melton 2000). Ce nombre pourrait être largement sous estimé dans la mesure où de nombreuses fractures, notamment vertébrales ne sont pas diagnostiquées. Une étude a même estimé que le risque de fracture ostéoporotique tout au long de la vie pourrait être de 47% chez la femme et de 23% chez l'homme (Oden *et al.* 1998). Ces données montrent que l'ostéoporose est un problème réel de santé publique.

1.2. Définitions de l'ostéoporose

L'ostéoporose a été définie en 1993 comme une « maladie diffuse du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et des altérations micro-architecturales du tissu osseux, conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse et du risque de fracture » (Consensus-Development-Conference 1993). Cette définition ne faisant pas état des altérations de la qualité osseuse intrinsèque, elle a été actualisée en 2001. La nouvelle définition tient compte de la diminution de la résistance mécanique augmentant le risque de fracture. Cette dernière introduit aussi le concept de qualité osseuse décrit dans le chapitre précédent (NIH 2001). Cependant, si cette définition est plus complète, les déterminants de la qualité osseuse intrinsèque ne sont pas accessibles par un examen clinique simple et donc ne facilitent pas le diagnostic de l'ostéoporose (Briot et Roux 2008). C'est pourquoi aujourd'hui le diagnostic de l'ostéoporose est basé sur une mesure quantitative de la BMD par DXA. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé a proposé une définition de l'ostéoporose fondée sur le T-score (différence en écart-type de la mesure par rapport à une densité osseuse théorique de l'adulte jeune de même sexe, au même site osseux et de même origine ethnique) avec les seuils suivants (WHO 1994):

- T-score > -1 : densité normale
- T-score compris entre -1 et $-2,5$: ostéopénie
- T-score $\leq -2,5$: ostéoporose
- T-score $\leq -2,5$ avec une ou plusieurs fractures : ostéoporose sévère

Ce seuil a été défini selon deux considérations, l'une mathématique l'autre épidémiologique. Au regard de la répartition Gaussienne de la BMD, ce seuil considère seulement 0,7% des adultes jeunes normaux de la population de référence. De plus, ce seuil permet d'identifier 30% des femmes ménopausées comme étant ostéoporotiques, ce que confirme les données épidémiologiques (Briot et Roux 2008).

1.3. Causes de l'ostéoporose

L'ostéoporose est une pathologie souvent multi causale aboutissant à une raréfaction osseuse et augmentant la fragilité osseuse. Les facteurs augmentant le risque de fracture ostéoporotique sont nombreux et d'origines diverses. De plus, l'analyse du rôle propre de chacun de ces paramètres dans la définition du risque fracturaire est délicate dans la mesure où ces déterminants sont souvent liés *in vivo*. L'ostéoporose dépend de deux événements majeurs, le premier correspond à l'acquisition du pic de masse osseuse et les facteurs l'influençant, le deuxième correspond à la perte osseuse physiologique ou induite et les facteurs l'influençant.

Le pic de masse osseuse correspond à la valeur la plus élevée atteinte au cours de la vie squelettique, généralement il est atteint avant l'âge de 20 ans et résulte de la croissance osseuse observée au cours de l'enfance et de l'adolescence. Le niveau du pic de masse osseuse est l'un des facteurs déterminants du risque de fracture ostéoporotique, plus il est haut, moins le risque d'avoir une faible masse osseuse plus tard est important (Orcel 2008). Les facteurs influençant

l'acquisition du pic de masse osseuse sont multiples. Parmi eux on peut évoquer des facteurs génétiques, l'âge de la puberté, les caractéristiques anthropométriques mais aussi les facteurs hormonaux, l'activité physique, la nutrition, le statut vitaminique D et par conséquent les facteurs environnementaux (Marcelli 2008; Bonjour *et al.* 2009). Après l'atteinte du pic de masse osseuse, on observe dans les conditions physiologiques une stabilité de cette masse durant 10 à 15 ans. Ensuite, jusqu'à 50 ans, une perte osseuse très lente est observée chez l'homme et la femme. Cette perte osseuse physiologique au rythme de 0,1 à 0,3% par an est attribuée à la sénescence des populations de cellules du remodelage osseux (Orcel 2008). En effet, il a été montré une diminution de l'épaisseur des paquets osseux trabéculaires avec l'âge, suggérant une activité diminuée des ostéoblastes (Lips *et al.* 1978). Ainsi, à chaque cycle de remodelage, la formation ne comble plus parfaitement la résorption osseuse et s'en suit une perte nette de masse osseuse (Fig. 36). Chez la femme, la carence oestrogénique liée à la ménopause va aboutir à une accélération du remodelage osseux et une résorption osseuse plus profonde augmentant ainsi la perte osseuse, on parle alors d'ostéoporose ménopausique (ce type d'ostéoporose sera décrit spécifiquement par la suite). Chez l'homme, la perte osseuse est minime avant 70 ans, mais il semblerait aussi que la prévalence familiale d'ostéoporose soit plus importante chez l'homme que chez la femme. Ceci suggère que l'ostéoporose masculine est d'avantage liée aux facteurs génétiques responsables du maintien du capital osseux (De Vernejoul 2008).

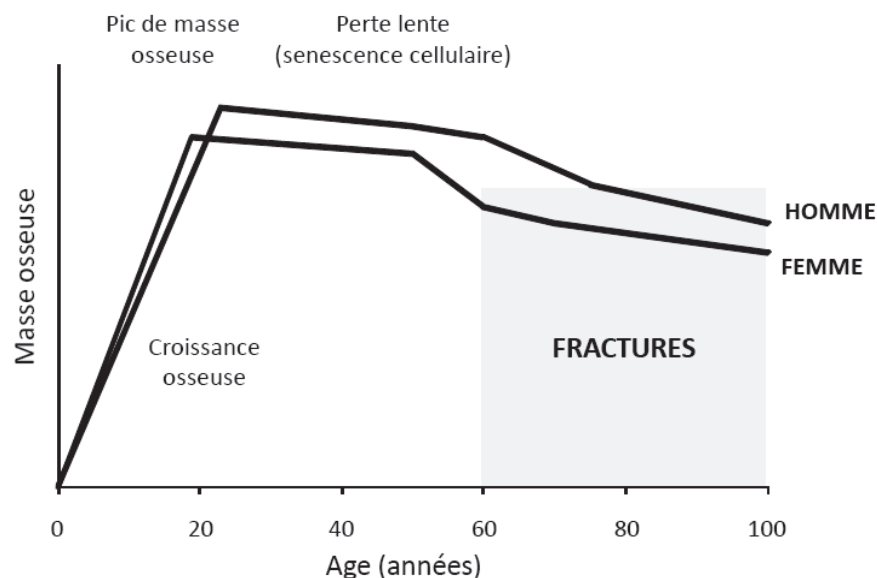


Figure 36: Evolution de la masse osseuse chez l'homme et la femme, adapté de (Orcel 2008).

Outre les modifications de l'activité du remodelage osseux liées à l'âge et ses causes hormonales, de nombreux facteurs de risques peuvent favoriser une diminution de la BMD ou la survenue de fractures. Ces facteurs ont les mêmes effets chez l'homme et la femme mais certains d'entre eux sont plus fréquents chez l'homme. Parmi ces facteurs, on note le tabagisme, la

consommation élevée d'alcool, l'inactivité physique, une alimentation pauvre en calcium, une carence en vitamine D, un antécédent de fractures chez les parents ou encore la perte de poids (Szulc *et al.* 2002). Ces facteurs de risque cliniques de fractures sont à distinguer des ostéoporoses secondaires. Est appelée ostéoporose secondaire, une ostéoporose résultant directement d'une pathologie clairement identifiée ou de l'utilisation d'un traitement (Trémollières et Ribot 2008). Les causes d'ostéoporoses secondaires sont multiples, leur incidence varie en fonction du sexe et de l'âge. Parmi les causes les plus fréquentes, on note les pathologies endocriniennes, les corticothérapies prolongées, l'immobilisation prolongée, les pathologies digestives, les rhumatismes inflammatoires, certaines hémopathies (De Vernejoul 2008; Trémollières et Ribot 2008).

1.4. Ostéoporose ménopausique

1.4.1. Généralités

L'ostéoporose ménopausique est la forme la plus fréquente d'ostéoporose. Le schéma classique de cette pathologie est une fracture du poignet 10 ans après le début de la ménopause, puis une fracture vertébrale entre 15 et 20 ans après le début de la ménopause et, finalement une fracture de hanche après 70 ans. Dans ce cas, la fragilité osseuse est majoritairement causée par un remodelage osseux accéléré et déséquilibré en faveur de la résorption générant une perte de masse osseuse. C'est la carence en œstrogènes caractérisant cette période qui est à l'origine d'une stimulation des ostéoclastes : on parle de « levée du frein des œstrogènes sur les ostéoclastes » (Chapurlat et Chappard 2009).

L'impact de la ménopause sur la qualité osseuse a été évalué au cours d'une étude recrutant 75 femmes âgées de plus de 46 ans qui ont été suivies 9,5 ans. Cette étude impliquait une visite semestrielle accompagnée d'une mesure de la BMD, d'un dosage hormonal et d'un dosage des marqueurs biochimiques du remodelage (Recker *et al.* 2000). Les résultats de ces travaux ont montré une diminution de la BMD qui suivait le profil chronologique du dosage sérique de l'œstradiol. En effet, la BMD commence à diminuer 2 à 3 ans avant la date de la ménopause, qui correspond à la période de pérимénopause au cours de laquelle la concentration d'œstradiol commence à diminuer. Quatre ans après la date de la ménopause, la vitesse de perte osseuse diminue et la BMD tend à se stabiliser (Recker *et al.* 2000). Cette étude a aussi recruté un groupe de patientes ménopausées qui suivaient une hormonothérapie maintenant le taux d'œstradiol aux taux observés en pré ménopause. Les auteurs ont donc pu étudier la perte osseuse spécifiquement liée à la carence oestrogénique et celle induite par l'âge. Ainsi, il a été démontré qu'en fonction du site osseux, la perte de masse osseuse pouvait être composée d'une part liée à l'âge et d'une part plus importante liée à la carence en œstrogènes. Par exemple, au niveau vertébral la perte osseuse cumulée sur 8 ans était de 10,5 % et entièrement liée à la perte induite par la carence en œstrogènes; tandis qu'au niveau du col fémoral, la diminution de BMD était de 9,5 % dont 0,5 % liée à l'âge (Recker *et al.* 2000).

Une analyse portant sur la même population a aussi montré que la BMD mesurée après le début de la ménopause était corrélée à celle mesurée avant sur une période de 5 à 5,5 ans. Autrement dit, une BMD élevée avant le début de la ménopause assure, sur un intervalle de temps restreint, une BMD plus élevée après le début de la ménopause (Zhao *et al.* 2006). Ceci souligne l'importance de l'atteinte du pic de masse osseuse avant la ménopause pour prévenir l'ostéoporose à un âge plus avancé. Ainsi, il a été décrit qu'une augmentation de 10% de la BMD au pic de masse osseuse pourrait retarder de 13 ans l'ostéoporose (Hernandez *et al.* 2003).

Les effets de la ménopause sur le remodelage osseux ont été étudiés par histomorphométrie sur des paires de biopsies osseuses transiliaques réalisées sur les sujets de l'étude longitudinales précédemment décrite (Recker *et al.* 2000). La première biopsie a été prélevée avant la ménopause et la seconde un an après la date de la ménopause (Recker *et al.* 2004a). Ce travail a mis en évidence qu'un an après la date de la ménopause, le remodelage osseux est très nettement accéléré, la fréquence d'activation du remodelage osseux (Ac.F pour activation frequency en #/an, qui représente la probabilité d'activation du remodelage osseux en un site donné) était doublée (Recker *et al.* 2004a). Plus tard, l'analyse histomorphométrique 3D a permis de montrer une diminution significative du BV/TV, du Tb.N et une augmentation de la connectivité, qui, associée à une augmentation significative du SMI traduit une perforation des travées de type plaque, d'où l'augmentation de la connectivité trabéculaire (Akhter *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats montre que le statut hormonal chez la femme est un déterminant majeur de la perte osseuse et du risque de fracture subséquent, mais aussi que l'effet de la ménopause sur le remodelage osseux et la microarchitecture est très rapide.

Plus récemment, ces mêmes échantillons osseux ont été étudiés sous l'angle de la qualité osseuse intrinsèque. En effet l'utilisation de la microradiographie quantitative et de la microindentation sur les biopsies paires a montré qu'après un an de ménopause, la microdureté du tissu osseux était significativement diminuée alors que ni la minéralisation ni son hétérogénéité n'étaient modifiées. Cette modification de la microdureté indépendamment de changement de la minéralisation tissulaire, alors que ces variables sont habituellement liées (Boivin *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010), suggère que la carence en œstrogène pourrait avoir un effet sur la matrice organique ou sur le cristal de minéral osseux (Bala *et al.* 2010a). Ces modifications pourraient conduire à une fragilité osseuse augmentée.

1.4.2. Action des œstrogènes sur les cellules osseuses et conséquences de la ménopause

Les cellules osseuses ainsi que leurs précurseurs expriment les deux types de récepteurs aux œstrogènes (ER α et ER β). Les effets cellulaires des œstrogènes peuvent soit être la conséquence directe d'interactions avec ces récepteurs ER, soit être liés à des voies intracellulaires non génomiques. En effet, la capacité des œstrogènes à prévenir l'apoptose des ostéoblastes et à stimuler celle des ostéoclastes a été associée à une augmentation de la phosphorylation des kinases cytoplasmiques ERK1 et ERK2 qui modulent l'expression de facteurs de transcription régulant l'apoptose (Kousteni *et al.* 2003).

Plus récemment, il a été observé que les souris nude athymiques ne produisant donc pas de lymphocytes T (LyT) étaient résistantes à la perte osseuse en situation de carence œstrogénique. Ceci suggère un lien entre les cellules immunitaires et la perte osseuse liée au statut hormonal. Par la suite, il a été montré qu'en situation de carence en œstrogène, les LyT, qui expriment le récepteur ER α , produisaient des cytokines capables de stimuler la différenciation ostéoclastique via la régulation de l'expression des protéines du système RANK / RANKL / OPG, du MCS-F et de son récepteur c-fms (Hofbauer *et al.* 1999c). Les LyT produisent essentiellement le TNF α et le RANKL qui de manière synergique augmentent l'expression de RANK par les préostéoclastes. Le TNF α est aussi capable de stimuler directement la différenciation et l'activité des ostéoclastes. De plus, le TNF α inhibe l'expression de cbfa1/Runx2, facteur de transcription impliqué dans l'ostéoblastogenèse (Gilbert *et al.* 2002). D'autres cytokines comme IL-1, IL-6 et IL-7 ont des actions semblables et pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la perte osseuse ménopausique (Fig. 37). Tous ces mécanismes d'action, ceux non encore élucidés ainsi que leurs voies de modulation plus fines sont à l'origine des perturbations du remodelage osseux associées au statut hormonal chez la femme ménopausée.

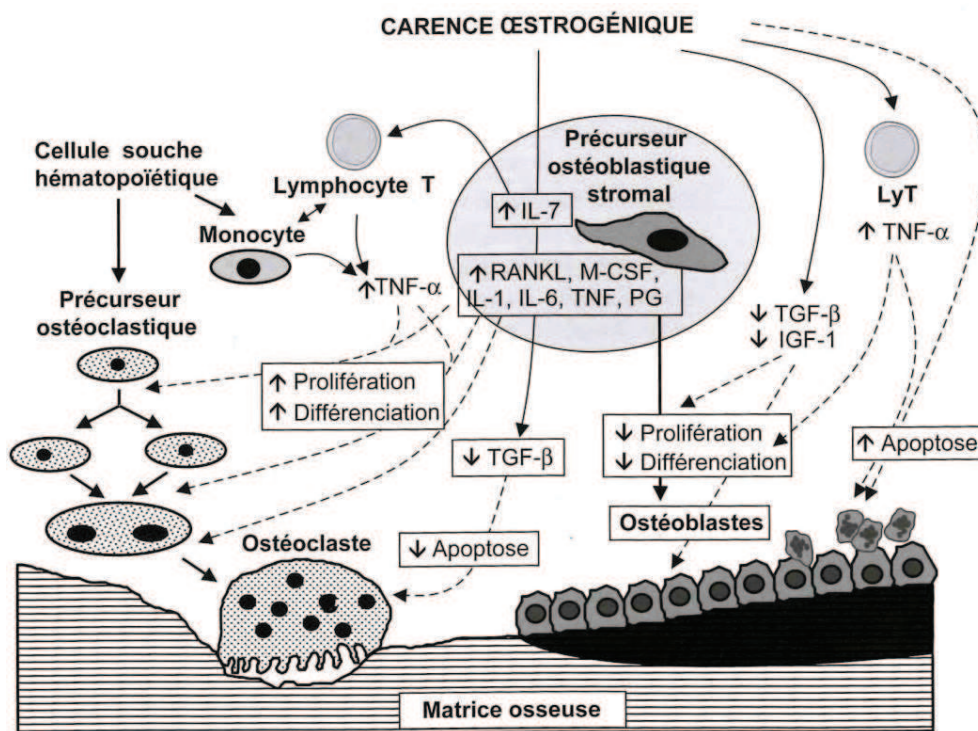


Figure 37: Effets de la carence œstrogénique sur les cellules osseuses conduisant à une augmentation de la résorption osseuse et à une diminution de la formation. (PG : prostaglandines / LyT : lymphocytes T), adapté de (Orcel 2008).

Au niveau cellulaire, la carence oestrogénique induit une augmentation de la prolifération et de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures. De plus, elle réduit l'apoptose des ostéoclastes, augmentant ainsi leur durée de vie. Ces actions combinées aboutissent à une résorption augmentée tant par les surfaces osseuses concernées que par la profondeur des lacunes créées. Le couplage résorption/formation étant conservé, une augmentation de la formation osseuse est observée. Cependant, la chute des taux d'oestrogènes augmente l'apoptose des ostéoblastes et pourrait aussi directement agir sur leur prolifération et sur l'activité de synthèse du tissu ostéoïde (Orcel 2008). Ces modifications conduisent à la perte osseuse nette observée à chaque cycle de remodelage et aux dégradations de la microarchitecture trabéculaire et corticale fragilisant l'os.

2. Traitements de l'ostéoporose ménopausique

L'ostéoporose ménopausique est associée à des altérations du remodelage osseux conduisant à un déséquilibre favorisant la résorption qu'une formation défectueuse ne comble pas. Les stratégies actuelles de traitements visent donc soit à ralentir la résorption avec des agents anticataboliques, soit à stimuler la formation en utilisant des agents anaboliques ou encore à moduler les deux processus avec des agents mixtes. Même si ces traitements impliquent des mécanismes différents, ils réduisent tous le risque de fracture ostéoporotique. Le choix du traitement va reposer sur plusieurs éléments tels que la BMD, l'âge de la patiente ou encore la présence de fractures prévalentes.

2.1. Agents anticataboliques

2.1.1. Bisphosphonates

Les inhibiteurs de la résorption les plus utilisés actuellement dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique sont les bisphosphonates (BPs). Ces molécules ont une structure chimique caractéristique qui leur confère la propriété de se lier au minéral osseux d'une part et d'inhiber par différents mécanismes l'activité des ostéoclastes. Ceci conduit à un ralentissement du remodelage osseux qui va se traduire par une augmentation de la BMD, une diminution des taux sériques et urinaires des marqueurs biochimiques du remodelage osseux, réduisant le risque de fracture. Il existe de nombreux BPs oraux ou intraveineux présentant des efficacités anti fracturaires variées. Parmi ceux ayant un effet sur le risque de nouvelle fracture ostéoporotique vertébrale et non vertébrale on notera l'alendronate (Black *et al.* 1996; Black *et al.* 2000), le risédronate (Harris *et al.* 1999; Reginster *et al.* 2000), l'ibandronate (Chesnut *et al.* 2004) et le zolédronate (Black *et al.* 2007). L'alendronate et le risédronate ont aussi la particularité de réduire le risque de développer une première fracture vertébrale, chez des femmes souffrant d'ostéoporose ménopausique (Cummings *et al.* 1998; Heaney *et al.* 2002). L'utilisation des BPs étant à l'origine de ce travail de thèse, leurs propriétés et leurs effets seront développés spécifiquement dans le prochain chapitre.

2.1.2. Modulateurs sélectifs des récepteurs oestrogéniques

L'ostéoporose ménopausique étant liée à la chute du taux d'œstrogènes au moment de la ménopause, les substituts hormonaux ont longtemps été considérés comme une stratégie de référence de son traitement. Cependant, pour prévenir l'ostéoporose, l'hormonothérapie doit être longue et dans ce contexte a été associée à des risques accrus de cancer du sein et de l'endomètre (Gennari *et al.* 2010). Les modulateurs sélectifs des récepteurs oestrogéniques (SERMs pour **S**elective **E**strogen **R**eceptor **M**odulators) sont donc apparus comme une alternative à l'hormonothérapie substitutive. En effet, ces composés présentent une structure tertiaire qui leur permet de se lier aux récepteurs ER α et/ou ER β et agissent comme agonistes ou antagonistes des œstrogènes d'une manière tissu dépendante. Le SERM le plus utilisé à ce jour dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique est le raloxifène qui est un agoniste des œstrogènes dans le tissu osseux. La grande étude de phase III, randomisée, multicentrique, en aveugle et contrôlée par un placebo MORE (pour **M**ultiple **O**utcomes of **R**aloxifene **E**valuation study) a mis en avant l'efficacité antifracturaire du raloxifène. Il a été montré qu'une dose orale quotidienne de 60 mg ou 120 mg de raloxifène diminuait significativement le risque de fracture de 30 à 50% et augmentait la BMD de 2 à 3% au niveau de la colonne lombaire et de la hanche (Ettinger *et al.* 1999). Cependant, les effets sur l'incidence des fractures périphériques n'ont été établis que chez des femmes souffrant d'une ostéoporose avancée (*i.e.*, présentant une faible BMD au col fémoral et des antécédents de fractures vertébrales) (McClung *et al.* 2001). De plus, même si le raloxifène est un inhibiteur de la résorption osseuse, l'augmentation du degré de minéralisation osseuse restait modérée mais expliquait la faible augmentation de BMD (Boivin *et al.* 2003).

Récemment, une nouvelle génération de SERMs a été développée avec des molécules comme le bazedoxifène, l'ospemifène, l'arzofoxifène, le levormeloxifène, l'idoxifène ou le lasofoxifène. Ces molécules ont conduit à des études cliniques de phases II ou III mais trois d'entre elles ont été arrêtées prématurément. En effet, les études conduites sur le levormeloxifène, l'idoxifène et l'arzofoxifène ont été stoppées à cause d'associations avec des effets secondaires sérieux (Gennari *et al.* 2007; Gennari *et al.* 2010). Le lasofoxifène a montré au cours de trois études cliniques de phase III qu'après 3 ans de traitement, la BMD (lombaire et fémorale) était significativement augmentée, les marqueurs biochimiques du remodelage osseux diminués et que le risque de fracture était abaissé au niveau vertébral (de 30 à 40%) et non vertébral (22%) versus placebo (Gennari *et al.* 2010), montrant le potentiel du lasofoxifène dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique.

2.1.3. Inhibiteurs de RANKL

Une des voies majeures de la régulation des ostéoclastes et de la résorption osseuse implique RANK / RANKL et OPG. Récemment, un anticorps monoclonal anti-RANKL entièrement humain (denosumab) a été approuvé par la FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration) et l'EMA (**E**uropean **M**edicines **A**gency) pour le traitement et la prévention de l'ostéoporose ménopausique. L'étude de phase III, multicentrique, randomisée et contrôlée FREEDOM

(**F**racture **R**eduction **E**valuation **D**enosumab in **O**steoporosis every 6 **M**onths) a démontré l'effet du denosumab sur les fractures vertébrales et non vertébrales après trois ans de traitement (Cummings *et al.* 2009). En effet, par rapport au placebo, le denosumab 60 mg sous cutané (s.c.) tous les six mois administré chez des femmes ménopausées et ostéoporotiques a montré une diminution significative de l'incidence des nouvelles fractures vertébrales (- 68%) et non vertébrales (- 40% à la hanche). De plus, ce travail montrait aussi une augmentation significative de la BMD au rachis (+ 9%) et à la hanche totale (+ 6%), ainsi qu'une diminution du taux sérique de CTX de 72% (Cummings *et al.* 2009). Deux autres études ont montré conjointement que le denosumab était une alternative à l'utilisation de l'alendronate (le bisphosphonate de référence). La première, appelée DECIDE (**D**etermining **E**fficacy : **C**omparison of **I**nitiating **D**enosumab versus alendronate) a comparé la réduction des marqueurs du remodelage osseux (sCTX et PINP) observée pour les deux traitements. Après un an de traitement, ces taux étaient comparables voir significativement plus bas après denosumab qu'après alendronate (Brown *et al.* 2009). Pendant cet essai, le denosumab entraînait une augmentation de la BMD significativement plus élevée que sous alendronate et ce, à tous les sites mesurés (Brown *et al.* 2009). La seconde étude appelée STAND (**S**tudy of **T**ransitioning from **A**lendronate to **D**enosumab) a montré chez des patientes traitées par l'alendronate, qu'après un an sous denosumab la BMD à la hanche totale, au rachis et à l'extrémité distale du radius était significativement plus élevée par rapport aux patientes ayant continué le traitement par l'alendronate (Kendler *et al.* 2010).

2.1.4. Inhibiteurs de la cathepsine K

La cathepsine K est une enzyme protéolytique clef de la résorption osseuse. Cette enzyme, fortement exprimée dans les ostéoclastes permet la dégradation de la trame collagénique préalablement déminéralisée au cours de la résorption osseuse. De plus, il a été observé que des mutations du gène codant pour la cathepsine K conduisaient chez l'homme à une pathologie rare, la pycnodysostose, qui se traduit par une ostéosclérose et des marqueurs de la résorption bas (Nishi *et al.* 1999; Chavassieux *et al.* 2007). Un inhibiteur peptidique de la cathepsine K, l'odanacatib a montré un intérêt significatif dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique. Une étude de phase II, randomisée, double insu et contrôlée par un placebo a mis en évidence qu'après 2 ans de traitement, l'odanacatib (50mg/semaine *per os*) augmentait la BMD au rachis (+ 5,5%) et au col fémoral (+ 3,2%). Ce régime diminuait aussi les marqueurs biochimiques du remodelage osseux (- 40% et - 25% pour le CTX et PINP, respectivement) (Bone *et al.* 2010). Récemment, ces résultats ont été confirmés après trois ans de traitement avec une augmentation progressive de la BMD (Eisman *et al.* 2011).

2.1.5. Perspectives de l'inhibition de la résorption osseuse

Devant l'incidence croissante de l'ostéoporose dans les populations vieillissantes, la recherche reste très active dans le développement de nouveaux traitements et de nouvelles cibles thérapeutiques (Roux 2010). Dans ce contexte, de nombreuses cibles ont été envisagées comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est une intégrine jouant un rôle dans l'adhésion des ostéoclastes aux surfaces

à résorber. Une étude avait montré qu'une dose de 200 mg deux fois par jour de L-000845704 (un antagoniste non peptidique d' $\alpha_v\beta_3$) pendant un an, augmentait significativement la BMD au rachis, à la hanche totale et au col fémoral par rapport au placebo (Murphy *et al.* 2005). Le peptide GLP-2 (« glucagon-like » peptide-2), une hormone intestinale a montré en injection s.c. chez des femmes ménopausées une diminution significative de la résorption osseuse sans modification de la formation (Henriksen *et al.* 2007). A ce jour, les autres cibles potentielles envisagées sont : les pompes à protons vacuolaires ATP dépendantes (v-ATPase), qui, présentes au niveau de la bordure plissée des ostéoclastes, permettent l'acidification de la cavité de résorption ; La tyrosine kinase C-src impliquée dans le développement de la bordure plissée des ostéoclastes matures ; les canaux chlore CLC-7 qui permettent l'acidification de la lacune de résorption par la sécrétion de chlore (Roux 2010).

2.2. Agents anaboliques

2.2.1. Hormone parathyroïdienne

L'hormone parathyroïdienne (PTH) intervient dans l'homéostasie calcique en agissant sur le système rénal, intestinal, squelettique et sur le métabolisme de la vitamine D. Un taux sérique chroniquement élevé de PTH induit un effet catabolique. Les récepteurs de la PTH sont exprimés par les ostéoblastes. La liaison de la PTH à son récepteur va induire la production de RANKL conduisant à une augmentation de la différenciation des ostéoclastes et de la résorption (Gallacher et Dixon 2010). Cependant, administrée de manière intermittente, elle stimule d'abord la formation puis la résorption osseuse définissant alors une « fenêtre anabolique » correspondant à une période au cours de laquelle la formation est optimale (Bilezikian 2008). Une étude mesurant les marqueurs biochimiques du remodelage osseux au cours d'un traitement par le tériparatide (fragment 1-34 de la PTH), a mis en évidence une augmentation plus rapide des marqueurs de la formation osseuse (pic de P1CP après 1 mois) par rapport aux marqueurs de la résorption (pic de NTX à 12 mois) (Dobnig *et al.* 2005). De plus, ce travail montrait une corrélation directe entre le pourcentage de changement des marqueurs de la formation après un mois et les gains de BV/TV, W.Th et Tb.Th observés après 22 mois de traitement. Autrement dit, l'augmentation de la formation osseuse précoce sous tériparatide est un bon prédicteur de son effet positif à long terme sur la microarchitecture osseuse (Dobnig *et al.* 2005). Actuellement, la PTH est le seul agent ostéoformateur utilisé dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique sévère chez des patientes ayant subi une ou plusieurs fractures.

L'effet antifracturaire du tériparatide a été montré au cours d'une étude de phase III appelée FPT (Fracture Prevention Trial). Une injection s.c. de tériparatide quotidienne pendant 21 mois augmentait la BMD de 2 à 12% en fonction du site mesuré (Neer *et al.* 2001). Le risque de fracture était diminué de 65% au niveau vertébral et de 35% au niveau périphérique (Gallagher *et al.* 2005). La chronologie des effets de la PTH a amené à considérer un couplage thérapeutique en « ouvrant » cette « fenêtre thérapeutique » avec un traitement par le tériparatide puis à en prolonger l'effet avec un traitement anticatabolique. L'utilisation des deux thérapies en même temps (alendronate + PTH) n'a pas montré d'effets synergiques, suggérant que l'alendronate

pourrait réduire l'effet anabolique de la PTH (Black *et al.* 2003). Cependant l'utilisation de l'alendronate suite à un traitement préalable par la PTH a montré un intérêt sur le gain de BMD. En effet, des patientes ostéoporotiques traitées un an par la PTH puis un an par l'alendronate ont montré un gain de BMD maintenu par rapport aux patientes ayant continué le traitement par la PTH. Ce gain de BMD était aussi supérieur à celui observé pour les patientes traitées 2 ans par l'alendronate (Black *et al.* 2005).

2.2.2. Perspectives des traitements anaboliques

A ce jour, la PTH est le seul traitement anabolique utilisé dans le traitement de l'ostéoporose mais d'autres alternatives sont étudiées comme les composés calcilytiques ou encore des inhibiteurs de la voie Wnt. Les calcilytiques agissent directement sur le métabolisme calcique pour augmenter la sécrétion de PTH (Roux 2010). Le calcium extra cellulaire régule en effet la sécrétion de PTH par l'intermédiaire d'un récepteur de surface CaR (pour Récepteur du Calcium). Les calcilytiques sont des antagonistes du CaR qui diminuent leur sensibilité au calcium et conduisent donc à une augmentation de la production de PTH. Récemment, un nouveau composé calcilytique a été découvert, le ronacaleret (Balan *et al.* 2009). Une étude préliminaire a montré chez des femmes ménopausées que deux doses successives espacées de 28 jours de 475 mg de ronacaleret *per os* augmentaient significativement les marqueurs de la formation osseuse (+ 63% pour l'ostéocalcine, + 79% pour le PINP *versus* placebo) sans modifier les taux des marqueurs de la résorption (Fitzpatrick *et al.* 2008). L'autre stratégie consiste à bloquer les inhibiteurs de la voie Wnt, une voie moléculaire majeure de la formation osseuse. Dans ce contexte, il a été montré au cours d'une étude de phase I chez des femmes ménopausées, qu'une unique injection s.c. de 3 mg/kg d'un anticorps anti-sclerostine (un inhibiteur naturel circulant de la voie Wnt) augmentait les marqueurs de la formation osseuse après 21 jours (+ 60% à + 100% *versus* placebo), avec une tendance à la diminution des marqueurs de la résorption (Padhi *et al.* 2007).

2.3. Agent mixte anticatabolique et anabolique

Le ranélate de strontium (commercialisé sous le nom Protelos®) est un traitement de l'ostéoporose ménopausique au mode d'action unique. Il agit à la fois en stimulant la formation osseuse et en inhibant la résorption osseuse (Marie *et al.*; Marie *et al.* 1985; Reginster et Neuprez 2010). Même si le mécanisme d'action du strontium n'est pas totalement élucidé, une récente étude *in vitro* a montré que ce dernier augmentait l'expression de la phosphatase alcaline (marqueur de la différenciation ostéoblastique) et la formation de nodules osseux (marqueur de l'activité ostéoblastique) d'ostéoblastes murins. En parallèle, ce travail mettait en évidence que le strontium réduisait l'activité phosphatase acide tartrate-résistante (marqueur de la différenciation ostéoclastique) et la capacité des ostéoclastes murins à résorber (Bonnelye *et al.* 2008). Ces résultats confirmaient donc l'action « découplante » du ranélate de strontium sur les populations cellulaires impliquées dans le remodelage osseux. L'effet du strontium sur le risque de fracture ostéoporotique a été étudié au cours de deux études pivots qui ont suivi plus de 6000 femmes

souffrant d'ostéoporose ménopausique, l'étude SOTI (Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention) et l'étude TROPOS (Treatment of Peripheral Osteoporosis). L'étude SOTI a montré une réduction de 41% du risque relatif de développer une nouvelle fracture vertébrale après 3 ans de ranélate de strontium (2g/jour *per os*) contre placebo. Dans le même temps, la BMD mesurée à la colonne lombaire était augmentée de 14% (Meunier *et al.* 2004). Le dosage des marqueurs du remodelage osseux durant cette étude confirmait l'augmentation de la formation osseuse (+8% pour la phosphatase alcaline) simultanément à une diminution de la résorption osseuse (- 12% pour le CTX) dès trois mois de traitement (Meunier *et al.* 2004). L'étude TROPOS a montré, contre placebo, une diminution du risque relatif de fracture périphérique de 16% après 3 ans de ranélate de strontium (Reginster *et al.* 2005). Parmi les patientes suivies lors de SOTI et TROPOS, 879 ont été recrutées pour poursuivre le traitement. Les risques de fractures vertébrales et périphérique étaient maintenus à un niveau bas et la BMD mesurée à la colonne lombaire continuait à augmenter jusqu'à 8 ans de traitement (Meunier *et al.* 2009; Reginster *et al.* 2009).

Le vaste programme de recherche initié en 1996 a impliqué une étude des effets du strontium sur la microarchitecture et la microstructure osseuse sur biopsies iliaques. L'analyse 3D par μ CT a montré contre placebo, une augmentation significative de l'épaisseur corticale sous strontium (+ 18%), du nombre de travées (+ 14%). La séparation trabéculaire et le Structural Model Index étaient significativement diminués (- 16% et - 22%, respectivement). Ces changements des propriétés microarchitecturales trabéculaires et corticales allaient dans le sens d'une amélioration de la résistance mécanique et une diminution du risque de fracture (Arlot *et al.* 2008). En ce qui concerne la qualité de la matrice osseuse, la quantité et la distribution de strontium retenue dans le tissu osseux au cours du traitement ont été mesurées par microanalyse par rayons X (Boivin *et al.* 2010). Les résultats de cette étude ont montré une accumulation dose dépendante de strontium uniquement dans le tissu osseux cortical et trabéculaire formé au cours du traitement. L'analyse effectuée sur les biopsies de patientes traitées jusqu'à 60 mois a mis en évidence l'atteinte d'un plateau du contenu en strontium après 3 ans au niveau de l'os total. Le degré de minéralisation osseux cortical et trabéculaire n'était pas changé au cours du traitement par rapport au placebo (Boivin *et al.* 2010). L'ensemble de ces résultats confirmait la préservation de la qualité du minéral osseux après traitement par le ranélate de strontium.

Partie 1

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -

Chapitre 4

Les Bisphosphonates

1.	Généralités	86
2.	Rôle de la structure chimique des bisphosphonates	87
3.	Propriétés pharmacocinétiques des bisphosphonates	90
3.1.	Modes d'administration des bisphosphonates.....	90
3.2.	Distribution tissulaire des bisphosphonates.....	91
3.2.1.	Tissus non-calcifiés.....	91
3.2.2.	Tissus calcifiés.....	91
4.	Mécanismes d'action tissulaire	92
4.1.	Inhibition de la minéralisation.....	92
4.2.	Inhibition de la résorption osseuse.....	93
5.	Mécanismes d'action cellulaire	93
5.1.	Effets sur les ostéoclastes.....	93
5.2.	Effets sur les ostéoblastes.....	94
5.3.	Effets sur les ostéocytes.....	95
6.	Mécanismes d'action moléculaire	95
6.1.	Formation d'analogues toxiques de l'ATP par les BPs non-azotés.....	95
6.2.	Inhibition de la voie du mévalonate par les BPs azotés.....	96
7.	Utilisations cliniques des bisphosphonates	99

8.	Bisphosphonates impliqués dans les travaux de cette thèse.....	100
8.1.	Alendronate.....	100
8.1.1.	Résultats cliniques.....	100
8.1.2.	Alendronate et qualité du tissu osseux.....	101
8.1.2.1.	Effets sur le remodelage osseux et l'accumulation de micro dommages.....	101
8.1.2.2.	Effets sur la minéralisation osseuse.....	104
8.1.2.3.	Effets sur la matrice organique.....	106
8.1.2.4.	Effets sur les propriétés mécaniques.....	107
8.2.	Ibandronate.....	110
8.2.1.	Résultats pré-cliniques.....	110
8.2.1.1.	Effets sur la masse et la résistance osseuse.....	110
8.2.1.2.	Effets sur la microarchitecture.....	111
8.2.1.3.	Effets sur les déterminants intrinsèques de la qualité osseuse.....	111
8.2.2.	Résultats cliniques : Vers un régime intermittent.....	112
8.2.2.1.	Etudes de phases II.....	112
8.2.2.2.	Etudes de phases III.....	113
	• Etude BONE.....	113
	• Etude MOPS.....	114
	• Etude MOBILE.....	115
	• Etude MOTION.....	116
	• Etudes BALTO I et II.....	116
	• Etudes IRIS et DIVA.....	117
8.2.3.	Ibandronate et qualité du tissu osseux chez la femme ostéoporotique.....	117
9.	Dégradations de la qualité osseuse associées avec l'utilisation prolongée des BPs.....	119
9.1.	Ostéonécrose de la mâchoire.....	119
9.2.	Fractures atypiques sous trochantériennes.....	120

Chapitre 4

Les bisphosphonates

1. Généralités

Les bisphosphonates (ou diphosphonates, ou biphosphonates, notés BPs) sont connus et synthétisés depuis la fin du XIX^{ème} siècle par des chimistes Allemands. Ces composés étaient initialement utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés anticorrosives et anticalcaires. A la fin des années 1960, il a été montré pour la première fois que le plasma et l'urine contenaient un composé capable d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium. Cette inhibition était due à un polyphosphate simple, le pyrophosphate inorganique (PPi) contenant un pont P-O-P. Par la suite, il a été montré que le PPi était capable d'inhiber *in vivo*, par injection parentérale certaines calcifications ectopiques. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que le PPi pourrait être un régulateur physiologique majeur de la minéralisation osseuse. Cependant, l'échec de l'utilisation du PPi administré par voie orale, lié à son hydrolyse rapide, a conduit à une utilisation très restreinte, à savoir comme agent de contraste en scintigraphie (lié au ⁹⁹Technecium) et comme antitartre dans les dentifrices (Fleisch 2000). La recherche s'est ensuite axée autour du développement d'analogues du PPi qui seraient stables à l'hydrolyse enzymatique, ce qui a abouti à l'étude des propriétés biologiques des BPs. En effet, les BPs sont des analogues structuraux du PPi où l'atome d'oxygène du pont phosphodiester (P-O-P) est remplacé par un atome de carbone. Le pont formé par l'atome de carbone géminé et les deux phosphores (P-C-P), n'existant pas dans la nature, il n'est pas hydrolysé par les enzymes biologiques et est excrété intact. Plus généralement, cette structure est très résistante sur le plan chimique et thermodynamique mais peut être hydrolysée en solution par un rayonnement ultraviolet.

Comme le PPi, la structure élémentaire des BPs, autrement dit le pont P-C-P contient de nombreux atomes d'oxygène ayant chacun un doublet d'électrons libres qui peuvent être déprotonés à pH physiologique. Ceci permet la formation de 2 liaisons de coordination avec un ion métallique divalent comme le Ca²⁺, le Mg²⁺, le Mn²⁺ ou le Zn²⁺. Ce mécanisme de chélation est à l'origine de la propriété des BPs de se fixer à l'apatite osseuse et donc de s'accumuler dans le tissu osseux (Jung *et al.* 1973). La liaison du pont P-C-P au calcium du tissu osseux forme une structure qui a valu aux BPs la dénomination de « Bone hook ». Le pont P-C-P permet aussi l'ajout de deux chaînes latérales R₁ et R₂ pouvant avoir des structures et des compositions très variées (Fig. 38). Outre sa capacité à se fixer spécifiquement au minéral osseux, les BPs sont utilisés dans le traitement des pathologies osseuses impliquant des dérégulations du remodelage car ils ont la capacité d'inhiber la résorption osseuse. En fonction des chaînes latérales R₁ et R₂, ces deux propriétés vont être modulées et conditionner l'efficacité clinique des BPs (Russell *et al.* 2008). En fonction de la présence ou non d'un atome d'azote dans la chaîne latérale R₂, deux catégories de BPs existent les BPs azotés (N-BPs) et non azotés (non N-BPs) (Fig. 38).

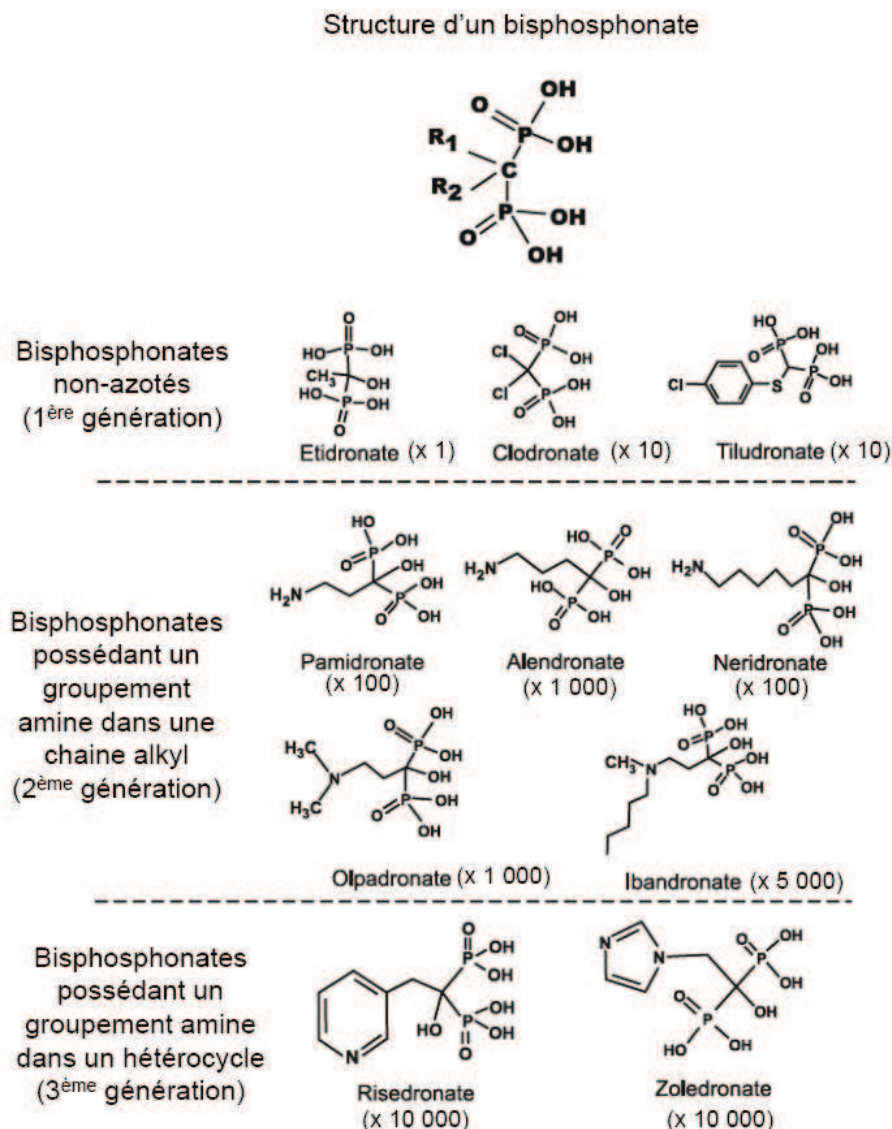


Figure 38: Formules chimiques développées des principaux bisphosphonates. Les potentiels antirésorptifs sont rapportés entre parenthèses et ont été déterminés par le modèle de Schenck en fonction de l'étidronate utilisé comme référence. Adapté de (Fleisch 2000).

2. Rôle de la structure chimique des bisphosphonates

Les deux propriétés principales des BP conduisant à leur utilisation dans les traitements des pathologies osseuses sont leur capacité à se lier spécifiquement à l'os et à inhiber la résorption osseuse. Cependant, il existe de nombreux BP qui présentent une grande variabilité d'affinité pour l'os et d'efficacité à inhiber la résorption osseuse (Russell *et al.* 2008). Il a été décrit que la chaîne latérale R₁, en fonction de sa nature chimique OH ou NH₂ améliorerait sa capacité à se lier au minéral osseux dans la mesure où, contrairement aux premiers BP (où R₁ :H

ou Cl), ces groupements permettaient la création d'une troisième liaison de coordination en augmentant leur affinité pour le minéral osseux (Jung *et al.* 1973; Van Beek *et al.* 1996).

Schématiquement, il était considéré que l'affinité d'un BP pour l'apatite osseuse était définie par la structure P-C-P et la contribution de la chaîne R_1 tandis que R_2 définissait l'activité antirésorptive (Russell et Rogers 1999). Ceci, suggèrent que tous les BPs ayant une chaîne R_1 identique auraient une affinité similaire pour le minéral osseux. Des travaux plus récents ont étayé cette hypothèse en montrant que les principaux BPs utilisés en clinique ayant un groupement OH en R_1 (étidronate, ibandronate, pamidronate, risédronate et zolédronate) présentaient des affinités semblables pour le minéral osseux humain. Dans cette étude, seul le tiludronate (R_1 : groupement chloro-phényl lié au carbone géminale via un atome de soufre) et le clodronate (R_1 : Cl) présentaient des affinités plus basses (Leu *et al.* 2006). Cependant, une autre étude portant sur la cinétique d'inhibition de la formation de cristaux d'hydroxyapatite dans des conditions constantes proches des conditions physiologiques (température : 37°C, force ionique : 0,15 M et pH : 7,4) a montré des différences de constante d'affinité (K_f) en fonction du BP testé (Nancollas *et al.* 2006). Les auteurs ont classé les BPs les plus courants en fonction de leur affinité pour l'hydroxyapatite suivant cet ordre zolédronate > alendronate (ALN) > ibandronate = risédronate > étidronate > clodronate (Nancollas *et al.* 2006). Le même classement a ensuite été retrouvé en déduisant l'affinité des BPs à partir de leur capacité à inhiber la dissolution d'apatite carbonatée, dont la structure est plus proche de celle de l'apatite osseuse (Henneman *et al.* 2008). L'utilisation de la chromatographie FPLC (pour Fast Performance Liquid Chromatography) sur colonne d'hydroxyapatite simulant le comportement des BPs à la surface des cristaux a aussi confirmé que l'affinité des BPs pouvait être expliquée en fonction de la structure de la chaîne R_2 (Lawson *et al.* 2005). Cette dernière technique a permis de mesurer la présence du BP dans l'éluât et d'en déduire le temps de rétention des différents BPs (Lawson *et al.* 2010). Ces travaux ont montré qu'en fonction de la structure de la chaîne R_2 , le temps de rétention du BP sur l'hydroxyapatite variait (Lawson *et al.* 2010). L'ensemble de ces résultats montre donc que les chaînes latérales R_1 et R_2 ont un rôle dans la liaison du BP au minéral osseux, mais aussi que la force de la liaison du BP au minéral pourrait avoir un effet sur son efficacité clinique. En effet, l'affinité d'un BP pour l'apatite osseuse pourra moduler son assimilation et sa rétention dans le squelette, sa diffusion dans le tissu osseux, son recyclage (capacité à la réadsorption suite à la désorption) et par conséquent son efficacité dans le temps (Russell et Rogers 1999; Nancollas *et al.* 2006; Lawson *et al.* 2010).

La modulation de l'affinité des BPs pour l'apatite osseuse en fonction de la chaîne R_2 n'est pas totalement élucidée. Cependant, les résultats mentionnés précédemment suggèrent fortement que la présence d'un groupement amine, ainsi que sa position dans une chaîne alkyle ou un hétérocycle pourraient améliorer significativement l'affinité du BP pour l'apatite (Russell *et al.* 2008). L'étude de la fixation des BPs simples, de première génération à l'hydroxyapatite a permis de décrire l'existence des deux liaisons de coordination entre le pont P-C-P et le calcium (au site CaI) et d'une troisième liaison si R_1 correspondait à OH ou NH_2 . L'utilisation de modèles numériques 3D permettant de simuler les interactions potentielles entre les BPs et l'apatite a mis en évidence une interaction possible entre le groupement NH_2 de la chaîne R_2 et un atome

d'oxygène du cristal osseux (Ebetino *et al.* 2005). Ainsi, certains N-BPs pourraient former un pont N-H-O avec l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de la maille cristalline lié aux CaII (Fig. 10, page 29). L'existence d'une telle liaison nécessite un angle N-H-O $\geq 125^\circ$ et une distance N-O proche de 3Å. L'ALN (angle N-H-O de 132° et N-O = 2,7Å) est capable de former cette liaison (Fig. 39). La longue chaîne R₂ de l'ibandronate ne permet pas à l'atome d'azote du groupement amine tertiaire d'être impliqué dans un pont N-H-O (Fig. 39) (Ebetino *et al.* 2005).

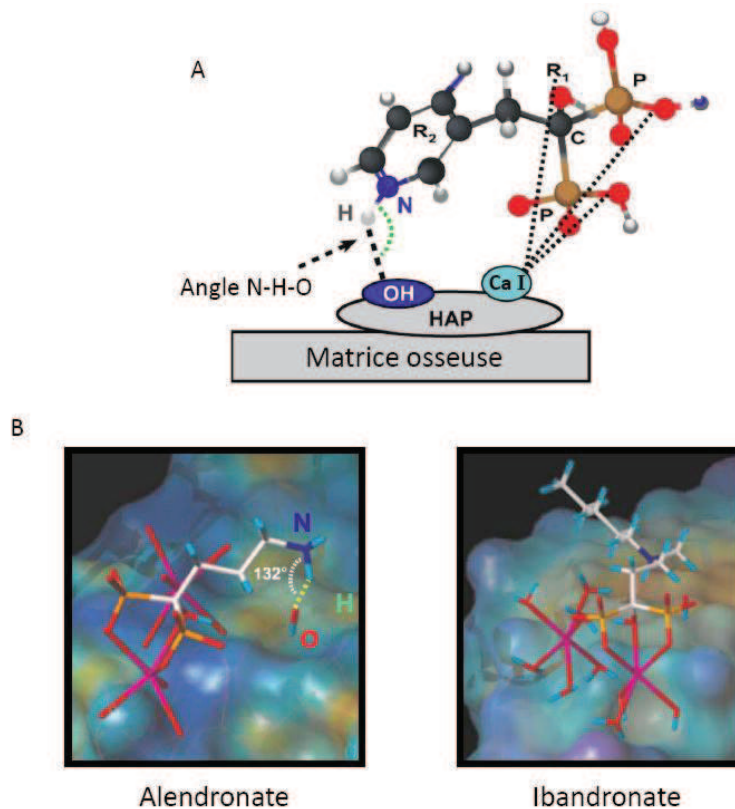


Figure 39: (A) Modèles moléculaires représentant la formation d'une deuxième liaison de type N-H-O entre un bisphosphonate (Zolédronate) et l'apatite osseuse (HAP). (B) La gêne stérique de la chaîne R₂ rend cette liaison impossible pour l'ibandronate, adapté de (Russell *et al.* 2008).

La présence d'un atome d'azote dans la chaîne R₂ d'un BP lui confère une charge électrique qui diffère en fonction de sa position. Lorsque le BP se lie au minéral, il peut transférer cette charge à la surface du minéral ce qui se traduit par une modification du potentiel zêta. Ce potentiel correspond à la charge qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent. Ce transfert de charge a été montré par la mesure du déplacement des cristaux dans un capillaire soumis à un champ électrique. Il existe une modification du déplacement des cristaux en fonction du BP avec lequel ils ont été préalablement incubés (Nancollas *et al.* 2006). Schématiquement, à pH 7,4, l'ALN, l'ibandronate et le zolédronate induisent de manière dose dépendante un potentiel zêta positif pour l'hydroxyapatite tandis que le clodronate, le risédronate et l'étidronate induisent un potentiel zêta négatif. Un changement de la charge à la surface des cristaux pourrait avoir

plusieurs conséquences dont un effet sur la fixation d'autres molécules chargées. Ainsi, un BP capable de « charger » positivement la surface du cristal d'hydroxyapatite pourrait faciliter la fixation d'autres molécules de BP via la charge négative portée par ses groupes phosphonates (Nancollas *et al.* 2006). De plus, un changement du comportement électrique du cristal agit sur sa capacité à former une interface entre le solide et la phase aqueuse, ce qui est un déterminant majeur de la croissance des cristaux.

L'ensemble de ces résultats implique que la structure du BP détermine son degré d'affinité pour le minéral osseux. De plus, la liaison même du BP au minéral induit des modifications (potentiel zêta, tension de surface) qui peuvent avoir des conséquences biologiques et moduler son efficacité clinique. Peu de travaux ont étudié spécifiquement l'effet du BP sur la structure du minéral osseux, mais certaines études suggèrent des effets sur la cristallinité du minéral (Durchschlag *et al.* 2006). Plus récemment, il a été montré qu'un groupe PO_4^{3-} d'un BP pouvait se substituer à un groupe PO_4^{3-} de la maille cristalline de l'apatite osseuse. Cette réorganisation pourrait augmenter la symétrie du cristal, traduisant l'augmentation de la cristallinité mesurée dans des os de rats incubés dans une solution contenant du zolédronate (Juillard *et al.* 2010).

3. Propriétés pharmacocinétiques des bisphosphonates

L'étude pharmacocinétique des BPs a été limitée par leurs propriétés physico-chimiques. En effet, la stabilité chimique des BPs et leur faible poids moléculaire ont compliqué leur détection ainsi que leur dosage. L'utilisation de BPs porteurs d'atomes radioactifs (C^{14} ou H^3) a cependant permis d'analyser les propriétés pharmacocinétiques des BPs chez l'animal et l'homme.

3.1. Modes d'administration des bisphosphonates

Les propriétés pharmacocinétiques des bisphosphonates rendent leur administration complexe. Par voie orale, la faible lipophilicité des BPs limite le transport transcellulaire à travers la paroi intestinale. Leur poids moléculaire compris entre 176 Da pour le médronate et 315 Da pour l'incadronate ne leur permet pas de transiter via la voie paracellulaire qui exclut les molécules de poids moléculaire supérieur à 150 Da. Il en résulte une biodisponibilité qui, même si elle varie en fonction du BP, reste souvent inférieure à 1%. La forte affinité des BPs pour les ions métalliques divalents contraint son administration à être effectuée à distance d'un repas. En effet, l'absorption d'un BP par voie orale est fortement diminuée ou annulée par l'alimentation, surtout si elle est riche en calcium (Lin 1996). C'est pourquoi la prise d'un BP par voie orale est recommandée à jeun, accompagnée d'un verre d'eau faiblement minéralisée et 30 minutes avant le premier repas. Les dosages des comprimés sont adaptés à cette faible biodisponibilité et sont généralement très élevés, ce qui peut causer des inflammations du tube digestif supérieur (Barrett *et al.* 2004; Abrahamsen 2010).

Devant la très faible biodisponibilité des BPs administrés par voie orale, les injections parentérales ont été testées. Les administrations s.c. et intramusculaire permettent une absorption complète des BPs mais, les composés salins de la solution injectable (Na^+ ou Ca^{2+}) peuvent causer des irritations et des nécroses au point d'injection. Ces voies d'administration n'ont donc pas été développées, au profit de l'administration i.v. qui augmente la biodisponibilité de 40 à 80%. Une injection trop rapide entraîne une concentration systémique élevée pouvant être néfaste pour les reins. Les BPs sont donc injectés par perfusion lente inférieure à 200 mg de composé actif par heure (Barrett *et al.* 2004). Ce mode d'administration est réservé aux BPs suffisamment puissant pour être injectés à de faibles doses sous forme de régimes intermittents. Le zolédronate a été le premier BP développé spécifiquement pour la perfusion i.v. et il peut être administré à raison de 5mg par an, améliorant la compliance au traitement qui est généralement faible dans le contexte d'une prise orale quotidienne.

3.2. Distribution tissulaire des bisphosphonates

3.2.1. Tissus non-calcifiés

Une fois dans la circulation sanguine, les BPs sont distribués dans tous les organes. A l'exception des reins, l'aspect lipophile des BPs couplé à l'absence de métabolisation limite le temps et le niveau d'exposition des tissus mous. Il a été montré chez le rat qu'une heure après l'injection d'ALN marqué par le C^{14} , 5% du traitement se situait dans les tissus mous contre 63% après 5 minutes (Lin 1996). Les BPs sont rapidement éliminés de la circulation sanguine (demi-vie plasmatique selon le BP : une à deux heures) par les reins (urine) et les os. Ainsi, jusqu'à deux tiers des BPs absorbés peuvent être retrouvés dans les urines au cours des 24 heures suivant la prise. La clairance rénale des BPs semble être assurée par la filtration glomérulaire classique (Barrett *et al.* 2004).

3.2.2. Tissus calcifiés

La forte affinité des BPs pour le calcium de l'apatite osseuse fait des os une composante importante de leur clairance sanguine. En fonction du degré d'affinité du BP pour le minéral osseux, de 30 à 70% des BPs absorbés se fixeront à l'os. Il existe un lien fort entre l'affinité du BP et la clairance non-rénale (vitesse et quantité de BPs captés par le tissu osseux). En effet, l'ALN qui dispose d'un groupement OH en R_1 présente une clairance non rénale proche du double de celle mesurée pour le clodronate qui possède un atome de chlore en position R_1 (Recker et Saville 1973; Lin 1996). De plus, chez l'Homme, la mesure des BPs excrétés dans les urines à distance de la prise du traitement a permis indirectement de mesurer la rétention osseuse des BPs. Ces mesures réalisées 24h après la prise de BPs montrent un taux urinaire qui suit un ordre inverse de celui de l'affinité du BP pour l'apatite : zolédronate (38%) < ALN (44%) < risédronate (65%) < clodronate (73%) (Conrad et Lee 1981; Khan *et al.* 1997; Mitchell *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002). La rétention des BPs dans l'os est dose dépendante mais saturable. En

effet, il a été montré avec l'ALN une proportionnalité entre la dose et la concentration dans l'os jusqu'à 5 mg/kg i.v. chez le rat. Ensuite, pour des doses croissantes, la concentration osseuse est inférieure à celle prédite par une relation linéaire. Ainsi, une augmentation de la dose par un facteur 500 se traduisait, dans la même étude, par une concentration osseuse augmentée 300 fois (Lin *et al.* 1992). Chez le rat, une dose de 90g d'ALN serait nécessaire pour saturer la rétention osseuse chez l'Homme (Sato *et al.* 1991).

La distribution des BPs n'est pas uniforme dans l'os, d'une manière générale, elle augmente avec l'activité du remodelage osseux. L'injection i.v. d'ALN marqué par le C^{14} chez le rat et le chien a mis en évidence une rétention plus importante d'un facteur 2 à 3 dans les épiphyses (majoritairement trabéculaires) que dans la métaphyse (majoritairement corticale) (Kasting et Francis 1992; Lin *et al.* 1992). Ces travaux suggéraient que la localisation préférentielle des BPs aux sites de remodelage pourrait être liée à une plus grande exposition des cristaux d'apatite aux zones préparées pour la résorption osseuse. Plus tard, l'observation de la radioactivité émise dans l'os de rat 24H après une injection d'ALN tritié (0,4 mg/kg) a permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, 70% des surfaces en cours de résorption étaient marquées contre seulement 2% pour les surfaces en cours de formation (Sato *et al.* 1991). L'élimination des BPs du tissu osseux est largement dépendante de 2 facteurs, le taux de remodelage et l'affinité du BPs pour le minéral osseux. Une activité de remodelage plus élevée va favoriser l'élimination du BP de l'os. L'affinité du BP pour l'apatite osseuse va pouvoir influencer cette durée puisqu'au cours de la résorption osseuse, l'acidification de la lacune va conduire à une désorption du BP qui, en fonction de son affinité va pouvoir se réadsorber à l'os. Ce concept, impliquant un « recyclage » pourrait donc expliquer les différences existantes dans l'action locale et la durée de l'effet des BPs (Russell *et al.* 2008). Ainsi, la demi-vie de l'ALN dans le tissu osseux humain a été estimée à plus de 10 ans (Gertz *et al.* 1993).

4. Mécanismes d'action tissulaire

Les BPs ont une très forte affinité pour le minéral osseux et leur présence dans la circulation est très courte. De ce fait, leurs effets dans l'organisme sont majoritairement observés dans le tissu osseux, où ils sont capables, comme le pyrophosphate inorganique, d'inhiber la minéralisation et la résorption osseuse.

4.1. Inhibition de la minéralisation

In vitro, les BPs inhibent la formation, la croissance mais aussi la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite (Fleisch *et al.* 1969; Francis 1969; Francis *et al.* 1969; Fleisch 2000). *In vivo*, l'etidronate inhibe les calcifications ectopiques aortiques ou rénales probablement par la captation des ions Ca^{2+} (Fleisch *et al.* 1970). Cependant, cet effet n'existe que pour des doses très élevées d'etidronate qui inhibent aussi la minéralisation osseuse normale, une situation qui pourrait être délétère pour la qualité osseuse (Fleisch 2000).

4.2. Inhibition de la résorption osseuse

In vitro et *in vivo*, les BPs sont des inhibiteurs puissants de la résorption osseuse. Initialement, il était pensé que l'affinité des BPs pour le minéral osseux, ainsi que leur capacité à inhiber la dissolution des cristaux étaient à l'origine de cette capacité à bloquer la résorption. Autrement dit, les BPs préviendraient la dissolution des cristaux d'apatite osseuse de l'acidification du microenvironnement par les ostéoclastes au cours de la résorption. Puis, il a été montré que le clodronate était un antirésorptif plus puissant que l'etidronate bien qu'il ait une affinité pour l'apatite plus faible. Ce résultat suggérait donc un effet cellulaire des BPs (Russell *et al.* 1970).

L'efficacité des différents BPs est mesurée par le modèle de Schenk. Ce modèle part du constat que le traitement par un bisphosphonate de jeunes rats induit, pendant la croissance, une ostéopétrose. La dose minimale de chaque BP nécessaire à induire cette ostéopétrose est comparée à celle de l'etidronate prise comme référence (Fig. 38). Les BPs de première génération avec une chaîne R₂ simple et courte, présentent une puissance comprise entre 1 et 10. Par la suite, cette puissance a été améliorée en augmentant la longueur de la chaîne R₂. Il a été montré que la taille optimale correspondait à une chaîne latérale R₂ de 4 à 7 atomes de carbone puisque dès 8 atomes de carbone, la puissance diminue (Russell *et al.* 1970). De plus, la puissance était aussi augmentée par l'ajout d'une fonction amine, d'abord primaire comme dans l'ALN (puissance x 1000) puis tertiaire dans le cas de l'ibandronate (puissance x 5000). La troisième génération de BPs inclut des hétérocycles contenant un atome d'azote comme un groupe pyridile pour le risédronate (puissance x 10 000) ou imidazole pour le zolédronate (puissance x 10 000).

5. Mécanismes d'action cellulaire

5.1. Effets sur les ostéoclastes

Les BPs se fixent essentiellement au minéral des surfaces osseuses en cours de résorption et sont donc proches des ostéoclastes (Sato *et al.* 1991). L'acidification des lacunes de résorption permet la protonation des BPs et leur libération de la matrice osseuse (Coxon *et al.* 2006). Une fois libérés de la matrice, les BPs sont internalisés par les ostéoclastes actifs via une endocytose de phase fluide (*i.e.*, non relayée par des récepteurs spécifiques), probablement sous forme de microprécipités avec le Ca²⁺ (Thompson *et al.* 2006). De plus, la pompe à proton vacuolaire ATPase dépendante favorise non seulement la libération des BPs de la matrice osseuse, mais a aussi un rôle essentiel dans la libération des BPs dans le cytoplasme des ostéoclastes (Takami *et al.* 2003). En effet, l'acidification des vésicules d'endocytose permettrait la dissociation du Ca²⁺ et la diffusion ou le transport des BPs à travers la membrane vésiculaire (Thompson *et al.* 2006). Plus récemment, l'utilisation de dentine incubée avec de l'ALN marqué par un fluorochrome a permis de visualiser l'internalisation de l'ALN par des ostéoclastes matures de lapin (Coxon *et al.* 2008) (Fig. 40).

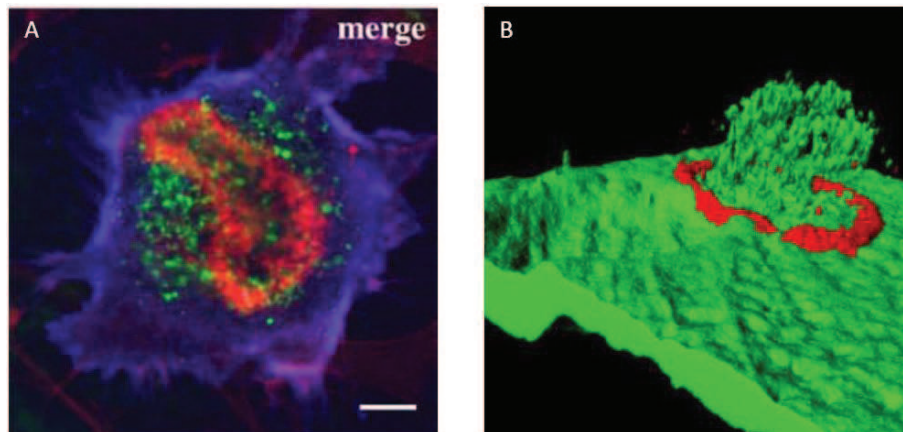


Figure 40: Internalisation de l'ALN marqué par un fluochrome montrée par microscopie confocale (A) et reconstruction 3D de coupes virtuelles obtenues en confocale (B). L'ALN est marqué en vert (carboxy fluorescein succinimidyl ester), l'actine en rouge (TRITC Phalloïdine) et la surface de l'ostéoclaste en violet (anticorps dirigé contre le récepteur à la vitronectine), adapté de (Coxon *et al.* 2008).

Les BPs, une fois internalisés par les ostéoclastes, vont avoir différents effets entraînant une diminution de leur activité de résorption. Il a été constaté que les BPs empêchaient la réorganisation du réseau d'actine, qui est primordial dans l'activité des ostéoclastes. Le réseau d'actine est non seulement impliqué dans l'adhésion des ostéoclastes à la surface osseuse via l'intégrine $\alpha\beta3$, mais aussi dans la formation de la ceinture d'actine et dans la formation de la bordure plissée (Sato *et al.* 1991; Colucci *et al.* 1998). Les BPs peuvent aussi inhiber la pompe à proton vacuolaire ATPase dépendante et ainsi inhiber l'acidification de la lacune de résorption (David *et al.* 1996). Les BPs inhibent aussi la sécrétion de cathepsine K (Sato *et al.* 2000). Finalement, les BPs induisent *in vitro* et *in vivo* l'apoptose des ostéoclastes impliquant la caspase 3 (Rogers *et al.* 2000). Tout ces résultats convergent vers l'inhibition de l'activité ostéoclastique, voir leur mort cellulaire par des mécanismes moléculaires différents en fonction de la composition du BP.

5.2. Effets sur les ostéoblastes

In vitro et *ex vivo*, des travaux ont suggéré un effet stimulateur des BPs sur la différenciation ostéoblastique mais aussi sur l'activité des ostéoblastes matures. Si les BPs inhibent la prolifération des ostéoblastes humains (Reinholz *et al.* 2000), ils favorisent leur différenciation (Reinholz *et al.* 2000; Im *et al.* 2004). Cependant, *in vivo* aucun effet direct des BPs sur les ostéoblastes n'a été clairement démontré. Il semblerait donc que la diminution des marqueurs de la formation osseuse au cours d'un traitement par les BPs soit liée à la balance entre

formation et résorption osseuse. Ainsi, une diminution drastique de la résorption osseuse aboutirait à la diminution de la formation osseuse (Russell *et al.* 2008).

5.3. Effets sur les ostéocytes

Les BPs sont internalisés préférentiellement par les ostéoclastes. Cependant, il a été montré que les BPs, même à de faibles doses inhibaient l'apoptose des ostéocytes (Plotkin *et al.* 1999; Follet *et al.* 2007). Les BPs atteindraient les ostéocytes via le fluide extracellulaire qui baigne les canalicules reliant les ostéocytes aux surfaces osseuses (Russell *et al.* 2007). Une étude récente utilisant du risédronate couplé à un fluorochrome montre sa présence dans les vaisseaux sanguins de l'os cortical mais aussi dans les lacunes ostéocytaires proches de ces vaisseaux. La présence du BP dans les lacunes était dépendante de la distance entre ces dernières et la surface osseuse. Ainsi, en établissant le pourcentage de lacunes marquées proches de la surface osseuse à 100, le pourcentage de lacunes marquées à une distance de 100 μm de la surface n'est plus que de 10-15% (Roelofs *et al.* 2010). L'inhibition de l'apoptose ostéocytaire implique l'ouverture par les BPs des hémicanaux composés de connexines 43 présents à la surface des ostéocytes (Plotkin et Bellido 2001; Plotkin *et al.* 2008). L'ouverture des connexines 43 par les BPs active la phosphorylation de la protéine Src qui permet la phosphorylation des tyrosines kinases ERK-1/-2 (Plotkin *et al.* 2005). Une fois phosphorylées, les protéines ERKs activent la phosphorylation de la protéine Hsp 90 qui phosphoryle à son tour la protéine Bad. Bad est une protéine pro-apoptotique qui une fois phosphorylée devient inactive et augmente donc la survie des ostéocytes (Plotkin *et al.* 2005).

6. Mécanismes d'action moléculaire

Les BPs azotés et non-azotés ont des modes d'action différents au sein de la cellule. Les BPs non azotés forment des analogues toxiques de l'ATP qui conduisent à l'apoptose des ostéoclastes tandis que les BPs azotés agissent via la voie du mévalonate.

6.1. Formation d'analogues toxiques de l'ATP par les BPs non-azotés

Des études utilisant la Résonance Magnétique Nucléaire ont montré chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* que le médronate (BP simple ou R₁: H et R₂: H) était converti en adénosine 5'(β , γ -méthylenetriphosphate) (Klein *et al.* 1988). Par la suite, ces mêmes résidus étaient retrouvés dans les cellules humaines (Rogers *et al.* 1996). Cette métabolisation est réalisée par l'aminoacyl-ARN_t synthase de classe II. Au cours de la traduction, les différents acides aminés sont liés aux ARN de transfert ou ARN_t. Pour cela, ils sont initialement condensés avec une molécule d'ATP (A_{ppp}) en un acide aminé adénylé (A_{ppa}) par l'aminoacyl-ARN_t synthase. Cette réaction réversible (Réaction 1, Fig. 41) libère un pyrophosphate inorganique (PP_i). Dans un second temps (Réaction 2, Fig. 41), l'A_{ppa} est condensé avec un ARN_t en libérant une

molécule d'AMP. La structure du BP (P-C-P) étant proche de celle du PPI (P-O-P), lors de la réaction inverse de la réaction 1, le BP peut se condenser avec l'AMP.

Le pont P-C-P étant une structure stable, le nouvel analogue d'ATP ne peut pas être métabolisé et va donc s'accumuler dans la cellule, interférer avec le métabolisme normal de l'ATP et induire l'entrée en apoptose. Dans l'ostéoclaste, ce composé inhiberait l'adénine nucléotide translocase de la membrane mitochondriale affectant ainsi leur perméabilité (Lehenkari *et al.* 2002). Ceci pourrait aboutir à l'activation des caspases, une étape précoce et irréversible de l'entrée en apoptose (Russell *et al.* 2008).

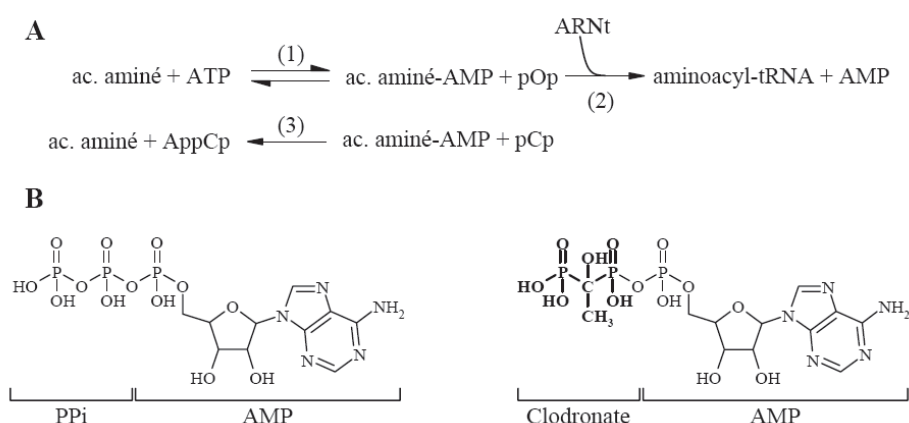


Figure 41: Formation d'analogues de l'ATP à partir de BPs non azotés. (A) Réaction 1 : L' aminoacyl-ARN_t synthase condense un acide aminé avec l'ATP, formant un acide aminé adénylé en libérant un PPI (pOp). Il est ensuite lié à un ARN_t (réaction 2). La réversion de la réaction 1 (réaction 3) peut lier un BP (pCp) à un acide aminé adénylé libérant un acide aminé et un analogue toxique de l'ATP (AppCp). (B) Formules chimiques développées de l'ATP (gauche) et d'un analogue stable de l'ATP contenant une molécule de clodronate (droite).

6.2. Inhibition de la voie du mévalonate par les BPs azotés

Les BPs azotés ont une structure plus complexe que les aminoacyl-ARN_t synthases ne reconnaissent pas. En effet, ni l'ALN ni le pamidronate ne se condensent avec l'AMP (Benford *et al.* 1999). Le mécanisme d'action des BP azotés a été élucidé grâce à des études *in vitro* sur des macrophages J774 et *in vivo* dans des foies de rats. L'incadronate inhibait la squalène synthase responsable de la transformation du farnésyl diphosphate (FPP) en squalène, un précurseur du cholestérol (Amin *et al.* 1992). Cependant, le pamidronate et l'ALN inhibaient aussi la synthèse du squalène mais étaient des inhibiteurs modérés de la squalène synthase, suggérant qu'ils inhibaient d'autres enzymes de la voie du mévalonate (Fig. 42). Par la suite, il a été précisé que les BPs azotés inhibaient directement la farnésyl diphosphate synthase (FPP synthase) à des doses de l'ordre du nM (Bergstrom *et al.* 2000). La FPP synthase est une enzyme homo dimérique qui

catalyse dans un premier temps la condensation du diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) avec une molécule d'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) pour former une molécule de géranylpyrophosphate (GPP). Dans un deuxième temps, la FPP synthase catalyse la condensation du groupement GPP avec une deuxième molécule d'IPP pour former une molécule de farnésylpyrophosphate (Fig. 42). Les BPs azotés ont la capacité de se fixer dans les sites de fixations du DMAPP et de l'IPP de la FPP synthase en empêchant la fixation de ces derniers (Kavanagh *et al.* 2006). L'atome d'azote contenu dans la chaîne latérale R₂ est en effet capable de former des liaisons N-O-H avec des groupements présents dans le site de fixation du GPP (Kavanagh *et al.* 2006). Cette fixation entraîne un réarrangement conformationnel qui ouvre le site de fixation de l'IPP et un deuxième bisphosphonate peut alors s'y fixer via les groupements phosphonates du pont P-C-P. Cette deuxième fixation entraîne un second réarrangement conformationnel qui stabilise les BPs et inactive l'enzyme de façon irréversible (Kavanagh *et al.* 2006). Il est important de noter que l'orientation de l'atome d'azote dans le site de fixation du GPP de la FPP synthase module le potentiel inhibiteur de cette enzyme (Dunford *et al.* 2008) et pourrait donc partiellement expliquer les différences d'efficacité entre les BPs azotés (Russell *et al.* 2008).

Outre son implication dans la synthèse du cholestérol, la voie du mévalonate conduit à la prénylation des petites protéines G (Ras, Rab, Rho, Rac...). Il s'agit d'une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de groupements FPP (Chaîne en C15) ou GGPP (Chaîne en C20). Ces longues chaînes carbonées se fixent sur une cystéine de la région C-terminale des protéines G. Cette liaison est rendue possible par l'action de la farnésyl-transférase (FTase) qui transfère le groupement FPP ou les géranyl-géranyl-transférases I et II (GGTase I et GGTase II) qui transfèrent le groupement GGPP sur les protéines G (McTaggart 2006). L'utilisation de mévalonate marqué par le C¹⁴ a permis de mettre en évidence que les BPs azotés inhibaient l'incorporation des groupements FPP et GGPP issus du mévalonate aux protéines G et, que cette inhibition corrélait avec l'apoptose des macrophages J774 (Luckman *et al.* 1998). L'inhibition de la FPP synthase par les BPs azotés induit donc l'inhibition de la synthèse des groupements prénylés et bloque la maturation des protéines G. Or, ces protéines sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que l'organisation du cytosquelette d'actine, le trafic des vésicules intracellulaires, la survie et l'activation de certaines intégrines (McTaggart 2006). Par exemple, il a été montré que l'inhibition de la prénylation des petites protéines G Rho et Rac bloque la formation de la ceinture d'actine des ostéoclastes (Coxon *et al.* 2001). De plus, l'inhibition de la prénylation de la protéine Rab par les BP azotés corrèle avec l'inhibition de la formation de la bordure plissée des ostéoclastes (Coxon *et al.* 2001). Il semblerait que l'inhibition de la prénylation de ces protéines G n'induit pas une inactivation de ces protéines mais plutôt une stimulation anormale des voies de signalisation régulées par Rho et Rac (Coxon *et al.* 2006).

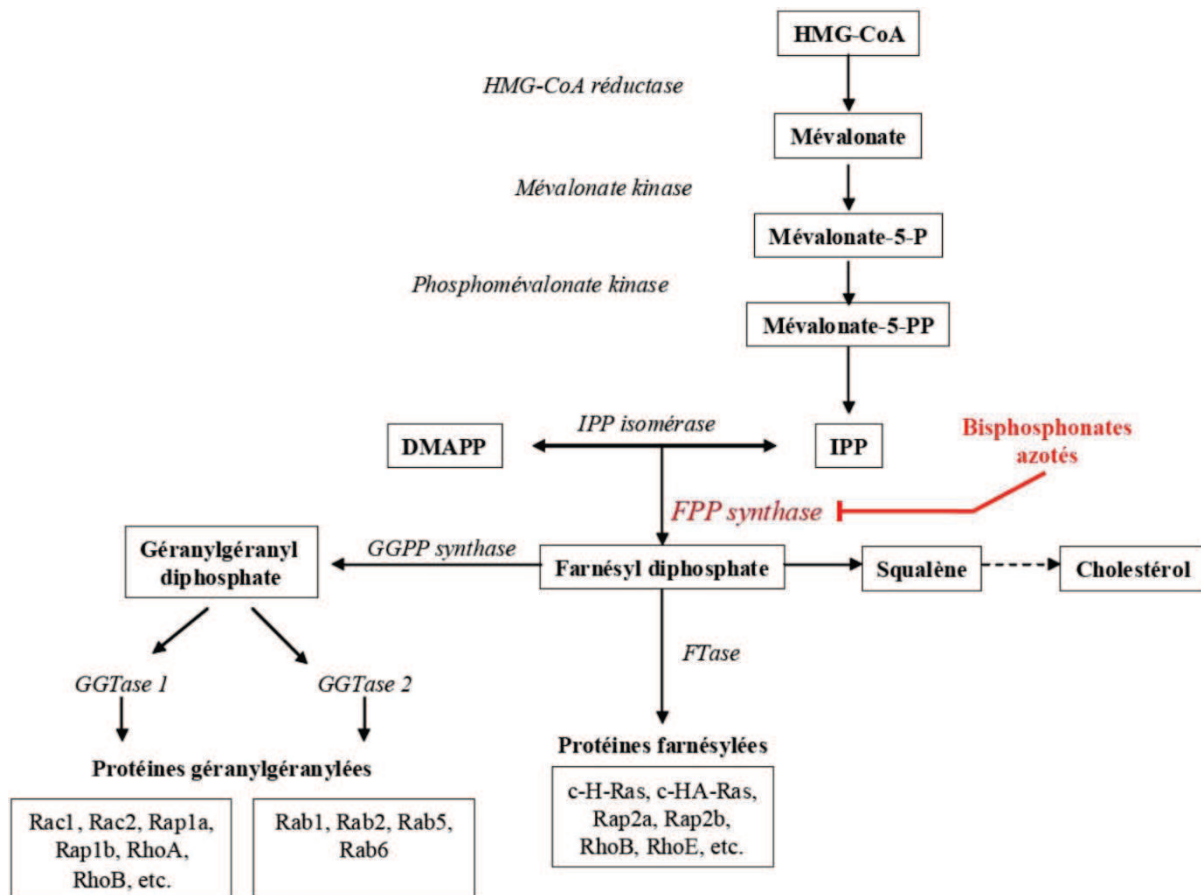


Figure 42: Inhibition de la voie du mévalonate par les bisphosphonates azotés aboutissant à l'inhibition de la prénylation des petites protéines G. Adapté de (Coxon *et al.* 2006).

Contrairement aux BPs non azotés, les BPs azotés ne sont pas directement condensés en métabolites de l'ATP. Cependant, l'inhibition de la FPP synthase conduit à une accumulation du groupement IPP qui se condense avec l'AMP pour former un analogue structural de l'ATP : l'acide 1-adenosine-5'-yle ester 3-(3-méthylbut-3-enyle) ester triphosphate (ApppI) (Monkkonen *et al.* 2006). Tout comme les composés AppCp obtenus avec les BPs non azotés, l'ApppI induit l'apoptose des cellules en bloquant l'adénine nucléotide translocase des membranes mitochondriales (Fig. 43) (Monkkonen *et al.* 2006). L'accumulation de l'IPP est aussi responsable d'un effet secondaire connu de l'utilisation des BPs azotés, la phase de réaction aiguë qui implique des symptômes pseudo grippaux (Russell *et al.* 2008). Cet effet secondaire est le plus souvent observé avec les BPs intraveineux, au cours de la première exposition au traitement. Il semblerait que l'internalisation des BPs azotés par les cellules, notamment les monocytes de la circulation périphérique conduirait à l'accumulation de l'IPP dans ces cellules. Or, l'IPP est connu pour être le ligand d'un récepteur présent à la surface des cellules γ, δ -T. Les mécanismes par lesquels l'IPP est présenté aux cellules γ, δ -T n'est à ce jour pas totalement élucidé mais l'activation de ces dernières conduit à un relargage de TNF α qui initierait cette réponse inflammatoire (Thompson et Rogers 2004).

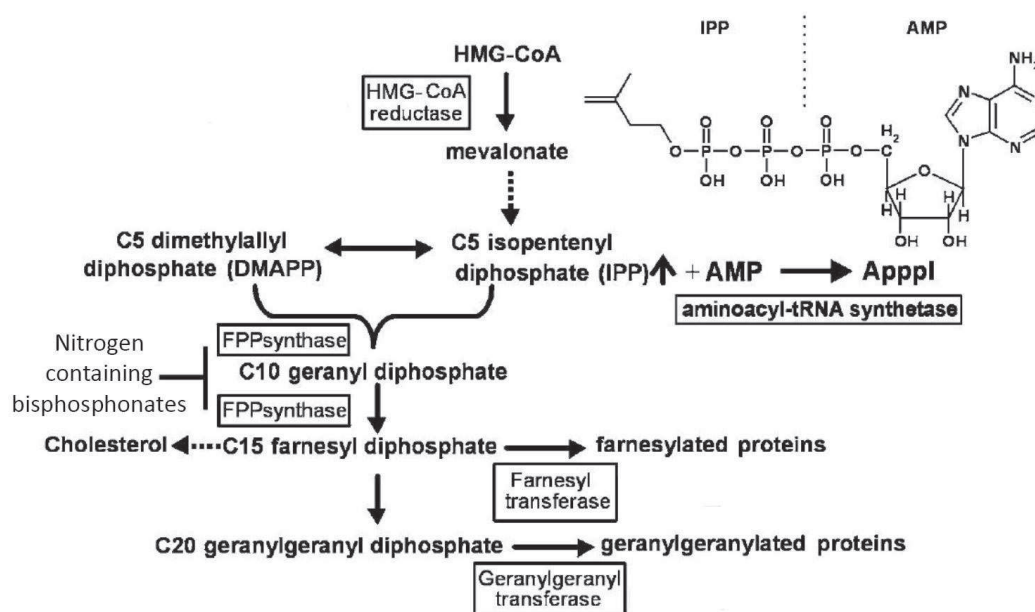


Figure 43: Mécanisme impliqué dans l'accumulation d'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) par l'inhibition de la farnésyl diphosphate synthase par les bisphosphonates azotés, adapté de (Monkkonen *et al.* 2006).

7. Utilisations cliniques des bisphosphonates

Outre leur utilisation dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique, les propriétés des BP ont fait un traitement de choix dans de nombreuses pathologies osseuses. Les BP sont ainsi utilisés dans le traitement de la maladie osseuse de Paget, une affection locale du tissu osseux qui se traduit par un remodelage osseux exacerbé et anarchique. L'édronate puis le clodronate ont montré une inhibition de la résorption dose dépendante chez des patients Pagétiques (Russell 2006). Plus récemment, une injection i.v. de zolédronate chez des patients souffrant de la maladie osseuse de Paget diminuait plus fortement les marqueurs sériques et urinaires du remodelage osseux après 60 jours qu'un traitement quotidien par le risédronate oral (Reid *et al.* 2005). Ce travail montrait ainsi que les BP de dernière génération, plus puissants, amélioreraient le traitement de cette pathologie avec des régimes d'administration moins contraignant et un effet plus rapide. Les BP sont aussi largement utilisés dans le domaine de l'oncologie où leur effet a été démontré dans le traitement des tumeurs ostéolytiques liées au myélome multiple (Sirohi et Powles 2004), des métastases osseuses liées au cancer du sein, de la prostate ainsi que d'autres tumeurs solides (Russell 2006; Russell *et al.* 2008). Finalement, les BP ont aussi montré des effets bénéfiques dans le traitement des formes modérées et sévères d'ostéogénèse imparfaite chez l'enfant et l'adolescent en réduisant le risque de fracture (Rauch et Glorieux 2005)

8. Bisphosphonates impliqués dans les travaux de cette thèse

8.1. L'alendronate

8.1.1. Les résultats cliniques

Le développement de l'ALN dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique est antérieur à celui de l'ibandronate et les premiers résultats cliniques montrant l'efficacité antifracturaire datent de la première moitié des années 1990. Deux études précliniques majeures ont conduit au développement clinique de l'ALN. La première étude avait mis en évidence que l'ALN augmentait significativement la masse osseuse, la raideur et la charge à rupture des vertèbres L4 et des fémurs de rats intacts (males et femelles) traités pendant 2 ans par rapport au groupe contrôle (Guy *et al.* 1993). La deuxième étude menée chez la babouine OVX a montré que les animaux traités pendant 2 ans par l'ALN avaient une BMD augmentée au col du fémur et à la colonne lombaire, des taux de marqueurs biochimiques du remodelage osseux significativement diminués et une résistance osseuse significativement augmentée à la vertèbre L4, comparativement au groupe OVX + véhicule (Balena *et al.* 1993).

Par la suite, l'étude de phase III FIT-VFA (FIT-1 pour **F**racture **I**ntervention **T**rial-**V**ertebral **F**racture **A**rm) a porté sur 2027 femmes ayant au moins une fracture vertébrale à l'inclusion dans l'étude, âgées de 45 à 80 ans, ménopausées depuis 5 ans ou plus et présentant un T-score $\leq -2,5$ à la colonne lombaire. Ces patientes ont ensuite été réparties aléatoirement dans les bras placebo, 5 mg/jour, 10 mg/jour pendant 3 ans ou 20 mg/jour pendant 2 ans suivit d'un an à 5 mg/jour d'ALN oral. Cette étude a révélé que la dose optimale, basée sur le gain de BMD était la dose de 10 mg/jour, aussi efficace que la dose 20 mg/jour puis 5 mg/jour. Cette dose augmentait significativement la BMD à la colonne lombaire, au col fémoral, au trochanter et pour le corps entier sans atteindre de plateau après 3 ans. Ce traitement diminuait significativement le risque de nouvelle fracture vertébrale de 47% et le risque de nouvelles fractures à la hanche de 51% par rapport au placebo (Lieberman *et al.* 1995; Black *et al.* 1996). Le deuxième bras de l'étude FIT était l'étude FIT-CFA (FIT-2 pour **F**racture **I**ntervention **T**rial-**C**linical **F**racture **A**rm) incluant 4432 femmes traitées durant 4 ans et n'ayant pas de fracture vertébrale et un T-score $\leq -1,6$ SD au col fémoral. Une sous population de 37% des patientes de FIT-2 avec un T-score $\leq -2,5$ SD au col fémoral (correspondant aux critères de définition de l'ostéoporose) a mis en avant une réduction de l'incidence de nouvelles fractures vertébrales de 50%, et de 56% pour une nouvelle fracture de la hanche sous ALN versus placebo (Cummings *et al.* 1998; Black *et al.* 2000). Ces résultats démontraient donc l'efficacité anti fracturaire de l'ALN dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique chez des femmes ayant ou non une fracture vertébrale préalable.

Plus récemment, l'étude FLEX (FIT Long-term EXtension) a porté sur 1195 patientes des études FIT qui avaient prolongé leur traitement par l'ALN jusqu'à 5 ans. Les patientes étaient séparées pour recevoir un placebo ou 5 mg/jour ou 10 mg/jour d'ALN oral pour une durée supplémentaire de 5 ans. Le but de l'étude était donc de comparer la BMD, les marqueurs du

remodelage osseux et l'incidence des fractures chez des patientes traitées 10 ans par l'ALN par rapport à des patientes n'ayant pas poursuivi le traitement. Les résultats publiés 3 (Ensrud *et al.* 2004) et 5 ans (Black *et al.* 2006) après le début de l'étude FLEX montraient que le traitement prolongé par l'ALN maintenait la BMD mesurée à tous les sites (hanche totale, col du fémur, trochanter et colonne lombaire) par rapport à la diminution observée chez les patientes recevant le placebo. La différence de BMD mesurée entre le groupe traité ALN et le placebo était, en fonction du site concerné, comprise entre 2 et 4% après 10 ans. Cependant, le traitement par le placebo maintenait la BMD à un seuil supérieur aux valeurs observées au moment de l'inclusion dans l'étude FIT. Les mêmes constatations étaient réalisées pour les différents marqueurs biochimiques du remodelage osseux. Par rapport aux valeurs mesurées à l'inclusion dans FLEX, les taux de ces marqueurs étaient maintenus chez les patientes recevant l'ALN et augmentés progressivement chez les patientes recevant le placebo (Ensrud *et al.* 2004; Black *et al.* 2006). Ainsi, comparativement aux patientes recevant l'ALN, une augmentation de 56% pour le CTX et de 60% pour le PINP était mesurée dans le groupe placebo après 10 ans. Les taux mesurés dans le groupe placebo restaient toutefois supérieurs aux taux mesurés à l'inclusion dans l'étude FIT. L'ensemble de ces résultats mettait donc en évidence un effet de l'ALN prolongé même après l'arrêt du traitement. Cet effet pourrait être lié au fait que l'ALN étant métaboliquement très stable, il pourrait être relargué localement et systématiquement au cours de la résorption de la matrice osseuse traitée et donc inhiber la résorption à un autre site, ralentissant la perte osseuse après l'arrêt du traitement. Concernant l'efficacité antifracturaire, le groupe traité durant 10 ans par l'ALN montrait une diminution significative du risque de fractures vertébrales par rapport au groupe ayant reçu 5 ans de placebo (Black *et al.* 2006). Cette différence n'était pas significative pour le risque de fractures non vertébrales. Cependant, il est important de rappeler qu'à l'inclusion dans l'étude FLEX, les patientes étaient issues de FIT et présentaient donc un gain de BMD pouvant les exclure des critères densitométriques les définissant comme ostéoporotiques. Dans ce sens, une étude *post-hoc* a récemment démontré que le traitement de 10 ans par l'ALN réduisait le risque de fractures non vertébrales chez les patientes sans fracture vertébrale prévalente et ayant un T-score < -2,5 SD au col fémoral à la fin de l'étude FIT par rapport au patientes ayant arrêté le traitement (Schwartz *et al.* 2010).

8.1.2. Alendronate et qualité du tissu osseux

8.1.2.1. Effets sur le remodelage osseux et l'accumulation de micro dommages

Les BPs dont l'ALN ont pour rôle premier de réduire l'activité du remodelage osseux en inhibant l'activité des ostéoclastes. Cette action ralentit la perte osseuse générée par un remodelage exacerbé dans le contexte de l'ostéoporose ménopausique. A court terme, le ralentissement du remodelage permet le comblement des cavités de résorption antérieures au traitement et, par conséquent, une augmentation de BMD est observée. A long terme, l'inhibition de la résorption conduit au maintien de ce gain de densité (Allen et Burr 2011). Parmi, les BPs commercialisés dans le traitement de l'ostéoporose, l'ALN est la molécule qui inhibe le plus fortement le remodelage osseux que ce soit au niveau global, mesuré par dosage des marqueurs

sanguins ou urinaires (Rosen *et al.* 2005) ou au niveau tissulaire mesurée par histomorphométrie (Chavassieux *et al.* 1997). En effet, l'étude histomorphométrique de biopsies osseuses de patientes de l'étude FIT ayant reçu un double marquage par les tétracyclines, a mis en évidence qu'après deux ou trois ans de traitement avec 10 mg/jour d'ALN oral, l'activité du remodelage était réduite de plus de 90% versus placebo (Chavassieux *et al.* 1997).

La mesure de l'activité du remodelage par histologie a aussi permis de montrer l'aspect site spécifique de l'effet de l'ALN, contrairement aux dosages des marqueurs biochimiques qui reflètent l'activité moyenne du remodelage dans tout le squelette. Chez la chienne Beagle, un modèle animal largement utilisé dans l'étude des effets des BPs, il a été montré qu'après six mois d'ALN oral à la dose thérapeutique, l'Ac.F était diminuée de 15% dans la mandibule, 46% dans la côte et n'était pas changée dans l'os cortical du fémur (Allen *et al.* 2010). En plus de cet effet site spécifique, il semblerait qu'un effet temps spécifique existe sur l'inhibition du remodelage osseux puisque pour le modèle animal précédemment décrit, après trois ans de traitement, l'inhibition du remodelage osseux était alors de 67% à la mandibule (Allen et Burr 2008b). L'étude de ces effets temps et sites spécifiques n'étant possible qu'ex-vivo, il n'existe pas de données chez l'Homme.

Le remodelage osseux, qu'il soit aléatoire ou ciblé, permet la pérennité des propriétés chimiques et mécaniques du tissu osseux, mais aussi la «réparation» des microdommages. Or, les BPs inhibent les deux types de remodelage, le premier via l'inhibition de l'activité des ostéoclastes et le second par l'inhibition de l'apoptose ostéocytaire qui correspond au signal d'activation du remodelage ciblé. Il est aujourd'hui admis que l'utilisation de BPs à des doses élevées ou comparables à celles utilisées en clinique favorise l'accumulation de microdommages dans les modèles animaux. Cette accumulation a été montrée à de multiples reprises chez le chien, un modèle pertinent, dans la mesure où contrairement aux modèles plus classiques (souris et rats), le chien dispose d'un mécanisme de remodelage osseux secondaire de type Haversien. Pour ce modèle, des doses 2,5 à 6 fois supérieures aux doses thérapeutiques, administrées pendant 1 an aboutissaient à une augmentation significative jusqu'à 75% de la densité de microdommages comparativement aux animaux non traités. Cette augmentation était vérifiée dans l'os cortical de côte, dans les vertèbres lombaires et thoraciques, dans l'os iliaque ainsi qu'au niveau du col du fémur (Mashiba *et al.* 2000; Mashiba *et al.* 2001). Plus récemment, une accumulation de microdommages a été mise en évidence dans la vertèbre de chiens traités 1 an avec une des doses d'ALN correspondant à la dose clinique et à la moitié de cette dose (Allen *et al.* 2006). Cette accumulation était significativement corrélée à la réduction de la fréquence d'activation du remodelage osseux (Fig. 44). De manière intéressante, les mêmes auteurs montraient dans ce modèle qu'après trois ans de traitement à la dose thérapeutique ou 5 fois la dose, la densité de microdommages n'était pas plus haute qu'après 1 an de traitement (Allen et Burr 2007). Ceci suggère que l'accumulation de microdommages est un effet précoce de l'utilisation de l'ALN.

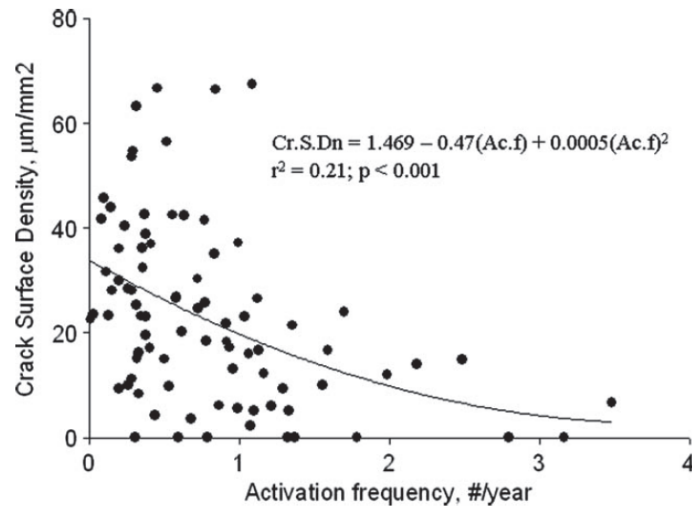


Figure 44: Relation non linéaire entre la densité de microdommages (Crack Surface Density, $\mu\text{m}/\text{mm}^2$) et la fréquence d'activation du remodelage osseux (Activation frequency, $\#/\text{year}$), adapté de (Burr 2003).

L'augmentation du microendommagement dans la matrice osseuse de patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique traitées par l'ALN n'a pas clairement été établie. A ce jour, deux études ont été conduites autour de cette hypothèse. La première, portait sur 66 femmes ménopausées et ostéoporotiques 38 d'entre elles étaient traitées par l'ALN depuis 5 ans en moyenne, les autres étaient non traitées (Stepan *et al.* 2007). Les patientes, après un double marquage par les tétracyclines, avaient subi une biopsie osseuse transiliaque pour l'analyse histologique des microdommages. La densité des microdommages était plus élevée chez les femmes traitées mais la différence n'était pas significative. De plus, les résultats provenaient de deux centres dont les mesures respectives présentaient des différences significatives. Contrairement aux patientes non traitées, pour les patientes traitées par l'ALN, la BMD mesurée au col fémoral corrélait négativement avec la densité de microdommages ($r'=-0.54$, $p=0.005$). Ces résultats suggéraient que les microdommages pourraient s'accumuler chez les patientes traitées par l'ALN présentant une BMD basse (Stepan *et al.* 2007).

La deuxième étude a porté sur 50 femmes ménopausées et ostéoporotiques traitées par un BP ($n=3$ par pamidronate intra veineux (i.v.), $n=37$ par ALN oral et $n=10$ par risédronate oral) durant 6,5 ans en moyenne. Une biopsie osseuse transiliaque a été faite pour la quantification des microdommages, les résultats étaient comparés à ceux obtenus sur 12 nécropsies (Chapurlat *et al.* 2007). Cette étude ne mettait pas en évidence de différences significatives entre les deux groupes ni pour la densité de microdommages ni pour leur longueur. Tout comme pour la première étude, les résultats ne montraient pas non plus de corrélations entre le microendommagement et la durée du traitement (Chapurlat *et al.* 2007). La limite principale de cette étude résidait dans son groupe contrôle qui n'était pas apparié pour l'âge et dont le passé médical était inconnu. Or, la présence d'un microdommage est un évènement rare et largement dépendant de l'âge et du métabolisme osseux de l'individu. Plus généralement, ces études ont été réalisées sur de l'os iliaque, les

biopsies à d'autres sites n'étant pas possibles. Or, ce n'est pas un site osseux porteur et il est admis qu'elle ne reflète que partiellement la densité de microfissures des autres sites osseux. Chez le chien, par exemple, la densité de microdommages est 2 fois plus élevée dans la vertèbre qu'au niveau de l'os iliaque (Mashiba *et al.* 2005).

8.1.2.2. Effets sur la minéralisation osseuse

L'ALN réduisant l'activité du remodelage osseux, pourrait induire une augmentation du degré de minéralisation. Théoriquement, une réduction de la fréquence d'activation du remodelage augmente la durée de vie d'un BSU, qui dispose alors d'une période de minéralisation secondaire plus longue avant d'être résorbé par un nouveau cycle de remodelage (Meunier et Boivin 1997). Ainsi, une augmentation de la proportion de BSUs plus matures entrainerait une augmentation du DMB et une homogénéisation de la minéralisation tissulaire. Cette hypothèse a été confirmée chez des femmes ostéoporotiques traitées par l'ALN. En effet, une étude menée sur un sous échantillon de 53 biopsies iliaques prélevées chez des patientes de l'étude FIT a clairement montré une augmentation significative du DMB cortical et trabéculaire, mesuré par microradiographie quantitative, chez les patientes traitées 2 ou 3 ans par 10 mg/jour d'ALN oral (Boivin *et al.* 2000). Pour l'os total (cortical + trabéculaire) le DMB était significativement plus élevé de 11% ($p < 0,0001$) après trois ans d'ALN par rapport aux patientes traitées par le placebo (Fig. 45). Aussi, sous ALN, la BMD lombaire était augmentée de 10% et le BV/TV mesuré sur ces biopsies iliaques n'était pas changé par rapport au groupe placebo (Chavassieux *et al.* 1997; Boivin *et al.* 2000). Ainsi, l'augmentation de la BMD observée au niveau de l'organe était expliquée par une augmentation de la densité minérale tissulaire plutôt que par une augmentation de la quantité de matrice osseuse (Boivin *et al.* 2000).

Une analyse a posteriori de ces mêmes données a mis en évidence une diminution significative de l'index d'hétérogénéité de la minéralisation, soulignant ainsi l'homogénéisation de la minéralisation observée sur les microradiographies (Fig. 45) (Boivin et Meunier 2002b). L'augmentation du DMB associée à une diminution de son hétérogénéité a ensuite été confirmée par imagerie quantitative par électrons rétrodiffusés (qBEI) (Roschger *et al.* 2001). De plus, ce dernier travail montrait par histomorphométrie une diminution significative de la porosité corticale (-46%, $p < 0,01$) après traitement, allant dans le sens d'une résistance à la fracture améliorée (Roschger *et al.* 2001). Lors de ces deux études transversales, le degré de minéralisation atteint après deux et trois ans de traitement n'était pas significativement différent. Ceci suggérait que l'augmentation du DMB était un effet précoce du traitement par l'ALN, puisqu'il diminuait rapidement. Récemment, l'utilisation du qBEI sur des biopsies iliaques issues de l'étude FLEX a montré que si le contenu calcique tissulaire (variable proche du DMB) était plus élevé après 5 ans d'ALN (suivi de 5 ans de placebo) et 10 ans d'ALN par rapport à 2 et 3 ans de traitement, les valeurs restaient dans la gamme physiologique d'une population contrôle. De plus, ni le contenu minéral, ni son hétérogénéité n'étaient différents entre les groupes traités 5 et 10 ans (Roschger *et al.* 2010).

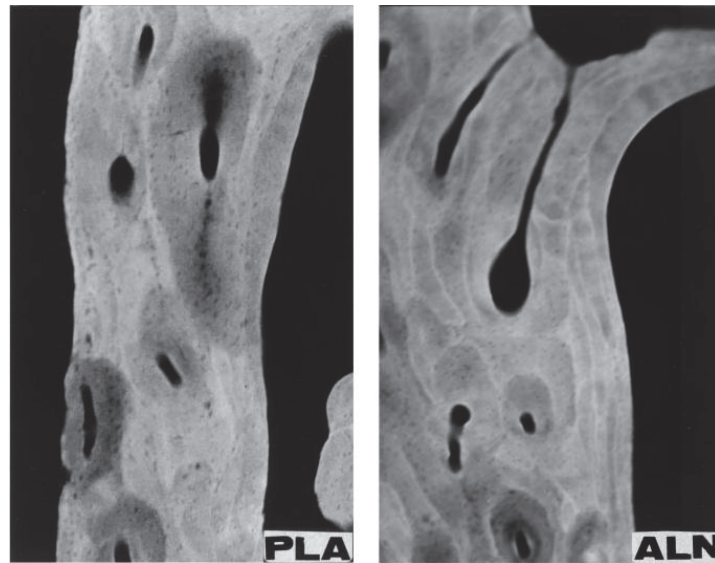


Figure 45: Microradiographies d'os cortical iliaque de patientes ostéoporotiques traitées durant trois ans par un placebo (PLA = Calcium + Vitamine D) ou par 10 mg/jour d'alendronate (ALN). Le niveau de gris après traitement apparaît plus élevé et plus homogène, reflétant l'augmentation du degré de minéralisation et la diminution de l'index d'hétérogénéité, adapté de (Boivin *et al.* 2000).

Au niveau du cristal du minéral osseux, que ce soit après 2, 3, 5 ou 10 ans de traitement par l'ALN, l'utilisation de la diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS pour Small-Angle X-ray Scattering) n'a pas montré de modifications de la taille des particules minérales (Roschger *et al.* 2001; Roschger *et al.* 2010). Toujours à partir de biopsies iliaques de l'étude FIT, l'utilisation de la FTIRI (FTIR-imaging) a permis de préciser les modifications de la minéralisation à l'échelle du cristal induites par 3 ans d'ALN. Cette technique de spectroscopie vibrationnelle permet d'accéder à de multiples variables reflétant la quantité et la qualité du minéral osseux, le rapport minéral/matrice organique (i.e., degré de minéralisation mesuré par FTIR), la carbonatation (contenu en carbonate de la maille cristalline) et la cristallinité qui est modulée à la fois par la taille du cristal et par la perfection cristalline. La FTIRI a permis de confirmer chez 7 patientes, l'augmentation significative du contenu minéral cortical ($p=0,055$ pour l'os trabéculaire) ainsi que la diminution de son hétérogénéité après traitement, dans l'os cortical et trabéculaire par rapport au placebo (Fig. 46). En revanche, ni la carbonatation, ni la cristallinité ne voyaient leur moyenne changer, seule leur hétérogénéité était significativement diminuée par l'ALN (Boskey *et al.* 2009). La suppression du remodelage osseux par l'utilisation d'ALN induit donc une augmentation de la minéralisation par augmentation du nombre de cristaux liée à une minéralisation secondaire plus longue, ce qui conduit à une homogénéisation des propriétés minérales à l'échelle tissulaire comme cristalline. Un degré de minéralisation ramené au niveau physiologique est signe d'une amélioration de la qualité osseuse et de la résistance mécanique globale (Follet *et al.* 2004). Cependant, il est connu que le DMB et son hétérogénéité sont des variables dont le rôle dans la qualité osseuse est défini par un optimum. En

effet, si ces variables sont trop basses ou trop élevées, l'os devient plus fragile. De plus, un tissu osseux plus minéralisé et plus homogène pourrait être un terrain favorable à l'initiation et à la progression de microdommages (Burr 2003).

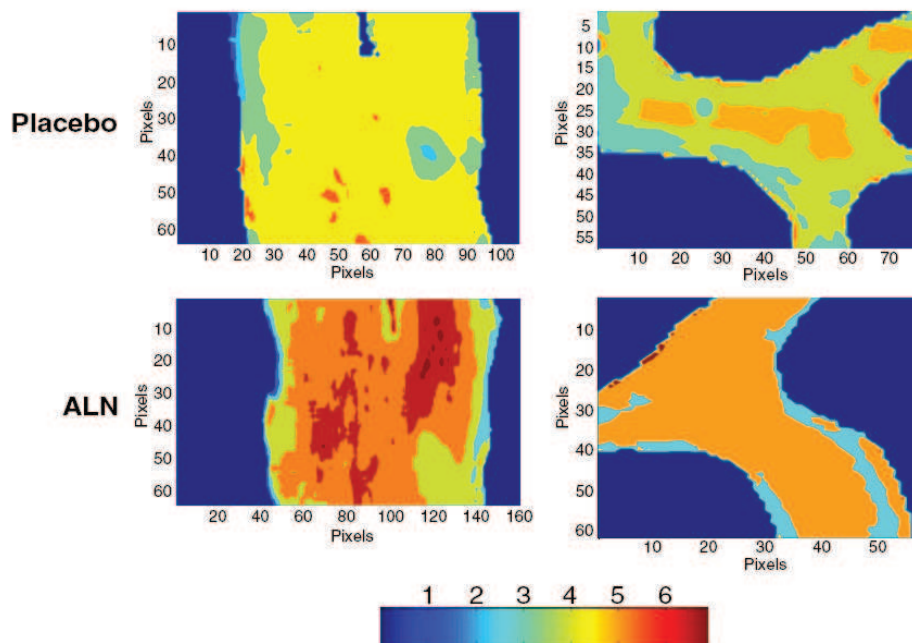


Figure 46: Images obtenues par FTIRI (Fourier Transform InfraRed Imaging) montrant l'augmentation du rapport minéral / matrice organique après trois ans d'alendronate dans l'os cortical (gauche) et trabéculaire (droite). Taille du pixel = 7 μ m de coté, adapté de (Boskey *et al.* 2009)

8.1.2.3. Effets sur la matrice organique

Les effets d'un traitement par l'ALN sur la matrice organique ont été peu étudiés chez la femme ostéoporotique. L'étude de Boskey et collaborateurs, décrite dans le paragraphe précédent, menée en FTIRI sur 7 biopsies de patientes traitées 3 ans par ALN et 10 par un placebo, n'a pas révélé de modification de la maturité du collagène dans l'os cortical et trabéculaire. Cependant, l'hétérogénéité de cette variable était significativement diminuée dans l'os trabéculaire (Boskey *et al.* 2009). Le faible nombre de zones d'intérêts analysées et de patientes ne permettait pas de conclure sur un effet direct de l'ALN ou une simple conséquence du ralentissement du remodelage osseux.

Des études conduites chez la chienne Beagle ont montré qu'après un an de traitement par une faible dose d'ALN oral (0,2 mg/kg/jour) la maturité du collagène mesurée par FTIRI était significativement augmentée dans l'os cortical et trabéculaire (Gourion-Arsiquaud *et al.* 2010). La maturité du collagène étant corrélée au module élastique mesuré par nano indentation

($r^2=0,93$, $p<0,001$), elle pourrait être un déterminant de l'effet anti fracturaire associé au traitement (Gourion-Arsiquaud *et al.* 2009; Gourion-Arsiquaud *et al.* 2010). Les techniques de spectroscopies vibrationnelles comme la FTIR ne permettent pas de distinguer le type de produit de glycation impliqué dans ce processus comme le permet le dosage chromatographique par HPLC (pour High Performance Liquid Chromatography). Cette dernière a permis de caractériser les modifications précises de la matrice collagénique après un an de traitement par l'ALN au niveau de l'os trabéculaire vertébral. L'administration d'une dose orale de 0,1 mg/kg/jour (i.e., inférieure à la dose équivalente utilisée dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique) augmentait significativement la concentration en PEN (+34%), le ratio PYD/DPD (+14%) et diminuait le ratio α/β CTX (-32%) par rapport aux animaux traités par le véhicule (Allen *et al.* 2008a). Ces résultats étaient corrélés à la fréquence d'activation du remodelage osseux. Autrement dit, le ralentissement du remodelage osseux observé sous ALN conduit à une accumulation de crosslinks enzymatiques et non-enzymatiques. L'accumulation d'AGE a été confirmée à la dose de 1mg/kg/jour dans une autre étude qui a aussi mis en évidence une corrélation négative entre le taux d'AGE et l'énergie plastique à rupture (Tang *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent chez l'animal que l'ALN pourrait avoir un effet complexe sur le comportement mécanique via des modulations des propriétés de la matrice organique. En effet, il a été montré que l'accumulation de crosslinks enzymatiques améliore la résistance et la raideur de l'os (Banse *et al.* 2002) tandis que l'accumulation d'AGE diminue la capacité de l'os à absorber de l'énergie avant de rompre (Vashishth *et al.* 2001).

8.1.2.4. Effets sur les propriétés mécaniques

Il est admis que l'ALN diminue significativement le risque de fracture témoignant d'une amélioration de la résistance mécanique de l'os à l'échelle de l'organe. Les essais classiques de biomécanique étant invasifs et destructeurs, seul des études utilisant des simulations d'essais par FEA ont été réalisées chez la femme ostéoporotique. Ces études ont prédit qu'au niveau vertébral, la résistance à la fracture en compression augmentait significativement dès 3 et 6 mois de traitement par l'ALN oral aux doses de 5 mg/jour (Imai *et al.* 2009) ou 10 mg/jour (Keaveny *et al.* 2007). Ces travaux montraient aussi que cette augmentation de la résistance mécanique osseuse était expliquée à hauteur de 80% par l'augmentation de la BMD (Keaveny *et al.* 2007). Ce type d'étude ne permet malheureusement pas de fournir des données quant à l'effet du traitement sur le comportement mécanique précis de la pièce osseuse.

Des éléments plus directs ont été obtenus par la suite à partir de modèles animaux. Le modèle de chienne Beagle intacte a permis de montrer qu'après un an de traitement par l'ALN avec une dose 5x supérieure à la dose équivalente utilisée en clinique, la charge à rupture était significativement plus haute comparativement aux animaux traités par le véhicule (Mashiba *et al.* 2001). Le même modèle animal montrait aussi une raideur, c'est-à-dire une résistance à la déformation élastique, significativement plus grande que chez les contrôles et ce, dès la demie dose clinique équivalente (Allen *et al.* 2006). Après un an, ces effets n'étaient pas observés au niveau de la côte, majoritairement corticale (Mashiba *et al.* 2000). Les résultats obtenus à trois

ans ne montraient de différences ni pour la charge à rupture ni pour la raideur, entre les animaux traités par l'ALN ou par le véhicule (Allen et Burr 2007). Que ce soit après 1 ou 3 ans de traitement, la capacité de l'os à absorber de l'énergie avant la rupture n'était pas influencée par l'ALN (Mashiba *et al.* 2001; Allen *et al.* 2006; Allen et Burr 2007). Tout comme les études réalisées par FEA chez la femme ostéoporotique, les résultats de ces études montrent toutes que les variations mécaniques au niveau de l'organe sont largement expliquées par la BMD (Fig. 47) (Allen et Burr 2008a). En résumé, la réduction de la fréquence d'activation du remodelage osseux observée sous ALN permet de maintenir une BMD plus élevée et conduit à une augmentation de la résistance mécanique globale. Ces résultats sont cohérents avec la réduction du risque fracturaire plus importante observée chez les patientes ostéoporotiques présentant un gain de BMD plus élevé (Seeman 2009).

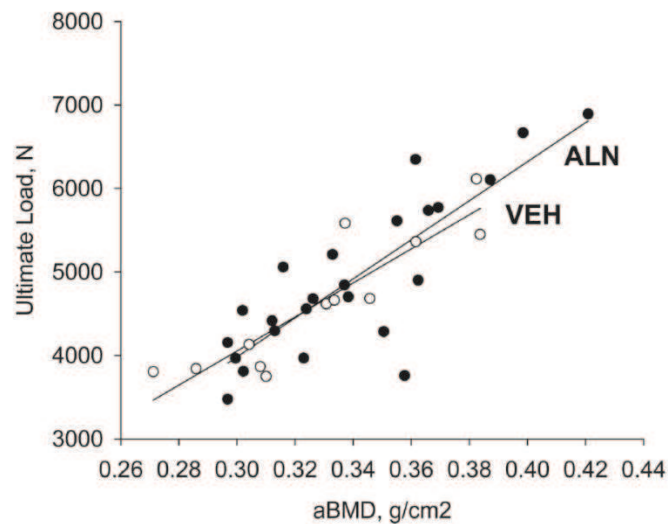


Figure 47: Regressions obtenues entre la charge maximale à rupture (Ultimate Load) et la densité minérale osseuse surfacique (aBMD) chez des chiennes Beagle traitées durant 3 ans par de l'alendronate (ALN) ou le véhicule (VEH). La relation entre les deux variables est similaire et indique que pour une BMD donnée, la résistance osseuse est la même dans les deux groupes, adapté de (Allen et Burr 2007).

Comme nous l'avons vu précédemment, la résistance mécanique de l'os est expliquée à la fois par la quantité de matrice osseuse et sa densité, mais aussi par les propriétés du matériau. Les propriétés du matériau ont été dérivées des essais réalisés en compression sur pièces osseuses entières. Ces études ont montré que si après 1 ou 3 ans de traitement par l'ALN ni la contrainte à rupture, ni le module d'élasticité n'étaient modifiés, la capacité du matériau à absorber de l'énergie avant de se rompre (i.e., la toughness) était diminuée. Toujours au niveau de la vertèbre, un an d'ALN conduisait à une diminution non significative de la toughness de 15 à 20% (Mashiba *et al.* 2001; Allen *et al.* 2006). Après trois ans d'ALN à la dose clinique équivalente

(0.20 mg/kg/jour) ou avec 5 fois cette dose, la toughness était significativement diminuée de 25 à 36% ($p < 0,004$) *versus* contrôle. Sur la côte, la diminution de toughness n'était significative (-33%, $p = 0,02$) que pour la dose de 1 mg/kg/jour après 3 ans d'ALN (Allen *et al.* 2008b). Dans cette dernière étude, seule la toughness liée au domaine de déformation plastique (i.e., irréversible) était diminuée. Les résultats à un an, laissent penser que la diminution de la toughness était liée à l'accumulation de microdommage. Cependant, les résultats à trois ans montraient une diminution continue de la toughness alors que la densité de microdommages n'était pas plus élevée qu'après 1 an d'ALN, infirmant donc cette hypothèse (Allen et Burr 2011).

Deux études, avec des mesures plus directes sur des cubes de 5 mm³ d'os trabéculaire de vertèbres, ont montré que l'ALN augmentait le module d'Young et la contrainte à rupture via une amélioration de la microarchitecture. La première étude menée chez 12 animaux traités durant 1 an par 1 mg/kg/jour d'ALN et 11 contrôles a montré une augmentation de 19% ($p = 0,007$ *versus* contrôle) du module d'Young dans la direction cephalo-caudale et de 24% de la contrainte maximale ($p = 0,009$ *versus* contrôle). Cette même étude révélait aussi une augmentation significative du BV et du Tb.Th, ainsi qu'une tendance à la diminution du SMI (-29%, N.S). Dans ce modèle, la combinaison du BV et de l'anisotropie expliquait 74-83% du module d'Young et 79% de la contrainte maximale (Ding *et al.* 2003). La deuxième étude basée sur le même type de tests en compression a confirmé ces résultats. En outre, l'utilisation d'un modèle FEA a permis de préciser que contrairement au module d'Young apparent (mesuré directement par le test mécanique), le module d'Young effectif (donné par le modèle numérique et indépendant du BV et de l'architecture) n'était pas changé après traitement par l'ALN (Day *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent donc qu'au niveau de l'os trabéculaire vertébral, l'amélioration des propriétés mécaniques est plutôt liée à une amélioration de la microarchitecture et de la masse osseuse qu'à une modification des propriétés intrinsèques de la matrice osseuse (Day *et al.* 2004). Finalement, il a récemment été montré qu'après 1 an de traitement par l'ALN (0,2 mg/kg/jour), la dureté mesurée par nanoindentation dans l'os trabéculaire de vertèbre était significativement augmentée par rapport aux animaux ayant reçu le véhicule (Wang *et al.* 2008a). Or les techniques d'indentation sont actuellement les seules à permettre une mesure directe des propriétés mécaniques à l'échelle tissulaire.

En résumé, l'ALN a donc un effet positif sur la résistance mécanique globale en réduisant le risque de fracture. Une large majorité de cet effet est associée à une augmentation de la BMD est due à une augmentation du DMB et non à une augmentation de la masse osseuse. Au niveau tissulaire, le DMB est augmenté par l'effet inhibiteur de l'ALN sur le remodelage osseux, ceci conduit à l'augmentation de la proportion de matrice osseuse plus mature et diminue l'hétérogénéité de la minéralisation. Plus généralement, cette homogénéisation se traduit après 3 ans de traitement pour une hétérogénéité diminuée pour la cristallinité ainsi que la maturité du collagène. Cependant, le tissu osseux traité par l'ALN présente aussi une accumulation de microdommages, une accumulation d'AGEs et une diminution de sa capacité à absorber de l'énergie avant de rompre. La plupart de ces conclusions sont issues d'un modèle canin dont le tissu osseux est, comme chez l'homme, perpétuellement renouvelé par un remodelage de type Haversien. Ce modèle présente toutefois une limite importante. En effet, la femelle ne montre pas

naturellement de chute brutale du taux d'œstrogène à l'origine de l'augmentation de l'activité du remodelage osseux et de la perte osseuse. L'effet de l'utilisation prolongée de l'ALN sur les propriétés intrinsèques de la matrice osseuse reste encore mal connu. L'ensemble des résultats mentionnés dans ce chapitre suggère que l'ALN pourrait avoir un effet double. A savoir un effet positif prédominant (augmentation de la BMD), qui pourrait masquer des effets plus négatifs à l'échelle tissulaire et sub-tissulaire (homogénéisation des propriétés physico-chimiques, accumulation de microdommages, accumulation d'AGEs).

8.2. L'ibandronate

Depuis le début des années 1990, l'ibandronate (IBN) a fait l'objet d'un vaste programme de développement préclinique impliquant de nombreux modèles animaux de l'ostéoporose humaine. Cette partie résumera les résultats principaux des études précliniques qui ont mené au développement de l'IBN comme traitement de l'ostéoporose ménopausique.

8.2.1. Résultats pré-cliniques

8.2.1.1. Effets sur la masse et la résistance osseuse

Une étude menée durant 2 ans sur des rats intacts jeunes a montré que de très fortes doses d'IBN oral (3, 7 ou 15 mg/kg/jour) étaient associées à une augmentation dose dépendante de la BMD ($p < 0.0001$) et de la résistance osseuse vertébrale ($p < 0,05$ pour la charge maximale à rupture et la raideur) par rapport à un groupe ayant reçu uniquement le véhicule. Cette étude a aussi mis en évidence une croissance normale des animaux, bien que les doses utilisées soient largement supérieures aux doses thérapeutiques (Lalla *et al.* 1998).

Par la suite, l'augmentation conjointe de la BMD et de la résistance mécanique sous IBN a été confirmée dans un modèle de rate ovariectomisée (OVX). Le traitement était administré par injection s.c. soit de manière quotidienne soit tous les 25 jours avec une dose cumulée identique dans les deux cas. Même la plus faible dose (0,2 µg/kg/jour) d'IBN prévenait, après 1 an de traitement, la diminution de BMD mesurée sur le fémur dans le groupe OVX. La dose la plus élevée (25 µg/kg/jour) maintenait les BMD vertébrale et fémorale aux niveaux de celles des animaux SHAM. De plus, toutes les doses testées maintenaient la résistance osseuse au niveau de celle des animaux SHAM. Associé à l'absence de différence significative entre les régimes quotidiens et intermittents, cette étude montrait donc que la dose cumulée était plus importante que son schéma d'administration (Bauss *et al.* 2002).

L'efficacité de l'IBN administré en continu ou de manière intermittente a ensuite été démontrée dans d'autres modèles animaux de l'ostéoporose ménopausique ou secondaire comme la chienne ovario-hystérectomisée (OHX) (Monier-Faugere *et al.* 1993; Monier-Faugere *et al.* 1999) ou le mini porc traité par des glucocorticoïdes (Gluer *et al.* 2007). Le développement

préclinique a abouti à une étude menée chez la guenon (*Macaca fascicularis*) OVX. Ainsi, l'IBN administré par injection i.v. tous les 30 jours durant 16 mois prévenait la diminution de la BMD induite par l'ovariectomie et améliorait la résistance osseuse respectivement pour des doses ≥ 30 et $150 \mu\text{g}/\text{kg}$. Le schéma d'administration de cette étude correspondait chez l'homme à une dose trimestrielle durant quatre ans (Smith *et al.* 2003; Muller *et al.* 2004).

8.2.1.2. Effets sur la microarchitecture

L'étude menée chez la rate OVX mentionnée dans le paragraphe précédent a aussi mis en évidence qu'un an après l'ovariectomie, le volume trabéculaire osseux, le nombre de travées étaient significativement diminués et la séparation entre les travées augmentée ($p < 0,0001$ comparativement aux animaux SHAM). L'IBN même à la dose minimale de $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ prévenait cette perte osseuse et améliorait significativement le nombre de travées et leur séparation ($p < 0,0001$ comparativement aux animaux SHAM). De plus, les mêmes bénéfices ont été rapportés avec les régimes intermittents de doses cumulées équivalentes (Bauss *et al.* 2002).

La prévention par l'IBN (continu et intermittent), de la perte osseuse induite par la carence oestrogénique a aussi été montrée chez la chienne OHX (Monier-Faugere *et al.* 1993). De même, chez la guenon, l'injection i.v. mensuelle de $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ d'IBN durant 16 mois a montré une amélioration significative des variables histomorphométriques comme la densité, le nombre, l'épaisseur et la séparation des travées mesurées en 3D par μCT par rapport aux animaux OVX. Les valeurs mesurées après traitement par l'IBN étaient, pour ces variables, proches de celles observées chez les animaux SHAM. Cette étude a aussi mis en évidence une prévention de la perte osseuse induite par l'ovariectomie et détectable dès $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ d'IBN (Muller *et al.* 2004). Ces résultats confirmaient ceux qui avaient été préalablement obtenus par histomorphométrie 2D dans la même étude (Smith *et al.* 2003).

8.2.1.3. Effets sur les déterminants intrinsèques de la qualité osseuse

Le concept actuel de qualité osseuse étant récent, peu de résultats ont été publiés sur les effets de l'IBN sur les propriétés intrinsèques du tissu osseux. Cependant, toutes les études mentionnées précédemment qui incluaient une analyse histologique ont montrée que même à des doses très supérieures à celles utilisées en clinique [jusqu'à 5000 fois la dose optimale chez le rat (Bauss et Russell 2004)], l'IBN n'était associé ni à une accumulation d'ostéoïde ni à des défauts de la minéralisation. Ceci a été montré chez le rat intact (Muhlbauer *et al.* 1991; Bauss et Russell 2004), le chien intact (Affentranger *et al.* 1995), la chienne OHX (Monier-Faugere *et al.* 1993) et la guenon OVX (Smith *et al.* 2003).

Chez la chienne OVX, la microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier a été utilisée pour étudier les effets de l'IBN sur les caractéristiques du minéral osseux. Ce travail montrait qu'une injection s.c. quotidienne d'IBN (4 ou $14 \mu\text{g}/\text{jour}$) ou intermittente ($65 \mu\text{g}/\text{jour}$)

durant 2 semaines puis 11 semaines sans) pendant un an augmentait significativement le rapport minéral sur matrice organique et la cristallinité corticale et trabéculaire par rapport aux chiennes OVX (Monier-Faugere *et al.* 1999). Plus récemment, et hors du contexte de développement préclinique, il a été montré chez la rate OVX qu'une injection s.c. mensuelle de 30 ou 90 µg/kg durant 4 mois augmentait significativement le module élastique du tissu osseux bien que son degré de minéralisation n'était pas modifié (Shahnazari *et al.* 2009).

L'ensemble de ces études a montré que l'IBN était un BP efficace à de très faibles doses dans la prévention des modifications osseuses induites par la carence en œstrogène ou des causes secondaires. Ces différents travaux ont aussi mis en évidence que l'efficacité de l'IBN était telle, que le délai entre deux doses successives pouvait être augmenté et que la dose cumulée était un facteur plus déterminant que le schéma d'administration. L'IBN a donc été développé en clinique comme un BP ayant le potentiel pour être administré de manière intermittente afin d'améliorer la compliance des patientes par rapport à un régime quotidien plus contraignant.

8.2.2. Résultats cliniques : vers un régime intermittent

8.2.2.1. Etudes de phases II

Suite aux études précliniques, trois études majeures de phase II ont été initiées, deux concernaient l'IBN oral et une l'IBN administré par injection i.v. (Schimmer et Bauss 2003). Chronologiquement, la première, menée chez 180 femmes ménopausées et ostéoporotiques a montré parmi les doses étudiées (0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2,5 mg et 5 mg par jour) une efficacité optimale pour le régime 2,5 mg/jour. Après 1 an de traitement, ce régime augmentait significativement la BMD lombaire par rapport à la mesure à l'inclusion ($p < 0,001$) mais aussi par rapport au placebo ($p < 0,001$). De même, ce régime diminuait significativement les taux des marqueurs biochimiques de la résorption et de la formation osseuses (Ravn *et al.* 1996). Par la suite, le régime 2,5 mg/jour a été utilisé comme traitement de référence pour comparer l'efficacité d'un régime intermittent (20 mg d'IBN tous les deux jours pour 12 doses successives et ce tous les trois mois) dans une étude enrôlant 240 femmes ostéoporotiques. Cette dernière étude basée sur les mêmes critères de jugement que la précédente, montrait qu'après 2 ans de traitement, le régime intermittent apportait les mêmes résultats que le régime quotidien (Riis *et al.* 2001).

La troisième étude de phase II, était une étude de recherche de dose pour l'utilisation de l'IBN en injection i.v. trimestrielle, menée sur une population de 125 femmes ostéoporotiques. Les résultats ont montré une augmentation dose dépendante de la BMD lombaire (significative dès la dose de 0.5 mg) par rapport au groupe placebo. Seule la dose de 2 mg montrait une diminution significative par rapport aux mesures faites à l'inclusion des marqueurs biochimiques de la résorption et de la formation osseuses (Thiebaud *et al.* 1997).

8.2.2.2. Etudes de phases III

- Etude BONE

L'étude BONE (iBAndronate Osteoporosis vertebral fracture trial in North America and Europe) est une grande étude multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée par un placebo. Cette étude a été conduite pour étudier l'efficacité, la tolérance de l'IBN oral et l'intérêt d'un régime intermittent avec un intervalle >2 mois entre deux doses successives. Cette étude a porté sur 2946 femmes âgées de 55 à 80 ans, ménopausées depuis au moins 5 ans, ayant eu de 1 à 4 fractures vertébrales (T₄-L₄) et un T-score compris entre -2 et -5 pour au moins une vertèbre (L₁-L₄). Les analyses ont été réalisées sur la population ITT (Intention To Treat), *i.e.*, l'ensemble des patientes ayant pris au moins une dose du traitement et s'étant rendue à au moins une visite de suivi (n = 2929). Les patientes ont ensuite été réparties dans l'un des 3 bras de l'étude : le bras placebo, le bras 2.5 mg/jour d'IBN oral et le régime 20 mg intermittent (20 mg d'IBN tous les deux jours pour 12 doses successives et ce tous les trois mois). L'ensemble des participantes a reçu quotidiennement un supplément de calcium (500 mg) et de vitamine D (400 UI) (Chesnut *et al.* 2004).

Cette étude a démontré la bonne tolérance de l'IBN oral avec une incidence des effets secondaires identiques dans les trois bras de l'étude. En ce qui concerne l'efficacité, l'étude a montré au niveau vertébral, une diminution significative du risque relatif de fracture après 3 ans de traitement de 62% (p<0,0001) pour le régime continu et 50% (p=0,0006) pour le régime intermittent. Cette réduction du risque fracturaire n'était pas significativement différente entre les deux régimes de traitement. En outre, l'étude BONE n'a pas permis de mettre en évidence un effet sur l'incidence des fractures ostéoporotiques non vertébrales. Ceci a été expliqué par le fait que la population de l'étude présentait une BMD relativement élevée au niveau du col fémoral (T-score : -1,73) et de la hanche totale (T-score : -2,03) par rapport aux autres études de phase III menées chez des femmes ostéoporotiques (Harris *et al.* 1999; Black *et al.* 2000). Or, le risque de fracture périphérique montre une interaction significative avec la BMD mesurée à la hanche à l'inclusion des patientes. Une analyse *post hoc* effectuée sur un sous échantillonnage de patientes présentant une BMD basse au niveau de la hanche au moment de l'inclusion montre une diminution du risque relatif de fracture non vertébrale après trois ans de traitement (69%, p=0,013 et 37%, p=0,22, respectivement pour les régimes continu et intermittent) (Chesnut *et al.* 2004).

L'étude BONE a aussi montré un effet positif de l'IBN oral continu et intermittent sur la BMD. En effet, la BMD mesurée dans la colonne vertébrale lombaire et la hanche (hanche totale, col fémoral et trochanter) était significativement plus élevée (p<0,0001) dans les groupes traités avec l'IBN par rapport au groupe placebo et ce, après 6, 12, 24 et 36 mois. Comparativement à la mesure faite à l'inclusion, la BMD lombaire était augmentée de 1,3%, 6,5% et 5.7% après 3 ans de placebo et d'IBN continu et intermittent, respectivement (Chesnut *et al.* 2004).

La capacité de l'IBN à ralentir l'activité du remodelage osseux a aussi été évaluée lors de l'étude BONE par le dosage des marqueurs biochimiques de la résorption et de la formation osseuses (Delmas *et al.* 2004). Les marqueurs de la résorption osseuse, CTX/créatinine et NTX/créatinine urinaires, étaient significativement abaissés dès 3 mois d'IBN par rapport au groupe placebo. Cet effet était maintenu après 3 ans de traitement. Les réductions des marqueurs de la résorption mesurés dans le groupe intermittent étaient moins importantes que dans le groupe traité en continu. Ce dernier point peut être expliqué par le fait que dans le groupe intermittent, les dosages ont été réalisés à la fin de la période sans traitement, ce qui correspond donc à des taux de suppression résiduels. Les marqueurs de la formation osseuse (ostéocalcine sérique), eux aussi étaient significativement diminués dès 3 mois dans les groupes traités par l'IBN par rapport au groupe placebo, et ce, jusqu'à 3 ans de traitement. Contrairement aux observations faites pour les marqueurs de la résorption, le taux d'ostéocalcine sérique n'était pas différent entre les deux régimes d'IBN (Delmas *et al.* 2004).

En résumé, les résultats de l'étude BONE ont clairement démontré l'intérêt de l'IBN dans le développement d'un traitement intermittent de l'ostéoporose et ont conduit à son autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2003 pour le régime quotidien. De plus, cette étude a été la première à montrer, dans une étude prospective, l'efficacité anti fracturaire d'un BP administré avec un intervalle >2 mois entre deux doses successives. La limite de cette étude était la complexité du régime intermittent qui n'apportait pas d'avantage, et de confort, par rapport aux régimes existants (Reginster *et al.* 2006b).

- Etude MOPS

Suite à l'étude BONE, l'étude MOPS (**M**onthly **O**ral **P**ilot **S**tudy) a été conduite pour étudier la tolérance, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique d'un régime mensuel d'IBN oral. Cette étude randomisée, en double aveugle de recherche de dose a porté 144 femmes (55-80 ans, ménopausées depuis plus de 3 ans) ayant une BMD lombaire basse (T-score moyen -1,1) durant 3 mois. Les patientes ont été réparties dans l'un des quatre groupes testés, à savoir : 50 mg, 100 mg ou 150 mg mensuels d'IBN oral, ou placebo. Suite au premier cycle de traitement, les patientes ayant reçu 50 mg d'IBN ont été séparées en deux groupes, l'un a continué à recevoir 50 mg, l'autre 100 mg pour les deux cycles suivants (Reginster *et al.* 2003). Dans cette étude de courte durée, les patientes n'ont pas reçu de supplément en calcium et en vitamine D, pour s'assurer que les effets mesurés étaient uniquement liés au traitement.

Après trois mois de traitement l'incidence des effets secondaires était identique dans le groupe ayant reçu le placebo et les groupes ayant reçu le composé actif. Cette étude a mis évidence que trois mois de traitement diminuaient le taux de CTX sérique comparativement au dosage effectué à l'inclusion pour les groupes traités avec 100 mg et 150 mg (-40,7% et -56,7%, respectivement). Cette étude a confirmé la faisabilité du développement d'un régime mensuel pour l'IBN oral (Geischke *et al.* 2003; Reginster *et al.* 2003).

- Etude MOBILE

Les précédents résultats ont conduit à la mise en place de l'étude MOBILE (**Monthly Oral iB**andronate **In LadiEs**). MOBILE était une étude de phase III, randomisée, en double aveugle conduite sur 2 ans, de type « étude de non-infériorité ». Cette étude, menée sur 1609 femmes ostéoporotiques, avec les mêmes critères d'inclusion que pour l'étude BONE, avait pour but de tester l'efficacité et la tolérance de différents régimes mensuels (deux doses quotidiennes successives de 50 mg ou 100 mg et 150 mg) d'IBN oral par rapport au régime 2,5 mg par jour. Toutes les participantes recevaient quotidiennement un supplément en calcium (500 mg) et en vitamine D (400 IU). L'analyse des variables d'efficacité a été effectuée sur la population PP (Per Protocol), c'est-à-dire que les patients sont exclus de l'analyse lorsque le protocole initial n'est pas totalement respecté, contrairement à la population ITT (Miller *et al.* 2005).

Les résultats après 1 an de traitement montraient des augmentations de la BMD lombaire de 4,3%, 4,1% et 4,9% respectivement pour les régimes de 50 mg/50 mg, 100 mg et 150 mg par mois et de 3,9% dans le régime 2,5 mg par jour. Des résultats similaires étaient observés pour la BMD mesurée au niveau de la hanche (totale, trochanter et col fémoral). Tous les régimes mensuels étaient non inférieurs au régime quotidien et le régime 150 mg/mois était significativement supérieur ($p=0,002$). Après 3 mois de traitement, le taux de CTX sérique était diminué de la même manière dans tous les régimes. Après 1 an de traitement, comparativement aux dosages réalisés au moment de l'inclusion, le taux de CTX sérique était diminué de 62,8%, 66,7% et 75,8% pour les régimes 50 mg/50 mg, 100 mg et 150 mg mensuels. Cette réduction était de 67,3% pour le régime 2,5 mg / jour (Miller *et al.* 2005).

L'ensemble de ces résultats a été confirmé après 2 ans de traitement avec une amélioration de la BMD mesurée au niveau de la colonne lombaire (5,3%, 5,3% et 6,4% pour les régimes 50 mg/50 mg, 100 mg et 150 mg contre 4,8% pour le régime quotidien) et de la hanche comparativement aux mesures faites à l'inclusion. Les résultats à 2 ans ont confirmé la supériorité du régime 150 mg mensuel par rapport au régime quotidien. Après 2 ans de traitement, le taux de CTX sérique était maintenu à un taux bas comparable à celui mesuré après 1 an (Reginster *et al.* 2006a).

Après 2 ans de traitement comme après 1 an, l'incidence des effets secondaires était identique dans tous les bras de l'étude. L'étude MOBILE a donc permis de montrer la bonne tolérance et la supériorité statistique du traitement mensuel avec 150 mg d'IBN par rapport au régime quotidien après 1 et 2 ans (Miller *et al.* 2005; Reginster *et al.* 2006b). Cette étude a conduit à l'approbation par la FDA de l'utilisation de l'IBN oral 150 mg mensuel dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique en 2005.

- Etude MOTION

L'efficacité et la tolérance de l'ibandronate mensuel ont été ensuite comparées à celles de l'ALN 70 mg oral par semaine (un des deux seuls BP utilisés de manière intermittente dans le traitement de l'ostéoporose, à ce moment là) dans l'étude MOTION (**M**onthly **O**ral **T**herapy with **I**bandronate for **O**steoporosis **I**Ntervention). Cette étude de non-infériorité, randomisée, en double aveugle, double insu et groupes parallèles a porté 1760 femmes avec des critères d'inclusion proches de ceux de l'étude BONE (Miller *et al.* 2008). Les patientes ont été réparties dans les deux bras de l'étude : 70 mg d'ALN oral hebdomadaire et 150 mg d'IBN oral mensuel.

Après 1 an de traitement, il a été relaté la non infériorité de l'IBN concernant le gain de BMD au niveau de la colonne lombaire (5,1% et 5,8% pour l'IBN et l'ALN, respectivement) et de la hanche totale (2,9% et 3% pour l'IBN et l'ALN, respectivement) par rapport aux mesures réalisées à l'inclusion dans le protocole. De plus, l'incidence de nouvelles fractures n'était pas significativement différente entre les deux bras de l'étude (2,1% et 2% respectivement pour l'IBN et l'ALN) (Miller *et al.* 2008). Des résultats plus récents ont montré aussi une réduction des taux sériques des marqueurs de la résorption et de la formation osseuses. Sept jours après la première dose de traitement, la réduction du taux de sCTX était de -84,7% pour l'IBN et de -48,3% pour l'ALN. Ces réductions étaient maintenues sur toute la durée de l'étude. En effet, après 1 an de traitement, la réduction du taux de sCTX était de -75,5% avec l'IBN et -81,2% avec l'ALN. Le taux de P1NP sérique était lui aussi diminué après 1 an de traitement de -68,2% avec l'IBN et -67,7% avec l'ALN (Emkey *et al.* 2009).

L'étude MOTION a donc montré la non-infériorité de l'IBN mensuel par rapport à l'ALN hebdomadaire pour l'activité inhibitrice du remodelage osseux, le gain de BMD et la tolérance du traitement.

- Etudes BALTO I et II

Afin de montrer la préférence des patientes pour le traitement avec l'IBN oral mensuel par rapport à l'ALN oral hebdomadaire, les études BALTO I puis II (**B**onviva **A**lendronate **T**rial in **O**steoporosis) ont été mises en place. Dans ce type d'étude, dite « croisée », les patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique ont reçu trois mois d'ALN hebdomadaire ou trois mois d'IBN mensuel suivi de trois mois de l'autre médication. A la fin de ces six mois les patientes répondaient à un questionnaire de préférence. L'étude BALTO I a porté 342 patientes américaines et a montré que parmi les patientes ayant une préférence, 71,4% préféraient l'IBN (Emkey *et al.* 2005). L'étude BALTO II avait une structure identique à BALTO I mais le recrutement des 350 patientes était international (Etats-unis, France et Allemagne). Elle a mis en évidence que parmi les 93,1% de patientes préférant l'un des deux traitements, 71,4% préféraient l'IBN contre 28,6% pour l'ALN ($p < 0,0001$) (Hadji *et al.* 2008).

- Etudes IRIS et DIVA

Suite à l'étude de phase II mentionnée précédemment (Thiebaud *et al.* 1997), un essai a été conduit sur 2862 femmes ostéoporotiques pour tester après trois ans l'efficacité anti fracturaire de l'IBN i.v. 0,5 mg et 1 mg trimestriel contre un placebo. Cette étude a montré que ces deux doses apportaient un gain de BMD lombaire significatif ($p < 0,0001$) par rapport au placebo. Malgré le gain de BMD, l'incidence de nouvelles fractures vertébrales était diminuée mais de manière non significative. Face à cette efficacité sub optimale, l'étude IRIS (Intermittent Regimen intravenous Ibandronate Study) conduite sur 520 femmes ostéoporotiques a montré la supériorité en terme de gain de BMD lombaire de l'IBN 2 mg i.v. par rapport à la dose de 1 mg après 1 an de traitement (Adami *et al.* 2004).

L'étude de phase III DIVA (Dosing IntraVenous Administration) a porté sur 1395 patientes pour tester la non infériorité des régimes i.v. 2 mg tous les deux mois et 3 mg tous les trois mois par rapport au régime oral 2,5 mg/jour qui a une efficacité anti fracturaire clairement établie au niveau vertébral. Une analyse sur la population Per Protocol (PP) a montré à 1 an une supériorité des régimes i.v. par rapport au régime oral pour les critères de jugement principaux (augmentation de la BMD lombaire et fémorale, réduction du taux de CTX sérique) (Delmas *et al.* 2006). Ces résultats ont été confirmés après 2 ans de traitement validant ainsi une alternative aux traitements oraux (Eisman *et al.* 2008). De plus, une méta-analyse a montré que la dose commercialisée de 3 mg tous les trois mois apportait la plus grande augmentation de BMD et la plus importante réduction du taux de fracture vertébrale parmi tous les essais menés pour l'IBN i.v. (Sebba *et al.* 2009). Finalement, une analyse post hoc récemment publiée, a mis en évidence que les régimes i.v. représentant une dose annuelle cumulée de 12 mg diminuaient significativement le risque de fracture non vertébrale par rapport au régime 2,5 mg/jour (correspondant à une dose annuelle cumulée de 5,5 mg) (Sambrook *et al.* 2010).

8.2.3. Ibandronate et qualité du tissu osseux chez la femme ostéoporotique

Au cours du développement de l'IBN oral, seul l'étude BONE incluait la réalisation de biopsies osseuses iliaques pour l'étude de ses effets sur la microarchitecture et la qualité osseuse intrinsèque. En effet, à partir de la population ITT de l'étude BONE, 110 patientes traitées durant 2 (n=14, n=16 et n=15 pour les bras placebo, 2.5 mg/jour et 20 mg intermittent, respectivement) ou 3 ans (n=19, n=20 et n=16 pour les bras placebo, 2.5 mg/jour et 20 mg intermittent, respectivement) ont été aléatoirement sélectionnées pour recevoir un double marquage par les tétracyclines et subir une biopsie osseuse (Recker *et al.* 2004b). Sur cet échantillonnage, deux études ont été à ce jour publiées, l'une portant sur l'analyse histomorphométrique et histodynamique 2D (Recker *et al.* 2004b) et l'autre sur la microarchitecture 3D évaluée par μ CT (Recker *et al.* 2009). L'étude histologique qualitative montrait pour les deux durées de traitement, et ce, indépendamment du régime administré, que le tissu osseux formé au cours du traitement présentait une qualité préservée. En effet, les biopsies provenant des patientes traitées ne présentaient pas de signes de toxicité cellulaire, de fibrose médullaire, de présence d'os tissé, ou d'accumulation de tissu ostéoïde. Les variables reflétant la dynamique de la minéralisation étaient

ralenties, en accord avec l'effet des BPs [diminution de la vitesse de minéralisation ajustée (Aj.AR en $\mu\text{m}/\text{jour}$), des surfaces en cours de minéralisation (MS en %) et des surfaces ostéoïdes (O.Th en μm) en association avec une augmentation du délai de minéralisation (MLT en jour)]. La fréquence d'activation du remodelage osseux était diminuée de 50 à 80% en fonction de la durée et du régime de traitement *versus* placebo. De plus, l'étude rapportait une tendance à l'amélioration de la microarchitecture avec une augmentation significative du nombre de travées et une diminution significative de la séparation trabéculaire pour le régime intermittent. Aucune des variables étudiées au cours de cette étude n'étaient significativement différentes entre le régime quotidien ou intermittent (Recker *et al.* 2004b). L'analyse des biopsies par μCT a mis en évidence une augmentation significative de la densité de connectivité trabéculaire et une diminution du SMI, traduisant un rapport plaque/poutre amélioré (Recker *et al.* 2009). L'ensemble de ces résultats attestait du maintien de la qualité osseuse et d'une amélioration de la microarchitecture trabéculaire sous IBN oral, même avec un régime intermittent présentant un délai supérieur à deux mois entre deux prises successives.

Récemment, une étude novatrice incluant une mesure de la BMD par tomographie et une évaluation non invasive de la résistance osseuse par analyse en éléments finis (FEA pour **F**inite **E**lement **A**nalysis) a montré, contre placebo, les effets positifs de l'IBN oral 150 mg/mois. Cette étude a suivi pendant 1 an 93 femmes ménopausées et ostéoporotiques traitées par un placebo ou de l'IBN oral. Il a été rapporté une augmentation significative de la BMD à la hanche et à la colonne lombaire par rapport au placebo, mais aussi une augmentation de la résistance osseuse mesurée par FEA à ces mêmes sites. Ce travail a aussi inclus une analyse de la structure de la hanche (HSA pour **H**ip **S**tructure **A**nalysis) à partir de données obtenues par DXA. L'utilisation de la HSA a montré que les femmes traitées par IBN oral présentaient au niveau du col fémoral une surface apparente, un diamètre externe et un moment d'inertie transversal augmentés, signes d'une résistance mécanique accrue (Lewiecki *et al.* 2009). Sur cette même population de patientes, une autre étude basée sur des mesures de BMD lombaire et à la hanche couplées à une nouvelle définition des volumes d'intérêts (VOIs pour **V**olume **O**f **I**nterest) a permis d'affiner les résultats précédemment décrits. En effet, les auteurs ont seuillé leurs images en trois volumes principaux : volume cortical, sous cortical et trabéculaire au niveau de la hanche. Pour les vertèbres, ces trois volumes étaient rapportés pour trois régions différentes du corps vertébral : supérieure, intermédiaire et inférieure. Pour la colonne lombaire, les patientes traitées par l'IBN présentaient une BMD significativement plus élevée au niveau de l'os cortical de la région intermédiaire, ainsi qu'au niveau de l'os trabéculaire de la région supérieure, *versus* placebo. Pour la hanche totale, la BMD de tous les VOIs était significativement plus élevée chez les patientes traitées par l'IBN *versus* placebo. Ces résultats étaient confirmés pour tous les VOIs mesurés au trochanter et pour l'os trabéculaire mesuré au niveau du col fémoral (Engelke *et al.* 2010).

Concernant l'IBN par voie i.v., une étude histologique portant sur 89 biopsies iliaques issues de patientes de l'étude DIVA (n=32 pour le bras 2,5 mg/jour oral, n=27 pour le bras 2 mg tous les deux mois i.v. et n=30 pour le bras 3 mg tous les trois mois i.v.) construite de la même manière que celle réalisée pour l'étude BONE a confirmé l'intérêt d'un régime i.v. intermittent par rapport au régime oral quotidien. L'histologie osseuse ne montrait pas d'altérations de la

minéralisation dans les différents groupes. Les paramètres microarchitecturaux 2D n'étaient pas significativement changés entre les différents régimes et restaient dans l'intervalle mesuré chez des femmes ménopausées saines. La fréquence d'activation du remodelage osseux était significativement plus basse dans les régimes i.v. *versus* le régime oral (Recker *et al.* 2010). Ces résultats montraient à l'échelle tissulaire que les régimes i.v., avec un délai entre les doses successives de 2 ou 3 mois, étaient des alternatives concrètes au régime oral.

9. Dégradations de la qualité osseuse associées avec l'utilisation prolongée des BPs

L'utilisation des BPs en oncologie et dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique a fortement augmenté au cours de la dernière décennie, les BPs sont cependant généralement bien tolérés avec des effets secondaires rares. Les plus fréquents sont des douleurs de l'estomac ou des syndromes pseudo-grippaux (Abrahamsen 2010). Au niveau osseux, les BPs, de part leur mécanisme peuvent ralentir le processus de réparation des fractures. Dans le cas de fractures traumatiques, les BPs ne ralentissent pas la formation du cal de fracture prolifératif, mais ralentissent légèrement le remodelage de cette structure cartilagineuse en tissu osseux lamellaire mature (Shane *et al.* 2010). L'utilisation de BPs pourrait aussi ralentir la réparation des fractures de fatigue au niveau intracortical. Ainsi, une étude a montré que l'utilisation prophylactique du risédronate, chez des sujets subissant un entraînement physique intense, ne réduisait pas le risque de développer une fracture de fatigue (Milgrom *et al.* 2004). Deux autres types d'altérations de la qualité osseuse ont été rapportés avec des incidences très faibles : l'ostéonécrose de la mâchoire et la fracture atypique sous trochantérienne.

9.1. Ostéonécrose de la mâchoire

L'ostéonécrose de la mâchoire associée à l'utilisation de BPs ou ONJ (pour OsteoNecrosis of the Jaw) a été définie en 2007 par un groupe de travail de l'ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research). Cette définition considérait comme ONJ une « zone d'os exposée au niveau de la région maxillofaciale ne cicatrisant pas dans les 8 semaines suivant sa détection par un professionnel de la santé, chez un patient qui recevait ou qui avait reçu un BP et qui n'avait pas reçu de radiothérapie craniofaciale » (Khosla *et al.* 2007). Cette complication a une incidence faible d' 1 cas pour 10 000 – 100 000 patients par an (Khosla *et al.* 2007). La vaste majorité des cas est associée à l'utilisation de BP en i.v. dans le traitement oncologique (doses plus élevées et plus fréquentes que dans le traitement de l'ostéoporose). De plus, l'ONJ apparaît principalement dans le contexte d'un traitement dentaire invasif. La physiopathologie de l'ONJ est peu connue et de nombreuses hypothèses ont été avancées.

L'hypothèse la plus probable associe l'ONJ à une forte dépression du remodelage osseux qui conduirait à une accumulation de microdommages, d'apoptose ostéocytaire conduisant à une nécrose du tissu osseux (Burr et Allen 2009; Hoefert *et al.* 2010). Il est important de garder à

l'esprit que l'os de la mâchoire est soumis, de part sa fonction, à de très fortes sollicitations mécaniques (fonction de mastication) qui en font un site osseux avec une forte activité de remodelage osseux et donc un site où une quantité importante de BP pourrait s'accumuler. Cependant, l'ONJ pourrait aussi être associée à d'autres facteurs directs ou indirects comme l'effet anti angiogénique des BPs (Abrahamsen 2010). En outre, une étude a révélé à la surface d'os exposé dans des cas d'ONJ, la présence d'un film bactérien composé de bactéries capables de résorber la matrice osseuse, et qui pourraient donc avoir un rôle dans la physiopathologie de l'ONJ (Sedghizadeh *et al.* 2008).

9.2. Fractures atypiques sous trochantériennes

Contrairement à l'ONJ, cette complication semble davantage associée à la durée du traitement qu'à la dose ou au mode d'administration. Cette complication est rapportée depuis peu de temps et l'association causale avec l'utilisation des BPs n'est pas clairement établie et la physiopathologie est loin d'être comprise. Le nombre de cas rapportés augmentant, un groupe de travail a été organisé lors du congrès de l'ASBMR en 2010 (Shane *et al.* 2010). Il n'y a pas à ce jour de définition consensuelle pour la fracture atypique sous trochantérienne mais quelques similitudes récurrentes entre les cas rapportés. Ainsi il s'agit généralement d'une fracture se développant sous la région du trochanter, spontanément ou faisant suite à traumatisme mineur (chute de sa hauteur), la fracture est souvent complète à travers le diamètre du fémur et forme une « épine » (Fig. 48). Le trait de fracture est souvent transversal mais peut avoir une configuration plus oblique. La plupart des cas montrent un épaississement de la corticale latérale, voire latérale et médiale qui est habituellement observé dans des fractures de fatigue. Cet épaississement peut former un « bec ». La réparation de telles fractures peut être retardée. Ces cas sont souvent associés à des douleurs prodromales quelques jours à quelques semaines avant l'apparition de la fracture. Finalement, il est important de noter que la majorité des cas de fractures atypiques apparaissent chez des patients cumulant d'autres facteurs de morbidité, comme un traitement avec un autre antirésorptif ou un traitement prolongé par les glucocorticoïdes (voir pour revue (Shane *et al.* 2010)).

Comme nous l'avons vu précédemment, les BPs ont de multiples effets sur le tissu osseux qui pourraient être à l'origine d'une fragilité osseuse. Parmi eux, une diminution drastique du taux de remodelage, l'accumulation d'AGEs, l'accumulation de microdommages, une augmentation de la minéralisation ainsi qu'une homogénéisation des propriétés des composantes minérales et organiques, et pour finir une diminution de l'angiogenèse. L'étude histologique de biopsies osseuses de patients ayant subi une fracture atypique ne montre pas de similitudes absolues, soulignant une fois de plus, la difficulté à comprendre ce phénomène (Tableau 3). La plupart de ces études montrent une diminution ou une absence de l'activité du remodelage osseux qui pourrait être sous-estimée dans le cas de biopsies réalisées au site de fracture (Odvin *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2007; Armamento-Villareal *et al.* 2009; Lee 2009; Giusti *et al.* 2010; Odvin *et al.* 2010). Certains auteurs ont regroupé ces observations sous le nom de syndrome SSBT (pour Severely Suppressed Bone Turnover). Dans ce contexte, il a été émis l'hypothèse que le

syndrome SSBT pourrait être lié à une sensibilité particulière des ostéoclastes aux BPs azotés chez des patients hétérozygotes pour une mutation influençant le fonctionnement des canaux à chlore ou des pompes à proton ATP dépendantes (Visekruna *et al.* 2008).

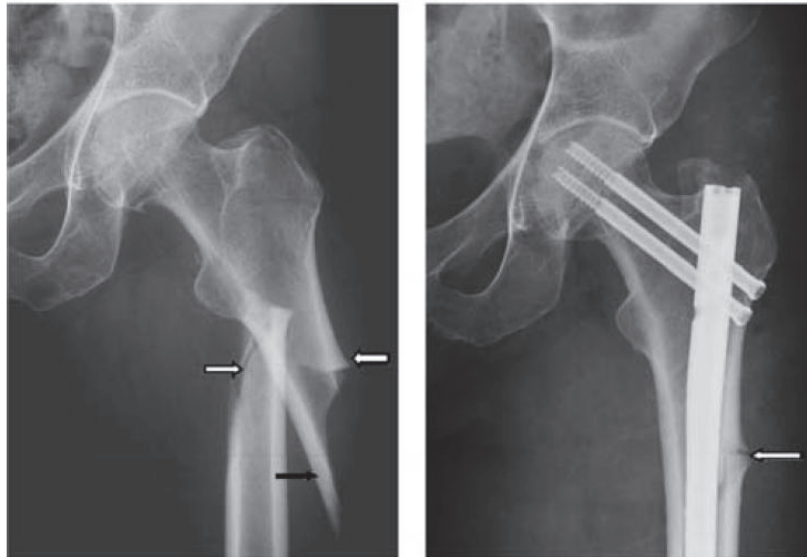


Figure 48: Radiographies montrant une fracture sous trochantérienne avant (à gauche) et après (à droite) réduction. A partir de la radiographie de gauche, il est possible d'observer l'aspect oblique du trait de fracture (flèches blanches) ainsi que l'épine formée sur la corticale médiale (flèche noire). La corticale latérale montre un épaississement typique formant un bec (flèche blanche), adapté de (Shane *et al.* 2010).

Cependant quelques observations montrent une augmentation du nombre d'ostéoclastes associée à des paramètres de formations osseuses maintenus à un bas niveau. Il pourrait donc y avoir plusieurs mécanismes possibles conduisant à une fracture atypique (Visekruna *et al.* 2008; Somford *et al.* 2009). Une de ces études a couplé à l'histologie une analyse plus fine des propriétés intrinsèques de la matrice osseuse chez une patiente de 76 ans traitée 8 ans par de l'ALN et ayant reçu des glucocorticoïdes durant 11 ans. Cette patiente a été admise pour une fracture sous trochantérienne du fémur gauche et neuf mois plus tard a développé le même type de fracture au fémur droit. Suite à cette deuxième fracture, la patiente a été biopsiée en site iliaque et 1 cm au-dessus du site de fracture. L'analyse histomorphométrique au site iliaque révélait une microarchitecture normale pour l'âge de la patiente, une diminution des surfaces ostéoïdes et une augmentation de la résorption. Les surfaces résorbées étaient trois fois plus élevées par rapport à une population contrôle et 6 à 13 fois par rapport à des patientes traitées par des glucocorticoïdes. Le nombre d'ostéoclastes était 4 fois plus élevé que chez des patientes traitées par l'ALN et ces cellules semblaient particulièrement grosses et actives (Somford *et al.* 2009). Ces résultats étaient confirmés sur la biopsie prélevée à proximité de la fracture. Sur ce dernier prélèvement, il n'y avait pas de signe d'hyperminéralisation, les cristaux d'apatite n'étaient pas modifiés mais plus matures, de manière cohérente avec le mécanisme d'action des BPs (Somford *et al.* 2009).

Référence de l'étude	n	Site biopsié	BP et durée d'exposition	Observations
(Somford <i>et al.</i> 2009)	1	Site de fracture et os iliaque	ALN 8 ans	Résorption augmentée et formation osseuse diminuée / pas de modification du minéral osseux.
(Lee 2009)	1	Site de fracture	ALN 8 ans	Absence d'ostéoclastes et d'ostéoblastes / peu d'ostéocytes
(Donnelly <i>et al.</i> 2010)	14	Site de fracture	Divers 7,4 ans	Microarchitecture normale / surfaces ostéoïdes normales / homogénéisation de propriétés intrinsèques mesurées par FTIRI
(Odvina <i>et al.</i> 2005)	9	Os iliaque	ALN 3-8 ans	Remodelage osseux fortement diminué (pas de double marquages) / délai de réparation des fractures / nombres d'ostéoclastes et d'ostéoblastes diminués
(Cheung <i>et al.</i> 2007)	1	Os iliaque	ALN 10 ans	Réduction de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes / ostéoïde plus fin mais plus étendu
(Visekruna <i>et al.</i> 2008)	2	Os iliaque	Cas 1 ALN 5 ans / Cas 2 ALN 10 ans	Cas 1 : nombre d'ostéoclastes augmenté / pas de double marquages / diminution des surfaces ostéoïdes Cas 2 : nombres d'ostéoclastes et d'ostéoblastes augmentés / diminution de l'Ac.F
(Armamento-Villareal <i>et al.</i> 2009)	7	Os iliaque	6 ALN et 1 RIS 2-10 ans	Remodelage osseux diminué chez 5 patientes sur 7 et normal chez 2 patientes
(Odvina <i>et al.</i> 2010)	6	Os iliaque	5 ALN et 1 RIS 3-11 ans	Diminution du nombre d'ostéoblastes / diminution des surfaces ostéoïdes / diminution du nombre d'ostéoclastes chez 3 patientes sur 6 / absence de double marquages chez 4 patientes sur 6

Tableau 3: Résumé des résultats histomorphométriques publiés sur des cas de fractures atypiques sous trochantérienne chez des patients traités par des BPs (ALN= alendronate / RIS = risédronate).

- Objectifs des travaux de thèse -

- Objectifs des travaux de thèse -

Ces travaux s'inscrivent dans le contexte de l'ostéoporose ménopausique, réel problème de santé publique, dont l'incidence ne cesse de croître. Les bisphosphonates de dernière génération font partie des traitements les plus couramment utilisés pour réduire le risque de fracture chez des patientes, diagnostiquées ostéoporotiques selon des critères densitométriques. Ces traitements étant souvent administrés de manière chronique, il convient donc d'en connaître les effets sur les propriétés de différentes composantes de la matrice osseuse à moyen et long termes. Certains cas de complications liées à une utilisation prolongée de bisphosphonates ayant été rapportés, ces traitements peuvent altérer la qualité de l'os dans certaines conditions. A ce jour, les techniques non invasives ne permettent pas d'accéder à des variables reflétant la qualité des échelles fines de la structure osseuse. Ce travail se propose d'étudier les effets sur les propriétés intrinsèques de l'os de deux bisphosphonates, l'ibandronate et l'alendronate, deux molécules azotées de deuxième génération largement utilisées dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique.

La première partie des travaux concerne l'étude de l'impact d'un traitement de 2 et 3 ans par l'ibandronate oral administré de manière continue ou intermittente sur la minéralisation ainsi que la microdureté à l'échelle du tissu et de l'unité structurale élémentaire. Basée sur l'action antirésorptive de l'ibandronate, notre hypothèse envisage que la prolongation de la durée de la minéralisation secondaire conduirait à une augmentation du degré de minéralisation moyen associé à une diminution de son hétérogénéité. Ceci se traduirait donc par une augmentation de la microdureté osseuse. La deuxième partie du travail expérimental concerne l'analyse des effets d'un traitement prolongé par l'alendronate oral (6,4 ans en moyenne) sur les propriétés minérales et organiques mesurées aux niveaux des nano- et micro-structures de l'os. Les liens entre ces propriétés et le comportement micromécanique ont été identifiés dans une population de patientes ostéoporotiques non traitées, utilisée comme population contrôle pour analyser les effets du traitement chez des patientes ostéoporotiques de même âge. L'hypothèse testée dans cette étude est qu'une augmentation sous traitement de la maturité des phases minérale et organique conduirait à une amélioration des propriétés mécaniques locales.

PARTIE 2
- Travaux personnels -

Partie 2 - Travaux personnels -

Chapitre 5

Etude des effets osseux de l'ibandronate oral continu ou intermittent dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique: résultats de l'étude BONE

1.	Introduction.....	128
2.	Matériel et méthodes.....	129
2.1.	Protocole de l'étude BONE et prélèvements osseux.....	129
2.2.	Préparation des échantillons osseux.....	130
2.2.1.	Préparation des coupes pour la microradiographie.....	130
2.2.2.	Préparation des blocs pour la microindentation.....	131
2.3.	Microradiographie quantitative de contact.....	131
2.4.	Microdureté Vickers.....	135
2.5.	Autres variables d'intérêt.....	135
2.6.	Analyse statistique.....	136
3.	Résultats.....	137
3.1.	Caractéristiques des patientes à l'inclusion dans l'étude BONE.....	137
3.2.	Effets de l'ibandronate sur l'activité du remodelage osseux après deux et trois ans de traitement.....	137
3.3.	Effets de l'ibandronate oral continu ou intermittent sur la minéralisation et la microdureté du tissu osseux (étude globale).....	138
3.3.1.	Résultats après deux ans de traitement.....	138
3.3.2.	Résultats après trois ans de traitement.....	143
3.3.3.	Relations entre le degré de minéralisation, la microdureté et le remodelage osseux.....	147
3.3.4.	Résumé des résultats de l'étude globale.....	147

3.4.	Effets de l'ibandronate oral continu ou intermittent sur la minéralisation et la microdureté des unités structurales élémentaires (étude focale)	148
3.4.1.	Résultats après deux ans de traitement.....	148
3.4.2.	Résultats après trois ans de traitement.....	150
3.4.3.	Résumé des résultats de l'étude focale.....	152
4.	Discussion.....	152
5.	Conclusion.....	155

Chapitre 5

Etude des effets osseux de l'ibandronate oral continu ou intermittent dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique: résultats de l'étude BONE

1. Introduction

Les BP sont les molécules les plus utilisées dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique. L'IBN est un N-BP oral de deuxième génération qui a entraîné au cours de l'étude BONE (iBAndronate Osteoporosis vertebral fracture trial in North America and Europe) une diminution du risque de fracture vertébrale contre placebo après trois ans de traitement. Cette diminution a été constatée avec le régime 2,5 mg/ jour et un régime intermittent présentant un délai entre deux prises successives > à 2 mois (-62% et -50%, $p < 0,0006$, respectivement) (Chesnut *et al.* 2004). Les deux régimes oraux d'IBN étaient aussi associés avec une augmentation des BMD lombaire et de la hanche, et une diminution des marqueurs biochimiques du remodelage osseux (Chesnut *et al.* 2004; Delmas *et al.* 2004). L'analyse histologique réalisée sur 110 biopsies iliaques de patientes de l'étude BONE a mis en évidence après trois ans de traitement une préservation de la structure du tissu osseux, une diminution de 50 à 75% de l'activité du remodelage osseux et une tendance à l'amélioration de la microarchitecture trabéculaire (Recker *et al.* 2004b). Cette amélioration a été récemment confirmée sur ces mêmes biopsies par microtomographie 3D (Recker *et al.* 2009). Comparativement au groupe placebo, le SMI était significativement diminué après traitement, indiquant un ratio plaque/poutre amélioré. L'ensemble de ces travaux n'ont pas mis en évidence de différence entre les deux régimes proposés.

L'amélioration de la résistance mécanique à l'échelle de l'organe après traitement par l'IBN oral est montrée par la diminution significative du risque de fracture ostéoporotique. Cependant, aucune donnée n'existe concernant l'effet de l'IBN sur la qualité osseuse intrinsèque et son rôle potentiel dans la diminution du risque de fracture observé. Le but de mon étude a donc été d'explorer dans les biopsies iliaques provenant des 110 patientes de l'étude BONE, le degré de minéralisation osseuse et sa distribution tissulaire par microradiographie quantitative après deux et trois ans de traitement. Une évaluation des propriétés micromécaniques a aussi été réalisée par microdurimétrie. Ces variables ont été étudiées à l'échelle du tissu osseux (niveau global) mais aussi à l'échelle des BSUs (niveau focal). L'étude au niveau focal permet d'étudier sur une population de BSUs corticaux et trabéculaires la relation directe entre minéralisation et dureté et donc d'observer si cette relation est modulée par le traitement par l'IBN. Le but de cette étude est donc de déterminer l'effet de l'IBN continu ou intermittent sur des variables de la qualité de la matrice osseuse, et ce, pour deux niveaux d'organisation de l'os. L'IBN étant un agent antirésorptif, les hypothèses principales à tester ont été une augmentation et une homogénéisation du degré de minéralisation au niveau du tissu osseux, ainsi qu'une augmentation conjointe de la microdureté globale.

2. Matériel et méthodes

2.1. Protocole de l'étude BONE et prélèvements osseux

Les patientes dont sont issues les biopsies osseuses ont participé à l'étude BONE sur la prévention des fractures par l'IBN. Cette étude internationale de phase III, en double aveugle, contrôlée par un placebo, randomisée a été réalisée sur 2946 femmes. Les critères d'inclusion des patientes dans cette étude ont été précisés précédemment (Chapitre 4, p. 113) et ont été publiés (Chesnut *et al.* 2004). Pour résumer, l'étude BONE a enrôlé 2946 femmes âgées de 55 à 80 ans, ménopausées depuis au moins 5 ans avec 1 à 4 fractures vertébrales prévalentes (T4-L4), un T-score compris entre -2 et -5 au niveau d'au moins une vertèbre lombaire. Ces patientes ont été réparties aléatoirement dans un des trois bras de l'étude pour recevoir *per os*, un placebo (groupe « PLA »), 2,5 mg/jour (groupe « 2,5 mg/j ») d'IBN ou 20 mg intermittent (20 mg tous les deux jours pour 12 doses successives et ce, tous les trois mois, groupe « 20 mg int ») pendant 3 ans. Toutes les patientes ont reçu quotidiennement par voie orale un supplément en calcium (500 mg) et en vitamine D (400 UI). Dans cette population, 110 patientes de 14 centres différents (13 en Amérique du Nord et 1 en Europe) ont été sélectionnées aléatoirement pour subir une biopsie osseuse iliaque après 22 ou 34 mois de traitement. Ces 110 patientes ont signé un consentement différent de celui les incluant dans l'étude BONE. Après 22 ou 34 mois de traitement, elles ont reçu un double marquage par les tétracyclines suivant le schéma 2 jours avec, 12 jours sans, 2 jours avec. Trois à 8 jours après la dernière dose de tétracyclines, les patientes ont subi une chirurgie légère, pour permettre la biopsie osseuse transiliaque à l'aide d'un trocart de diamètre interne de 7,5 mm. Le prélèvement est réalisé au niveau d'un site standard défini à 2 cm en arrière de l'épine iliaque antéro-supérieure et 2 cm en dessous de la crête iliaque. Un prélèvement osseux correspond donc à un cylindre d'environ 1 cm de longueur et de 7,5 mm de diamètre, présentant deux corticales aux extrémités d'un compartiment trabéculaire (Fig. 49).

Les échantillons osseux ont ensuite été fixés dans l'éthanol 70% pendant au moins dix jours, déshydratés 48 h dans l'éthanol absolu. Après une substitution de 48 heures dans le méthylcyclohexane, les prélèvements ont été imprégnés à +4°C dans trois bains de 48 heures dans le méthacrylate de méthyle (MMA) préalablement déstabilisé avec du dibuthylphtalate, les deux derniers bains présentant des concentrations croissantes de benzoylperoxide, le catalyseur de la polymérisation du MMA. La polymérisation du MMA est une réaction exothermique qui se produit après le passage des prélèvements pendant 24 à 48 heures dans une étuve à +32°C. Les prélèvements ainsi inclus dans une résine transparente et dure sont prêts pour la réalisation des coupes de tissu osseux (Fig. 49).

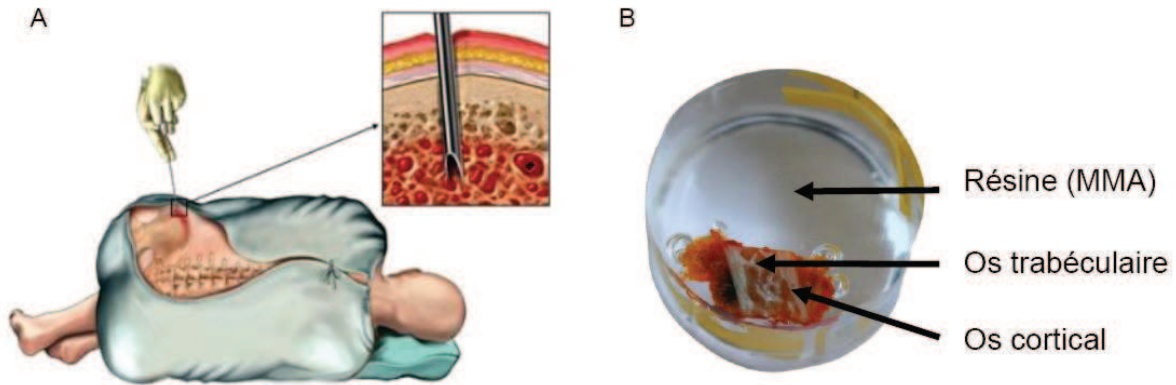


Figure 49 : Schéma représentant la réalisation d'une biopsie osseuse iliaque à l'aide d'un trocart à main (A), puis la biopsie elle-même après inclusion dans une résine de méthacrylate de méthyle (B).

2.2. Préparation des échantillons osseux

2.2.1. Préparation des coupes pour la microradiographie

La réalisation de microradiographies nécessite des coupes d'épaisseur uniforme afin d'éviter les artéfacts de mesure. On utilise donc une scie à fil diamanté (Well 3241, ESCIL, Chassieu, France). L'échantillon est fixé à un support par une cire thermosensible, liquide à 40°C. Le fil attaque le bloc de manière uniforme mais laisse des stries sur le matériel à chaque changement de sens de rotation de la bobine. Le fil diamanté baigne dans une solution aqueuse et lubrifiante qui évite tout phénomène de chauffe dû aux frottements et une usure prématurée du fil. Les coupes sont effectuées à une épaisseur de 150 μm , puis amincies à $100 \pm 1 \mu\text{m}$ par une méthode manuelle et un contrôle fréquent de l'épaisseur avec un comparateur précis au micromètre (Type 556G, Compac, Genève, Suisse). Les coupes sont d'abord usées entre deux plaques de verre dépoli à l'aide d'une poudre de carbure de silicium de granulation 180, 320 ou 600, du plus gros au plus fin (ESCIL, Chassieu, France). Elles sont ensuite polies avec une polisseuse (ESC 200GT, ESCIL, Chassieu, France) équipée d'un disque de feutre en présence d'une suspension d'alumine (1 μm), ce qui supprime les stries induites par le fil diamanté. L'état de surface est ensuite amélioré en continuant le polissage avec une suspension diamantée 0,25 μm . Finalement, les coupes sont débarrassées de toutes traces de poussières, de résine, d'alumine, de verre ou encore de carbure de silicium, par un nettoyage aux ultrasons deux fois cinq minutes (Ultrasonic cleaner, Branson 200, Branson, Soest, Pays-Bas). Les coupes, conservées entre deux lames de verre, sont alors prêtes à être microradiographiées. Ces mêmes coupes seront aussi utilisées pour les essais de microindentation à l'échelle du BSU.

2.2.2. Préparation des blocs pour la microindentation

Après la réalisation de la coupe à 150 μm à la scie à fil diamanté, le bloc est surfacé pour enlever les stries de coupe et obtenir un état de surface compatible avec des essais de microindentation. Ce surfacage est réalisé en trois temps : une première étape avec une polisseuse équipée d'un disque abrasif de granulation G1200 en présence d'une suspension d'alumine (1 μm), jusqu'à disparition des stries de coupes. La seconde étape est réalisée avec un disque de feutre en présence de la même suspension d'alumine et sert à enlever les traces de la première étape. Finalement, l'état de surface est amélioré grâce à un polissage avec une suspension diamantée à 0.25 μm . Le bloc est ensuite nettoyé dans un bain à ultrasons durant 5 min. L'ensemble de cette préparation conduit à un enlèvement de matière inférieur à 10 μm et permet donc de rester dans un plan comparable à celui de la coupe à 100 μm .

2.3. Microradiographie quantitative de contact

Pour mesurer le degré de minéralisation osseuse (DMB), c'est-à-dire la densité minérale du tissu osseux, il existe plusieurs méthodes comme l'imagerie quantitative par électrons rétrodiffusés (qBEI) (Roschger *et al.* 1995; Roschger *et al.* 1998; Sutton-Smith *et al.* 2008), la microtomographie par radiation synchrotron (SR μ CT) (Nuzzo *et al.* 2002) et la microradiographie quantitative (Boivin et Meunier 2002a; Boivin *et al.* 2008). Toutes ces méthodes montrent des résultats comparables (Boivin et Meunier 2003a). Parmi ces techniques, la microradiographie consiste en l'observation microscopique d'émulsions photographiques afin de visualiser et mesurer les différences d'absorption des rayons X à travers l'objet à analyser. Les rayons X mous sont produits par un générateur Philips (Limeil Brévannes, France) compact PW 1830/40 équipé d'une unité de diffraction PW 2273/20. L'anode de cuivre fournit un rayon polychromatique qui traverse un filtre de nickel. Le filtre permet l'obtention d'un rayon monochromatique composé uniquement des radiations $K\alpha$ du cuivre filtrées nickel d'une longueur d'onde de 1,54 Å (Boivin et Meunier 2002a). Le générateur, refroidi par eau est utilisé avec un courant de 25 kV et 25 mA. Un montage constitué d'un film photographique haute résolution (3000 lignes/mm) VRP-M sensible au vert (Geola, Vilnius, Lituanie), sur lequel sont mis en contact une coupe de tissu osseux de 100 ± 1 μm d'épaisseur et un étalon d'aluminium, est exposé 20 minutes à ce rayonnement à 30 cm du foyer. L'émulsion photographique est ensuite développée pendant 5 minutes dans le révélateur Kodak D19 à 20°C, puis rincée dans de l'eau acétifiée à 3% pour stopper la réaction et fixée dans un bain de fixateur rapide Ilford Hypman pendant 5 minutes. L'exposition et la révélation se font dans une pièce éclairée par une lumière inactinique, à l'abri de la poussière.

Pour l'évaluation quantitative de l'absorption des rayons X, un système de référence est construit sous forme d'un escalier de 8 marches d'aluminium pur à 99,5% d'épaisseurs différentes (Boivin et Meunier 2002a). Dans les conditions expérimentales utilisées, sachant que la masse par unité de surface de l'aluminium (Al) est de 0,003366 g/cm^2 , la correspondance entre la densité de l'aluminium et celle de l'hydroxyapatite est donnée par la relation :

$$\rho \text{ hydroxyapatite } (\rho \text{ HA}) = 0,561 m_{(\text{Al})} / d_{\text{HA}}$$

ρ : densité de matériau absorbant (g/cm^3)
 m : masse par unité de surface (g/cm^2)
 d : épaisseur du matériau absorbant (cm)

L'épaisseur d'une feuille d'aluminium étant calibrée à $11,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, pour une coupe de tissu osseux de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur, les différentes marches de l'étalon d'aluminium correspondent aux degrés de minéralisation suivants : marche 1 : $\rho \text{ HA} = 0,18883 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 2 : $\rho \text{ HA} = 0,37767 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 3 : $\rho \text{ HA} = 0,56650 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 4 : $\rho \text{ HA} = 0,75533 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 5 : $\rho \text{ HA} = 0,94416 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 6 : $\rho \text{ HA} = 1,13300 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 7 : $\rho \text{ HA} = 1,32183 \text{ g}/\text{cm}^3$ / marche 8 : $\rho \text{ HA} = 1,51066 \text{ g}/\text{cm}^3$. Le système de calibration est exposé avec chaque microradiographie pour éviter toute dérive liée au vieillissement de la source scellée (Fig. 50).

L'image radiographique est ensuite numérisée avec une caméra CCD couleur 1600×1200 pixels (Microfire, Shenzhen, Chine) couplée à un microscope (Axioscop, Zeiss, Wetzlar, Allemagne). Après un binning /2 monochrome, chaque image a une taille de pixel de $5,72 \mu\text{m}$ de côté. La mesure du niveau de gris moyen de chaque marche de l'étalon permet d'obtenir, pour chaque microradiographie, la courbe d'étalonnage convertissant chaque niveau de gris en densité minérale exprimée en gramme de minéral par cm^3 de tissu osseux. La résolution est telle qu'elle rend possible deux types de mesure : la mesure globale, à l'échelle du tissu ou la mesure focale d'un BSU seuillé comme une région d'intérêt (ROI) à part entière. Dans le cas d'une mesure globale, les variables d'intérêt, à savoir le degré de minéralisation moyen (DMB en g/cm^3) et l'index d'hétérogénéité (HI en g/cm^3) sont mesurées séparément pour chaque corticale (C1 et C2), l'os cortical total (C1 + C2), l'os trabéculaire (S) et l'os total (C1+C2+S). Pour une mesure focale, le BSU cortical ou trabéculaire à analyser est manuellement sélectionné et seul le DMB est mesuré (Boivin et Meunier 2002a; Boivin *et al.* 2008). Lors de l'étude focale, le DMB a été mesuré sur 10 BSUs anciens (interstitiels) et 10 BSUs récents corticaux et trabéculaires, 40 BSUs différents ont donc été analysés par échantillon, représentant un total de 3760 BSUs. La distinction entre BSUs anciens et récents a été faite principalement sur des critères morphologiques basés sur la taille du canal de Havers et/ou le DMB.

Une fois la ROI seuillée, le logiciel dédié (Minéralisation v 2.0b, Exploranova, La Rochelle, France) convertit le niveau de gris de chaque pixel en densité minérale. A partir d'une analyse des courbes de distribution des valeurs de DMB, les variables d'intérêts sont mesurées. Le DMB correspond à la densité minérale de l'ensemble du tissu analysé tandis que HI est la largeur à mi-hauteur des courbes de distributions et donne une information sur la dispersion des valeurs de DMB (Fig. 50). Un HI élevé indique une hétérogénéité importante au niveau de la minéralisation et suggère une activité soutenue du remodelage osseux. Au contraire, un HI bas implique une homogénéisation du DMB pouvant être liée à une faible activité du remodelage osseux.

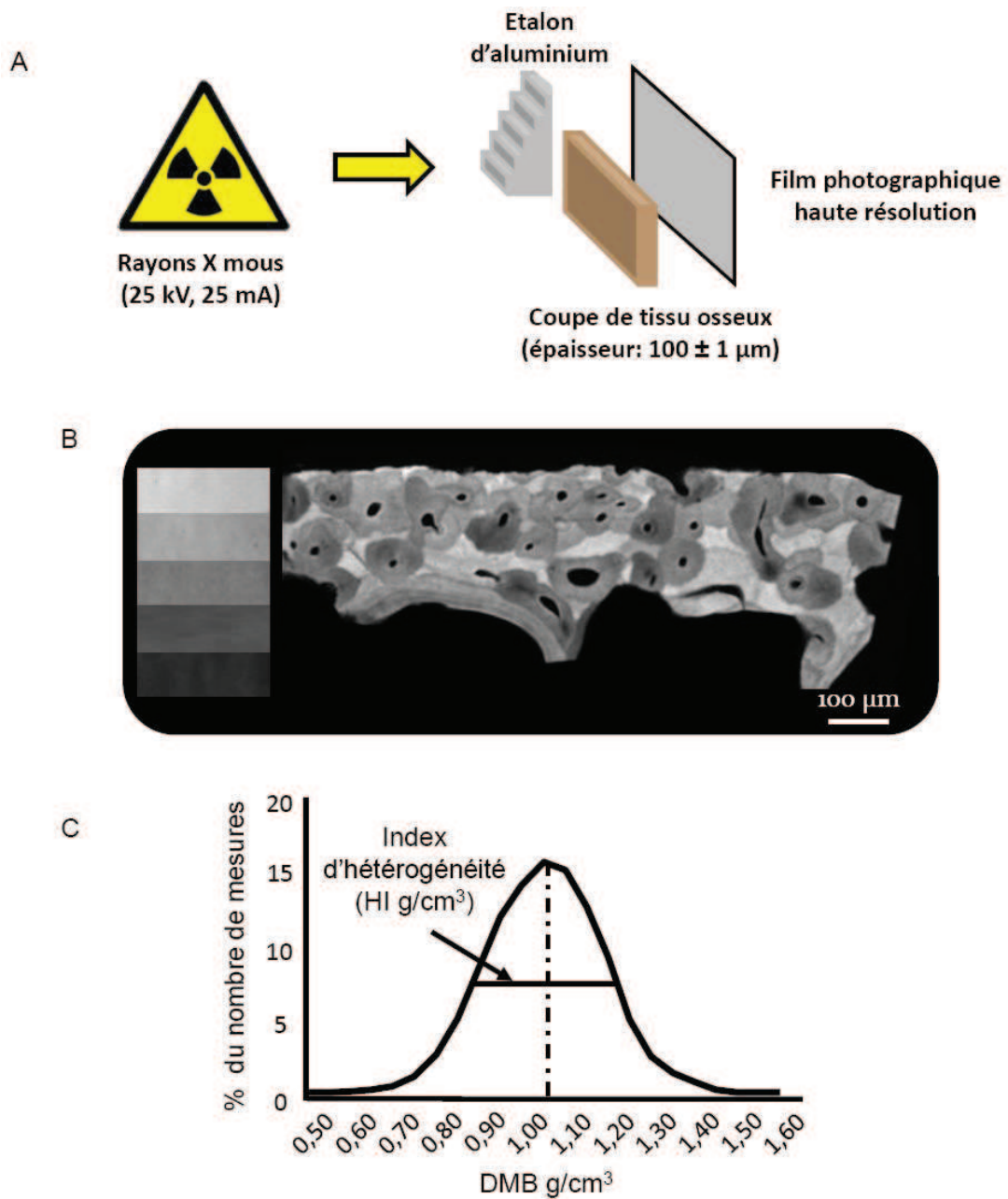
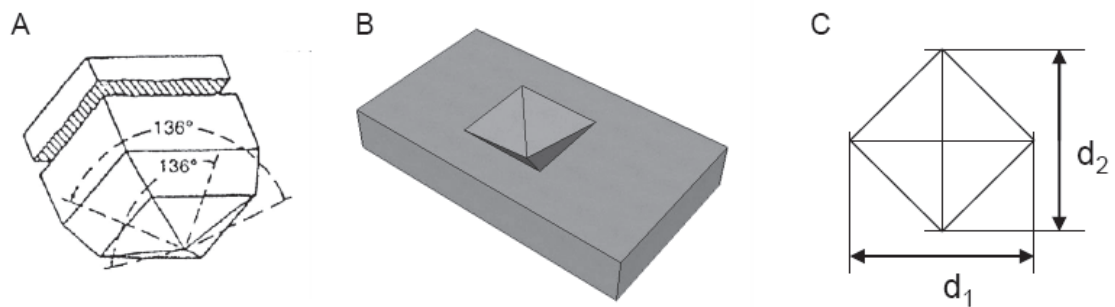


Figure 50 : Schéma représentant le principe de la microradiographie de contact (A). Après révélation, la microradiographie permet d'établir la courbe d'étalonnage grâce à l'étalon d'aluminium (B, gauche) et de mesurer les niveaux de gris de l'échantillon osseux (B, droite). Plus le niveau de gris est clair, plus le degré de minéralisation (DMB) est grand. La microradiographie permet d'obtenir pour chaque échantillon osseux une courbe de distribution des valeurs de DMB en fonction de leur pourcentage du nombre de mesures (C). Ces courbes sont ensuite utilisées pour mesurer le DMB moyen et l'index d'hétérogénéité.

2.4. Microdureté Vickers

La microindentation permet mesurer la résistance d'un matériau à la pénétration d'un diamant soumis à la pression exercée par une charge constante pendant un temps déterminé. Connaissant la géométrie de l'indenteur Vickers (pyramide à base carrée dont l'angle au sommet est identique entre les faces), une formule permet, via la mesure des diagonales de l'empreinte laissée dans le matériau, de remonter à la microdureté Vickers. Elle est notée H_v et correspond au rapport d'une force sur la surface projetée de l'indent (kg/mm^2) (Fig. 51). Lors d'un travail précédent, j'ai défini les paramètres caractéristiques adaptés aux essais de microindentation sur le tissu osseux humain. Ainsi, pour le microduromètre Micromet 5104 (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), une charge de 25 g est appliquée 10 s (Boivin *et al.* 2008). L'essai laisse à la surface du tissu osseux une empreinte de forme carrée d'une trentaine de μm de diamètre et d'une profondeur inférieure à 10 μm . La mesure consiste à obtenir la longueur des deux diagonales de l'empreinte dès retrait de l'indenteur avec le logiciel OmniMet HMS v2.31 (Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) (Fig. 51).



$$H_v = 1854,4 \times P \times d^{-2}$$

H_v : dureté Vickers en kg/mm^2

P : charge d'essai en g

d : longueur moyenne des 2 diagonales en mm ($d_1 + d_2 / 2$)

Figure 51 : Caractéristiques de l'indenteur Vickers (A), de son empreinte résiduelle vue en perspective (B) et de dessus (C) et formule permettant de calculer la microdureté Vickers (H_v).

La mesure de microdureté peut être réalisée de deux manières (Fig. 52), soit de façon globale, à l'échelle du tissu osseux, soit de façon focale, à l'échelle du BSU. La mesure de la microdureté globale consiste à réaliser de façon aléatoire 60 empreintes, à la surface du bloc surfacé (20 dans chaque corticale et 20 dans l'os trabéculaire), espacées d'au moins 200 μm . L'utilisation de 60 essais aléatoires est justifiée par une précédente étude qui a montré qu'il s'agissait du nombre minimum d'idents à réaliser pour obtenir une moyenne reproductible pour un échantillon donné et avec un coefficient de variation intra et inter observateur $\leq 5\%$ (Boivin *et*

al. 2008). Cette méthode permet d'obtenir une mesure de la microdureté moyenne exprimée pour l'os cortical, l'os trabéculaire et l'os total (cortical + trabéculaire). La deuxième approche consiste à se situer à l'échelle du BSU en effectuant pour un BSU donné de 2 à 5 essais, en fonction de sa taille, pour obtenir sa microdureté moyenne (Fig. 52). Dans cette étude, ces deux stratégies ont été employées, la mesure globale sur les blocs et la mesure focale sur 3760 BSUs dont le DMB était mesuré par microradiographie quantitative. Dans ce dernier cas, la microradiographie était utilisée pour se localiser et les essais de microindentation étaient réalisés sur la coupe à 100 μm déjà microradiographiée.

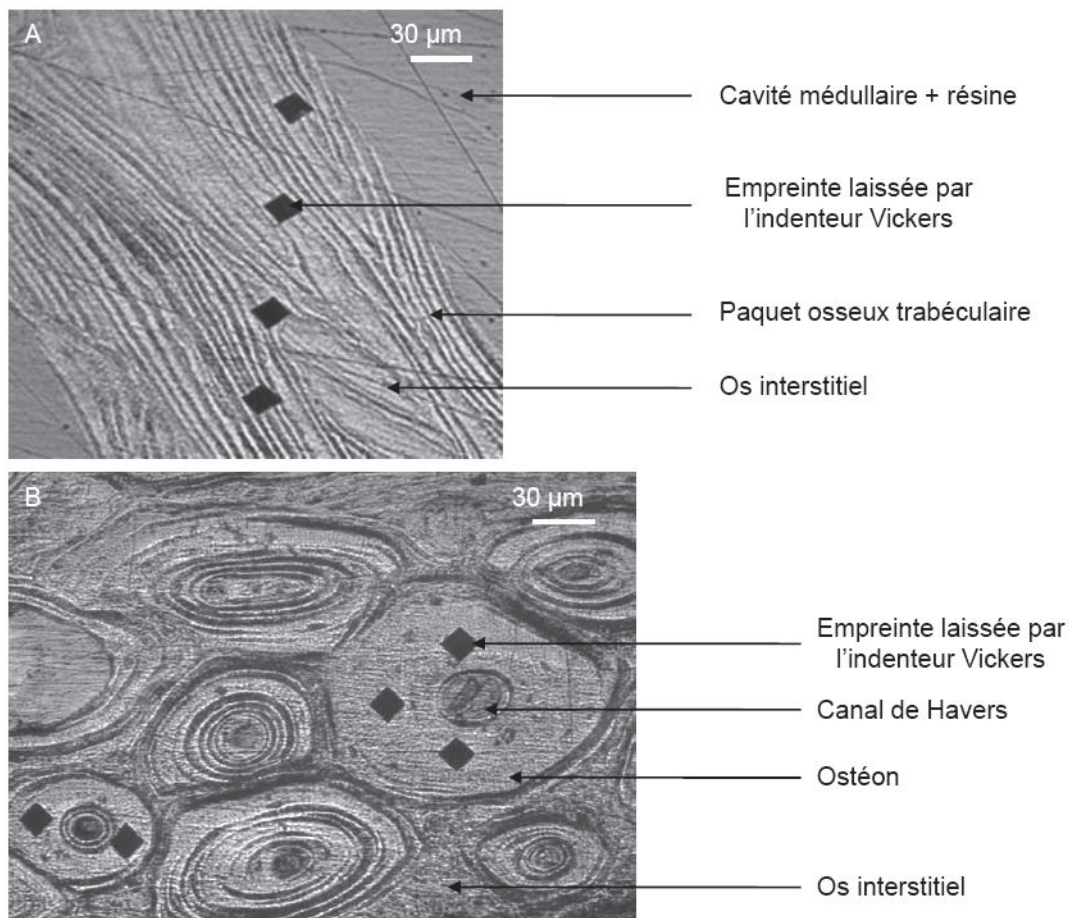


Figure 52 : Mesure globale de la microdureté sur une travée osseuse (A) et mesure focale sur des ostéons corticaux (B).

2.5. Autres variables d'intérêt

L'analyse de nos résultats a nécessité l'utilisation des variables démographiques, des valeurs de BMD mesurées à la visite précédent la biopsie iliaque ou encore les variables histodynamiques. Toutes ces données ont été directement obtenues des investigateurs concernés après accord avec Hofmann-La Roche (Bâle, Suisse). Ainsi, les valeurs de BMD mesurées avant

biopsie au rachis lombaire (L1-L4) et au col fémoral (Chesnut *et al.* 2004), et les variables histodynamiques mesurées directement sur le tissu et reflétant l'activité du remodelage osseux (Recker *et al.* 2004b) ont été utilisées. Les protocoles impliqués dans l'obtention de ces variables étaient décrits dans les articles mentionnés. En résumé, les biopsies incluses en résine de MMA, étaient utilisées pour réaliser des coupes minces à l'aide d'un microtome lourd à couteau en carbure de tungstène en différents plans de la biopsie. Ces coupes, après coloration, permettent d'accéder aux paramètres nécessaires à la caractérisation histologique statique et dynamique de l'échantillon osseux. Ainsi, des coupes ont été colorées par un trichrome de Goldner modifié pour mesurer la surface osseuse (BS pour Bone Surface), et par le bleu de toluidine mettant en évidence les lignes cémentantes et permettant la mesure des murs ostéoniques (W.Th pour Wall Thickness). Des coupes non colorées ont aussi été utilisées pour mesurer les marquages fluorescents. Quatre variables dynamiques caractéristiques du remodelage osseux ont été mesurées ou calculées dans l'os trabéculaire :

- Le MAR (Mineralization Apposition Rate, en $\mu\text{m}/\text{jour}$) qui correspond à la vitesse de minéralisation. Le MAR est donné par la distance entre les milieux de deux marquages fluorescents successifs divisée par le nombre de jours entre les deux marquages.
- Le MS/BS (Mineralizing Surfaces / BS, en %) qui correspond à l'extension des surfaces en cours de minéralisation. Il est donné par la longueur des doubles marquages fluorescents + la moitié des simples rapporté au BS.
- Le BFR/BS (Bone Formation Rate / BS, en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{jour}$) qui représente la quantité de tissu osseux formée par unité de surface osseuse par jour. Le BFR est calculé en multipliant le MAR par le MS.
- L'Ac.F (Activation Frequency, en # / an): qui correspond à la fréquence d'activation du remodelage osseux. Il est calculé en multipliant le BFR/BS par le W.Th (en μm). L'Ac.F caractérise la probabilité annuelle d'initiation d'un nouveau site de remodelage en un site osseux trabéculaire donné.

2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant SPSS v.16 (SPSS inc., Chicago, IL, USA) avec un risque alpha défini à 5%.

Pour l'étude globale, chaque variable a été rapportée à une valeur moyenne par échantillon, le test de Shapiro-Wilk a révélé que leur distribution ne suivait pas une loi normale. Une procédure non paramétrique a donc été choisie. Pour tester si une différence existait entre les trois groupes (PLA / 2,5 mg/j et 20 mg int), un test de Friedman a été utilisé. Dans le cas d'un test significatif, le test de Mann-Whitney a permis de tester les différences entre chaque groupe. Les liaisons entre les variables ont été testées par le Rho de Spearman (r' : coefficient de corrélation de Spearman).

Pour l'étude focale, chaque BSU analysé a été considéré comme un évènement statistique indépendant, après avoir observé un effet « individu » non significatif dans le modèle ANCOVA (analyse de la covariance). L'analyse a donc porté sur 3760 BSUs différents. Les variables d'intérêts suivaient une loi normale et une procédure paramétrique a été utilisée. Les différences relatives au traitement ont été testées par une analyse de la variance (ANOVA), dans le cas d'une réponse significative, les groupes ont été comparés deux à deux par un test de Scheffé. Finalement, les liaisons entre les variables ont été décrites en utilisant le modèle linéaire (r^2 : coefficient de corrélation linéaire de Bravais–Pearson).

3. Résultats

3.1. Caractéristiques des patientes à l'inclusion dans l'étude BONE

Parmi les 110 patientes provenant des trois groupes de l'étude BONE, et incluses dans l'étude sur biopsies osseuses, les variables démographiques à l'inclusion étaient comparables. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes pour l'âge, la durée de la ménopause, la taille, le poids et l'indice de masse corporelle (IMC) (Tableau 4).

	PLA (n=36)	2,5 mg/j (n=40)	20 mg int (n=34)
Age (années)	66,44 ± 5,56	66,13 ± 5,98	65,85 ± 5,48
Temps depuis le début de la ménopause (années)	17,56 ± 5,99	19,65 ± 7,09	17,70 ± 7,11
Taille (cm)	160,26 ± 6,64	160,76 ± 5,78	160,56 ± 5,87
Poids (kg)	67,60 ± 9,28	69,25 ± 12,95	71,42 ± 13,32
Indice de Masse Corporelle (kg/m ²)	26,35 ± 3,53	26,88 ± 5,41	27,67 ± 4,70

Tableau 4 : Caractéristiques des patientes biopsiées à l'inclusion dans l'étude BONE, pour les groupes traités placebo (PLA), 2,5 mg/jour (2,5 mg/j) et 20 mg intermittent (20 mg int) d'ibandronate oral. Résultats exprimés sous forme Moyenne ± SD.

3.2. Effets de l'ibandronate sur l'activité du remodelage osseux après deux et trois ans de traitement

Après 2 ans d'IBN, le régime continu diminue significativement l'activité du remodelage osseux avec une diminution de 75% ($p=0,003$) des surfaces en cours de minéralisation et de 70% ($p=0,017$) de l'Ac.F par rapport au groupe PLA (Tableau 5). Le régime intermittent conduit à une diminution de 40% des surfaces en cours de minéralisation et de 36% de l'Ac.F par rapport au PLA, toutefois, ces différences ne sont pas significatives. A noter que le MS/BS et le BFR/BS

sont significativement plus élevés dans le groupe 20 mg int par rapport au groupe 2,5 mg/j (Tableau 5).

Traitement 2 ans	PLA (n = 12)	2,5 mg/j (n = 16)		20 mg int (n = 15)		
	Moyenne (DS)	Moyenne (DS)	p vs. PLA Mann-Whitney	Moyenne (DS)	p vs. PLA Mann-Whitney	p vs. 2,5 mg/j Mann-Whitney
MAR	0,428 (0,0831)	0,462 (0,091)	0,4080	0,449 (0,108)	0,9304	0,3652
MS/BS	5,565 (5,272)	1,376 (1,664)	0,0028	3,354 (3,784)	0,1161	0,0219
BFR/BS	0,025 (0,026)	0,006 (0,007)	0,0036	0,016 (0,019)	0,2565	0,0296
Ac.F	0,351 (0,375)	0,104 (0,112)	0,0169	0,223 (0,306)	0,2386	0,1560

Tableau 5 : Effets de l'ibandronate oral continu et intermittent sur le remodelage osseux après deux ans de traitement.

Après 3 ans, le traitement quotidien par l'IBN ne présente aucune différence significative, pour les variables reflétant l'activité du remodelage osseux, par rapport au PLA. Le traitement intermittent aboutit à une diminution significative de 44% ($p=0,029$) des surfaces en cours de minéralisation (Tableau 6). Pour ce même régime, l'Ac.F était 34% plus bas que pour le groupe PLA, mais la différence n'atteignait pas le seuil de la significativité.

Traitement 3 ans	PLA (n = 19)	2,5 mg/j (n = 20)		20 mg int (n = 16)		
	Moyenne (DS)	Moyenne (DS)	p vs. PLA Mann-Whitney	Moyenne (DS)	p vs. PLA Mann-Whitney	p vs. 2,5 mg/j Mann-Whitney
MAR	0,419 (0,090)	0,550 (0,379)	0,1686	0,496 (0,074)	0,0186	0,5663
MS/BS	4,046 (2,629)	4,266 (7,307)	0,0815	2,267 (1,587)	0,0289	0,9492
BFR/BS	0,018 (0,012)	0,020 (0,032)	0,2060	0,012 (0,009)	0,1120	0,8986
Ac.F	0,258 (0,173)	0,275 (0,438)	0,1600	0,169 (0,138)	0,1046	0,9746

Tableau 6 : Effets de l'ibandronate oral continu et intermittent sur le remodelage osseux après trois ans de traitement.

3.3. Effets de l'ibandronate oral continu et intermittent sur la minéralisation et la microdureté du tissu osseux (étude globale)

3.3.1. Résultats après deux ans de traitement

Après deux ans de traitement par l'IBN oral les deux régimes montrent des DMB plus élevés de 1,2 à 3,5% par rapport au groupe PLA, que ce soit pour l'os cortical, l'os trabéculaire ou l'os total. Tout comme pour le DMB, le HI n'est pas significativement modifié après traitement par l'IBN par rapport au PLA (Tableau 7). La microdureté moyenne est significativement plus élevée chez les patientes traitées par l'IBN, +7 à +8% ($p < 0,02$) par

rapport au groupe PLA, et ce, pour tous les compartiments osseux (Tableau 7). A l'échelle de l'organe, la BMD était plus élevée au rachis lombaire, +10% par rapport au PLA alors qu'au niveau du col fémoral, aucune différence significative n'a été trouvée (Tableau 7). Il est important de noter, qu'aucune différence significative n'a été observée pour toutes les variables d'intérêts entre le régime quotidien et le régime intermittent.

Bien que le DMB moyen et l'HI ne soient significativement modifiés après deux ans de traitement par l'IBN oral, la distribution du DMB semble modifiée. En effet, l'histogramme de distribution des valeurs de DMB (Fig. 53) montre pour l'os total que la fréquence maximale est observée pour le groupe PLA pour un DMB compris entre 1,0 et 1,1 g/cm³ alors que pour les deux groupes traités par l'IBN, elle se situe entre 1,1 et 1,2 g/cm³. De plus, à partir de cette classe de DMB moyen (1,0 – 1,1 g/cm³), les fréquences pour les valeurs suivantes sont plus élevées dans les groupes traités par l'IBN par rapport au groupe traité par le PLA (Fig. 53). Ceci suggère qu'un traitement de 2 ans par l'IBN oral induit un déplacement de la distribution de la minéralisation vers les plus hautes valeurs de DMB, sans toutefois changer significativement ni le DMB, ni l'HI entre les groupes de l'étude.

L'utilisation de boîtes à moustaches permet de visualiser la distribution des variables en présentant de bas en haut : le minimum, le premier quartile, la médiane, le troisième quartile et le maximum (Fig. 54). Ces éléments graphiques montrent que les médianes pour le DMB cortical et trabéculaire des groupes PLA, 2,5 mg/j et 20 mg int se situent dans la gamme définie par une population de 20 femmes préménopausées saines [âge : 49,5 ± 2 ans / taille : 165 ± 6 cm / poids 69,6 ± 13 kg (Recker *et al.* 2004a; Bala *et al.* 2010a)]. Par rapport à cette population, les médianes pour l'HI trabéculaire des trois groupes de l'étude sont dans la même gamme. Pour l'os cortical, la minéralisation est plus homogène après traitement par l'IBN par rapport à la population de femmes préménopausées qui contient la médiane de l'HI mesuré dans le groupe PLA. La figure 54 montre aussi que 2 ans d'IBN oral, contrairement au placebo, ramènent la microdureté corticale et trabéculaire au niveau observé chez des femmes avant la ménopause.

Traitement (2 ans)	PLA (n = 12)	2,5 mg/d (n = 16)		20 mg int (n = 15)				
	Moyenne (DS)	Moyenne (DS)	Δ vs. PLA (%)	p vs. PLA Mann-Whitney	Moyenne (DS)	Δ vs. PLA (%)	p vs. PLA Mann-Whitney	p vs. 2,5 mg/d Mann-Whitney
DMB (g/cm³)								
Os total	1,088 (0,061)	1,127 (0,059)	3,502	0,1042	1,113 (0,059)	2,269	0,2617	0,5143
Os cortical	1,076 (0,069)	1,114 (0,059)	3,333	0,0777	1,091 (0,075)	1,197	0,4642	0,3230
Os trabéculaire	1,124 (0,053)	1,156 (0,065)	3,556	0,3036	1,129 (0,052)	1,177	0,7697	0,3943
HI (g/cm³)								
Os total	0,234 (0,108)	0,223 (0,054)	-3,393	0,9630	0,267 (0,130)	15,707	0,5582	0,5800
Os cortical	0,223 (0,107)	0,214 (0,061)	-3,447	0,9630	0,267 (0,145)	20,459	0,6256	0,6352
Os trabéculaire	0,203 (0,071)	0,194 (0,042)	-5,348	0,9590	0,213 (0,097)	3,775	0,9611	0,9304
Hv (kg/mm²)								
Os total	44,536 (2,869)	47,971 (2,829)	7,711	0,0033	47,920 (2,826)	7,596	0,0068	0,8433
Os cortical	44,602 (2,977)	48,037 (2,713)	7,701	0,0033	47,825 (2,817)	7,227	0,0100	0,8433
Os trabéculaire	44,655 (3,233)	48,265 (3,155)	8,085	0,0077	48,001 (3,348)	7,494	0,0149	0,8461
BMD (g/cm²)								
Rachis lombaire (L1-L4)	0,774 (0,082)	0,855 (0,114)	10,475	0,0276	0,901 (0,082)	11,394	0,0009	0,1490
Femoral Neck	0,635 (0,086)	0,661 (0,090)	5,128	0,2985	0,645 (0,109)	3,016	0,9268	0,4175

Tableau 7 : Effets de l'ibandronate oral continu (2,5 mg/j) et intermittent (20 mg int) après deux ans sur le degré de minéralisation (DMB), l'index d'hétérogénéité (HI), la microdureté (Hv) et la densité minérale osseuse (BMD), par rapport au placebo (PLA). La microdureté est significativement plus haute chez les patientes traitées par l'ibandronate, indépendamment de changements significatifs de la minéralisation tissulaire et de son hétérogénéité. Résultats rapporté comme Moyenne (DS) les différences significatives sont rapportées dans les cases grisées.

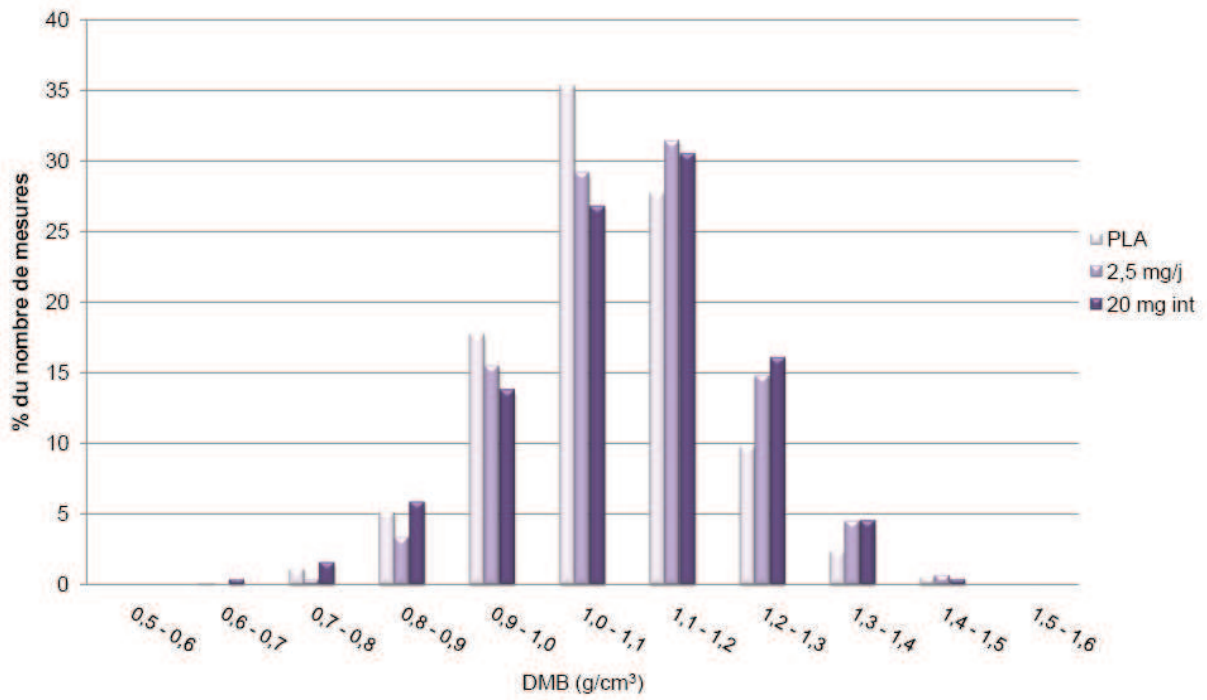


Figure 53 : Histogramme des fréquences observées pour les différentes valeurs de degré de minéralisation (DMB) pour l'os total. Après deux ans de traitement par l'ibandronate oral continu (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int), la distribution de la minéralisation est déplacée vers les valeurs élevées de DMB.

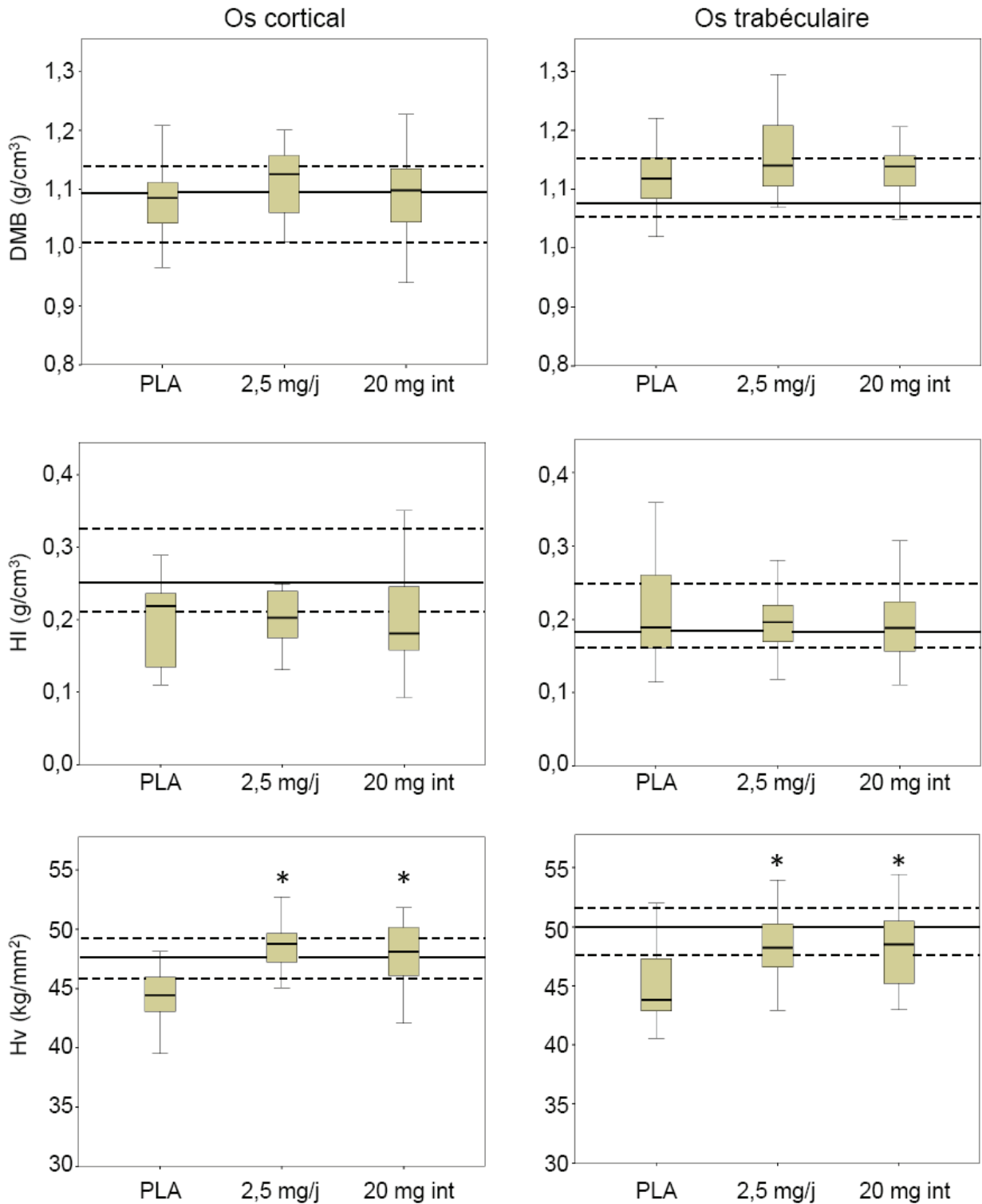


Figure 54 : Effets de deux ans de traitement avec un placebo (PLA) ou l'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int) sur le degré de minéralisation (DMB), l'index d'hétérogénéité (HI) et la microdureté (Hv). Les lignes continues correspondent à la médiane d'une population de 20 femmes préménopausées saines (Recker *et al.* 2004a; Bala *et al.* 2010a), les lignes pointillées marquent l'intervalle de confiance à 90% de cette même population. Deux ans d'ibandronate oral ramènent la microdureté osseuse corticale et trabéculaire au niveau des femmes avant la ménopause, contrairement au placebo.

* $p < 0,05$ vs. PLA.

3.3.2. Résultats après trois ans de traitement

Après trois ans de traitement, comme après deux ans, le groupe traité par l'IBN quotidien ne montre pas de différence significative ni pour le DMB, ni pour l'HI par rapport au groupe PLA. Le traitement intermittent présente un DMB supérieur de 2 à 3% par rapport au groupe PLA, mais le seuil de significativité n'est pas atteint (Tableau 8). Pour les deux régimes d'IBN, la microdureté de l'os total est significativement plus haute que dans le groupe PLA (+3 à +4%, $p < 0,04$). D'une manière générale sous traitement par IBN, la microdureté est significativement plus élevée que dans le groupe PLA pour tous les compartiments osseux, sauf pour l'os cortical avec le régime quotidien. L'IBN oral quotidien et intermittent augmentent donc la microdureté osseuse indépendamment de changements significatifs de la minéralisation osseuse et de sa répartition (Tableau 8). L'histogramme de distribution des valeurs de DMB pour l'os total (Fig. 55) montre que les fréquences maximales sont atteintes pour la même classe de DMB (1,1 – 1,2 g/cm³) pour les trois groupes. Pour les classes suivantes comprises entre 1,2 et 1,5 g/cm³, les fréquences sont plus élevées dans les groupes traités par l'IBN que dans le groupe PLA, montrant un léger déplacement de la distribution vers les valeurs plus élevées de DMB (Fig. 55).

Par rapport aux valeurs observées pour une population de femmes avant la ménopause, les médianes pour le DMB cortical et trabéculaire sont maintenues pour les groupes PLA, 2,5 mg/j et 20 mg int dans la gamme de cette population contrôle (Fig. 56). L'index d'hétérogénéité est maintenu à un niveau compatible avec la distribution observée avant ménopause. Le régime intermittent ramène la microdureté osseuse dans la gamme observée avant ménopause, pour l'os cortical et trabéculaire, alors que les valeurs du groupe PLA sont en dehors de cette gamme. Ce résultat est aussi observé pour l'os cortical avec le régime quotidien.

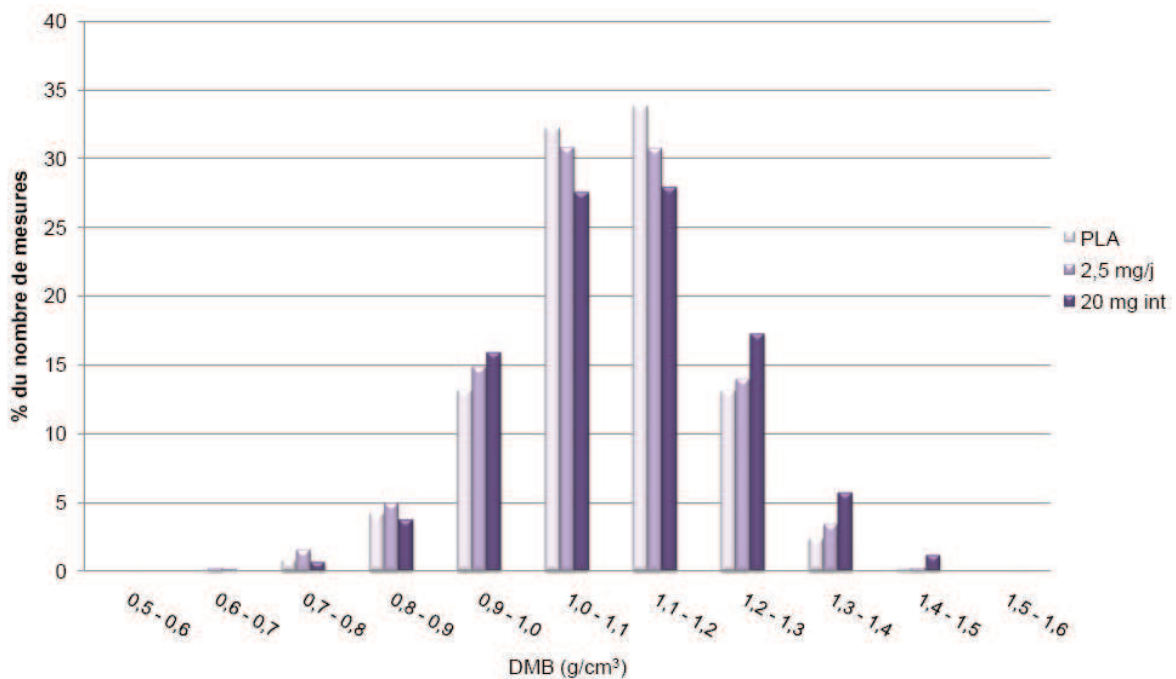


Figure 55 : Histogramme des fréquences observées pour les différentes valeurs de degré de minéralisation (DMB) pour l'os total. Après trois ans de traitement par l'ibandronate oral continu (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int), la distribution de la minéralisation est déplacée vers les valeurs élevées de DMB.

Traitement (3 ans)	PLA (n = 19)	2,5 mg/d (n = 20)			20 mg int (n = 16)			
	mean (DS)	mean (DS)	Δ vs. PLA (%)	p vs. PLA Mann-Whitney	mean (DS)	Δ vs. PLA (%)	p vs. PLA Mann-Whitney	p vs. 2,5 mg/d Mann-Whitney
DMB (g/cm ³)								
Os total	1,106 (0,049)	1,102 (0,048)	-0,326 (4,349)	0,8863	1,135 (0,075)	2,614 (6,780)	0,1542	0,1175
Os cortical	1,100 (0,058)	1,091 (0,055)	-0,795 (5,004)	0,5600	1,123 (0,088)	2,074 (7,996)	0,2721	0,1456
Os trabéculaire	1,121 (0,042)	1,113 (0,043)	-0,769 (3,877)	0,6000	1,157 (0,080)	3,187 (7,152)	0,2055	0,0682
HI (g/cm ³)								
Os total	0,211 (0,066)	0,255 (0,083)	20,770 (39,150)	0,0804	0,235 (0,079)	11,157 (37,265)	0,5133	0,3101
Os cortical	0,208 (0,072)	0,258 (0,098)	23,824 (47,045)	0,1084	0,225 (0,080)	8,222 (38,312)	0,5919	0,3101
Os trabéculaire	0,192 (0,069)	0,205 (0,056)	6,811 (29,380)	0,3565	0,192 (0,053)	0,220 (27,640)	0,7433	0,4587
Hv (kg/mm ²)								
Os total	45,836 (2,968)	47,361 (2,122)	3,327 (4,631)	0,0342	48,016 (2,571)	4,756 (5,609)	0,0160	0,4028
Os cortical	46,035 (2,989)	47,073 (2,169)	2,255 (4,711)	0,1432	48,084 (2,701)	4,451 (5,869)	0,0237	0,2095
Os trabéculaire	44,935 (2,687)	48,071 (1,928)	6,979 (4,290)	0,0029	48,195 (2,960)	7,256 (6,589)	0,0123	0,8077
BMD (g/cm ²)								
Rachis lombaire (L1-L4)	0,801 (0,089)	0,889 (0,086)	10,989 (10,708)	0,0032	0,846 (0,097)	5,658 (12,125)	0,1327	0,2657
Femoral Neck	0,637 (0,077)	0,670 (0,093)	5,137 (14,527)	0,1946	0,653 (0,112)	2,601 (17,638)	0,7968	0,2818

Tableau 8 : Effets de l'ibandronate oral continu (2,5 mg/j) et intermittent (20 mg int) après trois ans sur le degré de minéralisation (DMB), l'index d'hétérogénéité (HI), la microdureté (Hv) et la densité minérale osseuse (BMD), par rapport au placebo (PLA). La microdureté osseuse est significativement plus haute chez les patientes traitées par l'ibandronate, indépendamment de changements significatifs de la minéralisation tissulaire et de son hétérogénéité. Résultats rapporté comme Moyenne (DS) les différences significatives sont rapportées dans les cases grisées.

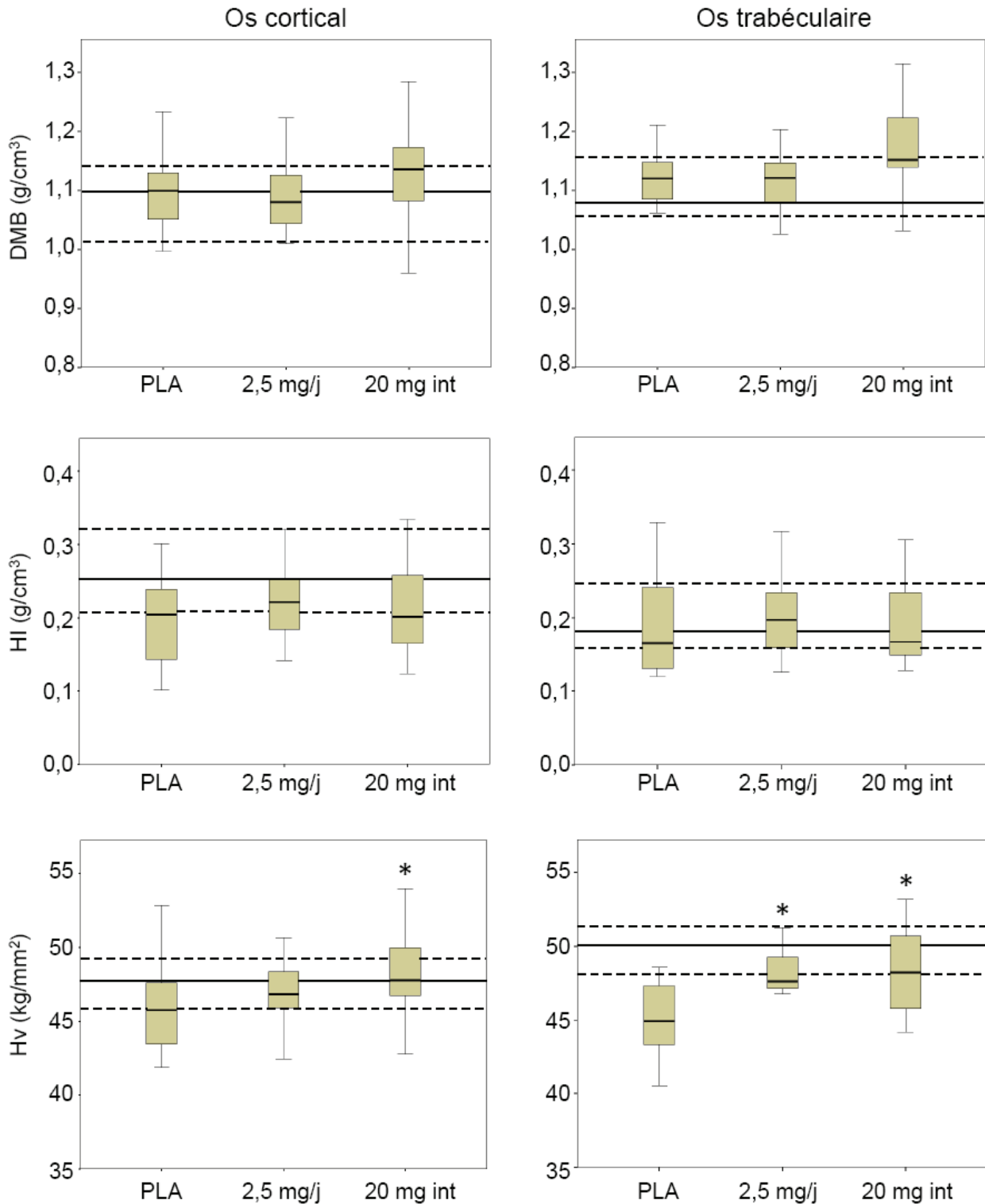


Figure 56 : Effets de trois ans de traitement avec un placebo (PLA) ou l'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int) sur le degré de minéralisation (DMB), l'index d'hétérogénéité (HI) et la microdureté (Hv). Les lignes continues correspondent à la médiane d'une population de 20 femmes préménoapuses saines (Recker *et al.* 2004a; Bala *et al.* 2010a), les lignes pointillées marquent l'intervalle de confiance à 90% de cette même population. * $p < 0,05$ vs. PLA.

Le maintien du degré de minéralisation moyen et de son hétérogénéité entre le groupe PLA et les groupes traités par l'IBN continu ou intermittent après deux ou trois ans est aussi visible sur les microradiographies. En effet, leur observation qualitative des montre qu'indépendamment du traitement, de sa durée ou encore du régime d'administration, aucune tendance à l'homogénéisation de la minéralisation n'est visible (Fig. 57).

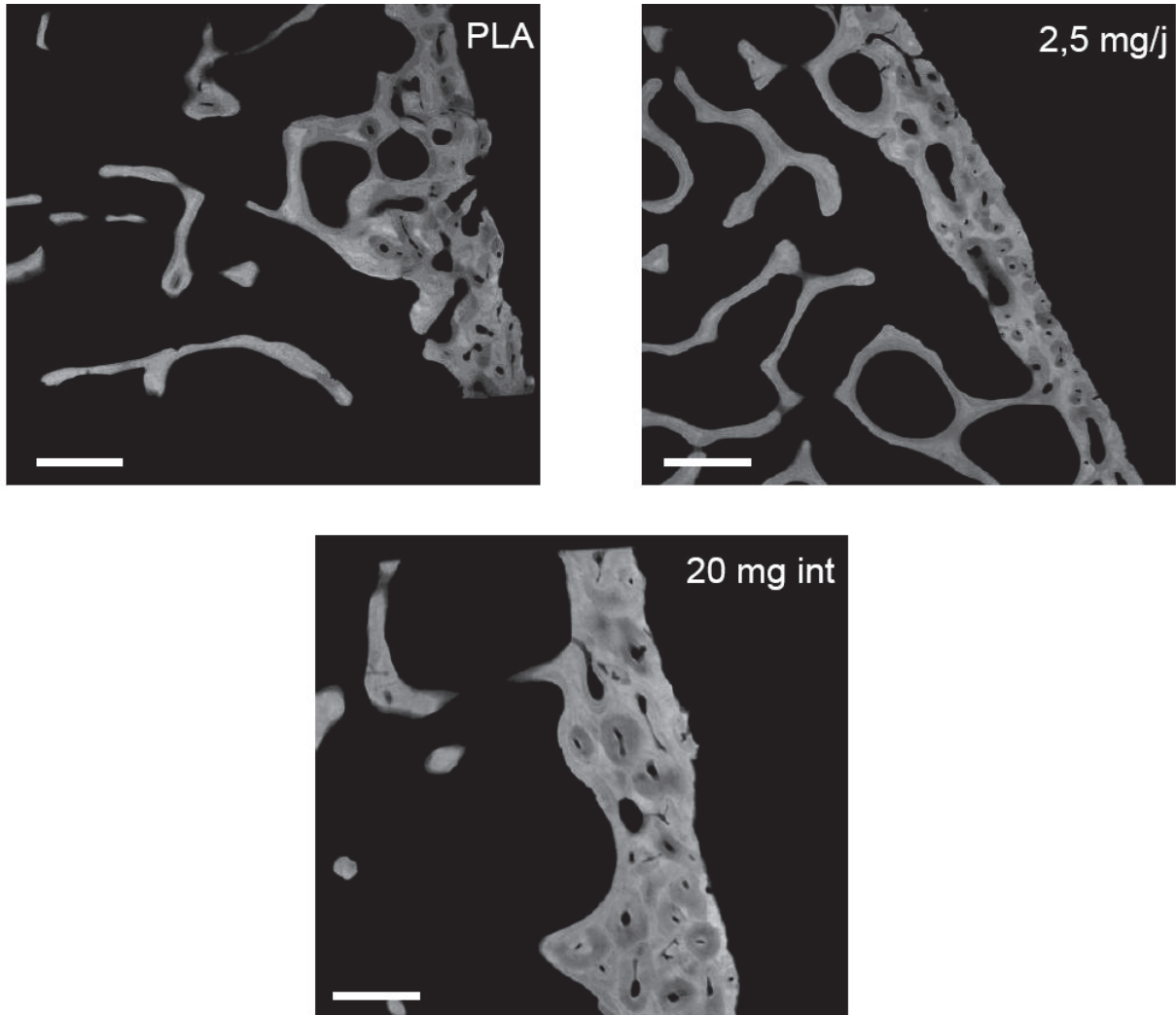


Figure 57 : Microradiographies de tissu osseux cortical et trabéculaire après trois ans de traitement par le placebo (PLA), l'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) et intermittent (20 mg int). Ces microradiographies montrent une hétérogénéité de la minéralisation préservée entre les différents groupes. Barre d'échelle : 600 μ m.

3.3.3. Relations entre le degré de minéralisation, la microdureté et le remodelage osseux

Lorsque l'on regroupe les résultats obtenus pour les différents groupes et les diverses durées de traitement, les variables reflétant la minéralisation du tissu osseux (DMB et HI de l'os trabéculaire) ne sont pas corrélées avec les variables du remodelage osseux (MAR, MS/BS, BFR/BS et Ac.F). Le DMB est corrélé significativement avec la microdureté, ainsi, plus le tissu est minéralisé plus sa dureté est élevée (Tableau 9). La microdureté est aussi significativement et inversement corrélée au MS/BS, BFR/BS et Ac.F. Donc, plus le remodelage osseux est actif, plus la dureté est basse. L'augmentation de microdureté observée après traitement par l'IBN peut donc être associée au ralentissement du remodelage osseux au niveau tissulaire.

Variables	DMB	HI	Hv
DMB		0,106	0,401**
HI	0,106		0,053
Hv	0,401**	0,053	
MAR	0,118	0,038	0,032
MS/BS	-0,102	-0,002	-0,345**
BFR/BS	-0,021	0,101	-0,228*
Ac.F	-0,005	0,078	-0,239*

Tableau 9 : Coefficients de corrélation de Spearman (r') entre les variables dynamiques du remodelage osseux (MAR, MS/BS, BFR/BS et Ac.F), le degré de minéralisation (DMB) et son hétérogénéité (HI) et la microdureté (Hv). * $p < 0,05$ / ** $p < 0,001$.

3.3.4. Résumé des résultats de l'étude globale

Cette première étude réalisée à l'échelle du tissu osseux iliaque révèle que 2 ou 3 ans de traitement par l'IBN oral continu ou intermittent diminuent modérément l'activité du remodelage osseux, et augmentent significativement la microdureté par rapport au PLA. Cette amélioration de la résistance micromécanique, ramenant les valeurs de microdureté au niveau observé chez des femmes avant la ménopause, se produit indépendamment de modifications significatives du degré de minéralisation moyen ou de l'index d'hétérogénéité. Cependant la distribution des valeurs de minéralisation tend à être déplacée vers les plus hauts degrés de minéralisation après IBN par rapport au PLA. Les corrélations entre microdureté, degré de minéralisation et activité du remodelage osseux montrent que le ralentissement du remodelage osseux observé sous IBN est une cause de l'augmentation de la microdureté indépendante du degré de minéralisation. Finalement, aucune différence significative n'a été observée pour le degré de minéralisation, l'index d'hétérogénéité et la microdureté entre le régime quotidien et le régime intermittent avec un délai $>$ à deux mois entre deux doses successives.

3.4. Effets de l'ibandronate oral continu et intermittent sur la minéralisation et la microdureté des unités structurales élémentaires (BSU, étude focale)

3.4.1. Résultats après deux ans de traitement

Après deux ans de traitement, pour les trois groupes étudiés, le DMB et la microdureté mesurés dans l'os ancien sont significativement plus élevés que dans l'os récemment formé ($p < 0,0001$ pour toutes les comparaisons). Ceci montre que les différences de DMB et microdureté existant entre des matrices de maturités différentes sont préservées après deux ans de traitement par l'IBN oral. Mesurés dans le groupe traité par l'IBN quotidien, le DMB et la microdureté de l'os cortical récent sont significativement plus élevés que dans le groupe PLA et 20 mg int, tandis que pour l'os cortical ancien, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le groupe PLA et les deux régimes d'IBN. Dans l'os trabéculaire, le DMB des BSUs récents et anciens est significativement plus haut que pour les groupes PLA et 20 mg int. Toujours dans l'os trabéculaire, la microdureté n'est pas changée de manière significative ni pour l'os récent, ni pour l'os ancien entre les groupes (Tableau 10).

Traitement (2 ans)		PLA	2,5 mg/j	p vs. PLA Scheffe	20 mg int	p vs. PLA Scheffe	p vs. 2,5 mg/j Scheffe
Os cortical							
DMB (g/cm ³)	BSU récent	0,986 (0,118)	1,044 (0,090)	<0,0001	1,012 (0,117)	0,1454	0,0377
	BSU ancien	1,178 (0,100)	1,184 (0,068)	0,8364	1,155 (0,099)	0,1113	0,0238
Hv (kg/mm ²)	BSU récent	41,116 (4,546)	42,822 (4,363)	0,0031	41,027 (3,825)	0,9843	0,0014
	BSU ancien	52,973 (5,369)	52,998 (5,053)	0,9992	51,607 (5,089)	0,0809	0,0673
Os trabéculaire							
DMB (g/cm ³)	BSU récent	1,044 (0,119)	1,104 (0,088)	<0,0001	1,064 (0,082)	0,2212	0,0019
	BSU ancien	1,193 (0,079)	1,227 (0,089)	0,0031	1,188 (0,077)	0,8903	0,0002
Hv (kg/mm ²)	BSU récent	43,980 (4,426)	44,378 (4,247)	0,7419	43,487 (3,970)	0,6326	0,1868
	BSU ancien	54,276 (4,395)	54,134 (4,860)	0,9682	53,691 (4,278)	0,5723	0,6985

Tableau 10 : Effets de deux ans de placebo (PLA) et d'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int) sur le degré de minéralisation (DMB) et la microdureté (Hv) mesurés à l'échelle de l'unité structurale élémentaire (BSU) du tissu osseux. Résultats exprimés comme moyenne (DS), les différences significatives sont grisées.

La figure 58 montre qu'à l'échelle du BSU, le DMB est corrélé de manière positive et significative ($p < 0,0001$) avec la microdureté osseuse dans l'os cortical et trabéculaire dans les trois groupes de l'étude. Ces corrélations sont hautement significatives mais présentent des dispersions importantes justifiant les valeurs de r^2 comprises entre 0,34 et 0,47 (Fig. 58). L'analyse de la covariance, ou ANCOVA qui permet de comparer des modèles linéaires deux à deux, a mis en évidence que le lien entre DMB et microdureté était significativement différent dans l'os trabéculaire après deux ans d'IBN intermittent par rapport au groupe PLA (Tableau 11).

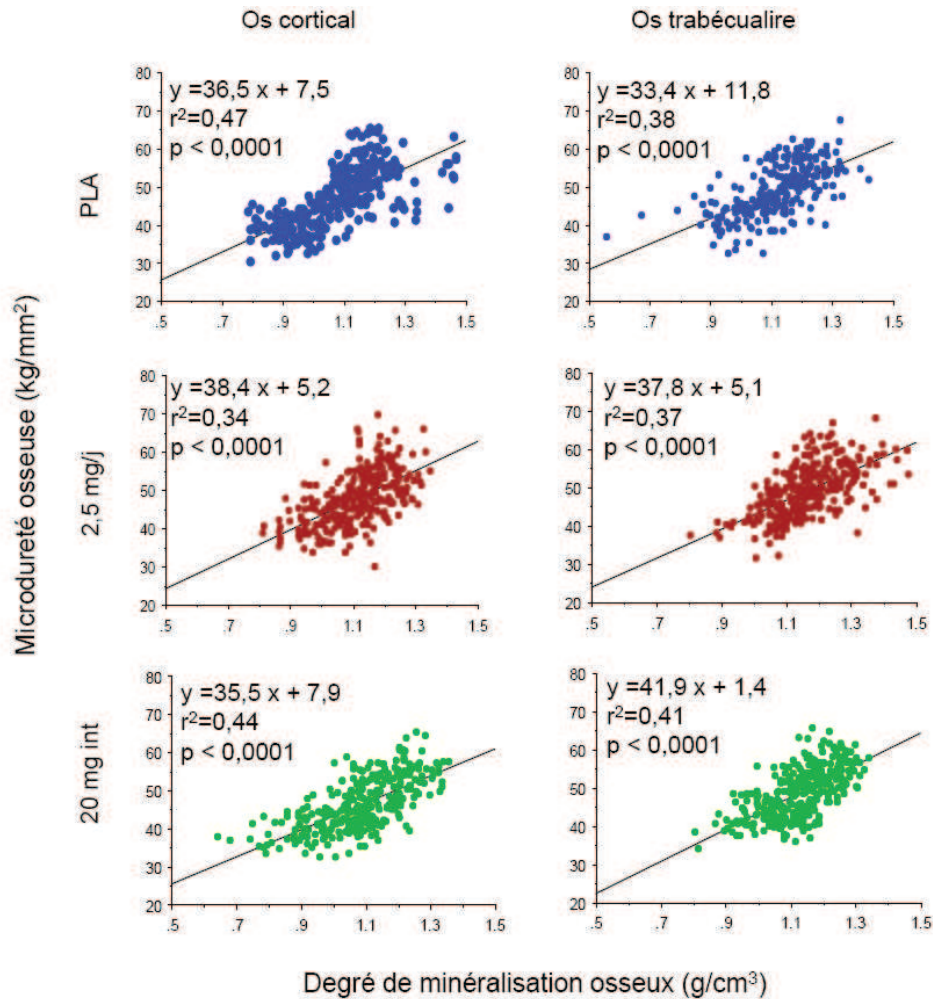


Figure 58 : Corrélations observées entre le degré de minéralisation et la microdureté osseuse mesurés dans les mêmes unités structurales élémentaires après deux ans de traitement par le placebo (PLA) ou l'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int).

Traitement (2 ans)	compartiment osseux	p vs. PLA	p vs. 2,5 mg/j
2,5 mg/j	Cortical	0,6399	-
	Trabéculaire	0,2587	-
20 mg int	Cortical	0,7419	0,4499
	Trabéculaire	0,0327	0,3174

Tableau 11 : Valeurs de p obtenues par le modèle ANCOVA après deux ans de traitement afin de comparer deux à deux les modèles linéaires corrélant le degré de minéralisation et la microdureté osseuse. Les valeurs significatives sont grisées.

3.4.2. Résultats après trois ans de traitement

Comme après 2 ans, après 3 ans de traitement l'os ancien est systématiquement plus minéralisé et plus dur que l'os récent ($p < 0,0001$ pour tous les groupes et compartiments osseux). Ceci montre qu'après 3 ans d'IBN oral, il existe toujours des matrices de maturités différentes avec des propriétés micromécaniques significativement différentes, allant dans le sens d'un tissu osseux hétérogène. A l'échelle du BSU, peu de différences existent entre les groupes pour un compartiment osseux donné. Ainsi, par rapport au groupe PLA, seul le DMB mesuré dans l'os trabéculaire récent du groupe traité par l'IBN intermittent présente une valeur significativement plus élevée (Tableau 12). Lorsque l'on compare les deux différents régimes d'IBN on note que les DMB corticaux et trabéculaires des BSUs récents et anciens sont significativement plus hauts que ceux mesurés pour le régime quotidien. Ces résultats reflètent la tendance observée au niveau tissulaire, à savoir qu'après trois ans, il existe une tendance à la diminution du DMB dans le groupe 2,5 mg/j par rapport aux groupes PLA et 20 mg int (Fig. 56).

Traitement (3 ans)		PLA	2,5 mg/j	p vs. PLA Scheffe	20 mg int	p vs. PLA Scheffe	p vs. 2,5 mg/j Scheffe
Os cortical							
DMB (g/cm ³)	BSU récent	1,021 (0,102)	0,998 (0,112)	0,1089	1,036 (0,126)	0,4415	0,0060
	BSU ancien	1,193 (0,087)	1,159 (0,077)	0,0011	1,203 (0,122)	0,6108	<0,0001
Hv (kg/mm ²)	BSU récent	42,075 (4,852)	42,162 (4,794)	0,9827	42,947 (4,885)	0,2423	0,3102
	BSU ancien	54,036 (5,988)	52,790 (5,348)	0,0819	54,649 (6,025)	0,6106	0,0100
Os trabéculaire							
DMB (g/cm ³)	BSU récent	1,068 (0,090)	1,062 (0,079)	0,8494	1,105 (0,127)	0,0135	0,0006
	BSU ancien	1,198 (0,065)	1,188 (0,072)	0,6180	1,216 (0,115)	0,2320	0,0152
Hv (kg/mm ²)	BSU récent	44,576 (4,405)	43,319 (4,252)	0,0467	44,730 (4,403)	0,9613	0,0175
	BSU ancien	53,636 (4,162)	53,947 (4,657)	0,8283	54,097 (4,045)	0,7057	0,9557

Tableau 12 : Effets de trois ans de placebo (PLA) et d'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int) sur le degré de minéralisation (DMB) et la microdureté (Hv) mesurés à l'échelle de l'unité structurale élémentaire (BSU) du tissu osseux. Résultats exprimés comme moyenne (DS), les différences significatives sont grisées.

Après 3 ans, comme après 2 ans le DMB et la microdureté sont corrélés de manière positive et significative dans tous les compartiments osseux et dans les 3 groupes de l'étude (Fig. 59). Les corrélations entre DMB et microdureté sont toutes hautement significatives ($p < 0,0001$) avec cependant une dispersion marquée des points autour du modèle prédictif, justifiant les coefficients de corrélation modérés compris 0,29 et 0,48 (Fig. 59). L'analyse ANCOVA montre que les modèles linéaires décrivant la liaison entre DMB et microdureté sont significativement différents dans l'os trabéculaire des deux régimes d'IBN oral par rapport au groupe traité PLA. De plus, entre les deux régimes d'IBN, le lien entre DMB et microdureté est significativement différent, pour l'os cortical et trabéculaire (Tableau 13).

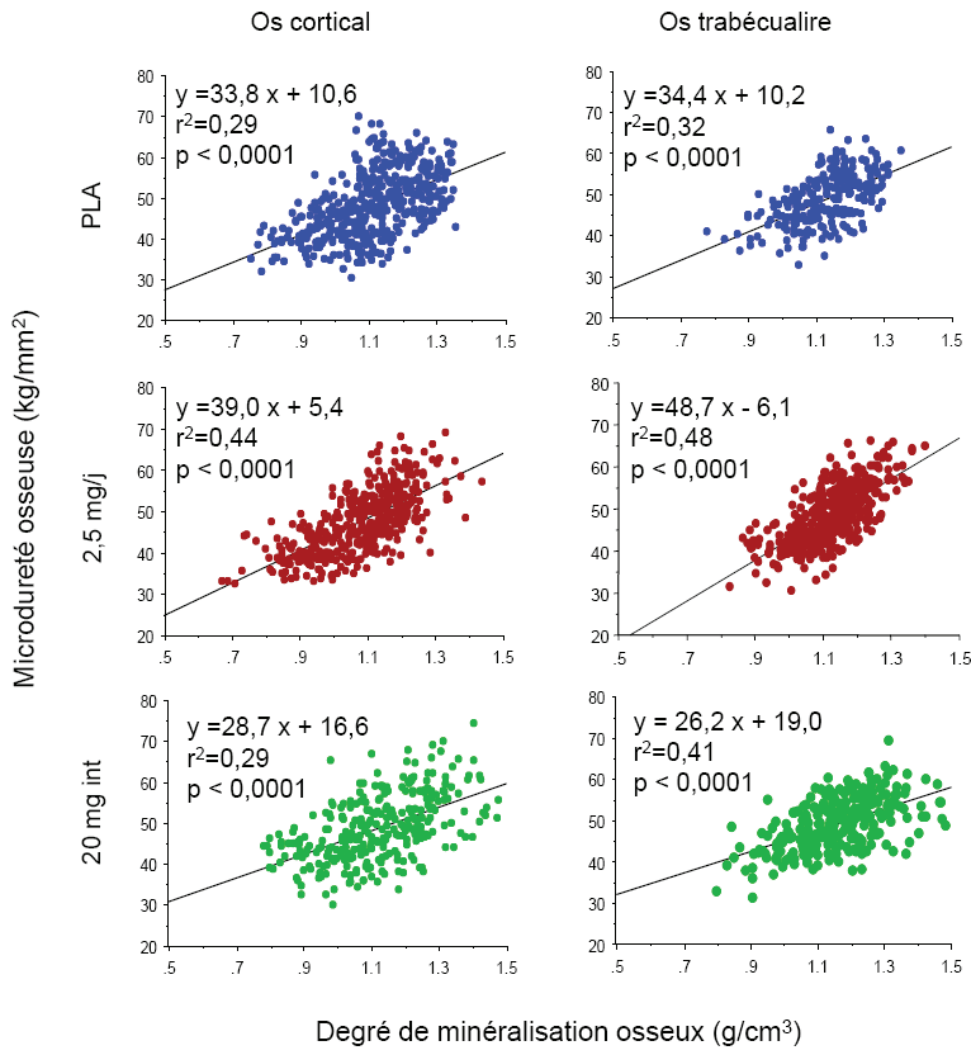


Figure 59 : Corrélations observées entre le degré de minéralisation et la microdureté osseuse mesurés dans les mêmes unités structurales élémentaires après trois ans de traitement par le placebo (PLA) ou l'ibandronate oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int).

Traitement (3 ans)	compartiment osseux	p vs. PLA	p vs. 2,5 mg/j
2,5 mg/j	Cortical	0,1200	-
	Trabéculaire	0,0070	-
20 mg int	Cortical	0,1728	0,0019
	Trabéculaire	0,0467	<0,0001

Tableau 13 : Valeurs de p obtenues par le modèle ANCOVA après trois ans de traitement afin de comparer deux à deux les modèles linéaires corrélant le degré de minéralisation et la microdureté osseuse. Les valeurs significatives sont grisées.

3.4.3. Résumé des résultats de l'étude focale

Les mesures réalisées à l'échelle du BSU ont permis de mettre en évidence que l'utilisation de l'IBN oral pendant 2 ou 3 ans maintenait une différence significative de DMB et de microdureté entre une matrice répondant aux critères morphologiques d'une région récemment formée et d'une région plus ancienne. L'activité antirésorptive de l'IBN ne semble pas altérer l'hétérogénéité de la minéralisation secondaire et la microdureté osseuse. Ceci va dans le sens des résultats obtenus au niveau global. La corrélation entre le degré de minéralisation et la microdureté mesurés dans les mêmes BSUs est significative pour tous les compartiments osseux, et ce, dans les trois groupes de patientes. Cependant, l'analyse statistique montre que le lien entre ces deux variables de la qualité osseuse peut être différent en fonction du traitement.

4. Discussion

Dans le but de comprendre comment l'ibandronate oral, administré de manière quotidienne ou intermittente, agit sur la qualité osseuse intrinsèque, le degré de minéralisation et la microdureté ont été mesurés dans des biopsies de patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique issues de l'étude BONE. Mon étude est la première à avoir évalué la minéralisation et la microdureté osseuse à deux niveaux de l'organisation structurale de l'os, le tissu osseux et le BSU. A l'échelle du tissu osseux le DMB et l'index d'hétérogénéité étaient préservés après 2 et 3 ans de traitement par l'IBN par rapport au placebo. Cependant, la distribution des valeurs de DMB tendait à être déplacée vers les valeurs plus élevées dans les groupes traités par l'IBN. Malgré l'absence de modifications significatives de la minéralisation, la microdureté globale était augmentée dans les groupes traités par l'IBN par rapport au placebo, suggérant un changement dans la corrélation de ces deux variables. L'étude réalisée à l'échelle du BSU a permis de confirmer que l'IBN pouvait induire une modulation de la corrélation entre ces variables par rapport aux résultats obtenus dans le groupe placebo. Au niveau tissulaire aucune différence n'a été constatée entre les modes d'administration de l'IBN, quotidien ou intermittent, montrant l'intérêt de l'utilisation d'un régime intermittent avec une période sans prise > à 2 mois.

Les antirésorptifs, en ralentissant l'activité du remodelage osseux, prolongent la durée de la minéralisation secondaire et augmentent ainsi le DMB moyen mesuré au niveau tissulaire. Ce modèle reliant l'activité du remodelage osseux au contenu minéral tissulaire a été vérifié dans le cas de l'ALN. En effet, 2 ans d'ALN oral (10 mg/j) diminuaient significativement l'Ac.F de 87% ($p < 0,0001$) par rapport au placebo (Chavassieux *et al.* 1997), conduisant à une augmentation significative du DMB de l'os total de 8% ($p = 0,0026$) (Boivin *et al.* 2000). Par la suite, il a été montré qu'une diminution plus modérée de l'Ac.F conduisait à un DMB plus faiblement augmenté. Ainsi avec le raloxifène oral 120 mg/j (un SERM utilisé dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique), après 2 ans de traitement, l'Ac.F était diminué de 55% (Ott *et al.* 2002) et conduisait à une augmentation non significative du DMB de 5% (Boivin *et al.* 2003). Ces résultats suggéraient une corrélation directe entre l'activité du remodelage osseux tissulaire mesurée par histomorphométrie et le degré de minéralisation. Cette corrélation a été mise en évidence dans le cas du traitement par le risedronate oral 5 mg/j (un autre bisphosphonate

commercialisé) où l'étendue des surfaces en cours de minéralisation (MS/BS) était inversement corrélée à la densité minérale tissulaire (Borah *et al.* 2005). La présente étude montre que le régime quotidien d'IBN oral, après 2 ans, conduit à une diminution significative de l'Ac.F de 70% ($p = 0,0169$) et à une augmentation non significative du DMB de 4%. L'absence de modification significative de la minéralisation secondaire sous IBN pourrait donc être liée à sa capacité modérée à diminuer l'Ac.F (Recker *et al.* 2004b).

Il convient aussi de souligner que dans les études précédentes, si toutes les patientes recevaient un supplément calcique, toutes ne recevaient pas un supplément en vitamine D. Or, un supplément en calcium et en vitamine D stimule la minéralisation osseuse. L'étude menée sur l'effet du raloxifène mettait en évidence qu'après 2 ans, le supplément en calcium et en vitamine D administré (500 mg et 400-600 UI par jour, respectivement) dans le groupe placebo était responsable, après deux ans de traitement d'une augmentation du DMB de l'os total de 4,98%. L'augmentation observée dans le groupe traité par le raloxifène était de 5,26% (Boivin *et al.* 2003). Dans l'étude BONE, toutes les patientes ont reçu un supplément en calcium et vitamine D, autrement dit, l'effet de l'IBN sur le DMB pourrait être masqué par l'effet lié à cette supplémentation. Ceci semble cohérent dans la mesure où, pour 22 femmes ostéoporotiques non traitées âgées de 68 ± 5 ans issues d'une étude précédente, le DMB de l'os total était de $1,03 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$ (Boivin *et al.* 2003) alors qu'après 2 ans de supplément en calcium et vitamine D les résultats de la présente étude montre une valeur de $1,09 \pm 0,14 \text{ g/cm}^3$. Malheureusement, l'étude BONE étant transversale, elle ne permet pas de calculer la part d'augmentation du DMB liée aux suppléments par rapport à celle induite par le traitement.

La diminution modérée de l'Ac.F peut être liée à la dose faible d'IBN donnée au cours de des régimes. En effet, le régime quotidien produit une exposition annuelle cumulée (ACE pour Annual Cumulative Exposure) de 912,5 mg et le régime intermittent de 960 mg. Or, la dose utilisée aujourd'hui en clinique dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique est de 150 mg par mois, produisant une ACE de 1800 mg. L'ACE de la présente étude correspond donc à la moitié de celle utilisé actuellement en clinique. De plus, il a été montré que l'IBN oral réduisait l'activité du remodelage osseux de manière dose dépendante. Après 1 an de traitement à 1 mg/j, le taux de CTX urinaire était diminué de 50% par rapport au dosage à l'inclusion dans l'étude, la dose de 2,5 mg/j diminuait ce taux de 80% (Ravn *et al.* 1996). L'étude MOBILE a montré la supériorité statistique de la dose de 150 mg mensuel par rapport au régime quotidien, quant à l'inhibition du remodelage osseux après 1 ou 2 ans de traitement (Miller *et al.* 2005; Reginster *et al.* 2006a). L'IBN oral quotidien ou intermittent permet donc, même avec une faible ACE, de maintenir le DMB dans la gamme définie par une population de femmes avant la ménopause. Le ralentissement du remodelage osseux dans ce cas, produit un décalage de la distribution de la minéralisation vers les plus hautes valeurs de DMB, mais il est insuffisant pour modifier significativement le DMB moyen et l'hétérogénéité de la minéralisation au niveau tissulaire. Ces résultats sont aussi cohérents avec les observations précliniques réalisées chez la chienne OHX qui montraient que seules les doses les plus importantes d'IBN produisaient une augmentation significative du degré de minéralisation au niveau iliaque (Monier-Faugere *et al.* 1999).

L'inhibition modérée de l'activité du remodelage osseux par l'IBN administré avec une ACE faible, laisse supposer une activité de formation osseuse, qui peut expliquer non seulement l'absence d'une augmentation significative du DMB mais aussi la tendance à l'augmentation de la masse osseuse qui a été rapportée pour la même population de patientes. L'étude histomorphométrique des mêmes biopsies révèle une tendance à l'augmentation du BV/TV, du Tb.N, du Tb.Th et à la diminution du Tb.Sp après traitement par l'IBN par rapport au groupe traité par le placebo (Recker *et al.* 2004b). Cette tendance a été confirmée par la suite en histomorphométrie 3D (Recker *et al.* 2009). Ainsi, l'augmentation de la BMD rapportée pour les doses utilisées dans la présente étude (Chesnut *et al.* 2004) pourrait être le résultat d'une combinaison associant une tendance à l'augmentation du DMB et une tendance à l'augmentation de la masse osseuse. Ce mécanisme est différent de celui proposé pour l'ALN qui, en diminuant de façon drastique l'activité du remodelage osseux augmente de manière significative le DMB et n'influence pas le BV/TV et les autres paramètres décrivant la microarchitecture osseuse (Chavassieux *et al.* 1997; Boivin *et al.* 2000). Dans ce dernier cas, l'augmentation de la BMD était due uniquement expliquée par l'augmentation du contenu minéral tissulaire.

Notre étude a montré que si la minéralisation secondaire n'était pas modifiée par le traitement par l'IBN, la microdureté osseuse était significativement augmentée. Ceci suggère une dissociation des deux paramètres qui ont été à de nombreuses reprises montré comme étant fortement corrélés (Carlstrom 1954; Amprino 1958; Weaver 1966; Boivin *et al.* 2008; Bala *et al.* 2010b). Plus récemment, il a été montré que si la microdureté était majoritairement expliquée par le degré de minéralisation osseux, la matrice organique jouait un rôle non négligeable qui pourrait expliquer jusqu'à un tiers de la microdureté osseuse (Boivin *et al.* 2008). L'augmentation de la microdureté pourrait donc être partiellement expliquée par l'augmentation d'une variable indépendante du DMB comme, la maturité et/ou la qualité de la matrice organique et/ou de l'ultrastructure minérale (maturité et cristallinité). Cette hypothèse est renforcée par la corrélation obtenue entre microdureté, activité du remodelage osseux et DMB alors que le DMB n'était pas significativement corrélé à l'activité du remodelage. De plus, on sait que l'IBN peut aussi bien avoir une action sur la cristallinité que sur la maturité de la matrice organique. En effet, l'étude préclinique conduite chez la chienne OHX mettait en évidence que l'IBN s.c. quotidien à la dose de 4,1 µg/kg augmentait significativement la cristallinité (Monier-Faugere *et al.* 1999). Plus récemment, il a été montré chez la femme ostéoporotique, qu'un an d'IBN oral quotidien (2,5 mg/j) ou intermittent (20 mg int) diminuait significativement le ratio des isomères α -CTX / β -CTX de 38% par rapport au placebo et de 50% par rapport au ratio mesuré à l'inclusion (Byrjalsen *et al.* 2008). Ceci indique que l'IBN induit une maturation du collagène pour les ACE et les régimes identiques à ceux utilisés dans l'étude BONE.

Ce travail a pour la première fois inclus dans une étude clinique, des investigations réalisées à l'échelle du BSU pour évaluer l'influence d'un traitement sur les liens entre deux variables de la qualité osseuse intrinsèque. Après un traitement par l'IBN oral, les différences de DMB et de microdureté entre l'os récent et l'os ancien étaient préservées. Ces différences étaient comparables à celles préalablement mesurées dans une population contrôle non traitée (Boivin *et al.* 2008). Le traitement par l'IBN oral n'aboutit donc pas à une homogénéisation des propriétés de la matrice osseuse. Si la corrélation entre DMB et microdureté était confirmée dans tous les

groupes et tous les compartiments osseux, le modèle linéaire liant ces deux variables pouvait être, après traitement par l'IBN, significativement différent du modèle observé dans le groupe placebo. Ce résultat indique donc, que pour une valeur donnée de DMB, la variation attendue de microdureté va être différente en fonction du groupe observé. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus à l'échelle du tissu, à savoir que l'IBN augmente significativement la microdureté indépendamment des modifications de la minéralisation.

L'effet antifracturaire de l'IBN est clairement établi pour des ACE faibles et indique une amélioration de la résistance mécanique osseuse à l'échelle de l'organe (Chesnut *et al.* 2004). En considérant la structure multi échelle de l'os, notre étude montre qu'au niveau tissulaire, contrairement à l'hypothèse initiale et aux observations faites pour d'autres bisphosphonates (Boivin *et al.* 2000; Borah *et al.* 2005), l'effet de l'IBN sur la minéralisation secondaire n'explique pas cette amélioration. Cependant, l'augmentation de la microdureté moyenne à cette même échelle pourrait être impliquée dans l'amélioration de la résistance à la fracture. La microdureté mesurée dans les mêmes conditions dans de l'os trabéculaire de calcanei humains était corrélée positivement avec le module élastique apparent et tendait à l'être avec la force à rupture ($p=0,065$) obtenus en compression uniaxiale sur des cubes d'os adjacents (Boivin *et al.* 2008).

Notre étude comporte des limites, la première étant la dose utilisée dont l'ACE pour le régime continu et intermittent correspond à la moitié de l'ACE de la dose clinique utilisée actuellement dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique (150 mg oral par mois). Ceci limite donc l'inférence de nos résultats dans l'interprétation des résultats obtenus chez des femmes traitées hors protocole clinique. Cependant, notre étude montre que même une ACE basse conduit à une amélioration significative des propriétés micromécaniques du tissu osseux. L'étude BONE, dans sa construction transversale ne permet pas non plus de tester l'effet de la durée du traitement. Il existe aussi une limite technique concernant la mesure des variables de la minéralisation par microradiographie dans l'os trabéculaire. La quantification du DMB a été établie pour une épaisseur de tissu osseux de 100 μm . Or, les travées peuvent être considérées schématiquement comme des cylindres de diamètre maximal compris entre 120 et 150 μm . Un échantillon de 100 μm d'épaisseur peut donc présenter, en fonction du plan de coupe, des zones de tissu osseux trabéculaire d'une épaisseur inférieure à 100 μm pourrait fausser partiellement les corrélations entre le DMB trabéculaire et les autres variables. L'étape de seuillage décrite dans le protocole de mesure permet de diminuer ce biais potentiel.

5. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que 2 et 3 ans d'ibandronate orale quotidien ou intermittent avec une exposition annuelle cumulée faible, augmentaient la microdureté du tissu osseux tout en préservant la minéralisation et son hétérogénéité. L'analyse à l'échelle de l'unité structurale élémentaire suggère que l'ibandronate pourrait agir sur la matrice organique ou l'ultrastructure minérale, ce qui pourrait expliquer cette dissociation apparente entre le degré de

minéralisation et la microdureté tissulaire. L'augmentation de la microdureté couplée à la préservation de la densité minérale tissulaire pourrait contribuer à l'effet antifracturaire de l'ibandronate. Cette étude confirme aussi l'intérêt du régime intermittent qui produit des effets osseux comparables au régime quotidien tout en présentant un délai supérieur à 2 mois entre 2 doses successives. Afin de préciser les résultats obtenus et les hypothèses soulevées, le rôle respectif de la minéralisation et de la qualité de la matrice organique devra être analysé dans les biopsies de l'étude BONE ainsi que dans des biopsies de patientes ayant été traitées par la dose clinique de 150 mg par mois. Ce travail a aussi mis en évidence, l'utilité et la faisabilité de la microindentation dans la mesure d'une variable micromécanique dans le contexte d'études cliniques impliquant un grand nombre de biopsies.

Partie 2

- Travaux personnels -

Chapitre 6

Etude des effets osseux de l'utilisation prolongée de l'alendronate oral dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique

1.	Introduction.....	159
2.	Matériel et méthodes.....	160
2.1.	Sujets analysés et prélèvements osseux.....	160
2.2.	Protocole technique.....	161
2.3.	Indentation instrumentée.....	162
2.3.1.	Protocole expérimental.....	164
2.3.2.	Variables obtenues par indentation instrumentée.....	165
2.4.	Microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIRM).....	169
2.4.1.	Principe.....	169
2.4.2.	Obtention des spectres.....	170
2.4.3.	Variables obtenues par FTIRM.....	171
2.5.	Analyse statistique.....	173
2.5.1.	Etude tissulaire.....	173
2.5.2.	Etude à l'échelle du BSU.....	174
3.	Résultats.....	174
3.1.	Etude au niveau tissulaire.....	174
3.1.1.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur l'activité du remodelage osseux.....	174
3.1.2.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la minéralisation osseuse.....	175
3.1.3.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la microdureté osseuse.....	178
3.1.4.	Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur les caractéristiques nanostructurales de la matrice osseuse mesurées par FTIRM.....	179
3.1.5.	Effets de la durée d'un traitement par l'ALN oral.....	181
3.1.6.	Résumé des résultats de l'étude au niveau tissulaire.....	182

3.2.	Etude à l'échelle du BSU.....	183
3.2.1.	Caractérisation des propriétés microstructurales et micromécaniques chez des patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique non traitées.....	183
3.2.1.1.	Rôle du degré de minéralisation dans les propriétés micromécaniques de l'os cortical.....	189
3.2.1.2.	Rôle de la qualité du minéral et du collagène dans le comportement micromécanique.....	189
3.2.2.	Effets d'un traitement prolongé par l'alendronate oral sur les propriétés microstructurales et micromécaniques à l'échelle du BSU.....	193
4.	Discussion.....	201
5.	Conclusion.....	214

Chapitre 2

Etude des effets osseux de l'utilisation prolongée de l'alendronate oral dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique.

1. Introduction

La qualité osseuse est largement dépendante de l'activité du remodelage osseux, c'est pour cela qu'il a été suggéré qu'une suppression prolongée des remodelages ciblé et non ciblé pourrait altérer la qualité et les compétences mécaniques du tissu osseux. Dans le contexte de l'ostéoporose ménopausique, un traitement de 3 ans avec l'ALN oral diminue de 90% l'activité du remodelage osseux (Chavassieux *et al.* 1997). Ceci conduit à une augmentation du degré de minéralisation qui reflète quasi exclusivement l'augmentation de BMD observée à l'échelle de l'organe (Boivin *et al.* 2000). Des travaux réalisés chez l'animal ont montré que l'utilisation de l'ALN pouvait conduire à une accumulation de microdommages et à des altérations de la matrice organique (Mashiba *et al.* 2000; Allen *et al.* 2006; Boskey *et al.* 2009; Gourion-Arsiquaud *et al.* 2010). L'utilisation de l'ALN induit aussi une homogénéisation des propriétés minérales et organiques, du niveau tissulaire au niveau de la nanostructure, qui pourrait avoir un effet délétère sur la résistance osseuse (Boskey *et al.* 2009; Gourion-Arsiquaud *et al.* 2010). Cependant, de nombreuses études montrent l'efficacité de l'ALN dans la diminution du risque de fractures ostéoporotiques, et ce, même après 10 ans d'utilisation (Black *et al.* 2006; Schwartz *et al.* 2010). Les cas de fragilité osseuse associés à l'utilisation de l'ALN ont une incidence faible et leur mécanisme reste inexpliqué. La littérature récente met en avant que l'augmentation de la BMD, largement responsable de l'amélioration de la résistance mécanique globale, pourrait « masquer » des effets à des échelles plus fines de la structure osseuse (Khosla *et al.* 2007; Shane *et al.* 2010). Cette idée implique non seulement des effets différents en fonction de l'échelle de l'investigation, mais aussi une hiérarchie quant à leur impact sur le comportement mécanique global.

Dans ce contexte, cette partie de ma thèse a eu pour but d'analyser les effets d'un traitement prolongé par l'ALN sur la qualité osseuse intrinsèque à plusieurs niveaux d'organisation du tissu osseux, mais aussi leurs conséquences sur le comportement micromécanique. Cette étude a été réalisée en suivant deux axes principaux définis par l'échelle d'investigation à la base de l'analyse. La première partie s'est focalisée au niveau tissulaire tandis que la deuxième a été basée à l'échelle du BSU. L'utilisation de techniques telles que la microradiographie quantitative, l'indentation Vickers ou instrumentée et la microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier a permis de déterminer les effets de l'ALN du cristal au tissu osseux. L'analyse au niveau du BSU a permis d'établir les liens existant entre les variables de la qualité osseuse intrinsèque et d'aborder l'influence de l'ALN sur ces derniers.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sujets analysés et prélèvements osseux

Trois populations principales ont été définies à partir des biopsies iliaques disponibles au sein de l'équipe « Qualité osseuse et marqueurs biologiques » de l'unité INSERM 1033. Vingt-deux femmes souffrant d'ostéoporose ménopausique et n'ayant pas reçu de traitement anti-ostéoporotique (groupe PMOP). Seize femmes souffrant d'ostéoporose ménopausique traitées pendant 3 ans par de l'ALN oral 10 mg/jour (groupe ALN_{3ans}) et 32 femmes hors protocole clinique souffrant d'ostéoporose ménopausique et traitées en moyenne durant 6,4 ans par de l'ALN oral 10 mg/jour ou 70 mg/semaine.

- Groupe PMOP (n=22)

Le groupe PMOP est issu d'une population de femmes recrutées pour une grande étude de phase III, l'étude MORE visant à étudier les effets sur le risque de fracture du raloxifène (Ettinger *et al.* 1999). Cette étude a été réalisée sur des paires de biopsies obtenues avant et après traitement. Nos 22 prélèvements osseux correspondent aux biopsies réalisées avant traitement sur le groupe randomisé pour recevoir le traitement par le raloxifène oral 60 mg/jour (Ott *et al.* 2002; Boivin *et al.* 2003). Les patientes étaient ménopausées depuis au moins 2 ans. Elles présentaient une BMD lombaire et/ou à la hanche avec un T-score $\leq -2,5$, ou au moins deux fractures vertébrales radiographiques (diminution de la taille d'une vertèbre $>$ à 25% de la taille moyenne). Les critères d'exclusion principaux étaient : une immobilisation prolongée, une pathologie du métabolisme osseux, un contexte endocrinologique nécessitant un traitement hormonal, l'utilisation d'œstrogène, de progestérone ou d'androgène au cours des 6 mois précédant l'étude (Ettinger *et al.* 1999). L'âge moyen de cette population était de $69,4 \pm 5,5$ ans et le BV/TV moyen mesuré par histomorphométrie 2D sur les biopsies iliaques était de $17,2 \pm 3,5\%$ (Ott *et al.* 2002).

- Groupe ALN_{3ans} (n=16)

Le groupe ALN_{3ans} est issu d'une population de femmes recrutées pour une étude phase III, l'étude FIT visant à étudier les effets sur le risque fracturaire de l'ALN oral 10 mg/jour (Lieberman *et al.* 1995). Les patientes de cette étude avaient au moins une fracture vertébrale à l'inclusion dans l'étude, étaient âgées de 45 à 80 ans, ménopausées depuis 5 ans ou plus et présentant un T-score $\leq -2,5$ à la colonne lombaire. Nos 16 prélèvements sont issus du groupe de patientes randomisées dans le bras 10 mg d'ALN oral par jour qui ont accepté de subir après 3 ans de traitement une biopsie osseuse iliaque (Chavassieux *et al.* 1997; Boivin *et al.* 2000). Les critères d'exclusion principaux étaient : une pathologie ou un traitement connu pour altérer le métabolisme osseux ou une déficience en vitamine D (Lieberman *et al.* 1995). L'âge moyen de ce groupe était de $63,6 \pm 1,4$ ans et le BV/TV moyen mesuré par histomorphométrie 2D était de $16,6 \pm 5,8\%$ (Chavassieux *et al.* 1997). Ces prélèvements osseux ayant été transférés chez Merck Sharp & Dohme au cours de l'investigation, seul la minéralisation a pu être analysée par microradiographie quantitative.

- Groupe ALN_{LT} (n=32)

Le groupe ALN_{LT} correspond à une population de femmes ménopausées depuis au moins 5 ans, hors protocole clinique, souffrant d'ostéoporose ménopausique, traitées en moyenne $6,4 \pm 2,0$ ans (gamme 3-10 ans) avec de l'ALN oral (10 mg par jour ou 70 mg hebdomadaire). Ce groupe d'âge moyen $70,4 \pm 8,6$ ans a été recruté dans le cadre d'une étude visant à déterminer si un traitement prolongé par l'ALN conduisait à une accumulation de microdommages (Chapurlat *et al.* 2007). Dans cette population, 18 patientes avaient au moins une fracture ostéoporotique (3 à la hanche, 15 au niveau vertébral) avant traitement. Vingt-quatre de ces patientes ont reçu leur traitement durant au moins 5 ans. Les critères d'exclusion de cette étude sont comparables à ceux des études mentionnés pour les deux autres groupes (Chapurlat *et al.* 2007). Pour résumer, ces critères ont été la présence d'une maladie métabolique autre que l'ostéoporose ménopausique ; l'utilisation d'un traitement différent de l'ALN reconnu pour interférer avec le métabolisme squelettique comme les œstrogènes, les SERMs, la calcitonine, de fortes doses de glucocorticoïdes, l'héparine ou encore un traitement anticonvulsant au cours des 6 derniers mois ; une hyperparathyroïdie non contrôlée ; tout autre pathologie ou trouble qui selon le praticien aurait pu compromettre la bonne prise de l'ALN ou interférer avec les variables d'intérêt ; un abus de drogue ou d'alcool dans les cinq dernières années ; une allergie connue aux tétracyclines ou à la novocaïne ; une modification de la morphologie de la hanche ne permettant pas la réalisation d'une biopsie iliaque.

Toutes les patientes de ces trois groupes ont reçu avant la réalisation de la biopsie iliaque un double marquage par les tétracyclines, permettant d'analyser par histomorphométrie l'activité du remodelage osseux au niveau tissulaire. Tous les prélèvements osseux ont été fixés, déshydratés et inclus dans une résine de MMA, suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent (Fig. 49, p.128-129).

2.2. Protocole technique

Cette étude est divisée en deux parties utilisant soit des techniques déjà décrites dans le chapitre précédent (histomorphométrie osseuse, microradiographie ou encore microdurimétrie), soit des techniques mises en place spécifiquement pour cette partie et qui seront introduites ci-après (Fig. 60).

Dans la première partie de l'étude réalisée à l'échelle tissulaire, les biopsies incluses en bloc ont été coupées à 100 μm d'épaisseur pour la microradiographie quantitative (p.129) et à 2 μm d'épaisseur pour la FTIRM. Les coupes de 2 μm d'épaisseur ont été obtenues en utilisant un microtome lourd Polycut E (Leica, Wetzlar, Allemagne). Les blocs restants ont été polis en surface pour permettre la mesure de la microdureté Vickers globale (à l'échelle tissulaire). Les valeurs des variables histomorphométriques ont été obtenues auprès des investigateurs en charge de leur mesure (Fig. 60).

La deuxième partie de l'étude a permis de caractériser les propriétés microstructurales et le comportement micromécanique de populations de BSUs corticaux (ostéons et tissu interstitiel). Cette étude a eu comme matériel de départ les coupes de 100 μm d'épaisseur microradiographiées pour l'étude tissulaire (Fig. 60). Les microradiographies ont permis de sélectionner les BSUs en fonction de leur DMB pour les investigations suivantes. Le but étant d'observer de quelle manière un traitement prolongé par l'ALN oral allait influencer les propriétés de la matrice osseuse et les liens entre ces différentes propriétés, les BSUs ont été sélectionnés pour représenter une gamme de valeurs de DMB la plus large possible. Les coupes à 100 μm ont ensuite été collées sur des plots en aluminium de 30 mm de diamètre correspondant au porte objet du Nano Indenter II. Le collage a été réalisé avec de la Technovit 3040 jaune (Heraeus, Kluzer GmbH, Hanau, Allemagne). Cette résine est suffisamment rigide pour ne pas créer un milieu tampon avec une contribution mécanique entre l'échantillon et le plot d'aluminium. De plus, elle est la seule parmi les différentes solutions testées (résine epon A+B, colle epoxy, colle cyanoacrylate, colle araldite, cire d'abeille, colle à bois, technovit verte) à permettre le décollage du plot sans destruction de la coupe. Les BSUs choisis en fonction de leur DMB ont ensuite été testés mécaniquement par indentation instrumentée. Les coupes ont été décollées puis recollées sur des plots de MMA, pour être recoupées à 2 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome Polycut E (Leica, Wetzlar, Allemagne). Les BSUs indentés ont été localisés sur les coupes à 2 μm et ont été analysés par FTIRM. La difficulté à conserver l'intégrité des coupes de 100 μm d'épaisseur au cours des différentes étapes (collage, décollage, recoupes), justifie la différence des nombres de zones analysées entre les différentes techniques (Fig. 60).

2.3. Indentation instrumentée

L'indentation instrumentée a été utilisée pour caractériser le comportement mécanique de la matrice osseuse à l'échelle du BSU. Les BSUs à indenter (ostéon plus os interstitiel) ont été choisis à partir des microradiographies, ainsi, par échantillon ont été testés sur les coupes à 100 μm microradiographiées (Fig. 60). Les BSUs ont été sélectionnés en fonction de leur DMB pour évaluer une gamme de minéralisation la plus large possible, le but étant d'étudier les liens entre les propriétés de la microstructure et le comportement mécanique et l'effet sur ces derniers d'un traitement prolongé par l'ALN.

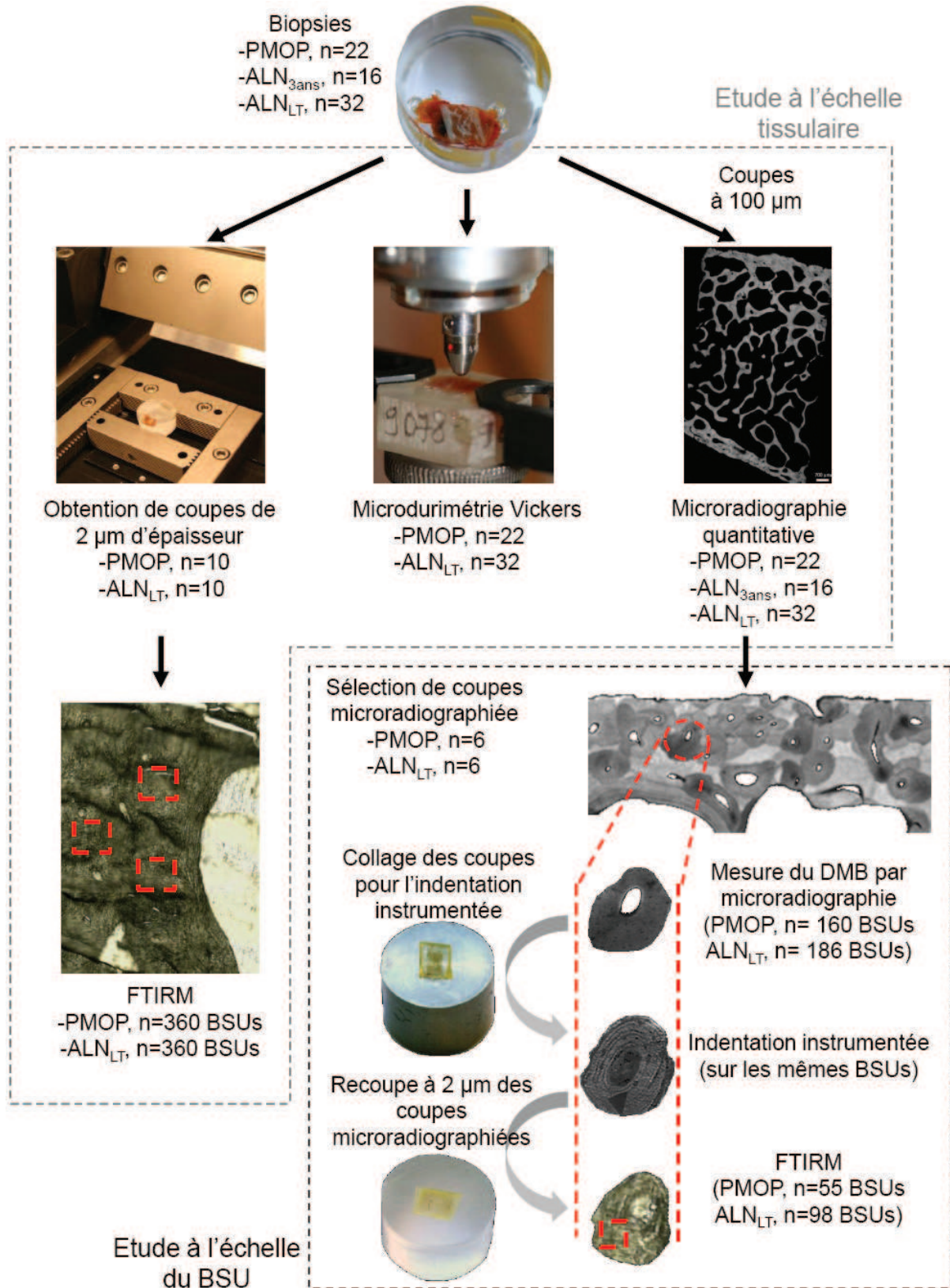


Figure 60 : Schéma décrivant le protocole technique de l'étude des effets osseux d'un traitement prolongé par l'alendronate à l'échelle tissulaire et à l'échelle du BSU.

2.3.1. Protocole expérimental

Les essais ont été réalisés avec un nanoindenteur Nano Indenter II (Nano Instruments inc., Knoxville, TN, USA) équipé d'un indenteur Berkovich (Pyramide à base triangulaire). La machine était calibrée suivant les recommandations publiées par Oliver & Pharr avec un échantillon de silice fondue (Oliver et Pharr 1992). La procédure d'indentation a été spécialement développée pour nos essais pour atteindre une profondeur de 5 μm , comparable à celle atteinte en microdurimétrie Vickers. Le choix d'une profondeur élevée pour ce type d'essai permet de tester plusieurs lamelles de tissu osseux et donc de s'affranchir de l'hétérogénéité de structure décrite à l'échelle lamellaire (Ascenzi et Bonucci 1968; Giraud-Guille 1988; Weiner *et al.* 1999), et de pouvoir considérer ce dernier comme un matériau homogène. Au cours de la procédure, l'indenteur était piloté en déplacement pendant les phases de chargement / déchargement et en effort pendant les phases de maintien conformément au protocole suivant, où lorsque l'objectif de chaque phase est atteint le système passe automatiquement à la phase suivante (Fig. 61) :

- Phase de recherche du point de contact entre l'indenteur et la surface de l'échantillon.
- Phase de chargement répartie en 7 segments de charge jusqu'à la profondeur maximale de 5120 nm.
- Phase de maintien de 10 secondes à la charge atteinte à la profondeur maximale pour s'affranchir de la viscosité du matériau testé.
- Phase de retrait de l'indenteur jusqu'à 90% de la décharge totale.
- Phase de maintien de 50 secondes à charge constante permettant la mesure de la dérive thermique.
- Phase de décharge totale.

Les essais ont été réalisés en mode CSM (Continuous Stiffness Mode) afin de contrôler les variables mesurés en temps réel au cours de la descente de l'indenteur. Ce mode implique durant les 7 segments de charge l'ajout d'un signal sinusoïdal de 45 Hz de fréquence et de 1,2 μN d'amplitude. Ce signal permet au cours de la charge un petit retrait de l'indenteur à partir duquel est calculé la Stiffness (S donné par la machine) qui permet de remonter au module élastique E et à la dureté de contact H_c en fonction de la position de l'indenteur. Ce mode permet donc d'observer l'évolution des paramètres au cours de l'essai (Fig. 61) et de voir si l'indenteur rencontre sur les 5120 nm de sa course un matériau de composition différente (lacune périostéocytaire ou BSU sous jacent).

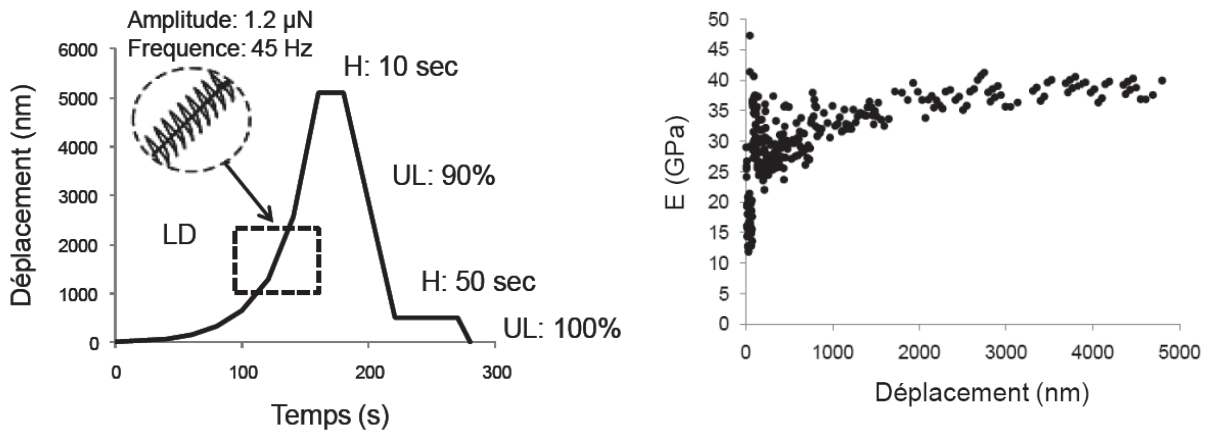


Figure 61 : Procédure d'indentation réalisée sur le tissu osseux en mode CSM (courbe de gauche) avec une phase de charge (LD pour Load), une phase de maintien (H pour Holding) et une phase de décharge (UL pour Unload). La courbe de droite présente l'évolution du module élastique (E) en fonction de la profondeur observée grâce à l'utilisation du mode CSM. Pour l'essai pris en exemple, le tissu osseux est mécaniquement homogène entre 1 et 5 μm .

2.3.2. Variables obtenues par indentation instrumentée

L'essai d'indentation donne pour résultat brut une courbe représentant le déplacement de l'indenteur en fonction de la charge appliquée (Fig. 62). A partir de chaque courbe, il est possible de déduire différentes variables caractérisant le matériau testé. La méthode développée par Oliver & Pharr décrite précédemment permet de calculer le module élastique E ainsi que la dureté de contact H_c , exprimés en GPa (Oliver et Pharr 1992; Oliver et Pharr 2004). Les valeurs ont été extraites des courbes d'indentation grâce à un programme développé avec Matlab R210a (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) au laboratoire Matéis de l'INSA de Lyon. Le module élastique a été calculé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu^2)}{E} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i}$$

Où le module élastique et le coefficient de Poisson de l'indenteur sont $E_i = 1140$ GPa et $\nu_i = 0,07$, respectivement. Le tissu osseux a été supposé isotrope et son coefficient de Poisson a été supposé égal à 0,3 (Zysset *et al.* 1999). Le module d'indentation E_r est donné par la formule :

$$S = \frac{2\beta}{\sqrt{\pi}} \sqrt{A_c E_r}$$

Où A_c est l'aire de contact projetée, β est un coefficient de correction lié à la forme de l'indenteur Berkovich ($\beta = 1,034$) et S est la raideur de contact de l'échantillon. S est calculée comme étant la pente de la tangente initiale du segment de décharge sur la courbe d'indentation.

Cette tangente est définie à partir d'une régression en puissance de la courbe de décharge calculée suivant l'algorithme de Levenberg-Marquart. La dureté de contact H_c est calculée à partir de la relation suivante :

$$H_c = \frac{P_{max}}{A_c} = \frac{P_{max}}{\alpha_1 h_c^2}$$

Où P_{max} est la charge maximale, α_1 une constante géométrique adimensionnelle égale à $\pi \tan^2 \psi$ où ψ est l'angle d'un cône simulant la géométrie de l'indenteur pyramidal. Pour un indenteur de type Berkovich, $\psi = 70,3^\circ$ et la valeur de α_1 associée est de 24,5. h_c correspond à la profondeur de contact à P_{max} .

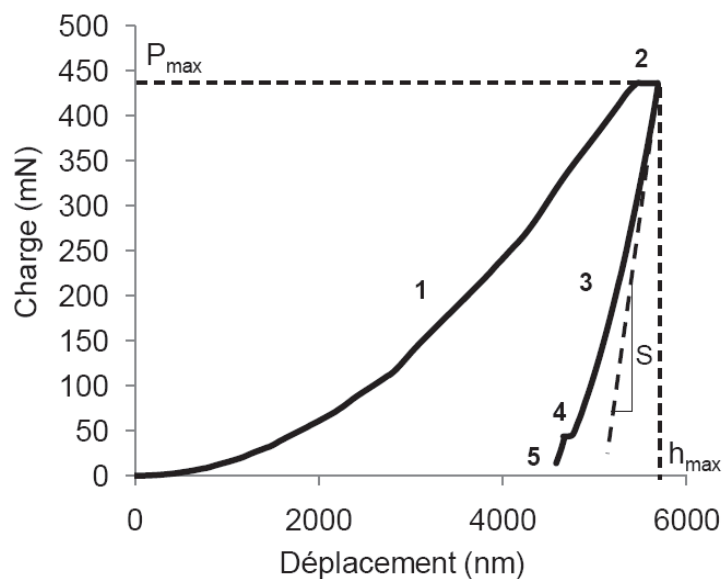


Figure 62 : Courbe charge – déplacement classique obtenue par indentation instrumentée. Elle peut être décomposée en une phase de charge (1) jusqu'à charge maximale (P_{max}) puis une phase de maintien de 10 secondes (2), une première décharge à 90% (3) suivie d'un segment de maintien de 50 secondes (4) et une décharge totale (5). La raideur de contact S correspond à la pente de la tangente au premier point de la courbe de décharge.

Dans l'étude des tissus minéralisés, la méthode d'Oliver & Pharr (Oliver et Pharr 1992; Oliver et Pharr 2004) conduit à des valeurs de H_c et E qui sont corrélées (Ferguson 2009; Smith *et al.* 2010). Cette relation souvent considérée comme linéaire montre que H_c reflète à la fois les propriétés plastiques et élastiques du matériau testé. Il y a donc une limite à considérer H_c comme une variable reflétant les caractéristiques plastiques d'un matériau. Sakai a ensuite développé un modèle permettant à partir des résultats d'un essai d'indentation de dissocier les composantes élastiques et plastiques et de déduire de H_c une variable purement plastique H , encore appelé dureté vrai (*true hardness*) (Sakai 1999). Ce modèle a par la suite été appliqué au tissu osseux

(Oyen et Cook 2003; Oyen 2006; Ferguson 2009; Smith *et al.* 2010). Dans ce modèle, le tissu osseux est considéré durant la charge comme un matériau purement élastoplastique. Ses propriétés mécaniques sont alors modélisées (Fig. 63) par un composant purement élastique (ressort régit par la loi de Hook) relié en série à un composant purement plastique (régit par la loi de Saint-Venant) suivant la modélisation de Maxwell. Le composant purement élastique est caractérisé par le module élastique E et le composant purement plastique par H.

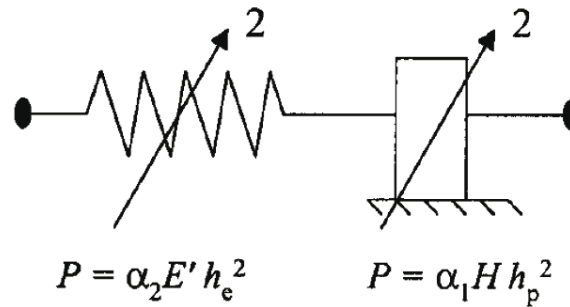


Figure 63 : Modélisation élastoplastique quadratique des propriétés mécaniques du tissu osseux suivant le modèle en série de Maxwell lors de la charge d'un essai d'indentation. Le composant de gauche correspond à un ressort purement élastique (Loi de Hook) et le composant de droite simule le comportement purement plastique (Loi de Saint-Venant). Adapté de (Oyen et Cook 2003).

Dans le cas de l'indentation conique ou pyramidale, la relation entre les variables de charge-déplacement dans le domaine élastique est de forme quadratique et est donnée par :

$$P_e = \alpha_2 E^* h_e^2$$

Où P_e est la charge appliquée à l'élément élastique et α_2 est une constante adimensionnelle dépendant de la forme de l'indenteur ($\alpha_2 = 4,4$ pour l'indenteur Berkovich). E^* est le module de déformation plane défini par :

$$E^* = \frac{1}{(1 - \nu^2)}$$

De même, dans le domaine de déformation purement plastique, la relation devient :

$$P_p = \alpha_1 H h_p^2$$

Avec P_p la charge appliquée à l'élément plastique, α_1 est une constante adimensionnelle dépendant de la forme de l'indenteur ($\alpha_1 = 24,5$ dans le cas de l'indenteur Berkovich) et H est le terme qui quantifie la déformation plastique (i.e., permanente). La forme quadratique de ces deux expressions est liée à la forme conique ou pyramidale de l'indent.

Ainsi, le déplacement total de la tête de l'indenteur h_c à P_{max} , peut être considéré comme étant la combinaison en série de déformations élastique (h_e) et plastique (h_p) avec:

$$h_c = h_e + h_p$$

Sachant que, le modèle en série de Maxwell implique que les charges appliquées sur les deux éléments sont identiques ($P_e = P_p = P_{max}$). La dureté de contact peut alors être écrite en combinant les équations précédentes :

$$H_c = \frac{1}{\alpha_1 [(\alpha_2 E^*)^{-1/2} + (\alpha_1 H)^{-1/2}]^2}$$

L'analyse des courbes d'indentations permet donc de calculer E , H_c et d'en déduire H . Il est important de noter que le tissu osseux est davantage considéré comme un matériau visco-élasto-plastique. La viscosité correspond aux déformations dépendant du temps. Dans l'analyse de nos courbes, les mesures de S , E , H_c et H ont été réalisées après soustraction du plateau à charge constante, en supposant que 10 secondes suffisaient à s'affranchir des déformations dépendant du temps. Cependant, le fluage observé sur chaque courbe d'indentation brute a été relevé et calculé comme la distance parcourue durant les dix secondes de maintien à charge constante à l'atteinte de h_{max} .

L'intégration des courbes charge-déplacement entre des bornes spécifiques permet de déduire les travaux spécifiques aux différents types de déformations, c'est-à-dire l'énergie nécessaire pour créer ces déformations spécifiques. Ainsi, le travail d'indentation total (W_{tot}) est défini par l'aire sous la courbe de charge et correspond à la somme du travail réversible (W_e) et irréversible (W_p) en mN.nm (Fig. 64). Le travail réversible ou énergie élastique correspond à l'aire sous la courbe de décharge. Le travail irréversible ou énergie plastique correspond au travail nécessaire pour générer une déformation plastique, cette variable est encore appelée « aire d'Hysteresis » (Ammann *et al.* 2007). Le rapport entre W_p et W_{tot} est appelé index de ductilité d'indentation noté D , il varie entre 0 (matériau purement élastique) et 1 (matériau purement plastique) (Sakai 1999).

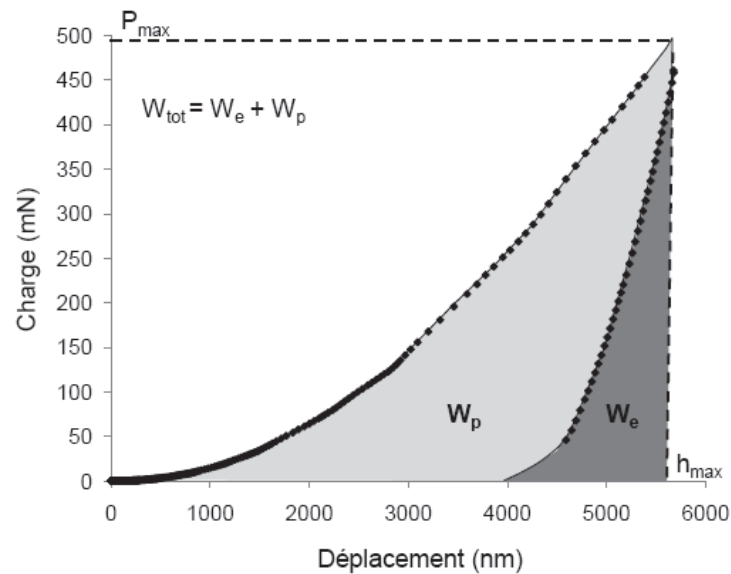


Figure 64 : Définition du travail d'indentation (W_{tot}) correspondant à la somme du travail élastique (W_e) réversible et du travail plastique (W_p) irréversible. Adaptée de (Sakai 1999).

2.4. Microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIRM)

2.4.1. Principe

La FTIRM est une technique de spectroscopie vibrationnelle basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par un matériau. Elle permet, par la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de caractériser les fonctions chimiques présentes dans le matériau. Le rayonnement infrarouge est une radiation électromagnétique. Sur le spectre électromagnétique, la région du moyen infrarouge, coïncidant avec le domaine d'énergie dans lequel les molécules vibrent, correspond aux longueurs d'ondes comprises entre 400 et 4000 cm^{-1} (2,5 – 25 μm). Lorsque l'énergie apportée par un faisceau lumineux est proche de l'énergie de vibration d'une molécule, cette dernière va absorber le rayonnement en diminuant l'intensité du signal transmis. L'énergie caractéristique de vibration d'une molécule va dépendre de ces éléments constitutifs et de sa conformation (taille, géométrie et symétrie). Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure données va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques.

L'analyse est réalisée avec un spectromètre par transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe, ainsi que l'intensité de l'absorption. Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers un interféromètre de Michelson. Dans ce dernier, une séparatrice répartit la moitié du faisceau vers un miroir fixe et l'autre moitié vers un miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, il apparaît alors des interférences en fonction de la position du miroir mobile. Ce

faisceau modulé est dirigé vers l'échantillon avant d'arriver sur le détecteur qui le transforme en signal électrique. Cet interférogramme est finalement converti en un spectre infrarouge par un calcul mathématique appelé transformée de Fourier (Fig. 65). Les liaisons chimiques peuvent vibrer selon différents modes correspondant à deux groupes :

- Les vibrations d'élongations (*stretching vibration*) symétriques, notées ν_1 et antisymétriques, notées ν_3 .
- Les vibrations de déformations (*bending vibration*) symétriques, notées ν_2 et antisymétriques, notées ν_4 .

Etant donnée la composition de la matrice extracellulaire osseuse, le spectre caractéristique de l'os contient des bandes de vibrations relatives aux protéines, aux phosphates et aux carbonates. Concernant les protéines, la liaison peptidique se traduit par une vibration d'élongation de la liaison N-H absorbant à 3250 cm^{-1} et peu sensible à la structure secondaire des protéines. Le mode de vibration des amides I correspond à une bande d'absorption observée à $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ qui est principalement attribuée à la vibration d'élongation du groupement C=O. Les amides II et III absorbent à 1550 cm^{-1} et entre 1200 et 1400 cm^{-1} , respectivement.

Concernant les groupements phosphates, 2 modes de vibrations existent, les vibrations d'élongation symétriques et antisymétriques $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ situées entre 910 et 1200 cm^{-1} et la vibration de déformation antisymétrique $\nu_4\text{PO}_4$ comprise entre 550 et 600 cm^{-1} (Fig. 65). Le domaine $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ est décomposé en vibrations d'élongations des liaisons P-O entre 1000 et 1200 cm^{-1} , des vibrations symétriques entre 1035 et 1080 cm^{-1} et anti symétriques à 960 cm^{-1} (Rey *et al.* 1991b). Les bandes entre 550 et 600 cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation des groupements O-P-O (Rey *et al.* 1990).

Dans le moyen infrarouge, les carbonates absorbent selon deux modes: la vibration d'élongation symétrique $\nu_2\text{CO}_3$ entre 800 et 900 cm^{-1} et la vibration $\nu_4\text{CO}_3$ à 1450 cm^{-1} (Rey *et al.* 1991a).

2.4.2. Obtention des spectres

Le microspectromètre utilisé (Perkin Elmer GX-II, Waltham, MA, USA) est couplé à un microscope Auto-image qui permet de travailler sur des ROIs de 30 à $40\text{ }\mu\text{m}$ de côté. La résolution spatiale pour l'étude à l'échelle tissulaire était de $35 \times 35\text{ }\mu\text{m}$ et de $30 \times 30\text{ }\mu\text{m}$ pour l'étude au niveau du BSU. Chaque spectre obtenu sur une coupe de tissu osseux de $2\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur correspond à la somme de 150 scans obtenus en mode transmission avec une résolution spectrale de 2 cm^{-1} . Les contributions de l'air et de la résine sont ensuite éliminées de chaque spectre par soustraction du spectre obtenu sur le MMA (Spectrum, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Le spectre déduit est finalement normalisé pour une intensité de $1,5$ dans le domaine $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$.

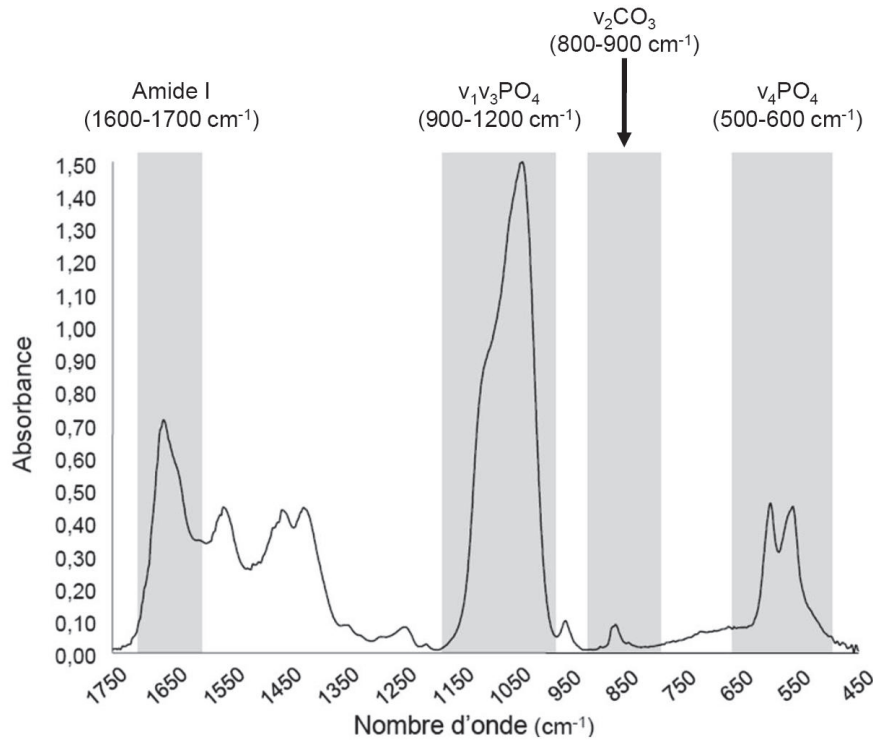


Figure 65 : Spectre infrarouge obtenu sur une coupe fine de tissu osseux montrant les principaux domaines analysés dans notre étude.

Deux types de collectes de spectres ont été utilisés : pour la première partie de l'étude focalisée au niveau tissulaire 720 ROIs correspondant à des ostéons corticaux, des paquets osseux trabéculaires et du tissu osseux interstitiel ont été analysées. Ces zones ont été sélectionnées sur des coupes provenant de 10 patientes PMOP non traitées et 10 patientes du groupe ALN_{LT}. Ces patientes ont été sélectionnées pour représenter au mieux les distributions de la population d'origine concernant l'âge des patientes et la durée du traitement pour le groupe traité. Dans la seconde partie de l'analyse, à l'échelle du BSU cortical, les coupes de 100 μm d'épaisseur ont été recoupées à 2 μm . Les spectres infrarouge ont été collectés sur les BSUs mécaniquement testés par indentation instrumentée (Fig. 60).

2.4.3. Variables obtenues par FTIRM

Les spectres obtenus sont ensuite déconvolués à l'aide du logiciel GRAMS/AI (Thermo Galactic, Salem, NH, USA). Ce logiciel permet d'obtenir les positions, les intensités, les FWHM et les aires sous les courbes des pics correspondants aux amides I (1600-1700 cm^{-1}), au $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ (900-1200 cm^{-1}), $\nu_2\text{CO}_3$ (850-900 cm^{-1}) et $\nu_4\text{PO}_4$ (500-650 cm^{-1}). A partir de ces données, les variables suivantes sont calculées (Bala *et al.* 2010b; Farlay *et al.* 2010):

- 1) La maturité minérale : correspond au rapport d'aire du pic 1030 cm^{-1} sur le pic 1110 cm^{-1} . Le domaine $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ est déconvolué en 5 sous-pics (Fig. 66). Le pic à 1030 cm^{-1}

représente un PO_4 apatitique tandis que le pic à 1110 cm^{-1} représente un PO_4 non apatitique qui disparaît au cours de la maturation du minérale. Le rapport des deux aires est donc un index de la maturation du minérale qui traduit la transformation du domaine non apatitique en domaine apatitique.

- 2) L'index de cristallinité minérale : est donné par la FWHM du pic à 604 cm^{-1} du domaine $\nu_4\text{PO}_4$. La cristallinité reflète à la fois le degré d'ordre, la perfection de l'arrangement des ions dans la maille cristalline, mais aussi la taille des cristaux. Le domaine $\nu_4\text{PO}_4$ est déconvolué en trois sous pics, le pic à 604 cm^{-1} est analysé car il est le mieux résolu (Fig. 66). Un pic plus fin traduit une cristallinité améliorée, donc, plus la largeur à mi-hauteur est grande, plus le pic est large et moins la cristallinité est bonne.
- 3) L'index de minéralisation : est donné par le rapport d'aire du pic à 1030 cm^{-1} sur le pic à 1660 cm^{-1} . Ce rapport correspond à l'importance du signal d'un phosphate apatitique par rapport au signal du pic principal des amides I et reflète donc la quantité de minéral mature présent dans la matrice organique. La définition de l'index de minéralisation est comparable à celle du degré de minéralisation mesuré par microradiographie quantitative expliquant la bonne corrélation observée entre ces deux variables.
- 4) La carbonatation minérale : est calculée par le rapport de l'aire sous le pic $\nu_2\text{CO}_3$ (entre 862 et 894 cm^{-1}) sur le pic $\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ (entre 910 et 1184 cm^{-1}). Cette variable reflète l'incorporation des ions CO_3^{2-} dans le cristal qui peuvent être substitués soit avec les ions OH^- , soit les ions PO_4^{3-} soit être présents dans la couche hydratée (i.e., en position labile).
- 5) La maturité du collagène : cette variable est souvent décrite comme reflétant le rapport des molécules de pontages (crosslinks) irréductibles sur les réductibles. Les molécules de pontage des fibres de collagène étant initialement divalentes et donc réductibles. Au cours du vieillissement du collagène, ces molécules vont subir des modifications biochimiques et devenir trivalentes et donc non réductibles et plus stables. Cette variable traduit donc une maturation du collagène et est calculée par le rapport de l'aire sous le pic à 1660 cm^{-1} sur l'aire sous le pic à 1690 cm^{-1} (Paschalis *et al.* 2001) (Fig. 66). Cependant, si toutes les expérimentations montrent que ce rapport traduit bien la maturité de la composante organique de la matrice osseuse, le fait qu'il représente un rapport de molécules de pontage est controversé. En effet, deux études récentes menées par le laboratoire montrent que même dans des situations où les crosslinks sont réduits à des niveaux anormalement bas (lyse par la lumière ultraviolette ou modèle de rats lathyriques ayant une lxyloxydase non fonctionnelle), la maturité du collagène n'est pas systématiquement modifiée.

La FTIRM permet donc à partir d'une mesure, de caractériser précisément la nanostructure de la matrice osseuse, aux niveaux minéral et organique.

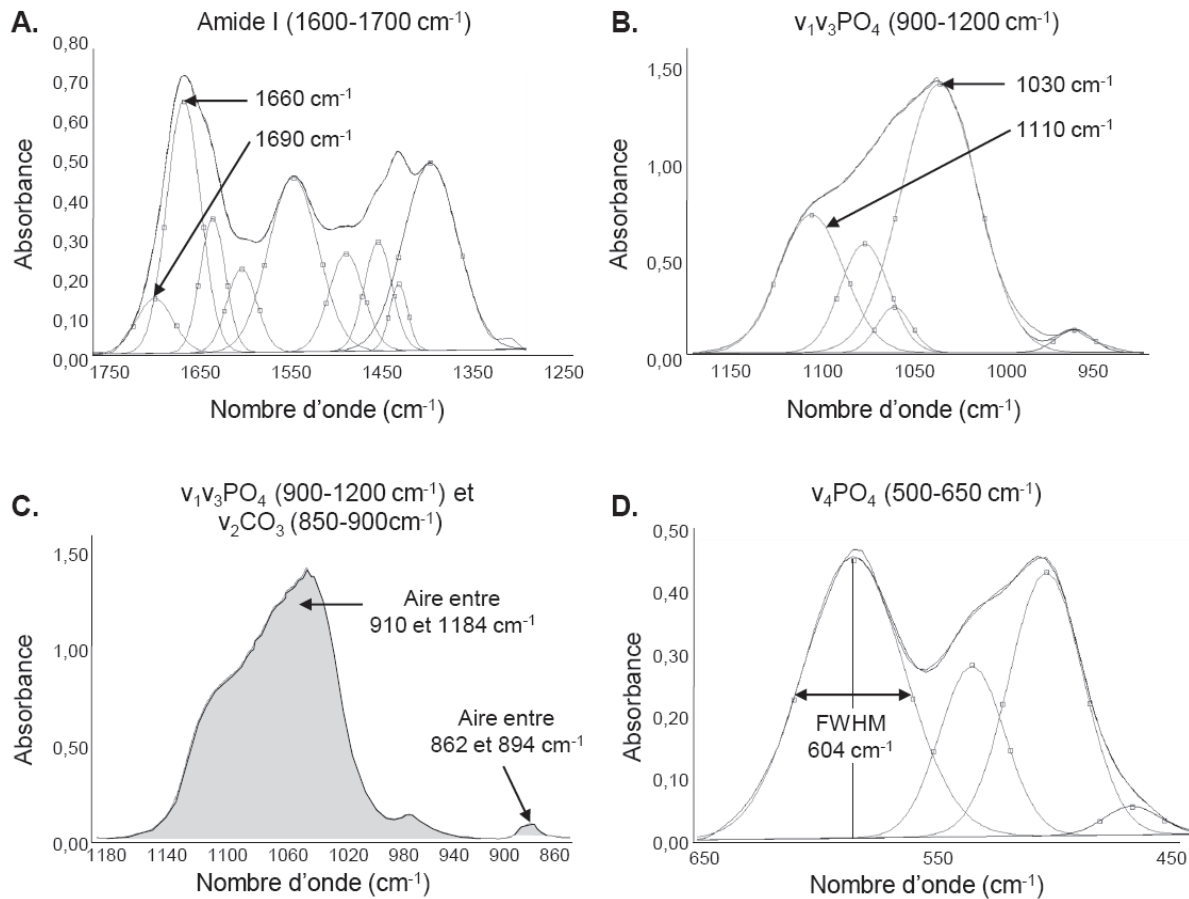


Figure 66 : Déconvolution et traitement des différents domaines analysés en microspectroscopie infrarouge par transformée de Fourier, permettant la mesure de la maturité du collagène (A), de la maturité minérale (B), de la carbonatation (C) de l'index de cristallinité (D) et de l'index de minéralisation (A & B).

2.5. Analyse statistique

Le traitement statistique des données a été réalisé avec SPSS v19.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA). Le risque α a été établi à 5%. Les résultats sont rapportés comme la moyenne \pm déviation standard (DS) ou moyenne (DS) dans certains tableaux. La normalité des variables a été préalablement testée suivant la procédure de Shapiro-Wilk.

2.5.1. Etude globale tissulaire

Aucune des variables mesurées au niveau global (DMB, HI, MAR, MS/BS, BFR/BS, Ac.F et Hv) ne suivait une distribution Gaussienne, une procédure non paramétrique a donc été utilisée. Les moyennes ont été comparées deux à deux par un test de Mann Whitney dans le cas où le test de Friedman produisait une réponse significative. Les corrélations ont été évaluées par

le test du rho de Spearman (coefficient de corrélation noté r^s). Les variables mesurées par FTIRM représentent une population de 720 régions d'intérêts (ostéons / paquets osseux trabéculaires / os interstitiel trabéculaire ou cortical). Ces variables suivaient toutes une loi normale, seul l'index de cristallinité minérale a été transformé par une fonction logarithme de base 10 pour être considéré comme normale. Les moyennes ont donc été comparées avec le test t de Student. Le modèle d'analyse multivariée de la covariance (MANCOVA) a été utilisé pour décrire les effets d'un traitement prolongé par l'ALN sur l'index de cristallinité et l'index de minéralisation après ajustement pour la maturité minérale qui reflète l'âge du minéral osseux.

2.5.2. Etude à l'échelle du BSU

Toutes les variables suivaient une distribution normale et une procédure paramétrique a été utilisée. L'influence des la micro- et nanostructures sur le comportement micromécanique a été évaluée par régression linéaire avec r correspondant au coefficient de corrélation de Bravais – Pearson. Pour décrire comment les propriétés micromécaniques sont définies par les propriétés structurales, l'utilisation d'un modèle de régression pas à pas a permis de classer l'importance de la variable (indépendante) dans la prédiction de la variable à expliquer (dépendante). Cette analyse a été complétée par une analyse des corrélations partielles, en calculant le coefficient de régression standardisé noté β et déterminé seulement si la variable entrait dans l'équation d'un des pas de la régression pas à pas. Les moyennes ont été comparées entre les groupes par un test t de Student.

3. Résultats

3.1. Etude au niveau tissulaire

Cette étude a donné lieu à la rédaction d'un article intitulé *Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate*, soumis pour publication dans un journal à comité de lecture international.

3.1.1. Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur l'activité du remodelage osseux

L'observation histologique des coupes de tissu osseux utilisées pour la mesure des variables dynamiques du remodelage osseux a mis en évidence une absence de marquages fluorescents pour 2 biopsies du groupe ALN_{3ans} et 7 biopsies du groupe ALN_{LT}. Ces biopsies n'ont pas été prises en compte dans l'analyse des variables présentées dans le tableau 14, car nous étions dans l'impossibilité de conclure à une absence de remodelage osseux à un problème avec la prise des tétracyclines. De plus, pour 5 biopsies du groupe ALN_{LT}, la présence de marquages fluorescents était évidente mais le nombre de marques était insuffisant pour quantifier l'activité du remodelage osseux. Pour ces 5 échantillons, le BFR/BS, le MS/BS et l'Ac.F ont été définis

comme nuls et le MAR comme non mesurable. Le traitement par l'ALN durant trois ans ou plus ne conduit pas à une modification significative de la vitesse de minéralisation par rapport aux patientes ostéoporotiques non traitées. Les surfaces en cours de minéralisation, le taux de formation osseuse et la fréquence d'activation sont significativement plus bas dans les groupes traités par l'ALN par rapport au groupe PMOP. Cependant, le traitement prolongé par l'ALN ne conduit pas à une diminution continue de l'activité du remodelage osseux par rapport au groupe traité durant 3 ans.

Variables	PMOP	ALN _{3ans}	ALN _{LT}
MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	0,641 (0,096)	0,612 (0,103)	0,718 (0,148)
MS/BS (%)	7,408 (4,652)	0,429 (0,395) ***	0,435 (0,615) ***
BFR/BS ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{jour}$)	0,048 (0,034)	0,003 (0,002) ***	0,004 (0,005) ***
Ac.F (#/an)	0,396 (0,255)	0,035 (0,038) ***	0,063 (0,066) ***

Tableau 14 : Effets d'un traitement oral par l'ALN durant 3 ans (ALN_{3ans}) ou plus (ALN_{LT}) par rapport à une population de patientes ostéoporotiques non traitées (PMOP) sur les variables reflétant l'activité du remodelage osseux : la vitesse de minéralisation (MAR), l'extension des surfaces en cours de minéralisation (MS/BS), le taux de formation osseuse (BFR/BS) et la fréquence d'activation (Ac.F). *** $p < 0,0001$ versus PMOP.

3.1.2. Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la minéralisation osseuse

Après traitement par l'ALN, les courbes de distribution des valeurs de DMB montrent un déplacement vers les valeurs plus élevées par rapport aux femmes PMOP non traitées (Fig. 67). Cette évolution est observée dans l'os cortical comme dans l'os trabéculaire, avec une tendance à la diminution de la FWHM de ces courbes après traitement par l'ALN (Fig. 67). Cette observation est confirmée par les valeurs moyenne du DMB et de l'HI dans ces trois groupes (Tableau 15). En effet après 3 ans et 6,4 ans de traitement avec l'ALN, le DMB cortical est significativement plus élevé que dans le groupe de femmes PMOP non traitées (+16,0% et +8,7%, $p < 0,05$, respectivement). Le DMB trabéculaire est lui aussi significativement plus élevé dans les groupes traités par l'ALN par rapport aux patientes non traitées (+10,6% et +5,8% après 3 ans et 6,4 ans de traitement, respectivement) (Tableau 15). Il est important de noter que le DMB mesuré dans l'os cortical et trabéculaire dans le groupe ALN_{LT} est significativement plus bas que dans le groupe ALN_{3ans}. Ces résultats indiquent que le DMB ne semble pas être augmenté de manière continue au cours de la durée du traitement. L'augmentation du DMB après traitement est accompagnée d'un HI significativement plus bas dans l'os trabéculaire par rapport au groupe PMOP, cette diminution n'atteignait pas le seuil de significativité dans l'os cortical (Tableau 15). Pour les trois groupes de l'étude, l'Ac.F est significativement et négativement corrélé avec le degré de minéralisation osseux ($r^2 = -0,37$, $p = 0,02$) et positivement avec l'index d'hétérogénéité ($r^2 = 0,35$, $p = 0,02$) (Fig. 68). Autrement dit, l'homogénéisation de la minéralisation osseuse et l'augmentation du degré de minéralisation moyen mesuré au niveau tissulaire est liée à l'inhibition du remodelage osseux par l'ALN oral.

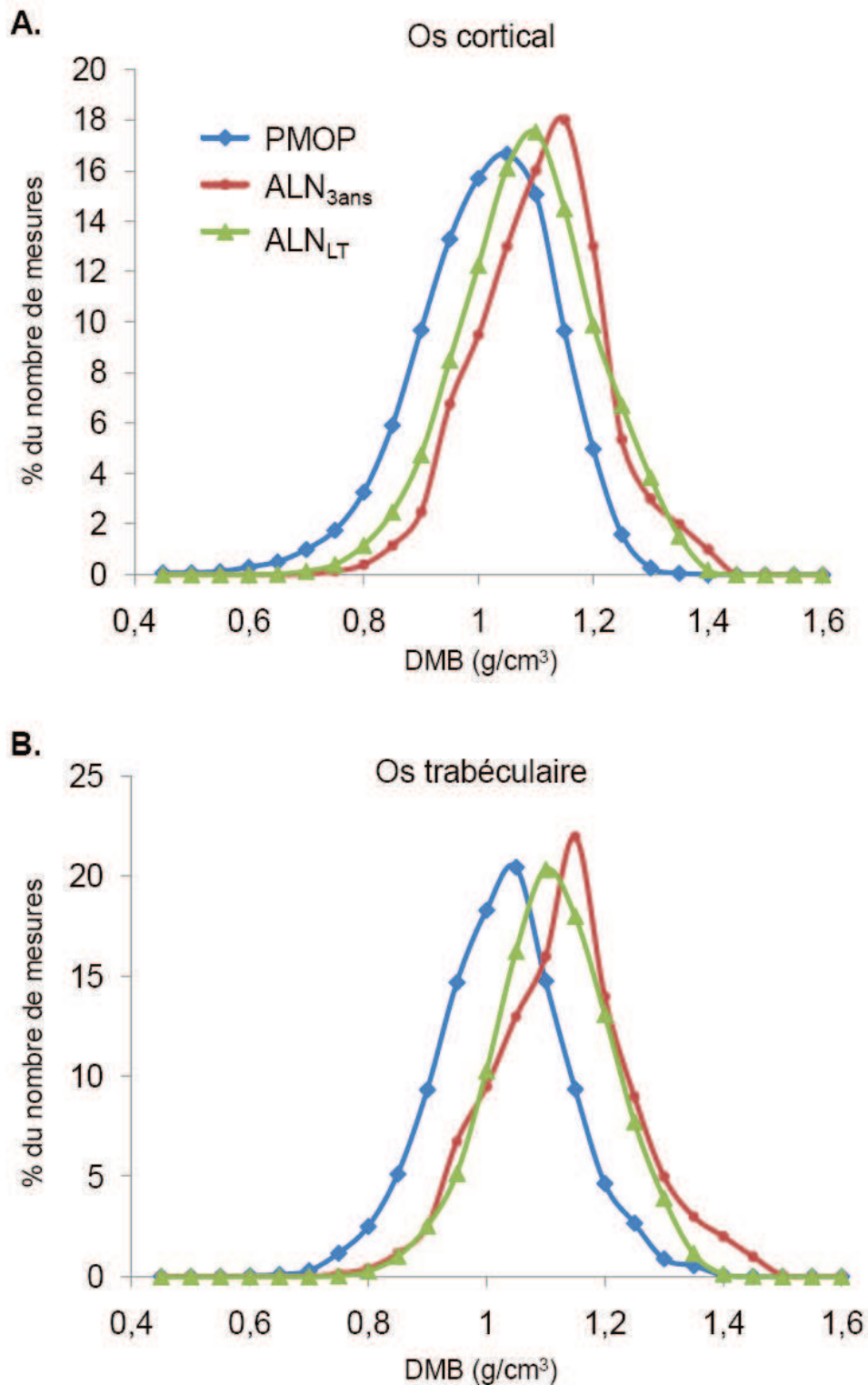


Figure 67 : Courbes de distribution des valeurs de degré de minéralisation (DMB) mesurées dans l'os cortical (A) et l'os trabéculaire (B) de femmes ostéoporotiques non traitées ou traitées 3 ans (ALN_{3ans}) ou 6,4 ans en moyenne (ALN_{LT}) par de l'alendronate oral. Dans les deux compartiments osseux, après traitement, les courbes sont déplacées vers les valeurs de DMB plus élevées, traduisant une augmentation du DMB moyen.

	Os cortical		Os trabéculaire	
	DMB (g/cm ³)	HI (g/cm ³)	DMB (g/cm ³)	HI (g/cm ³)
PMOP	1.033 (0.082)	0.249 (0.065)	1.077 (0.081)	0.244 (0.070)
ALN _{3ans}	1.198 (0.071) *	0.226 (0.069)	1.191 (0.073) *	0.155 (0.029) *
ALN _{LT}	1.123 (0.069) *‡	0.211 (0.058) ^Δ	1.140 (0.062) *‡	0.200 (0.050) *

Tableau 15 : Effets d'un traitement oral par l'ALN durant 3 ans (ALN_{3ans}) ou plus (ALN_{LT}) par rapport à une population de patientes ostéoporotiques non traitées (PMOP) sur la minéralisation osseuse. * p < 0,05, ^Δ p < 0,07 *versus* PMOP ; ‡ p < 0,05 *versus* ALN_{3ans}.

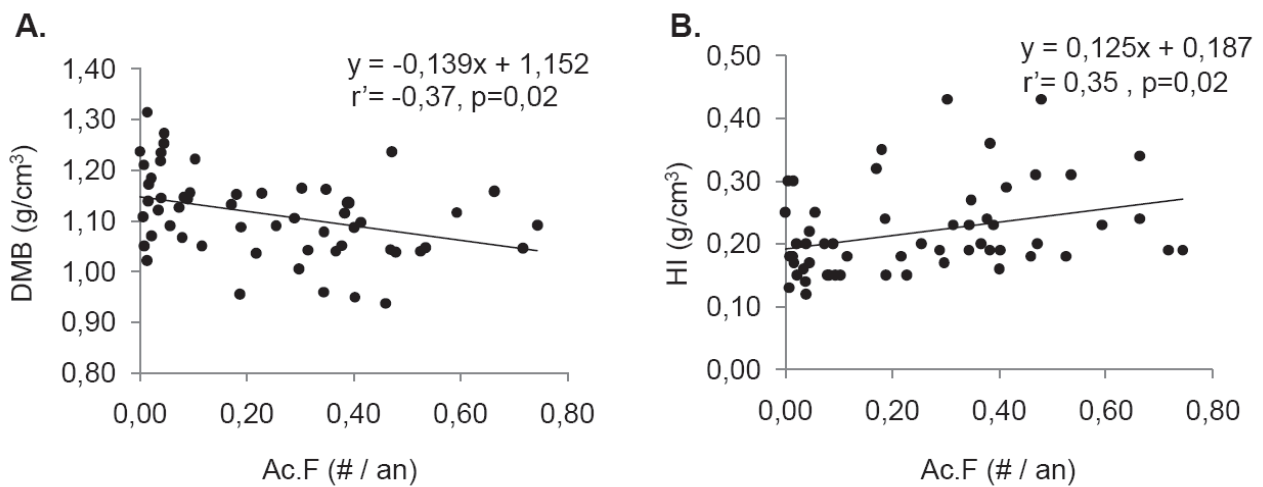


Figure 68 : Corrélations observées entre la fréquence d'activation du remodelage osseux (Ac.F) mesuré par histomorphométrie 2D avec le degré de minéralisation osseuse (DMB, A) et l'index d'hétérogénéité (HI, B). Ces régressions comprenant les valeurs du groupe PMOP, ALN_{3ans} et ALN_{LT} montrent que plus l'Ac.F diminue, plus la densité minérale tissulaire osseuse est élevée et homogène.

Les résultats obtenus par microradiographie quantitative montrent que le traitement par l'ALN conduit à une augmentation du DMB par homogénéisation de la minéralisation en lien avec l'inhibition du remodelage osseux. Cependant, cette diminution de l'activité ne semble pas conduire à une minéralisation totalement homogène, phénomène qui donnerait l'apparence d'un « os gelé ». En effet, même après 10 ans de traitement les microradiographies présentent les signes d'une minéralisation hétérogène (Fig. 69).

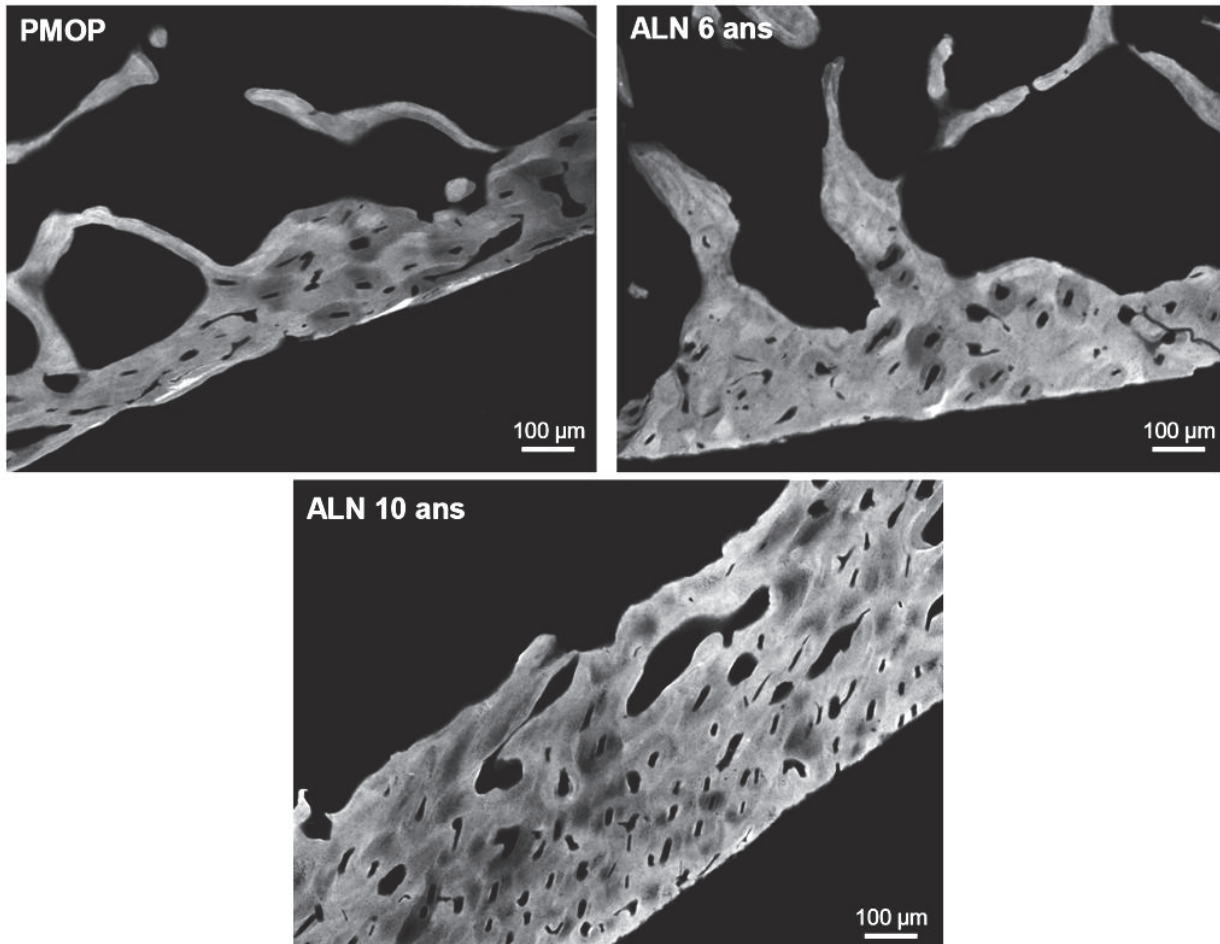


Figure 69 : Microradiographies de tissu osseux cortical provenant de patientes ostéoporotiques : non traitée (PMOP) ou traitée 6 ans et 10 ans par l'alendronate oral (ALN). Ces microradiographies montrent qu'une hétérogénéité de la minéralisation persiste même après 10 ans de traitement par l'ALN.

3.1.3. Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur la microdureté osseuse

La mesure de la microdureté Vickers dans l'os cortical et trabéculaire des patientes du groupe ALN_{LT} montrent des valeurs significativement plus basses que celles mesurées chez les patientes du groupe PMOP (Fig. 70). En effet, pour l'os cortical la valeur de microdureté moyenne est de $48,77 \pm 2,66 \text{ kg/mm}^2$ chez les patientes du groupe PMOP et de $45,14 \pm 4,21 \text{ kg/mm}^2$ dans le groupe ALN_{LT} (-7,5%, $p=0,0004$). Dans l'os trabéculaire, la microdureté moyenne est de $49,30 \pm 2,54 \text{ kg/mm}^2$ pour le groupe PMOP et de $45,44 \pm 4,65 \text{ kg/mm}^2$ (-7,8%, $p=0,0006$) (Fig. 70).

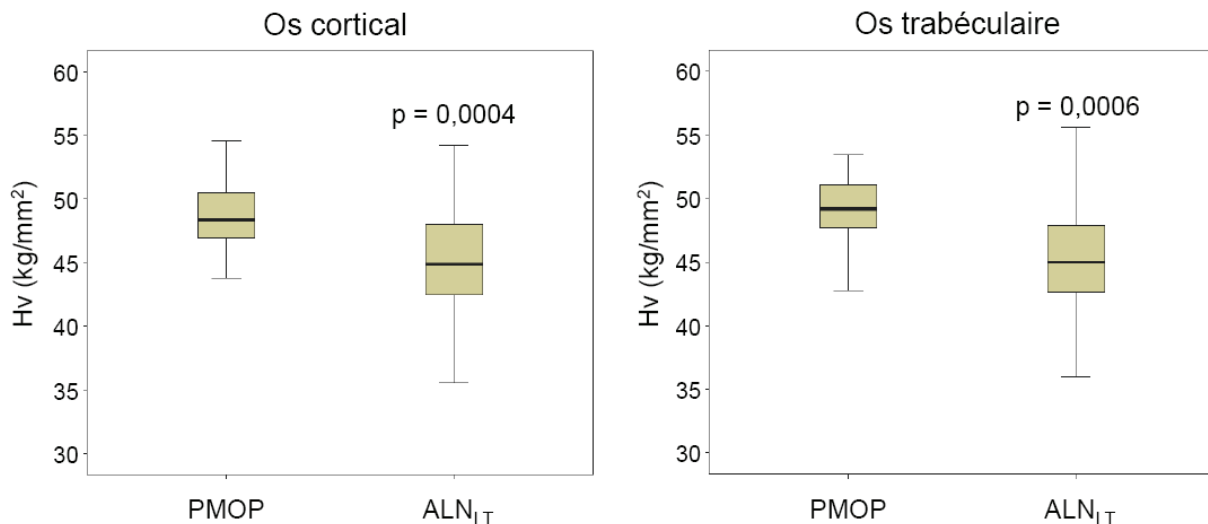


Figure 70 : Effets sur la microdureté osseuse (Hv) d'un traitement prolongé par l'alendronate oral (ALN_{LT}) par rapport aux patientes ostéoporotiques non traitées (PMOP).

3.1.4. Effets d'un traitement prolongé par l'ALN oral sur les caractéristiques nanostructurales de la matrice osseuse mesurées par FTIRM

Dans le groupe traité, l'investigation par FTIRM, menée dans l'os cortical (ostéons et os interstitiel), montre un index de minéralisation significativement plus haut que mesuré dans le groupe PMOP. Cette différence existant aussi dans l'os interstitiel trabéculaire montre une augmentation du rapport minéral sur matrice organique cohérente avec l'augmentation de DMB observée par microradiographie (Tableau 16). Dans les compartiments osseux où l'index de minéralisation est significativement plus haut dans le groupe traité, une maturité minérale significativement plus élevée est aussi observée. Ces résultats suggèrent que l'inhibition du remodelage osseux observé sous ALN produit une matrice osseuse plus minéralisée avec un minéral plus mature. Les résultats montrent aussi d'autres signes d'une matrice plus ancienne dans le groupe traité par l'ALN. En effet, après traitement, on observe une carbonatation minérale augmentée de 17% à 33% en fonction du compartiment osseux. Dans tous les compartiments osseux, la maturité du collagène est significativement plus élevée dans le groupe traité par rapport au groupe PMOP, avec des différences allant de +15% à +36% ($p < 0,001$). Les index de cristallinité minérale mesurés dans les ostéons corticaux et les paquets osseux trabéculaires sont significativement supérieurs dans le groupe traité que dans le groupe PMOP. Aucune différence de cristallinité n'a été observée pour l'os interstitiel cortical ou trabéculaire. A noter que l'index de cristallinité minérale correspondant à une largeur à mi-hauteur, une augmentation de cette variable traduit un élargissement de bande et donc une cristallinité diminuée. Le traitement par l'ALN conduit donc à une matrice osseuse « récente » (ostéons et paquets osseux trabéculaire) moins bien cristallisée (Tableau 16).

<i>Variables mesurées par FTIRM</i>		Os cortical		Os trabéculaire	
		Ostéons	Os interstitiel	Paquets osseux	Os interstitiel
Index de minéralisation	PMOP	2,550 (0,516)	2,667 (0,296)	2,613 (0,504) ‡	2,870 (0,347) ‡
	ALN _{LT}	2,773 (0,425) **	2,889 (0,444) *	2,413 (0,491) *,‡‡‡	3,073 (0,372) *,‡
Maturité minérale	PMOP	1,653 (0,230)	2,194 (0,142)	1,478 (0,176) ‡‡‡	1,857 (0,123) ‡‡‡
	ALN _{LT}	1,833 (0,161) ***	2,279 (0,215) *	1,451 (0,191) ‡‡‡	1,942 (0,170) *,‡‡‡
Index de cristallinité minérale	PMOP	25,537 (1,274)	25,563 (1,138)	24,942 (1,247) ‡‡‡	24,751 (0,948) ‡‡‡
	ALN _{LT}	25,670 (0,862) ***	25,453 (0,808) *	25,523 (1,384) *,‡	24,896 (0,870) ‡‡‡
Carbonatation minérale	PMOP	0,006 (0,0007)	0,006 (0,0005)	0,006 (0,0007)	0,006 (0,0003)
	ALN _{LT}	0,007 (0,0007) ***	0,007 (0,0003) ***	0,008 (0,0010) ***,‡	0,007 (0,0003) ***
Maturité du collagène	PMOP	4,335 (0,843)	4,440 (0,495)	4,195 (0,882)	4,635 (0,659)
	ALN _{LT}	5,699 (2,357) ***	6,043 (2,246) ***	5,582 (2,282) ***	5,326 (1,599) **,‡

* p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 vs. PMOP

‡ p < 0,05, ‡‡ p < 0,001, ‡‡‡ p < 0,0001 vs. Os cortical

Tableau 16 : Effets sur les caractéristiques de la nanostructure osseuse minérale et organique d'un traitement prolongé par l'alendronate oral (ALN_{LT}) par rapport à un groupe de patientes ostéoporotiques non traitées (PMOP). Les changements observés après traitement tendent à confirmer une augmentation de l' « âge » de la matrice osseuse compatible avec l'effet inhibiteur de l'ALN sur l'activité du remodelage osseux. Le traitement prolongé par l'ALN induit aussi une diminution de la cristallinité dans la matrice osseuse des ostéons corticaux et des paquets osseux trabéculaires.

Le choix des zones mesurées en FTIRM a été basé sur des critères morphologiques. Or, l'ALN diminue l'activité du remodelage osseux en augmentant la proportion de matrice plus mature. Les différences observées entre le groupe ALN_{LT} et PMOP (Tableau 16) pourraient donc être influencées par ce fait. Par exemple, pour le choix d'un ostéon dans le groupe PMOP et ALN_{LT}, la probabilité de réaliser la mesure sur une matrice osseuse plus ancienne est plus élevée dans le groupe ALN_{LT} que dans le groupe PMOP qui a une Ac.F environ 11 fois plus élevée. Le modèle MANCOVA permet de tester l'impact d'un effet fixe, ici, le traitement, sur différentes variables dépendantes après ajustement pour une covariable. Le choix de la covariable s'est porté sur la maturité minérale qui reflète l'âge du minéral osseux. Ainsi le tableau 17 montre que pour une maturité minérale donnée, le traitement prolongé par l'ALN produit des modifications significatives de la maturité du collagène et de la carbonatation minérale. L'utilisation prolongée de l'ALN a aussi un impact significatif sur la cristallinité mesurée dans la matrice osseuse « plus récente » (i.e., ostéons corticaux et paquets osseux trabéculaires), indépendamment de l'âge de la matrice minéralisée (Tableau 17). L'utilisation de l'index de minéralisation comme covariable produit les mêmes résultats confirmant que l'ALN induit des modifications de la nanostructure indépendantes de son effet sur le remodelage osseux (Tableau 17).

Valeurs de p obtenues avec le modèle MANCOVA	<i>Covariable: Maturité minérale</i>			
	<i>Effet fixe: Groupe (ALN_{LT} / PMOP)</i>			
	Os cortical		Os trabéculaire	
<i>Variables dépendantes</i>	Ostéons	Os interstitiel	Paquets osseux	Os interstitiel
Index de cristallinité minérale	0,001	0,410	0,002	0,767
Carbonatation minérale	0,0001	0,004	0,0001	0,0001
Maturité du collagène	0,0001	0,0001	0,0001	0,002

Valeurs de p obtenues avec le modèle MANCOVA	<i>Covariable: Index de minéralisation</i>			
	<i>Effet fixe: Groupe (ALN_{LT} / PMOP)</i>			
	Os cortical		Os trabéculaire	
<i>Variables dépendantes</i>	Ostéons	Os interstitiel	Paquets osseux	Os interstitiel
Index de cristallinité minérale	0,0001	0,011	0,001	0,001
Carbonatation minérale	0,0001	0,001	0,0001	0,0001
Maturité du collagène	0,0001	0,0001	0,0001	0,079

Tableau 17 : Valeurs de p produites par le modèle d'analyse multivariées de la covariance (MANCOVA) en utilisant la maturité minérale (haut) ou l'index de minéralisation (bas) comme covariable.

3.1.5. Effets de la durée d'un traitement par l'ALN oral

La composition du groupe ALN_{LT} qui contient des patientes traitées de 3 à 10 ans permet de tester les corrélations entre les variables mesurées au niveau tissulaire avec la durée du traitement. Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre la densité minérale tissulaire, l'index d'hétérogénéité, la fréquence d'activation du remodelage et la durée du traitement (Tableau 18).

Variables		DMB	HI	Hv	Ac.F
Durée du traitement	r'	0,05	-0,064	-0,312	0,274
	p	0,786	0,726	0,084	0,343

Tableau 18 : Valeurs de r' et de p obtenues entre le degré de minéralisation (DMB), l'index d'hétérogénéité (HI) la microdureté osseuse (Hv), la fréquence d'activation du remodelage osseux (Ac.F), et la durée du traitement par l'alendronate oral.

3.1.6. Résumé des résultats de l'étude au niveau tissulaire

Cette première partie de l'étude a montré que l'utilisation prolongée d'ALN conduisait au niveau tissulaire à un remodelage osseux significativement ralenti par rapport aux patientes non traitées (-84% pour l'Ac.F mesuré dans le groupe ALN_{LT} vs. PMOP). Cependant, les résultats indiquent aussi que cette diminution de l'activité du remodelage ne semble pas continue avec la durée du traitement, aucune des variables reflétant l'activité du remodelage osseux n'étant différentes entre les groupes ALN_{LT} et ALN_{3ans}. Après 6,4 ans, l'ALN maintient le degré de minéralisation osseuse à un niveau supérieur à celui mesuré chez les patientes PMOP non traitées. Comme il a été montré pour la population traitée 3 ans (Boivin *et al.* 2000; Boivin et Meunier 2002b), cette augmentation du DMB sous traitement se fait par une homogénéisation d'une matrice osseuse plus ancienne directement liée au ralentissement du remodelage osseux. En effet, cette étude a montré pour la première fois une corrélation significative directe entre l'activité du remodelage mesurée par histomorphométrie 2D et les variables reflétant la minéralisation osseuse tissulaire comme le DMB et l'HI.

Ces premiers résultats ont été confirmés par l'analyse en microspectroscopie infrarouge, qui montre après traitement, un minéral osseux globalement plus mature et plus carbonaté. La trame organique est elle aussi plus mature après traitement que dans le groupe PMOP, quels que soient les compartiments osseux. Cependant, le tissu osseux « récent » cortical et trabéculaire présente, dans le groupe ALN_{LT}, une cristallinité moins bonne que dans le groupe PMOP. L'analyse statistique des résultats a révélé que ces différences n'étaient pas uniquement liées à une maturation des différents composants de la matrice osseuse. De plus, malgré un DMB plus élevé, la microdureté moyenne, index de la résistance micromécanique tissulaire, est significativement plus basse dans le groupe ALN_{LT} que dans le groupe PMOP. Les différentes techniques de cette investigation n'ayant pas la même résolution spatiale et n'ayant pas toutes été réalisées dans les mêmes plans de la biopsie osseuse, les comparaisons directes entre les différents résultats restent limitées. Ces limites dans l'interprétation du mécanisme qui pourrait expliquer la diminution de la microdureté osseuse après une utilisation prolongée de l'ALN, ont justifié la deuxième partie de l'étude. Cette dernière a eu pour but de se focaliser à l'échelle du BSU afin de caractériser les liens entre les variables structureaux de la matrice osseuse et le comportement micromécanique pour étudier l'influence sur ces derniers d'un traitement prolongé par l'ALN.

3.2. Etude à l'échelle du BSU

Cette étude a donné lieu à la rédaction de deux articles, le premier intitulé *Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: an instrumented indentation study*, accepté pour publication dans le journal à comité de lecture international *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (Facteur d'impact 2010 : 3.176), doi : 10.1016/j.jmbbm.2011.05.017. Cet article est joint dans les annexes, p.267.

Le second intitulé *Alendronate long-term treatment in postmenopausal osteoporotic women is associated with alterations in crystallinity and micromechanical properties of bone at structural unit level*, soumis dans un journal à comité de lecture international.

3.2.1. Caractérisation des propriétés microstructurales et micromécaniques chez des patientes souffrant d'ostéoporose ménopausique et non traitées

3.2.1.1. Rôle du degré de minéralisation dans les propriétés micromécaniques de l'os cortical

Afin d'étudier le rôle du DMB, variable de densité minérale tissulaire de référence au sein du laboratoire, dans les propriétés micromécaniques du tissu osseux, la première analyse a porté sur la population de BSUs caractérisée par microradiographie (Fig. 71). Les premières observations ont permis de tester la validité de la procédure d'indentation et l'intérêt du mode CSM dans l'étude du tissu osseux. Afin de s'affranchir de l'hétérogénéité des propriétés entre chaque lamelle de tissu osseux d'un BSU, il a été choisi d'effectuer des empreintes d'une trentaine de μm de diamètre testant entre 4 et 10 lamelles. Ces essais ont impliqué une profondeur maximale définie à 5 μm correspondant à des charges maximales de 300 à 500 mN en fonction du DMB du BSU analysé. Le mode CSM a permis de contrôler l'évolution des variables mesurées tout au long de l'essai et ainsi d'exclure les essais dont la courbe E ou $H_c = f(h)$ présentait une rupture, signe d'un changement de milieu (Fig. 72). Les courbes obtenues montrent une variation au niveau du plateau \leq à 5% autour de la valeur moyenne calculée à partir des courbes charge-déplacement. Toute courbe présentant une rupture au niveau du plateau a été exclue de l'analyse.

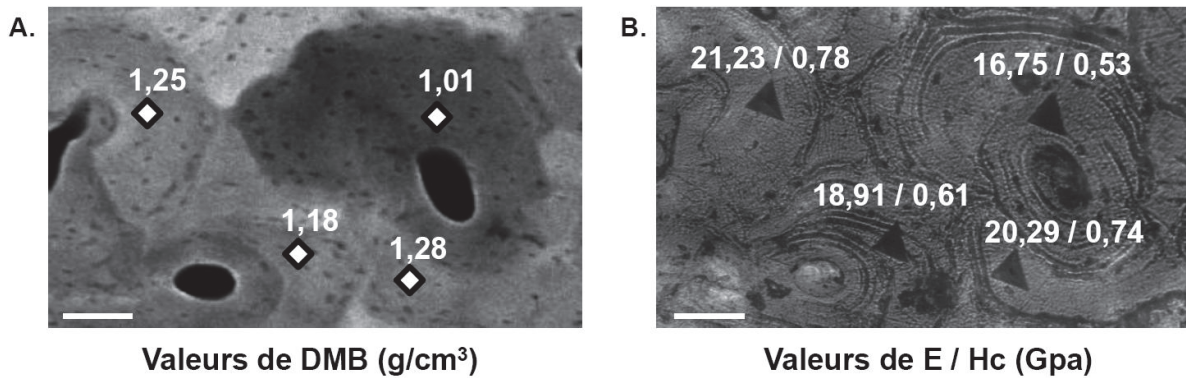


Figure 71 : Valeurs de degré de minéralisation (DMB) mesurées sur des ostéons et de l'os interstitiel choisis à partir d'une microradiographie (A). Image en réflexion montrant les empreintes laissées à la surface de la coupe de utilisée pour la microradiographie et valeurs du module élastique (E) et de la dureté de contact (H_c) mesurées dans les mêmes zones. Ces données montrent que E et H_c augmentent avec le DMB. Barre d'échelle : 50 μm .

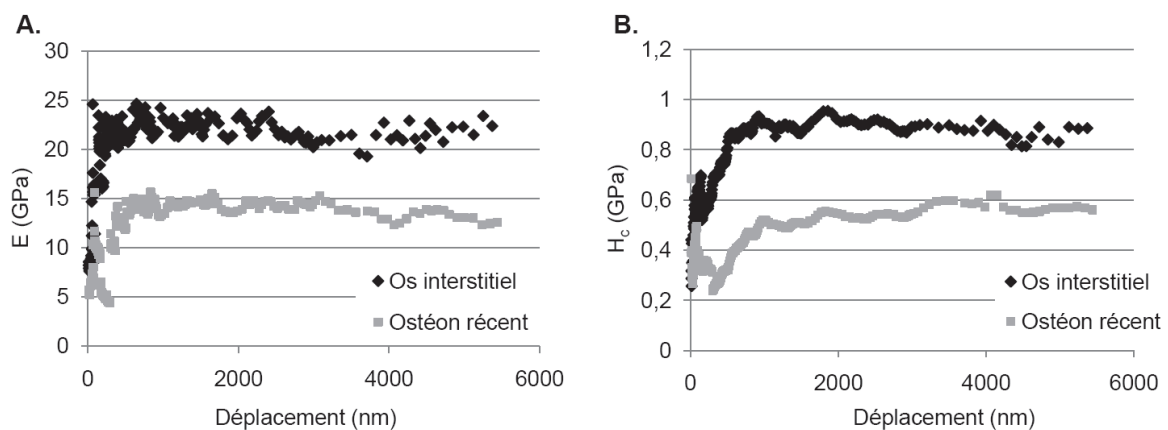


Figure 72 : Courbes illustrant l'utilité du mode CSM (Continue Stiffness Measurement) dans le suivi des variables mécaniques comme le module élastique (E) et la dureté de contact H_c en fonction de la position de l'indenteur au cours de la charge (A et B, respectivement). E et H_c sont plus élevés dans l'os interstitiel que dans un ostéon récent, et atteignent un niveau stable après 500-1000 nm.

Le modèle permettant d'extraire H_c , dureté purement plastique est basé sur un modèle élastoplastique ne prenant pas en compte la composante visqueuse. Le rôle du segment de maintien de 10 secondes à profondeur maximale est de limiter l'influence de cette composante avant la phase de décharge supposée purement élastique. Au cours de ces 10 secondes de maintien, on note un déplacement de la tête de l'indenteur à charge constante, encore appelé fluage. Les courbes de déplacement en fonction du temps à charge constante montrent que 10 secondes de maintien permettent de s'affranchir d'une large part de la déformation visqueuse du tissu osseux (Fig. 73)

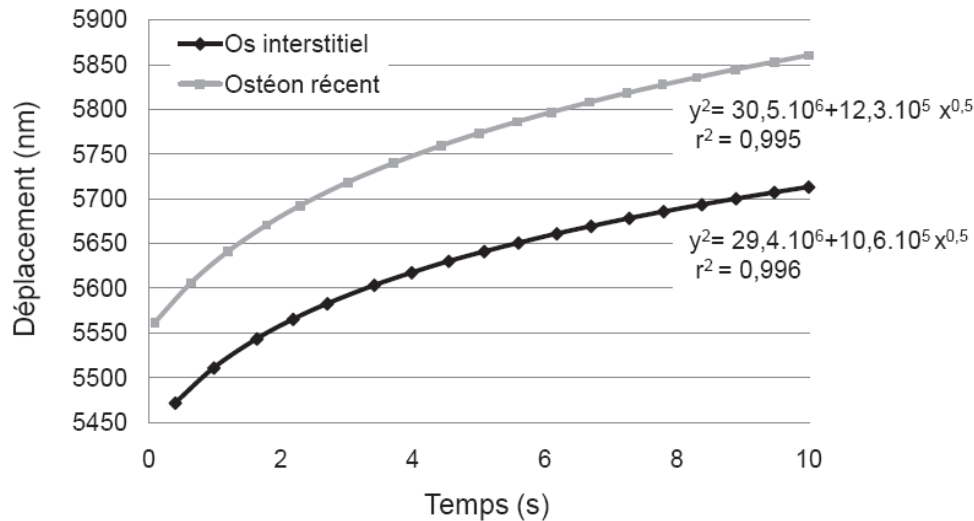


Figure 73 : Courbes illustrant la déformation de l'os à charge constante. Cette déformation dépendante du temps est caractéristique du comportement visqueux de l'os et est appelée fluage.

Les statistiques descriptives des variables obtenues par microradiographie et indentation instrumentée sont décrites dans le tableau 19. Les valeurs minimale ($0,879 \text{ g/cm}^3$) et maximale ($1,374 \text{ g/cm}^3$) de DMB sur cette population de 150 ostéons et régions de tissu interstitiel reflètent une gamme large, cohérente avec ce qui est habituellement observé sur les courbes de distribution à l'échelle tissulaire (Tableau 19).

Variables	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
DMB (g/cm^3)	1,127	0,094	0,879	1,374
H_c (GPa)	0,632	0,107	0,418	0,933
H (GPa)	1,811	0,393	1,043	2,833
E (GPa)	19,410	2,703	13,723	27,060
d_{Fluage} (μm)	0,241	0,024	0,199	0,340
W_{tot} (mN. μm)	713,411	106,762	494,115	979,445
W_p (mN. μm)	538,697	75,545	384,116	744,031
W_e (mN. μm)	174,714	34,391	102,090	263,251
Ductilité	0,756	0,019	0,710	0,803

Tableau 19 : Statistiques descriptives pour le degré de minéralisation (DMB), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), les différents travaux d'indentation [total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e)] ainsi que l'index de ductilité d'indentation mesurés sur 150 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel.

Afin d'évaluer l'influence du DMB dans le comportement micromécanique du osseux cortical, les corrélations entre les différentes variables d'intérêts ont été testées (Tableau 20). Mesurés sur 150 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel d'os cortical de patientes ostéoporotiques non traitées, le degré de minéralisation est significativement et positivement corrélé avec H_c et H , mais aussi avec E . Ceci montre que la quantité de minéral influence la capacité du tissu à se déformer dans le domaine élastique mais aussi dans le domaine plastique. Cependant, on note que le coefficient de corrélation est plus bas entre DMB et H qu'entre DMB et H_c , ce qui reflète un mélange élastique et plastique ($r=0,59$ et $r=0,79$, respectivement). Ce lien plus modéré entre DMB et H est aussi illustré par les régressions linéaires de la figure 74. Le DMB est aussi corrélé significativement et négativement avec le fluage, autrement dit, moins le tissu est minéralisé, plus il est visqueux (Tableau 20 et Fig. 74). Finalement, le DMB a aussi un rôle important dans la capacité du tissu osseux à absorber de l'énergie dans les domaines de déformations plastique et élastique. En effet le DMB est corrélé significativement avec les travaux d'indentations plastiques et élastiques. L'ensemble de ces résultats montre qu'à l'échelle du BSU, le contenu minéral est un déterminant majeur des propriétés micromécaniques. Le module élastique est significativement corrélé avec H_c ($r=0,79$, $p<0,0001$) et de manière plus modérée avec H ($r=0,59$, $p<0,005$) qui reflète un paramètre purement plastique (Fig. 75).

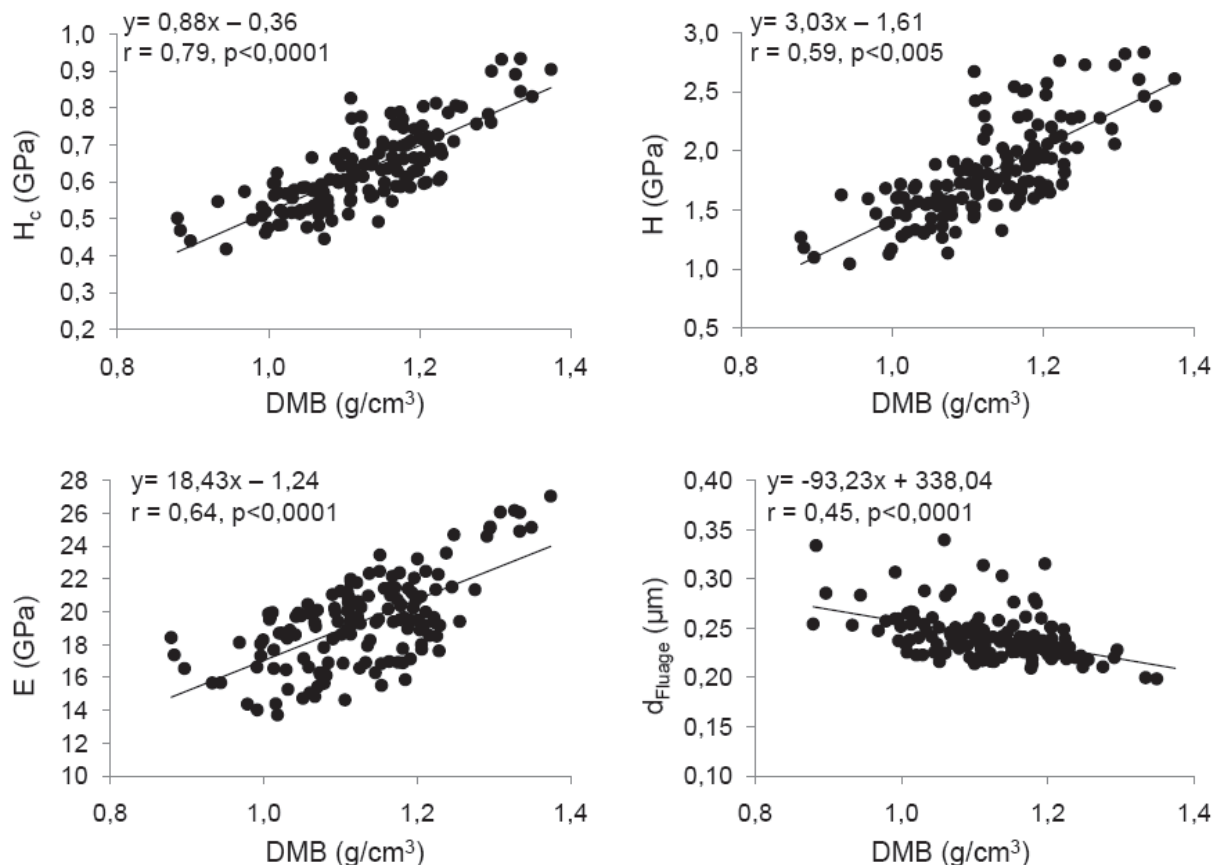


Figure 74 : Régressions linéaires obtenues entre le degré de minéralisation (DMB), et les variables micromécaniques dans l'os cortical de femmes ostéoporotiques non traitées (PMOP). Le DMB est significativement corrélé avec les paramètres reflétant les trois domaines de déformations principaux : élastique-plastique (H_c) élastique (E), plastique (H) et visqueux (d_{Fluage}).

Variables	DMB	H _c	H	E	d _{Fluage}	W _{tot}	W _p	W _e	Ductilité
DMB	1								
H _c	0,790 ***	1							
H	0,742 *	0,959 ***	1						
E	0,645 ***	0,794 ***	0,591 *	1					
d _{Fluage}	-0,562 ***	-0,644 ***	-0,555 ***	-0,632 ***	1				
W _{tot}	0,750 ***	0,971 ***	0,929 ***	0,776 ***	-0,563 ***	1			
W _p	0,734 ***	0,945 ***	0,866 ***	0,840 ***	-0,588 ***	0,987 ***	1		
W _e	0,716 ***	0,938 ***	0,984 ***	0,564 ***	-0,457 ***	0,936 ***	0,868 ***	1	
Ductilité	-0,399 ***	-0,507 ***	-0,696 ***	0,060	0,090	-0,443 ***	-0,296 ***	-0,726 ***	1

Tableau 20 : Matrice de corrélation présentant les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson obtenues entre le degré de minéralisation (DMB) mesuré par microradiographie quantitative et les variables micromécaniques: la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), le travail d'indentation total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e) et l'index de ductilité sur une population de 150 ostéons et régions de tissu interstitiel corticaux de femmes ostéoporiques non traitées (PMOP). Le degré de minéralisation est significativement corrélé avec toutes les variables mécaniques reflétant les différents domaines de déformation. * p < 0,05, *** p < 0,0001.

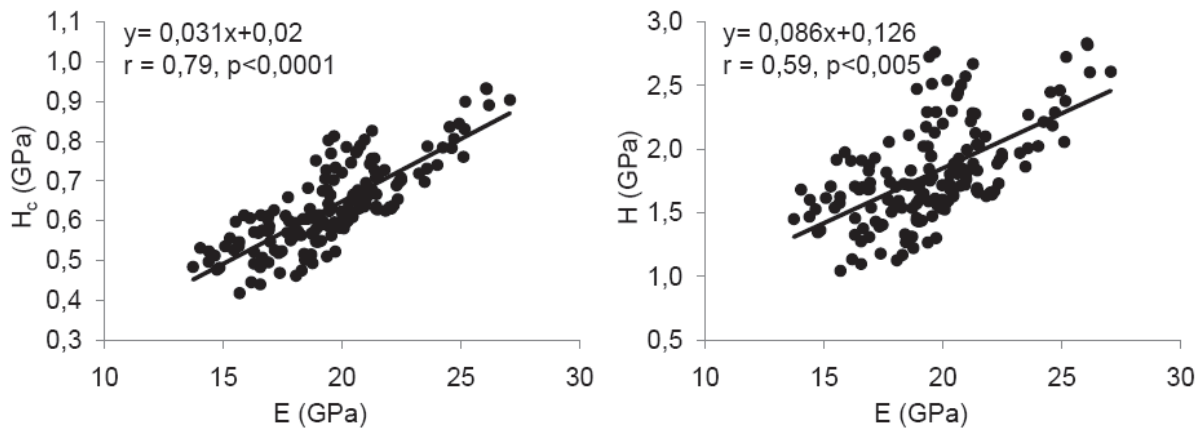


Figure 75 : Régressions linéaires obtenues entre le module élastique (E), la dureté de contact (H_c) et la dureté vraie (H) dans l'os cortical de femmes ostéoporotiques non traitées (PMOP). La dureté vraie qui est purement plastique, montre une corrélation significative avec E moins forte qu'entre E et H_c .

Dans le domaine des sciences des matériaux, le rapport H/E^* représente un index de la plasticité du matériau testé (Cheng et Cheng 1998; Sakai 1999). Ce rapport a été corrélé aux mesures des travaux d'indentations afin de pouvoir déduire les paramètres classiques obtenus en indentation à partir des énergies nécessaires à créer l'empreinte. Cette relation linéaire inverse entre H/E^* et $1-W_e/W_{tot}$ (*i.e.*, la ductilité d'indentation) est retrouvé dans le tissu osseux de femmes ostéoporotiques non traitées ($r=-0,92$, $p < 0,0001$, Fig. 76).

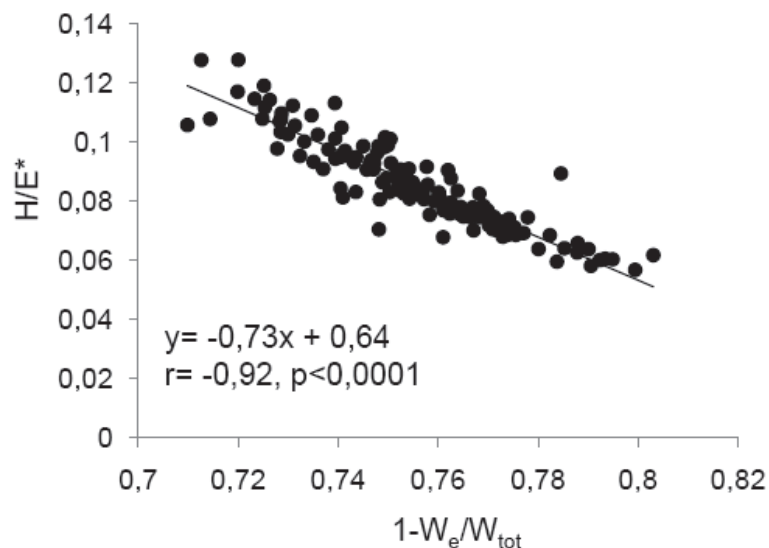


Figure 76 : Régression linéaires obtenue entre le rapport dureté vraie (H) et le module de déformation plane (E^*) et la ductilité d'indentation ($1-W_e/W_{tot}$).

3.2.1.2. Rôle de la qualité du minéral et du collagène dans le comportement micromécanique

Ce paragraphe concerne les ostéons et zones de tissu interstitiel identifiés après recoupe à 2 μm des coupes à 100 μm utilisées pour la microradiographie et les tests d'indentation, soit un total de 55 zones. Les statistiques descriptives des variables analysées pour ces zones sont présentées dans le tableau 21. La distribution des variables (Moyenne, écart type, Min et Max) de cette sous population de ROI est comparable à celle de la population globale ($n=150$) décrite dans le paragraphe précédent pour le DMB, H_c , H, E, d_{Fluage} , W_{tot} , W_p , W_e et l'index de ductilité d'indentation (Tableaux 19 et 21).

Variables	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
DMB (g/cm^3)	1,101	0,080	0,925	1,278
Index de minéralisation	2,844	0,419	1,953	4,001
Maturité minérale	1,847	0,227	1,300	2,547
Index de cristallinité minérale	24,775	0,698	22,849	26,086
Carbonatation minérale	0,007	0,001	0,005	0,010
Maturité du collagène	4,676	0,758	2,784	5,993
H_c (GPa)	0,627	0,093	0,477	0,836
H (GPa)	1,804	0,341	1,222	2,671
E (GPa)	19,099	2,693	14,029	24,524
d_{Fluage} (μm)	0,248	0,028	0,216	0,340
W_{tot} (mN. μm)	702,241	93,551	516,622	961,799
W_p (mN. μm)	525,547	65,931	384,116	698,548
W_e (mN. μm)	176,694	31,493	126,763	263,251
Ductilité	0,749	0,019	0,710	0,776

Tableau 21 : Statistiques descriptives pour le degré de minéralisation (DMB), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), les travaux d'indentation [total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e)] ainsi que l'index de ductilité d'indentation et les variables obtenues par FTIRM, mesurés sur 55 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel corticaux de femmes ostéoprotiques non traitées (PMOP).

L'influence des différentes variables d'intérêt sur le comportement micromécanique de l'os cortical de femmes ostéoporotique non traitées est mise en évidence dans la matrice de corrélation présentée ci-après (Tableau 22).

Variables	DMB	Index de minéralisation	Maturité minérale	Index de cristallinité minérale	Carbonatation minérale	Maturité collagénique
DMB	1					
Index de minéralisation	0,531 ***	1				
Maturité minérale	0,233	0,455 ***	1			
Index de cristallinité minérale	-0,260	-0,368 ***	0,002	1		
Carbonatation minérale	-0,092	-0,222	-0,078	0,311 *	1	
Maturité du collagène	0,520 ***	0,649 ***	0,446 ***	-0,185	-0,180	1
H _c	0,699 ***	0,664 ***	0,340 *	-0,245	-0,024	0,553 ***
H	0,574 ***	0,680 ***	0,203	-0,254	-0,012	0,554 ***
E	0,680 ***	0,405 ***	0,484 ***	-0,145	-0,025	0,347 *
d _{Fluage}	-0,240	-0,321 *	-0,294	0,196	-0,097	-0,089
W _{tot}	0,550 ***	0,572 ***	0,187	-0,331 *	0,014	0,490 ***
W _p	0,557 ***	0,497 ***	0,208	-0,314 *	-0,087	0,446 ***
W _e	0,466 ***	0,659 ***	0,119	-0,325 *	0,224	0,521 ***
Ductilité	-0,110	-0,496 ***	0,093	0,156	-0,477 ***	-0,327 *

Tableau 22 : Matrice de corrélation présentant les valeurs de coefficient de corrélation de Pearson obtenues entre le degré de minéralisation (DMB) mesuré par microradiographie quantitative, les variables micromécaniques : la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), le travail d'indentation total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e) et l'index de ductilité, et les caractéristiques du minéral et du collagène mesurées par FTIRM, sur une population de 55 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel corticaux de femmes ostéoporiques non traitées (PMOP). * p < 0,05, *** p < 0,0001.

Les variables reflétant la qualité du minéral ont un impact significatif sur les propriétés micromécaniques de l'os cortical chez la femme ostéoporotique. En effet, la maturité minérale qui reflète l'âge du minéral osseux, est significativement et positivement corrélée avec H_c et E ($r=0,34$, $p<0,05$ et $r=0,48$, $p<0,0001$, respectivement), deux variables qui ont une composante élastique (Tableau 22 et Fig. 77). En revanche, la maturité minérale n'est pas corrélée pas avec H , qui elle est une variable purement plastique. L'index de cristallinité minérale qui est influencé par la taille et la perfection cristallines, n'est corrélé ni avec les paramètres classiques obtenus en indentation, à savoir E et H_c , ni avec H . Cependant, il est inversement corrélé ($r=-0,33$, $p<0,05$) avec le travail total d'indentation (W_{tot}), ce qui signifie que plus la cristallinité est élevée, plus l'énergie nécessaire pour créer une même déformation au sein d'un BSU est élevée (Tableau 22). Le taux de substitution des carbonates dans la maille cristalline (*i.e.*, carbonatation minérale) est inversement corrélé avec l'index de ductilité d'indentation ($r=-0,48$, $p<0,0001$). Autrement dit, plus le taux de carbonate est élevé, plus le tissu osseux tend à être élastique (Tableau 22).

La maturité collagénique est significativement corrélée avec H_c et H ($r=0,55$, $p<0,0001$ et $r=0,55$, $p<0,0001$, respectivement) et de manière plus modérée avec E ($r=0,35$, $p<0,05$). Cette variable qui représente l'âge de la matrice organique est aussi corrélée avec le travail total d'indentation ($r=0,49$, $p<0,0001$). Il est important de noter que les variables de la maturité des deux composantes principales de la matrice osseuse influencent le comportement mécanique de manière différente. La maturité du minéral influence E mais pas H , tandis que la maturité du collagène agit plutôt sur E . La composante minérale est donc associée avec le domaine de déformation élastique et la composante organique avec le domaine de déformation plastique (Fig. 77).

Afin d'analyser les contributions de la quantité de minéral, de sa qualité et de la maturité du collagène dans les propriétés micromécaniques du tissu osseux, nous avons utilisé une analyse par régression pas à pas qui indique la significativité de l'entrée d'une variable dans un modèle, ainsi que son rang en terme d'importance dans ce modèle. Suite à cette analyse, l'utilisation de corrélations partielles a permis d'obtenir la valeur de β qui indique la liaison de la variable indépendante avec la variable à prédire si son entrée dans le modèle est significative (Tableau 23). Un modèle simple visant à expliquer E , H_c et H par le DMB, la maturité du collagène et l'index de cristallinité minérale a été considéré. Les résultats montrent que E , est expliqué par la quantité de minéral ($\beta=0,68$, $p<0,001$) alors que ni la maturité du collagène, ni l'index de cristallinité n'a une entrée significative dans le modèle. La dureté de contact est expliquée majoritairement par le DMB ($\beta=0,46$, $p<0,001$) puis par la maturité du collagène ($\beta=0,33$, $p=0,004$), l'index de cristallinité minérale est lui hors modèle. La dureté vraie est uniquement expliquée par la maturité du collagène ($\beta=0,58$, $p<0,001$). Ces résultats confirment et renforcent ceux obtenus par l'étude des corrélations bivariées, à savoir que la déformation plastique est majoritairement liée au collagène alors que la déformation élastique est majoritairement expliquée par le contenu minéral.

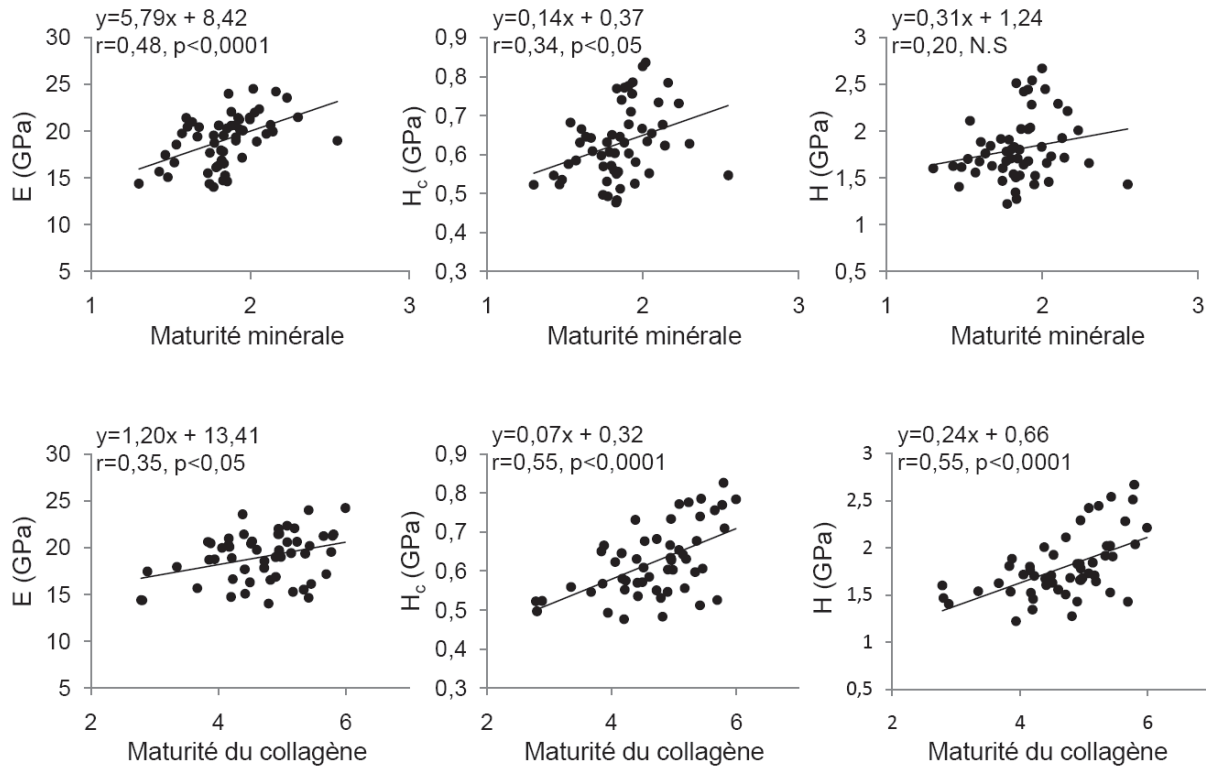


Figure 77 : Régressions linéaires obtenues entre le module élastique (E), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H) et la maturité du minéral (en haut) et celle du collagène (en bas) dans l'os cortical de femmes ostéoprotiques non traitées (PMOP). Ces résultats soulignent l'importance de la maturité minérale dans la déformation élastique et celle du collagène dans la déformation plastique.

Variables					
Dépendante	Indépendante	Rang donné par la régression pas à pas	R final	β	Valeur de p
E	DMB	1		0,68	<0,001
	Maturité du collagène	hors modèle	0,68	-	-
	Index de cristallinité minérale	hors modèle		-	-
H_c	DMB	1		0,46	<0,001
	Maturité du collagène	2	0,74	0,33	0,004
	Index de cristallinité minérale	hors modèle		-	-
H	DMB	hors modèle		-	-
	Maturité du collagène	1	0,58	0,58	<0,001
	Index de cristallinité minérale	hors modèle		-	-

Tableau 23 : Résumé de l'analyse par régression pas à pas et corrélations partielles décrivant le module élastique (E), la dureté de contact (H_c) et la dureté vraie (H) en fonction du degré de minéralisation (DMB), de la maturité du collagène et de l'index de cristallinité minérale dans l'os cortical de femmes ostéoprotiques non traitées (PMOP).

3.2.2. Effets d'un traitement prolongé par l'alendronate oral sur les propriétés microstructurales et micromécaniques à l'échelle du BSU

Dans le groupe ALN_{LT}, 185 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel ont été caractérisés par microradiographie et testés par indentation instrumentée. Les statistiques descriptives des variables obtenues avec ces deux techniques sont présentées dans le tableau 24.

Variables	Moyenne	Valeur de p vs . PMOP	Ecart type	Minimum	Maximum
DMB (g/cm ³)	1,124	0,7651	0,086	0,831	1,340
H _c (GPa)	0,594	0,0004	0,087	0,373	0,795
H (GPa)	1,815	0,9175	0,324	1,036	2,695
E (GPa)	16,740	< 0,0001	2,754	7,978	24,805
d _{Fluage} (μm)	0,232	0,4896	0,018	0,197	0,318
W _{tot} (mN.μm)	677,598	0,0010	90,700	417,649	877,413
W _p (mN.μm)	502,470	< 0,0001	68,333	305,163	659,791
W _e (mN.μm)	175,128	0,9026	27,396	106,873	248,055
Ductilité	0,742	< 0,001	0,022	0,655	0,796

Tableau 24 : Statistiques descriptives pour le degré de minéralisation (DMB), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), les travaux d'indentation [total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e)] ainsi que l'index de ductilité d'indentation mesurés sur 185 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel dans l'os cortical de patientes ostéoporotiques traitées de manière prolongée par l'ALN (ALN_{LT}). Les valeurs de p significatives sont soulignées dans des cases grisées.

Les groupes PMOP et ALN_{LT}, présentent des distributions de DMB identiques (Tableaux 19 et 24). Pour rappel, le choix des ROI à tester a été réalisé de manière à étudier la gamme de minéralisation la plus large possible, sans tenir compte des proportions relatives d'os ancien et d'os récent. Il est donc cohérent de ne pas obtenir de différence pour le DMB contrairement à ce qui a été observé à l'échelle tissulaire (Tableau 15). De plus, les valeurs minimales et maximales sont similaires entre les deux groupes, confirmant l'absence d'hypo- et surtout d'hyperminéralisation après traitement, comme le montraient les courbes de distribution du DMB au niveau tissulaire (Fig. 67). Par rapport aux moyennes obtenues dans le groupe PMOP, H_c, E, W_{tot}, W_p et l'index de ductilité d'indentation sont significativement plus bas dans le groupe ALN_{LT}. Ces résultats montrent que le comportement micromécanique de la matrice osseuse est modifié après administration prolongée d'ALN oral, indépendamment de la densité minérale tissulaire. Le tableau 25 montre que dans le groupe ALN_{LT}, les corrélations entre le DMB et les variables micromécaniques sont les mêmes que dans le groupe PMOP (Tableaux 20 et 25). Ceci indique que les modifications mécaniques observées dans le groupe traité ne sont pas liées à des modifications de DMB.

Variables	DMB	H _c	H	E	d _{Fluage}	W _{tot}	W _p	W _e	Ductilité
DMB	1								
H _c	0,664 ***	1							
H	0,619 ***	0,859 ***	1						
E	0,462 ***	0,779 ***	0,356 ***	1					
d _{Fluage}	-0,568 ***	-0,671 ***	-0,564 ***	-0,568 ***	1				
W _{tot}	0,631 ***	0,973 ***	0,792 ***	0,807 ***	-0,568 ***	1			
W _p	0,586 ***	0,929 ***	0,662 ***	0,886 ***	-0,535 ***	0,980 ***	1		
W _e	0,626 ***	0,904 ***	0,971 ***	0,462 ***	-0,549 ***	0,867 ***	0,750 ***	1	
Ductilité	-0,169 *	-0,113	-0,567 ***	0,480 ***	0,110	0,006	0,203 ***	-0,489 ***	1

Tableau 25 : Matrice de corrélation présentant les valeurs de coefficient de corrélation de Pearson obtenues entre le degré de minéralisation mesuré par microradiographie quantitative et les variables micromécaniques : la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), le travail d'indentation total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e) et l'index de ductilité sur une population de 185 ostéons et régions de tissu interstitiel corticaux de patientes ostéoporotiques traitées de manière prolongée par l'ALN (ALN_{LT}). Le degré de minéralisation est significativement corrélé avec toutes les variables mécaniques reflétant les différents domaines de déformation. * p < 0,05, *** p < 0,0001.

Comme observé dans le groupe PMOP, la relation inverse entre H/E^* et $1-W_e/W_{tot}$ est maintenue avec les mêmes caractéristiques dans le groupe ALN_{LT} (Fig. 78). Ce résultat confirme la validité des variables déduites des essais d'indentation instrumentée.

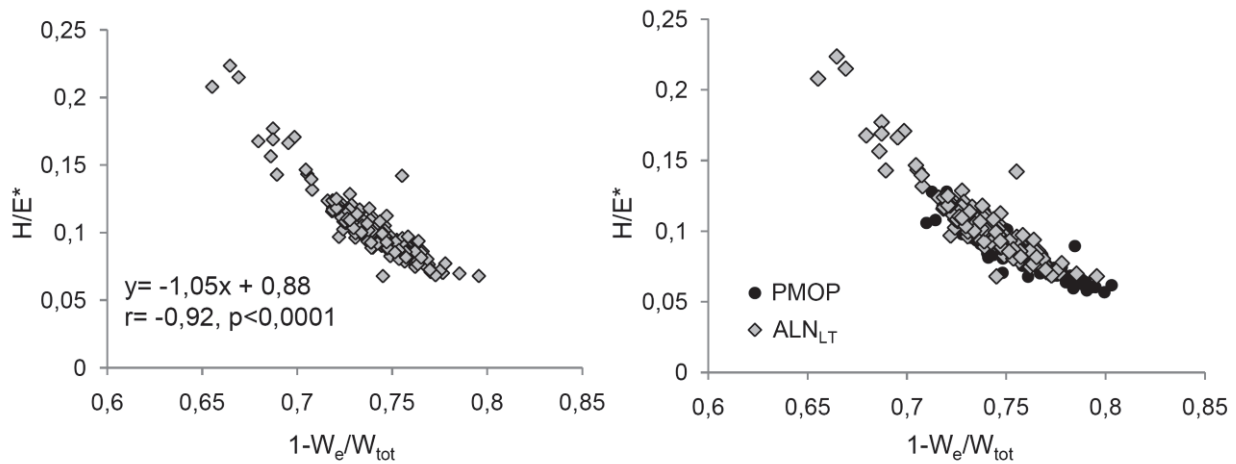


Figure 78 : Régressions linéaires obtenues entre le rapport dureté vraie (H) et le module de déformation plane (E^*) et la ductilité d'indentation ($1-W_e/W_{tot}$) dans le groupe ALN_{LT} et PMOP (à droite).

L'évaluation des caractéristiques du minéral et de la maturité collagénique par FTIRM n'a pu être effectuée que sur 98 ostéons et zones de tissu interstitiel. Les statistiques descriptives relatives à ces ROI sont présentées et comparées à celles obtenues pour le groupe PMOP dans le tableau 26. Lorsque l'on compare les moyennes des différentes variables d'intérêts, on note que pour un DMB et une maturité minérale similaire, l'index de cristallinité minérale est significativement plus élevé dans le groupe ALN_{LT} que dans le groupe PMOP, traduisant donc une diminution de la cristallinité. Le groupe ALN_{LT} montre aussi une carbonatation et une maturité du collagène significativement plus élevées que dans le groupe PMOP. Au niveau micromécanique, H_c et E sont significativement plus basses dans le groupe traité alors que H n'est pas influencée (Tableau 26). Le traitement prolongé par l'alendronate semble donc agir davantage sur l'élasticité du tissu osseux que sur sa plasticité.

Mesurée dans le groupe ALN_{LT} , la carbonatation minérale est significativement plus haute que dans le groupe PMOP, cependant, cette variable n'est associée avec aucune des variables du comportement micromécanique mesurées par indentation (Tableaux 26 et 27). L'utilisation prolongée de l'ALN montre aussi un déplacement à charge constante plus bas que dans le groupe PMOP. Ceci implique qu'indépendamment des changements du DMB, les patientes traitées ont une matrice osseuse avec une viscosité diminuée. Les travaux d'indentation sont aussi influencés par l'ALN. Le travail d'indentation total est plus bas dans le groupe traité que dans le groupe PMOP, cependant, la distribution de cette variable étant large, le seuil de significativité n'est pas atteint. Les résultats montrent que cette tendance à la diminution de W_{tot} est expliquée par une

diminution du travail d'indentation plastique (W_p) (501,4 et 525,5 mN.μm, $p=0,04$ pour les groupes ALN_{LT} et PMOP, respectivement) ; alors que le travail d'indentation élastique (W_e) est similaire entre les deux groupes (174,5 et 176,7 mN.μm, N.S pour les groupes ALN_{LT} et PMOP, respectivement).

Ces résultats indiquent donc que le traitement prolongé par l'ALN oral induit, par rapport au tissu osseux de patientes non traitées, des modifications du comportement mécanique, ainsi que des modifications de la nanostructure indépendamment de la quantité et de la maturité du minéral. La matrice de corrélations bivariées montre que le traitement par l'ALN module aussi les liens entre les différentes variables mesurées (Tableaux 22 et 27, Fig. 79). En effet, contrairement à ce qui est observé chez les patientes PMOP non traitées, la maturité minérale n'est pas associée avec les propriétés mécaniques mesurées localement par indentation (Tableau 27 et Fig. 80). Les liens entre la maturité du collagène et les propriétés mécaniques présentent aussi des différences entre les deux groupes. En effet, la liaison qui existait entre la maturité du collagène et la dureté vraie dans le groupe PMOP, n'est pas retrouvée dans le groupe ALN_{LT}. Parallèlement, les corrélations entre la maturité minérale, H_c et E sont maintenues dans le groupe traité.

Variables	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	p	
					Moyenne PMOP	ALN _{LT} vs. PMOP
DMB (g/cm ³)	1,112	0,078	0,831	1,310	1,101	0,3982
Index de minéralisation	2,809	0,410	1,892	3,796	2,844	0,6186
Maturité minérale	1,926	0,298	1,208	2,526	1,847	0,0950
Index de cristallinité minérale	25,290	0,763	23,066	27,841	24,775	< 0,0001
Carbonatation minérale	0,0072	0,001	0,006	0,010	0,0068	0,0006
Maturité du collagène	4,992	0,653	3,394	7,085	4,676	0,0081
H_c (GPa)	0,590	0,084	0,387	0,744	0,627	0,0134
H (GPa)	1,793	0,314	1,036	2,695	1,804	0,8458
E (GPa)	16,767	2,580	7,978	20,945	19,099	< 0,0001
d_{Fluage} (μm)	0,234	0,018	0,209	0,318	0,248	0,0008
W_{tot} (mN.μm)	675,903	87,450	490,551	819,523	702,241	0,1066
W_p (mN.μm)	501,402	65,485	342,229	610,814	525,547	0,0445
W_e (mN.μm)	174,501	27,020	106,873	236,997	176,694	0,6719
Ductilité	0,742	0,023	0,655	0,796	0,749	0,0621

Tableau 26 : Statistiques descriptives pour le degré de minéralisation (DMB), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), les travaux d'indentation total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e) ainsi que l'index de ductilité d'indentation et les paramètres obtenus par FTIRM, mesurés sur 98 ostéons et régions de tissu osseux interstitiel corticaux de patientes ostéoporotiques traitées de manière prolongée par l'ALN (ALN_{LT}). Les valeurs de p significatives sont soulignées dans des cases grisées.

Le traitement par l'ALN influence aussi le lien entre l'index de cristallinité minérale et les propriétés micromécaniques. Alors que dans le groupe PMOP la cristallinité n'était pas associée avec H, H_c ou E, dans le groupe ALN_{LT}, la cristallinité est significativement corrélée avec ces variables (r compris entre -0,43 et -0,54, p<0,0001).

L'ensemble de ces résultats confirme les diminutions de microdureté globale et de cristallinité observées à l'échelle tissulaire et met en évidence que ces deux phénomènes sont liés à l'échelle du BSU. L'utilisation de l'approche statistique basée sur la régression pas à pas et les corrélations partielles, met aussi en avant l'importance de la cristallinité dans le comportement mécanique de la matrice osseuse traitée (Tableau 28). Dans le groupe ALN_{LT} par rapport aux données obtenues dans le groupe PMOP, l'index de cristallinité minérale a une entrée significative dans l'explication de E, H_c et H ($\beta=-0,28$, $\beta=-0,30$ et $\beta=-0,22$, respectivement avec p <0,008). De plus, la régression pas à pas montre que la prédiction de E dans ce modèle est majoritairement liée à la cristallinité (rang 1) puis au DMB (rang 2), tandis que dans le groupe PMOP, seul le DMB expliquait E (Tableaux 23 et 28). La diminution de la cristallinité observée après un traitement prolongé par l'ALN a donc un rôle dans les changements du comportement micromécanique, en accord avec les résultats obtenue à l'échelle tissulaire.

Variables	DMB	Index de minéralisation	Maturité minérale	Index de cristallinité minérale	Carbonatation minérale	Maturité collagénique
DMB	1					
Index de minéralisation	0,411 ***	1				
Maturité minérale	-0,158	0,592 ***	1			
Index de cristallinité minérale	-0,370 ***	-0,573 ***	-0,033	1		
Carbonatation minérale	-0,120	-0,272 *	-0,189	0,125	1	
Maturité du collagène	0,026	0,430 ***	0,426 ***	-0,272 ***	-0,106	1
H _c	0,667 ***	0,438 ***	-0,118	-0,539 ***	-0,037	0,233 *
H	0,656 ***	0,433 ***	-0,070	-0,456 ***	-0,043	0,151
E	0,401 ***	0,290 ***	-0,130	-0,428 ***	-0,002	0,254 *
d _{Fluage}	-0,577 ***	-0,308 ***	0,139	0,434 ***	-0,060	-0,125
W _{tot}	0,594 ***	0,432 ***	-0,092	-0,532 ***	-0,041	0,227 *
W _p	0,520 ***	0,402 ***	-0,091	-0,512 ***	-0,036	0,236 *
W _e	0,663 ***	0,440 ***	-0,082	-0,484 ***	-0,043	0,165
Ductilité	-0,308 ***	-0,181	0,014	0,068	-0,003	0,041

Tableau 27 : Matrice de corrélation présentant les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson obtenues entre le degré de minéralisation (DMB) mesuré par microradiographie quantitative, les variables micromécaniques : la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H), le module élastique (E), le déplacement à charge constante (d_{Fluage}), le travail d'indentation total (W_{tot}), plastique (W_p) et élastique (W_e) et l'index de ductilité et les caractéristiques du minéral et du collagène mesurées par FTIRM, sur une population de 98 ostéons et régions de tissu interstitiel corticaux de patientes ostéoporotiques traitées de manière prolongée par l'ALN (ALN_{LT}). * p < 0,05, *** p < 0,0001.

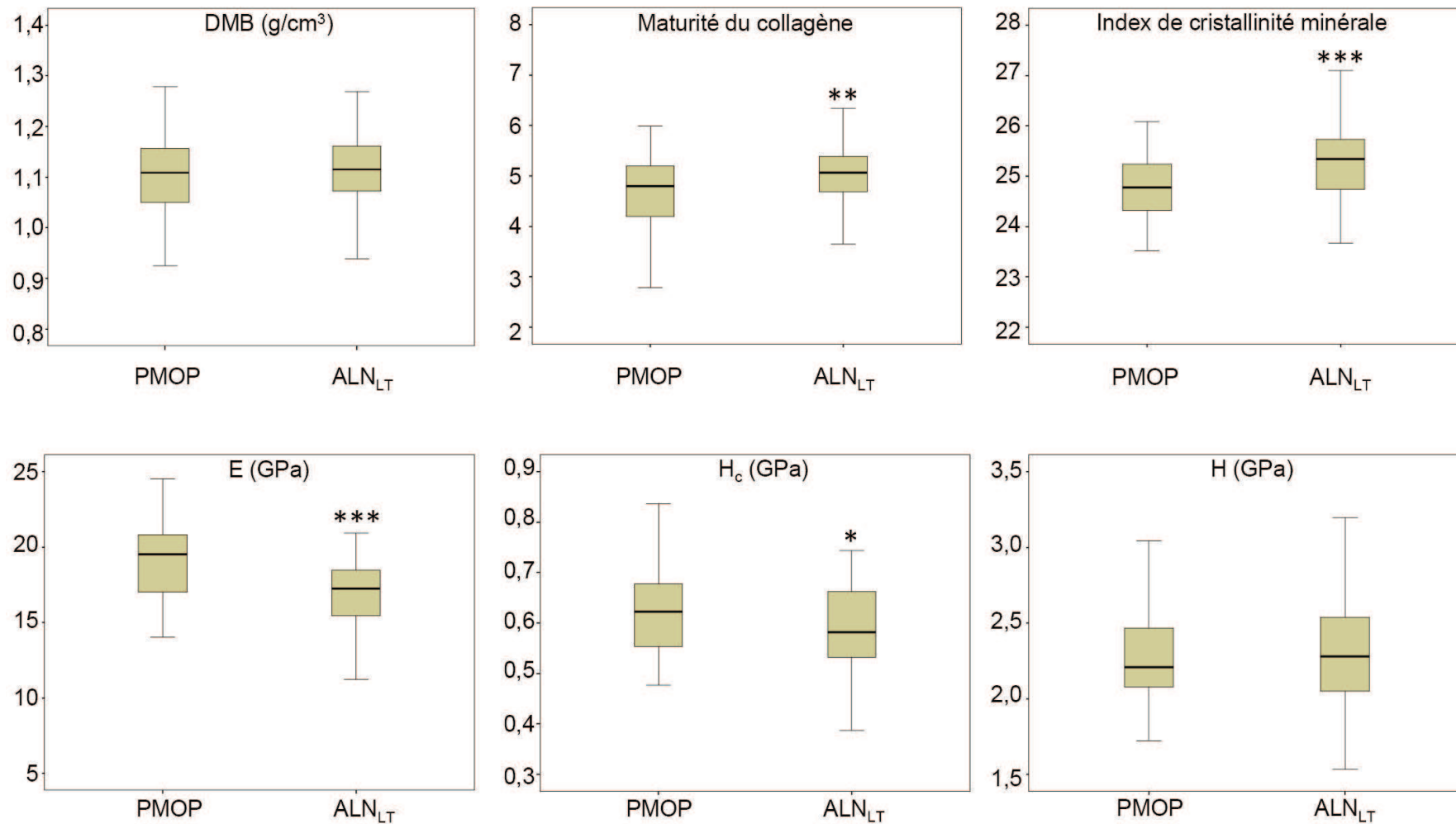


Figure 79 : Effets d'un traitement prolongé par l'alendronate oral (ALN_{LT}) sur le degré de minéralisation osseuse (DMB), la maturité du collagène, l'index de cristallinité minérale, le module élastique (E), la dureté de contact (H_c) et la dureté vraie (H). Comparaisons avec le groupe non traité (PMOP) * p < 0,05, ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

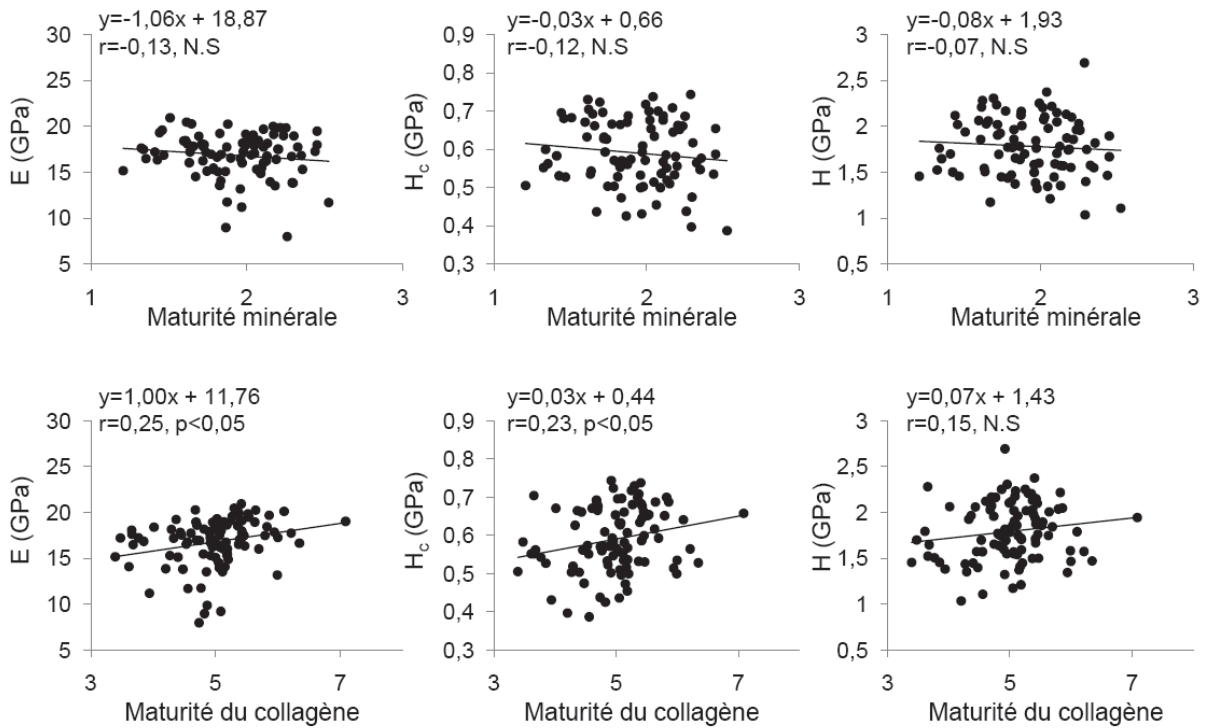


Figure 80 : Régressions linéaires obtenues entre le module élastique (E), la dureté de contact (H_c), la dureté vraie (H) et la maturité du minéral (en haut) et du collagène (en bas). Chez les patientes ayant reçu un traitement prolongé par l'alendronate oral, la maturité minérale n'est pas associée avec les variables classiques obtenues par indentation.

Variables					
Dépendante	Indépendante	Rang donné par la régression pas à pas	R final	β	Valeur de p
E	DMB	2		0,30	0,002
	Maturité du collagène	hors modèle	0,54	-	-
	Index de cristallinité minérale	1		-0,28	0,006
H_c	DMB	1		0,57	<0,0001
	Maturité du collagène	3	0,76	0,15	0,031
	Index de cristallinité minérale	2		-0,30	0,001
H	DMB	1		0,58	<0,0001
	Maturité du collagène	hors modèle	0,71	-	-
	Index de cristallinité minérale	2		-0,22	0,008

Tableau 28 : Résumé de l'analyse par régression pas à pas et corrélations partielles décrivant le module élastique (E), la dureté de contact (H_c) et la dureté vraie (H) en fonction du degré de minéralisation (DMB), de la maturité du collagène et de l'index de cristallinité minérale dans l'os cortical de patientes ostéoporotiques traitées de manière prolongée par l'ALN (ALN_{LT}).

4. Discussion

Cette étude a exploré les effets, sur la minéralisation, les caractéristiques du minéral, du collagène et la microdureté, d'un traitement prolongé par l'ALN dans un groupe de patientes hors protocole clinique souffrant d'ostéoporose ménopausique. Au niveau tissulaire, nous avons montré que la matrice osseuse de patientes traitées présentait un degré de minéralisation élevé dû à une homogénéisation d'une matrice plus ancienne. Cette augmentation moyenne de « l'âge » du tissu osseux était aussi vérifiée au niveau de l'ultrastructure, avec des maturités minérale et collagénique augmentées par rapport aux patientes ostéoporotiques non traitées. Malgré un degré de minéralisation plus élevé, les microduretés corticale et trabéculaire étaient significativement diminuées dans le groupe traité. De plus, pour une matrice osseuse d'âge donné, la cristallinité minérale était diminuée dans le groupe traité. En utilisant une approche multimodale à l'échelle du BSU nous avons abordé le rôle des nano- et microstructures sur le comportement micromécanique de la matrice osseuse. Dans le groupe PMOP, l'utilisation de variables innovantes a conduit à une caractérisation précise des propriétés micromécaniques. L'utilisation d'un modèle statistique basé sur une définition simple de la structure incluant la quantité de minéral (DMB), sa qualité (index de cristallinité minérale) ainsi que la qualité du collagène (maturité du collagène) a mis en évidence les rôles distincts de ces variables dans le comportement mécanique. En effet, si l'implication de la composante minérale dans les déformations élastiques est bien connue, nous avons montré pour la première fois à cette échelle, le rôle de la matrice organique dans le régime de déformation plastique. L'analyse du groupe ALN_{LT} a confirmé les résultats observés à l'échelle tissulaire, à savoir qu'après traitement les propriétés mécaniques locales sont altérées indépendamment de la minéralisation et de l'âge de la matrice. De plus, si la cristallinité n'influçait pas le comportement mécanique dans le groupe PMOP, sa modulation sous traitement était largement impliquée dans la diminution des propriétés mécaniques.

4.1. Influence d'un traitement prolongé par l'alendronate sur le degré de minéralisation : implication dans le comportement micromécanique

Le DMB moyen mesuré dans l'os cortical et trabéculaire chez les patientes PMOP traitées 3 ans ou plus par l'ALN était significativement plus élevé que dans le groupe non traité. Les corrélations mises en évidence entre l'Ac.F mesurée par histomorphométrie, le DMB et l'HI ont déjà été observées au cours de l'étude des effets du risédronate en utilisant la microtomographie 3D (Borah *et al.* 2005). Ces corrélations indiquent que l'augmentation du DMB est liée à la profonde réduction de l'activité du remodelage osseux de 90% après trois ans et de 80% dans le groupe traité au long cours par rapport aux patientes non traitées. L'augmentation de DMB sous ALN est donc due à une proportion plus élevée de matrice plus minéralisée. Ce mécanisme montré initialement pour la population de patientes traitées 3 ans (Boivin *et al.* 2000; Roschger *et al.* 2001; Boivin et Meunier 2002b; Boskey *et al.* 2009) est donc maintenu au cours de la suite du traitement. Ces résultats sont aussi en accord avec les études montrant une augmentation de la densité minérale tissulaire suite à des traitements antirésorptifs par d'autres BP comme le

risédronate (Borah *et al.* 2005) ou encore par des SERMs comme le raloxifène (Boivin *et al.* 2003). Cette étude montre donc qu'un traitement prolongé par l'ALN maintient le DMB à un niveau plus élevé que chez les patientes non traitées. Or, le DMB est une variable jouant un rôle majeur dans la résistance mécanique globale, ce qui suggère une amélioration de la résistance osseuse (Zioupou *et al.* 2000; Follet *et al.* 2004).

Le caractère transversal de l'étude et le fait que le groupe ALN_{LT} soit composé de patientes hors protocole clinique, rendent les comparaisons directes entre les groupes ALN_{LT} et ALN_{3ans} limitées. Cependant, même si par rapport au groupe PMOP, le DMB est plus élevé dans le groupe ALN_{LT}, il est plus bas que dans le groupe ALN_{3ans}. Ceci montre que l'augmentation du DMB n'est pas continue avec la durée du traitement, en accord avec l'absence de corrélations entre les variables analysées et la durée de traitement. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans l'étude FLEX. Le pourcentage massique de calcium au niveau tissulaire évalué par qBEI sur des biopsies traitées 5 ans ALN + 5 ans PLA et 5 + 5 ans ALN n'est pas significativement modifié entre les deux groupes (Roschger *et al.* 2010). Aussi, entre 3 et 10 ans de traitement le pourcentage de calcium atteint un plateau tandis que l'hétérogénéité de cette variable augmente. Ces résultats suggèrent que la densité minérale tissulaire n'augmente pas progressivement au cours des 10 ans de traitement (Roschger *et al.* 2010). Ce qui est cohérent avec les résultats observés à l'échelle de l'organe. Les données de l'étude FLEX montrent en effet qu'après 4 ans de traitement par l'ALN oral (10mg/ jour) la BMD mesurée à la hanche totale, au col fémoral et au trochanter se stabilise et n'augmente pas de manière continue (Bone *et al.* 2004; Black *et al.* 2006). Ces résultats sont en accord avec le dosage des marqueurs biochimiques du remodelage osseux qui ne diminuent pas de manière continue au cours des 10 ans de traitement, mais semblent se stabiliser, voire augmenter après 3 ans (Bone *et al.* 2004; Black *et al.* 2006). Basé sur le fait que la mesure de la BMD tient compte à la fois de la minéralisation et du volume osseux, il a été émis l'hypothèse que le maintien de la BMD et la tendance à l'augmentation de l'hétérogénéité de la minéralisation au cours du traitement pouvait être liée à une balance formation/résorption positive, mais impliquant une augmentation de volume osseux trop faible pour être détectée par histomorphométrie (Fratzl *et al.* 2007; Roschger *et al.* 2010). Une évolution comparable a été rapportée avec le risédronate, dans une étude incluant 3 biopsies par patiente (à l'inclusion dans l'étude et après 3 et 5 ans de traitement), le degré de minéralisation était augmenté après trois ans et maintenu après 5 ans (Borah *et al.* 2005; Borah *et al.* 2006; Fratzl *et al.* 2007).

Les courbes de distribution de la minéralisation pour les valeurs hautes de DMB, ne mettent pas en évidence d'hyperminéralisation liée au traitement par rapport à la population de femmes contrôles disponible au laboratoire [n=30, âge (moyenne ± DS [gamme]) : 48,8 ± 20,9 [20-93] ans (Boivin et Meunier 2002a; Boivin *et al.* 2008)]. Sur ces courbes, la classe la plus élevée de DMB correspondait à la classe [1,45 – 1,50 g/cm³] et avait une fréquence d'observation de 0,1% et 0,003% dans les groupes ALN_{LT} et contrôle, respectivement. De plus, le DMB moyen et l'HI mesurés dans le groupe ALN_{LT} sont compris dans la gamme définie par la population contrôle (Boivin et Meunier 2002a; Boivin *et al.* 2008). Ceci confirme que l'augmentation de DMB liée au traitement par l'ALN est bien due à l'augmentation de la proportion de matrice plus

minéralisée et non à une augmentation du contenu minéral local au-delà des valeurs physiologiques maximales.

La corrélation entre la minéralisation osseuse et la microdureté a été montrée à de nombreuses reprises (Carlstrom 1954; Amprino 1958; Weaver 1966; Boivin *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010). La diminution de la microdureté observée après traitement alors que le degré de minéralisation est augmenté est donc un résultat inattendu. D'autant plus qu'il a été montré pour l'os trabéculaire iliaque de femmes contrôles ($n=23$, âge= 64 ± 5 ans) que la dureté et le module élastique étaient corrélés avec le taux de formation osseuse. Dans cette population, plus le taux de formation osseuse (BFR/BS) était bas, plus la dureté et le module étaient élevés (Wang *et al.* 2008b). Cependant, si l'effet des BP sur la minéralisation osseuse est bien illustré, peu d'études ont analysé leurs effets sur les propriétés micromécaniques à l'échelle tissulaire. Les principaux résultats existants ont été obtenus sur des modèles animaux et leurs conclusions diffèrent. Chez la rate ovariectomisée traitée 16 mois avec du pamidronate (0,6 mg/kg, 5 jours par mois) le module élastique mesuré dans la vertèbre était significativement diminué alors que la microdureté n'était pas modifiée (Brennan *et al.* 2009). Chez la chienne OVX dont le métabolisme osseux implique un remodelage de type Haversien, comme chez l'homme, un traitement de 23 semaines par l'ALN (6 mg/jour) n'influait ni la dureté Vickers, ni le module élastique mesurés à la diaphyse fémorale (Wang *et al.* 1999). En revanche, après un an de traitement avec une dose comparable (0,2 mg/kg/jour), la microdureté de l'os cortical vertébral était plus élevée que dans le groupe ayant reçu le véhicule, le module élastique n'était pas modifié (Wang *et al.* 2008a).

A l'échelle du BSU, la caractérisation des propriétés mécaniques par indentation instrumentée en utilisant une gamme de charges élevée est assez originale dans l'étude du tissu osseux. La littérature présente communément des études utilisant des charges maximales de l'ordre de la dizaine de μN pour des profondeurs d'indentation proches du μm . Dans ce dernier cas, le test est réalisé à l'échelle de la lamelle osseuse. Il a été montré que les propriétés mécaniques variaient d'une lamelle à l'autre au sein d'un même ostéon (Hengsberger *et al.* 2002; Fratzl et Weinkamer 2007). Cette hétérogénéité est liée à la structure rappelant celle du contreplaqué (i.e., « rotative plywood ») (Ascenzi et Bonucci 1968; Giraud-Guille 1988; Weiner *et al.* 1999), qui pour un plan de section donné, conduit à des orientations de fibres de collagène et/ou des différences de densité minérale d'une lamelle à l'autre (Marotti 1993). De plus, pour une orientation donnée, les propriétés mécaniques ne varient pas au sein d'une même lamelle (Hengsberger *et al.* 2001; Burket *et al.* 2011). Notre étude a impliqué des charges maximales proches de 500 mN pour atteindre une profondeur maximale de 5,2 μm . Ces conditions généraient des empreintes d'une trentaine de μm de diamètre, soit 4 à 6 lamelles permettant de s'affranchir de l'hétérogénéité inter-lamelles et de caractériser les propriétés à l'échelle du BSU. Suivant la théorie des contacts de Hertz, les propriétés mesurées par indentation concernent un volume semi ellipsoïdal dont la dimension verticale correspond à 9 fois la profondeur de l'indent et 7 fois pour la dimension radiale (Johnson 1985; Hengsberger *et al.* 2002). Pour des indents de 5 μm de profondeur, cela correspond à un volume de 45 μm de profondeur et 35 μm de diamètre. Ceci est compatible avec l'indentation sur des coupes de 100 μm , et le choix des régions à indenter a été réalisé de manière à respecter au mieux ce continuum supposé. Une étude préalable a aussi mis en évidence par microscopie à force atomique que les échantillons utilisés

présentaient une rugosité de surface proche de 200 nm (résultats non publiés). Cette rugosité est compatible avec la norme ISO 14577-4 qui préconise d'utiliser une profondeur d'indentation au moins 20 fois supérieure à la rugosité.

Pour les deux groupes de l'étude (ALN_{LT} et PMOP), les valeurs rapportées de DMB, E, H_c et H, à l'échelle du BSU, sont dans la gamme rapportée dans la littérature pour le tissu osseux (Hengsberger *et al.* 2002; Hoffler *et al.* 2005; Boivin *et al.* 2008; Zysset 2009; Smith *et al.* 2010). De même, pour les variables reflétant l'ultrastructure (carbonatation, maturité du collagène et index de cristallinité minérale) (Paschalis *et al.* 1996; Farlay *et al.* 2010). Les corrélations fortes obtenues entre le DMB et les variables micromécaniques confirment, à ce niveau d'organisation de la structure osseuse, le rôle majeur du contenu minéral dans le comportement mécanique. Ce rôle de la minéralisation sur la résistance de l'os est bien illustré et est connu à de nombreux niveaux d'organisation depuis la nanostructure jusqu'à l'échelle de l'organe (Hoc *et al.* 2006; Boivin *et al.* 2008; Mulder *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010; Burket *et al.* 2011). L'utilisation de la nanoindentation dans l'étude du tissu osseux a montré à de multiples reprises la forte dépendance entre E et H_c, justifiant le développement de la variable purement plastique H (Sakai 1999; Oyen 2006). Contrairement à une étude récente conduite sur le tissu osseux trabéculaire humain (Smith *et al.* 2010), une corrélation entre H et E a été retrouvée dans nos deux groupes. Cette liaison peut être justifiée par une gamme de valeurs de DMB plus large due au protocole expérimental (choix des zones en fonction de leur DMB), mais aussi au choix d'un groupe de patientes ostéoporotiques avec une activité de remodelage élevée. De plus, au cours de la minéralisation secondaire, l'évolution de la maturité du collagène et celle du DMB suivent une chronologie similaire (Bala *et al.* 2007). Or les résultats obtenus dans le groupe PMOP montraient que E était majoritairement expliqué par le DMB tandis que H l'était par la maturité du collagène. La corrélation entre H et E n'est donc pas paradoxale pour une population de BSUs incluant des valeurs de DMB extrêmes. La littérature issue de la science des matériaux homogènes et isotropes révèle une indépendance entre H et E (Cheng et Cheng 1998; Sakai 1999). Par exemple, le verre présente des valeurs de E et H de 74 GPa et 15 GPa, respectivement, tandis que pour le cuivre, ces valeurs sont de 130 GPa et 1,6 GPa, respectivement (Sakai 1999). La complexité du comportement mécanique du tissu osseux, ainsi que ses différences par rapport à celui d'autres matériaux est aussi illustrée par les corrélations observées entre le rapport H/E^* et $1-W_e/W_{tot}$. Par rapport à la régression linéaire entre ces deux variables pour l'aluminium, le cuivre, le saphir ou encore la silice fondue, le tissu osseux présente des valeurs de $1-W_e/W_{tot}$ comprises entre celles du cuivre et du saphir et les valeurs de H/E^* sont supérieures à celles du saphir ou de la silice fondue (Cheng et Cheng 1998; Cheng et Cheng 2000). Ceci indique que dans un tissu biologique composite et hiérarchisé comme le tissu osseux, les relations entre propriétés élastiques et plastiques diffèrent par rapport aux matériaux homogènes micromécaniquement caractérisés.

Aux différentes échelles d'investigation, les résultats suggèrent qu'une dissociation entre propriétés micromécaniques et contenu minéral est possible dans certaines conditions. Cette dissociation a été observée dans la comparaison des propriétés intrinsèques chez des sujets sains et des sujets ayant subi une fracture ostéoporotique au col du fémur. Cette étude montrait que le groupe fracturé présentait un degré de minéralisation plus faible, mais pas de modification de la dureté ou du module élastique (Fratzl-Zelman *et al.* 2009). Ce travail suggérait que des

modifications de la matrice organique chez les patientes fracturées pourraient conduire à une augmentation de la raideur. Ceci compenserait les altérations des propriétés mécaniques attendues avec une diminution du degré de minéralisation. La matrice osseuse pouvant être décrite comme un matériau composite multiéchelle, la diminution de microdureté indépendante du degré de minéralisation pourrait donc être liée à des modifications de la qualité du minéral et/ou du collagène.

4.2. Influence d'un traitement prolongée par l'alendronate sur les maturités collagénique et minérale et la carbonatation: implications dans le comportement micromécanique

Notre analyse par FTIRM de l'étude tissulaire a révélé que le traitement prolongé par l'ALN produisait d'autres signes d'un vieillissement de la matrice osseuse, comme une augmentation des maturités minérale et du collagène, cohérents avec son effet antirésorptif. Ainsi, aux niveaux cortical et trabéculaire, la carbonatation minérale et la maturité du collagène étaient significativement plus élevées dans le groupe traité, allant dans le sens d'une matrice plus mature. Le rôle de ces variables dans le comportement micromécanique osseux est encore peu connu, tout comme l'effet du traitement par l'ALN sur ces dernières. Chez la chienne Beagle, il a été montré qu'un traitement d'un an avec de l'ALN 0,2 mg/kg/jour ou 1 mg/kg/jour conduisait à une augmentation significative de l'index de minéralisation et de la maturité du collagène (Gourion-Arsiquaud *et al.* 2010). L'hétérogénéité de ces variables tendait à être diminuée. Dans ce modèle animal, le traitement n'entraînait pas de modification du taux de substitution par les carbonates. Une autre étude réalisée chez la femme ménopausée ostéoporotique traitée 3 ans par l'ALN oral 10 mg/jour montrait par FTIRI que seul l'index de minéralisation était augmenté (Boskey *et al.* 2009). Cependant l'hétérogénéité de cet index, mais aussi celle du rapport carbonates sur phosphates et de la maturité du collagène était diminuée dans le groupe traité *versus* placebo. Ces effets sont cohérents avec une matrice globalement plus mature car se renouvelant moins. L'analyse utilisée dans notre étude a permis de montrer que les changements de carbonatation et de maturité du collagène étaient indépendants de la maturité minérale [*i.e.*, l'âge de la matrice osseuse (Farlay *et al.* 2010)] et du degré de minéralisation, largement influencé par le taux de remodelage osseux (Boivin et Meunier 2002b; Boivin *et al.* 2010).

La mesure de la microdureté Vickers du tissu ostéoïde de patients ostéomalaciques a montré que près d'un tiers de la microdureté de la matrice minéralisée était expliquée par les propriétés de la matrice organique (Boivin *et al.* 2008). La composante organique a donc un rôle non négligeable dans le comportement mécanique du tissu. L'évolution de la maturité du collagène évaluée par spectroscopie vibrationnelle au cours d'un traitement par un BP est encore peu illustrée. Dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique, 3 ans d'ALN ne modifient pas de manière significative le rapport $1660/1690\text{ cm}^{-1}$ (Boskey *et al.* 2009). De même, après 3 ans de risédronate, la maturité du collagène de l'os iliaque mesurée par FTIRI n'était pas modifiée par rapport aux résultats obtenus sur la biopsie à l'inclusion dans l'étude, malgré une diminution de 50% de la fréquence d'activation du remodelage (Ac.F) (Eriksen *et al.* 2002; Durchschlag *et al.* 2006). Complétée par une analyse FTIRM de type « line-scan » dans du tissu en cours de

formation et en cours de résorption (matrice ancienne), ce travail montrait des variations de maturité collagénique à l'échelle locale. Au niveau des sites de formation, sur la biopsie à baseline, la maturité du collagène ne varie pas avec la distance à la surface. Dans les biopsies traitées 3 et 5 ans, cette variable augmente avec la distance à la surface. De plus, la maturité du collagène est systématiquement plus basse après 5 ans de traitement qu'après 3 ans (Durchschlag *et al.* 2006). Au niveau des sites de résorption, ni la distance depuis la surface, ni la durée du traitement n'influencent la maturité du collagène. Cette apparente discordance avec l'augmentation de cette variable observée pour le groupe ALN_{LT}, tend à montrer deux informations essentielles. La première est que les propriétés physico-chimiques du tissu osseux sont influencées par les BPs de manière indépendante de leur effet antirésorptif, la seconde, que ces effets diffèrent en fonction de la structure du BP.

Actuellement, il est admis que la composante organique de l'os joue un rôle important dans la résistance mécanique en « protégeant » les cristaux des pics de contraintes en homogénéisant la distribution de ces contraintes dans la matrice (Jager et Fratzl 2000; Gao *et al.* 2003). La maturité du collagène semble donc agir de manière positive sur les propriétés mécaniques tissulaires. De plus, dans certains cas de dissociation entre résistance mécanique et BMD, la maturité du collagène avait un rôle dans cette indépendance (Blank *et al.* 2003; Paschalis *et al.* 2005). La corrélation directe entre la maturité du collagène évaluée par FTIRM ou microspectroscopie Raman et les propriétés micromécaniques issues de tests d'indentation a été étudiée dans certains modèles animaux. Un lien positif est révélé entre maturité du collagène, dureté et module élastique, ce qui limite l'implication de cette variable dans la diminution de microdureté sous traitement (Donnelly *et al.* 2009; Gourion-Arsiquaud *et al.* 2009; Isaksson *et al.* 2010). L'analyse de la maturité du collagène par spectroscopie vibrationnelle est toutefois trop limitée pour conclure sur le phénomène global de maturation du collagène de type I. Le rapport $1660/1690\text{ cm}^{-1}$ a été initialement décrit comme correspondant au rapport de la pyridinoline (crosslink enzymatique mature) sur la dihydroxylysinonorleucine (DHLNL, crosslink enzymatique immature) (Paschalis *et al.* 2001; Blank *et al.* 2003; Paschalis *et al.* 2005). Si le fait que ce ratio reflète la maturité du collagène est admis, sa définition sur le plan biologique reste controversée. En effet, des travaux récents menés sur des rats lathyriques, ayant une lysyl oxydase déficiente, montrent qu'une diminution de 80% de la concentration en PYD, ne modifie pas le rapport $1660/1690\text{ cm}^{-1}$ (Farlay *et al.* 2011). Ce rapport étant statistiquement lié à la maturité du minéral, les auteurs avançaient que ce ratio pouvait être davantage lié à un changement de la structure secondaire du collagène associé au processus de minéralisation (Farlay *et al.* 2011). La maturation du collagène implique aussi d'autres crosslinks enzymatiques comme la déoxyypyridinoline, mais aussi deux processus non enzymatiques tels que la production d'AGE et l'isomérisation / racémisation des télépeptides du collagène (Viguet-Carrin *et al.* 2006a). Si l'implication du processus de maturation enzymatique dans la résistance mécanique n'est pas évidente (Ziopoulos *et al.* 1999; Banse *et al.* 2002; Follet *et al.* 2011), l'accumulation d'AGE et de télépeptide C-terminal de forme β du collagène de type I (β -CTX) est associée à une résistance mécanique diminuée (Viguet-Carrin *et al.* 2006b; Tang *et al.* 2007). Il a été démontré dans plusieurs travaux conduits chez la chienne Beagle que le ralentissement du remodelage osseux par l'ALN conduisait à une accumulation d'AGE et de β -CTX menant à une diminution

de la résistance mécanique osseuse (Allen et Burr 2008a; Tang *et al.* 2009). Ces résultats étaient confirmés chez la femme ostéoporotique traitée 2 ans par l'ALN (Byrjalsen *et al.* 2008).

Dans le groupe PMOP, à l'échelle du BSU, une association a été mise en évidence entre la maturité du collagène et le régime de déformation plastique (H) mais pas avec le régime élastique (E). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par microdurimétrie, qui mesure une variable mêlant des composantes plastique et élastique, dans le tissu ostéoïde de patients ostéomalaciques (Boivin *et al.* 2008). L'importance de la qualité du collagène dans la compétence mécanique de l'os est aussi illustrée dans des cas d'ostéogenèse imparfaite (OI). Cette pathologie associée avec une structure altérée du collagène conduit à une augmentation de la fragilité osseuse (Prockop 1992; Vetter *et al.* 1992; Traub *et al.* 1994). Cette altération du collagène a aussi été associée avec une désorganisation de la distribution des particules minérales (Fratzl *et al.* 2004). Cependant, il a été montré dans un modèle murin *oim* (osteogenesis imperfecta murine) que la résistance et la capacité à absorber de l'énergie avant rupture (*i.e.*, toughness) des fibres de collagène, étaient diminuées de moitié par rapport aux souris saines (Misof *et al.* 1997). Ces résultats suggèrent que l'altération du comportement plastique associée à l'OI pouvait être directement liée aux modifications de la trame collagénique (Misof *et al.* 1997). En outre, comme l'apatite osseuse est un matériau rigide incapable de dissiper beaucoup d'énergie, le rôle du collagène dans la toughness de l'os serait primordial (Fratzl *et al.* 2004).

L'influence du collagène dans les propriétés mécaniques locales reste obscure. En effet, la caractérisation mécanique de fibres de collagène de type I isolées révèle un comportement quasi élastique en tension qui devient davantage viscoélastique à l'état hydraté (van der Rijt *et al.* 2006; Svensson *et al.* 2010). Ces résultats montrent donc que la description du comportement mécanique de la matrice osseuse nécessite de comprendre l'association entre minéral et trame organique. Autrement dit, comment l'association entre deux composants majoritairement élastiques conduit au comportement visco-élasto-plastique complexe du tissu osseux (Oyen et Ko 2007; Oyen et Cook 2009; Launey *et al.* 2010). Dans ce contexte, de nombreux modèles ont été proposés et mettent tous en avant l'importance de l'intégrité du collagène et de leurs molécules de pontages dans la capacité du tissu à se déformer dans le domaine plastique à différentes échelles d'organisation de l'os (Reilly et Burstein 1975; Zioupos *et al.* 1999; Thompson *et al.* 2001; Wang *et al.* 2002). Parmi ces modèles, le maintien des fibres de collagène par une trame organique non fibrillaire agissant comme une colle pourrait être, au moins partiellement, responsable de la toughness de l'os (Fratzl *et al.* 2004; Fantner *et al.* 2005). Dans ce modèle, la trame interfibrillaire serait capable de dissiper l'énergie au cours de l'application de forces de cisaillement (Gupta *et al.* 2005). Même si ce modèle a été décrit pour des déformations en tension, un mécanisme similaire semble cohérent avec nos résultats obtenus en indentation. La structure tridimensionnelle du collagène pourrait avoir un impact sur ses propriétés mécaniques. En effet, une étude conduite en nanoindentation sur l'os cortical de fémur de bœuf déminéralisé a montré qu'au sommet de l'empreinte, le collagène perdait sa structure supramoléculaire en bande. Or, l'utilisation d'un modèle en éléments finis définissait cette zone comme celle où les déformations plastiques étaient maximales (Tai *et al.* 2005). L'implication du collagène dans les propriétés mécaniques locales de l'os est donc complexe et largement dépendante de son interaction avec le minéral osseux.

Après un traitement prolongé par l'ALN, nous avons montré, à l'échelle du BSU, une modification du rôle de la maturité du collagène dans le comportement mécanique par rapport aux patientes non traitées. En effet, après traitement, la maturité du collagène n'était pas corrélée avec H et la régression pas à pas montrait que cette variable n'entrait pas de manière significative dans sa définition. Contrairement aux observations du groupe PMOP, la maturité du collagène entrait dans la définition statistique de H_c dans le groupe traité. Cependant, cette partie de l'étude a aussi mis en évidence, dans les deux groupes, une liaison positive entre la maturité du collagène, E et H_c . L'augmentation de cette variable indépendamment de la minéralisation, son rôle dans les propriétés mécaniques mesurées par indentation, et la limite dans son interprétation, tendent à montrer, comme à l'échelle tissulaire, la faible probabilité de son implication dans la diminution de E et H_c . La différence majeure entre les deux groupes semble donc être liée à l'implication de la cristallinité dans le comportement mécanique de la matrice osseuse des patientes traitées par l'ALN.

Une des propriétés structurales des BPs qui pourrait influencer la maturité de la matrice organique est leur capacité à moduler le potentiel zêta. Outre les différences d'affinité pour l'apatite, la structure du BP agit sur la charge électronique de la surface des cristaux via des transferts de charges. Ainsi, l'ALN induit un potentiel zêta positif pour l'hydroxyapatite, tandis que le risédronate induit un potentiel zêta négatif (Nancollas *et al.* 2006). Ces changements de l'environnement physico-chimique pourraient aussi bien influencer la maturation du cristal, mais aussi la cinétique des enzymes impliquées dans la maturation du collagène (Durchschlag *et al.* 2006).

A l'échelle tissulaire, le groupe ALN_{LT} présentait une maturité minérale plus élevée que chez les patientes non traitées, sauf pour le compartiment « paquets osseux trabéculaires ». Ce résultat pourrait être lié à une surestimation de la maturité minérale mesurée pour le même compartiment chez les patientes ostéoporotiques et non traitées. D'une manière générale, l'activité du remodelage osseux est de 5 à 10 fois plus élevée dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical, phénomène accentué dans le contexte ostéoporotique (Recker *et al.* 2004a; Kazanci *et al.* 2006). Un travail récent, a montré que durant la ménopause, une augmentation de la fréquence d'activation du remodelage par 3 et des surfaces érodées par 2, ne conduisait pas à une diminution du DMB, mais à une augmentation des proportions relatives de matrice très jeune et plus minéralisées (Bala *et al.* 2010a). Ceci conduisait à un maintien du DMB moyen au cours de la ménopause malgré une diminution de l'épaisseur des murs ostéoniques. Le groupe PMOP de la présente étude était caractérisé par une épaisseur moyenne des murs ostéoniques trabéculaires de $38,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (Ott *et al.* 2002). L'acquisition des spectres IR dans les « paquets osseux trabéculaires » étant réalisée avec une résolution spatiale de $35 \times 35 \mu\text{m}$, les mesures ont pu prendre en compte une part de matrice plus ancienne sous jacente.

La maturité minérale décrit le rapport entre les phosphates apatitiques et non-apatitiques, qui augmente au cours de la maturation de la matrice osseuse. Ce rapport $1030/1110 \text{ cm}^{-1}$ est comparable au rapport $1030/1020 \text{ cm}^{-1}$ utilisé par d'autres équipes (Paschalis *et al.* 1996; Boskey *et al.* 2009), et ces deux index sont bien corrélés [$r^2=0,86$, $p<0,0001$ (Farlay *et al.* 2010)]. En

utilisant la FTIRI, une augmentation non significative du rapport 1030/1020 cm^{-1} a été observée après 3 ans de traitement par l'ALN contre PLA (Boskey *et al.* 2009). Après un traitement prolongé par l'ALN, notre étude a mis en évidence une augmentation du rapport 1030/1110 cm^{-1} , de manière cohérente avec les résultats publiés à 3 ans (Boskey *et al.* 2009). Le rapport 1030/1020 cm^{-1} est actuellement appelé « maturité/cristallinité » car il est aussi corrélé, dans l'os normal, avec les valeurs de cristallinité mesurées par diffraction des rayons X (Paschalis *et al.* 1996). Cependant, la cristallinité reflète une combinaison de la taille et de la perfection cristalline (degré d'ordre des éléments constitutifs dans la maille cristalline) (Glimcher 1990). Le rapport 1030/1110 cm^{-1} est aussi statistiquement lié à la cristallinité dans le cas d'un os contrôle (Farlay *et al.* 2010). Il existe toutefois des cas où cette corrélation n'est pas retrouvée, comme dans la fluorose où la maturité de la matrice est diminuée, en lien avec la stimulation des ostéoblastes par les ions fluor, mais la cristallinité est augmentée par la substitution des OH par le fluor (Farlay *et al.* 2010). Ceci confirme la nécessité de mesurer séparément les deux variables, et d'être prudent dans la comparaison des différents rapports utilisés.

L'impact de l'ALN sur la carbonatation et la maturation du collagène aurait un rôle limité dans la diminution de la microdureté osseuse. La carbonatation minérale reflète le taux de substitution des carbonates aux groupements PO_4 ou OH, *in vitro*, et augmente avec la maturation de l'apatite synthétique (Rey *et al.* 1995; Cazalbou *et al.* 2004). Dans le cas de l'apatite osseuse, le taux de carbonates semble évoluer de manière différente en fonction de l'échelle d'investigation et du processus de modelage ou de remodelage. Au cours du modelage, il a été montré que le taux de carbonates augmentait (Rey *et al.* 1989; Rey *et al.* 1991a). Chez la souris, le rat et le lapin qui évoluent selon une croissance continue sans remodelage Haversien, le ratio carbonate/phosphate augmente avec l'âge de la matrice (Busa *et al.* 2005; Fuchs *et al.* 2008; Donnelly *et al.* 2009; Isaksson *et al.* 2010). Une fois la période de modelage achevée, au cours du remodelage osseux, la tendance semble inversée. Dans l'os trabéculaire, le tissu en surface (plus récent) était plus carbonaté que l'os interstitiel (Gadaleta *et al.* 1996; Ou-Yang *et al.* 2001). Récemment, une étude du laboratoire a confirmé cette tendance (Bala *et al.* 2010b). Dans un modèle de brebis âgées, ayant subi des injections de différents fluorochromes (avec une résolution temporelle de 6 mois), le taux de carbonates augmentait rapidement au cours de la minéralisation primaire puis diminuait de manière continue au cours de la minéralisation secondaire. Après trente mois de minéralisation, le taux de carbonates n'était pas différent de celui mesuré dans l'os interstitiel (Bala *et al.* 2010b). L'augmentation de la carbonatation sous ALN, alors que les autres indicateurs de la maturité de la matrice osseuse augmentent, est donc inattendue. La littérature étant encore pauvre sur le sujet, il est cependant possible de spéculer que le remodelage osseux étant fortement diminué sous traitement, l'évolution du taux de carbonatation suivrait plutôt celle observée au cours du modelage. Des études menées dans les animaux à croissance continue, il est aussi ressorti que la carbonatation était corrélée de manière positive avec la dureté et le module élastique évalué par indentation (Busa *et al.* 2005; Donnelly *et al.* 2009; Isaksson *et al.* 2010). L'implication de la carbonatation dans la diminution des propriétés micromécaniques osseuses semble donc peu probable.

4.3. Influence d'un traitement prolongée par l'alendronate sur la cristallinité minérale: implications dans le comportement micromécanique

La méthode de référence actuelle pour mesurer la cristallinité du minéral est la diffraction des rayons X, qui mesure le degré de cristallinité absolue. Les techniques de spectroscopie vibrationnelle peuvent cependant être utilisées pour mesurer une cristallinité relative, c'est-à-dire une variable dérivée reflétant la cristallinité absolue. En spectroscopie Raman par exemple, la FWHM du pic à 960 cm^{-1} (élongation symétrique du phosphate) est largement utilisée pour la mesure de la cristallinité dans le tissu osseux (De Mull *et al.* 1988; Penel *et al.* 1998; Akkus *et al.* 2004; Goodyear *et al.* 2009). Avec les techniques de spectroscopie, l'effet de la cristallinité est lié à un élargissement des bandes dû à des variations dans l'environnement du cristal et à l'existence d'une distribution des niveaux d'énergies. En spectroscopie IR, l'élargissement des bandes peut être mesuré soit directement, soit par résolution des bandes. En IR, l'utilisation de la résolution du domaine $\nu_4\text{PO}_4$ pour mesurer une cristallinité relative est établie depuis les années 1960 avec l'utilisation du « splitting factor » ou du rapport de Shemesh qui en est dérivé (Termine et Posner 1966; Shemesh 1990). L'index de cristallinité minérale mesuré comme la FWHM du pic à 604 cm^{-1} est corrélé avec les deux index cités ci-avant (Farlay *et al.* 2010). Le pic à 604 cm^{-1} est aussi une bande bien résolue dont la déconvolution est reproductible. Une augmentation de l'index de cristallinité minérale, autrement dit une diminution de la cristallinité a été rapportée dans le groupe traité de manière prolongée par l'ALN. Ceci suggère une diminution de la taille / perfection des cristaux sous traitement malgré une augmentation de la maturité. Cependant, la FTIRM ne permet pas de distinguer laquelle des variables (taille ou perfection) est influencée par l'ALN.

Le rôle de la cristallinité dans la résistance mécanique osseuse est aujourd'hui perçu comme important et une taille trop petite ou trop grande pourrait être néfaste pour la qualité osseuse (Faibish *et al.* 2006). Les cristaux procurent à l'os sa rigidité et sa résistance en compression tandis que le collagène lui confère sa flexibilité et sa résistance en tension (Currey 1969; Akkus *et al.* 2004; Currey 2004). Ce rôle est peu décrit dans la définition des paramètres mécaniques locaux comme la microdureté mais a été déduit à partir d'essais mécaniques classiques. Une étude menée sur des éprouvettes corticales de fémurs humains montrait que la cristallinité, mesurée par spectroscopie Raman expliquait de 7 à 48% de la variabilité des propriétés mécaniques en essai monotonique et de 11 à 63% en essai de fatigue (Yerramshetty et Akkus 2008). Or, cette mesure de la cristallinité, de la même manière qu'en FTIRM reflète à la fois la taille mais aussi la stœchiométrie/perfection des cristaux. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'ALN sur la cristallinité du minéral pourrait être responsable, au moins partiellement, de la diminution de la microdureté osseuse moyenne observée après un traitement prolongé par l'ALN.

Chez les patientes PMOP, à l'échelle du BSU, l'index de cristallinité minérale n'était lié ni aux propriétés élastiques ni aux propriétés plastiques. Ces résultats sont en apparente contradiction avec les travaux réalisés à l'échelle tissulaire qui ont montré l'implication de la taille et de la perfection cristalline dans la résistance aux contraintes monotoniques ou cycliques en tension dans l'os cortical (Yerramshetty et Akkus 2008). La comparaison de nos résultats avec

ceux de cette précédente étude est toutefois limitée. En effet, l'indentation évalue les propriétés mécaniques locales au cours de la compression, mais surtout, au cours de la décharge pour analyser les propriétés élastiques. De tels essais ne concernent donc pas le comportement du matériau à rupture contrairement aux essais en tension réalisés par Yerramshetty et Akkus (Yerramshetty et Akkus 2008). De plus, l'échelle d'investigation est aussi un élément à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. A l'échelle tissulaire, il existe une hétérogénéité des propriétés physico-chimiques liée à l'activité du remodelage osseux (Boivin *et al.* 2009; Bala *et al.* 2010b). Cette hétérogénéité est accrue avec l'hyper remodelage osseux et son déséquilibre entre formation et résorption dans le contexte de l'ostéoporose ménopausique (Recker *et al.* 2004a). Au cours du processus de minéralisation, chez la brebis, la cinétique de l'évolution de la cristallinité mesurée par FTIRM était différente de celle du DMB et de H_c (Bala *et al.* 2010b). Au cours de la phase rapide de minéralisation primaire, toutes ces variables augmentaient significativement. Au cours de la minéralisation secondaire, la cristallinité était stable jusqu'à un an et demi de minéralisation puis une seconde phase d'augmentation se produisait. Cette deuxième phase d'augmentation coïncidait avec l'atteinte des maxima physiologiques de DMB et de H_c , deux variables fortement corrélées (Bala *et al.* 2010b). L'absence de corrélation entre la cristallinité et les variables mécaniques dans le groupe PMOP est donc cohérente avec cette dissociation entre la quantité et la qualité du minéral avec la microdureté. A l'échelle du tissu, la cristallinité moyenne, qui dépend de l'âge moyen du tissu (influencé par l'activité du remodelage osseux), jouerait un rôle déterminant dans les propriétés mécaniques globales. Au contraire, à l'échelle du BSU, les propriétés mécaniques seraient majoritairement influencées par le contenu minéral et la maturité du collagène.

Notre étude montre que l'utilisation prolongée de l'ALN conduit à des modifications de la taille et/ou de la perfection cristalline, indépendantes du taux de substitution par les carbonates et menant à des altérations du comportement micromécanique de l'os. En ce qui concerne la taille des cristaux, une longueur augmentée a été associée à un module élastique plus élevé (Handschin et Stern 1995). Cet effet pourrait être directement ou indirectement lié à la manière dont le collagène est affecté (Freeman *et al.* 2001; Akkus *et al.* 2004). Des cristaux longs présentent de plus grandes surfaces, le long desquelles les interactions chimiques et/ou physiques entre collagène et minéral peuvent se produire et moduler la mobilité des molécules de collagène (McCutchen 1975). En revanche, pour un tissu avec une fraction minérale identique mais des cristaux plus petits, ce même modèle implique un nombre plus important de zones sans contact entre minéral et collagène (Yerramshetty et Akkus 2008). Dans ce dernier cas, ces zones augmenteraient la capacité du tissu à se déformer dans le domaine plastique. Chez les patientes traitées par l'ALN, les essais d'indentation révèlent une tendance à la diminution du travail d'indentation total lié à une diminution significative du travail plastique alors que le travail élastique n'est pas modifié. La matrice osseuse traitée de manière prolongée par l'ALN présente une capacité plus faible à dissiper de l'énergie pour une déformation plastique identique. Même si le modèle proposé par Yerramshetty et Akkus (2008) reste à confirmer, nos résultats suggèrent que les modifications de la cristallinité après traitement ne seraient pas liées à une modification de la taille des cristaux. Ceci est cohérent avec les résultats de l'étude FLEX qui a montré, après 10 ans de traitement par l'ALN, que la taille des particules minérales n'était pas modifiée (Roschger *et al.* 2010).

Une implication directe de l'ALN a été suggérée dans le changement de la structure du cristal. Le fait que parmi les différents BPs, une modification minime de la structure puisse aboutir à des différences majeures d'affinité pour le minéral osseux laisse penser que la configuration tridimensionnelle de la molécule et son orientation dans l'espace pourraient jouer un rôle dans son mécanisme d'action (Russell *et al.* 2008). La modélisation numérique des interactions entre différents BPs azotés et l'apatite osseuse a mis en évidence des interactions différentes entre le cristal et le BP en fonction de sa nature (Ebetino *et al.* 2005). L'ALN se liait à un calcium de type I par l'intermédiaire de son pont P-C-P, commun à tous les BPs, mais aussi l'atome d'azote pouvait créer une deuxième liaison de type N-H-O avec un OH en lien direct avec un calcium de type II (Ebetino *et al.* 2005; Russell *et al.* 2008). Or, il a été suggéré que la liaison d'un élément aux sites CaI ou CaII pouvait influencer les propriétés du cristal (Li *et al.* 2007; Russell *et al.* 2008). Une seule étude a évalué, chez la femme ostéoporotique, l'effet d'un BP sur la cristallinité relative mesurée par spectroscopie vibrationnelle. Cette étude a montré qu'après trois ans de traitement par le zolédronate, pour une matrice osseuse de même âge, contrôlé par double marquage par les tétracyclines, la cristallinité mesurée par microspectroscopie Raman était diminuée par rapport aux patientes ayant reçu le placebo (Gamsjaeger *et al.* 2011). Ces auteurs mesuraient aussi une augmentation du MAR sous traitement qui pourrait conduire à une accumulation de minéral moins mature et moins bien cristallisé. L'augmentation du MAR n'étant pas en accord avec le ralentissement du remodelage osseux, il a été avancé que l'électronégativité acquise par la fixation du zolédronate à l'apatite pourrait avoir un effet sur l'initiation et la cinétique de la nucléation secondaire (Gamsjaeger *et al.* 2011). Dans le cas de l'ALN, l'utilisation de la dose orale de 10 mg/jour n'a pas été associée avec une modulation significative de la vitesse de minéralisation (Chavassieux *et al.* 1997; Black *et al.* 2006). Cela est en accord avec l'absence de différence de la vitesse de minéralisation entre les groupes PMOP et ALN_{LT} rapportée dans notre étude.

Malgré le faible nombre de travaux publiés sur l'effet de l'ALN sur la cristallinité de l'apatite osseuse, il est toutefois possible d'émettre deux hypothèses sur la diminution de cristallinité dans le groupe ALN_{LT}. La première implique un effet direct de l'ALN via son mode de liaison particulier en deux sites du cristal d'apatite qui agirait sur la symétrie, ou plus généralement, sur la géométrie de la maille cristalline. La seconde hypothèse est basée sur les perturbations électroniques induites par la fixation de l'ALN à l'apatite. *In vitro*, il a été montré que la liaison de l'ALN à l'hydroxyapatite conduisait à un potentiel zetâ positif et à une diminution de la tension interfaciale (qui décrit l'énergie pour rompre l'interface entre deux milieux) (Nancollas *et al.* 2006). Les modifications de potentiel zetâ peuvent conduire à une modulation des interactions entre les ions ou d'autres molécules chargées. De plus, la tension interfaciale est une variable connue pour influencer la forme et la cinétique de la croissance des cristaux (Wu *et al.* 1999; Wu et Nancollas 1999; Nancollas *et al.* 2006). Une modulation de la cinétique de croissance des cristaux, pourrait expliquer la présence de cristaux plus petits (index de cristallinité plus élevé) dans le groupe traité pour une matrice de même âge et de même DMB.

Que ce soit à l'échelle de l'organe ou du tissu osseux, aucune étude menée chez des patientes ostéoporotiques n'a évalué l'influence du traitement par les BPs améliorait sur les propriétés mécaniques (Allen et Burr 2011). Toutes les connaissances sont donc issues des études

sur modèles animaux et les résultats décrivant les propriétés matérielles ont été dérivés d'essais plus globaux. Ces études menées majoritairement chez la chienne Beagle mature ont montré, au niveau de la vertèbre ou de la côte, que le module de Young et la contrainte maximale à rupture n'étaient pas modifiés. Seule la capacité à absorber de l'énergie avant rupture était diminuée de 15 à 40% après 1 à 3 ans de traitement aux doses équivalentes ou supérieures aux doses cliniques (Mashiba *et al.* 2001; Allen *et al.* 2006; Allen *et al.* 2008a; Allen et Burr 2011). Cette diminution était liée à une diminution de la capacité à absorber de l'énergie dans le domaine de déformation plastique indépendamment de changements dans le domaine élastique (Allen *et al.* 2008b). Nos résultats suggèrent que ce mécanisme est aussi applicable à une échelle plus locale chez la femme ostéoporotique après un traitement au long cours par de l'ALN oral.

4.4 Limitations

Outre les limitations d'ordre technique mentionnées dans le chapitre précédent (Chapitre 5, p.155), l'analyse tissulaire a des limites spécifiques. La première concerne l'aspect transversal de ce travail qui a utilisé des échantillons provenant de différentes études. Cependant, toutes les biopsies ont suivi le même protocole technique, et l'acquisition des différentes variables a elle aussi été réalisée dans les mêmes conditions. De plus, le groupe ALN_{LT} est composé de patientes recrutées hors protocole clinique et peu d'informations concernant leur compliance au traitement ont été obtenues. Néanmoins, une réduction de 80% de l'Ac.F dans ce groupe par rapport au groupe non traité est cohérente avec l'inhibition du remodelage osseux observée au cours des différents essais cliniques contrôlés (Chavassieux *et al.* 1997; Black *et al.* 2006). Aucune information concernant le statut en vitamine D des patientes incluses dans le groupe ALN_{LT} n'a été renseignée, or, il s'agit d'une variable ayant un effet sur la minéralisation osseuse (Boivin *et al.* 2003; Fratzl *et al.* 2007). Le fait que le MAR ne soit pas différent entre les groupes valide toutefois notre interprétation. A l'échelle du BSU, outre le petit nombre d'échantillons testés (6 par groupe) et le fait que l'investigation n'ait porté que sur l'os cortical, la préparation des échantillons est aussi à considérer. Les biopsies osseuses ayant été réalisées pour des études histologiques, elles ont été successivement fixées et déshydratées dans l'alcool puis incluses dans une résine polymère. Ces différents traitements sont connus pour influencer les propriétés mécaniques évaluées par indentation. La déshydratation dans l'alcool, par exemple a été associée à une augmentation de 10% de la dureté et de 15 à 20% du module élastique (Bushby *et al.* 2004; Donnelly *et al.* 2006a; Dall'Ara *et al.* 2007). Il a aussi été montré que l'inclusion en méthacrylate de méthyle avec des bains d'imprégnation préalables modifiait substantiellement les mesures de nanoindentation (Bushby *et al.* 2004). Cependant, tous les échantillons ayant été préparés suivant le même protocole technique, ceci ne doit donc pas affecter les tendances observées entre les deux groupes. De plus la déshydratation et l'inclusion permettent une meilleure maîtrise de l'environnement expérimental (Lewis et Nyman 2008). Des essais ont aussi été effectués dans les conditions ambiantes, or le comportement mécanique est influencé par l'état d'hydratation de l'échantillon. Une étude chez le rat traité par le ranélate de strontium a mis en évidence une augmentation du module élastique uniquement lorsque les échantillons étaient hydratés (Ammann *et al.* 2007). Nos spectres IR ont révélé que les bandes correspondant au spectre de la résine étaient plus intenses dans les BSUs plus jeunes et moins minéralisés que dans les BSUs plus

anciens et plus minéralisés. Cette influence est mineure dans nos résultats obtenus en FTIRM, dans la mesure où la contribution de la résine est soustraite de tous les spectres obtenus sur le tissu osseux. Ceci peut être à l'origine d'un bruit dans les corrélations entre les variables mécaniques et celles obtenues en FTIRM. L'inclusion en résine tendait aussi à « lisser » les différences de propriétés mécaniques en prévenant les déformations plastiques (Ferguson 2009). Pour finir, les mesures d'indentation supposent un comportement élasto-plastique isotrope avec un coefficient de Poisson de 0,3. Or, le tissu osseux a un comportement mécanique plus complexe et un coefficient de Poisson inconnu. Toutefois, le tissu osseux semble présenter une isotropie transverse illustrée par microindentation (Weaver 1966; Ziv *et al.* 1996). Ainsi, nous pensons que cette caractéristique n'affecte pas les résultats de notre étude, dans la mesure où nous avons travaillé exclusivement dans le plan perpendiculaire aux canaux de Havers.

5. Conclusions

Pour conclure, l'étude initiée à l'échelle tissulaire a montré que le traitement prolongé par l'ALN oral préservait le degré de minéralisation à un niveau supérieur à celui mesuré chez des patientes ostéoporotiques non traitées. Malgré ce résultat lié à l'action antirésorptive de l'ALN, la microdureté osseuse était diminuée suggérant un effet de l'ALN sur la qualité de l'ultrastructure organique et/ou minérale. L'analyse par spectroscopie vibrationnelle a mis en évidence des modifications de maturité du collagène, de carbonatation minérale et de cristallinité indépendantes du vieillissement du tissu osseux. L'ensemble de ces résultats évoque le rôle possible de la modulation de la cristallinité sous traitement dans les modifications micromécaniques tissulaires. Cependant, l'échelle d'investigation et les différentes techniques ayant été réalisées sur des portions différentes des biopsies osseuses n'a pas permis l'analyse des relations directes entre les différentes variables, justifiant l'étude menée à l'échelle du BSU. A cette échelle, les modifications des propriétés mécaniques observées dans le groupe ALN_{LT} (diminution du module d'élasticité, de la dureté de contact, ou encore de la capacité à dissiper de l'énergie dans le régime de déformation plastique) couplées à une diminution de la cristallinité suggèrent une altération de la résistance mécanique à l'échelle de l'organe. Cependant, dans notre groupe ALN_{LT} aucune des patientes n'a eu de fracture atraumatique. Dans cette même population, aucune accumulation de microdommages n'a été mise en évidence (Chapurlat *et al.* 2007). L'implication de telles modifications dans la résistance osseuse globale semble donc très limitée. Ceci est cohérent avec les études publiées après 5 ou 10 ans de traitement avec l'ALN et qui montrent une diminution du risque de fracture, témoin de la compétence mécanique à l'échelle de l'organe (Ensrud *et al.* 2004; Black *et al.* 2006; Schwartz *et al.* 2010). De plus, dans nos deux groupes de patientes, les différentes modifications préservaient les valeurs dans des gammes observées pour le tissu osseux contrôle (Boivin *et al.* 2008; Zysset 2009; Smith *et al.* 2010). L'impact de ces effets pourrait être atténué par le gain de BMD et la préservation de la microarchitecture observés sous traitement (Keaveny *et al.* 2007; Burghardt *et al.* 2010; Folkesson *et al.* 2011). L'association entre BMD et microarchitecture pouvant expliquer jusqu'à 86% de la résistance mécanique en compression au niveau de la vertèbre (Wegrzyn *et al.* 2010). Ceci est aussi cohérent avec les observations faites au cours des essais cliniques et qui montrent que les patientes présentant un gain de BMD plus élevé ont une réduction du risque de fracture

plus importante (Seeman 2009). En outre, il sera nécessaire non seulement de confirmer ce mécanisme de diminutions des propriétés mécaniques locales dues à des changements de cristallinité dans un nombre plus important d'échantillon, mais aussi pour d'autres BPs. En effet, les différentes actions des BPs sur les constituants de la matrice osseuse mentionnées au cours de cette discussion, sont largement dépendantes des propriétés de la chaîne latérale R2 (Russell *et al.* 2008). Il conviendra de tester ce mécanisme dans des cas de fragilités associées à un traitement prolongé par un BP.

- Conclusion générale et perspectives -

Conclusion générale et perspectives

Les bisphosphonates constituent le groupe de médicaments le plus utilisé dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique mais aussi dans celui d'autres affections squelettiques. Dans le contexte de l'ostéoporose, leur efficacité antifracturaire est bien illustrée et atteste de la capacité du traitement à préserver la résistance mécanique de l'os en tant qu'organe. Ce travail de thèse a permis de préciser l'effet de deux bisphosphonates sur la qualité osseuse intrinsèque dans le traitement de l'ostéoporose ménopausique, l'ibandronate et l'alendronate. Nos résultats indiquent qu'un traitement de trois ans par l'ibandronate oral quotidien ou intermittent avec la demi-dose utilisée en clinique améliore le comportement micromécanique du tissu osseux tout en préservant la minéralisation tissulaire. Cette apparente dissociation entre minéralisation et dureté suggère une modification de la qualité de la matrice organique et/ou du minéral osseux. Cependant, une microdureté améliorée et un degré de minéralisation normal sont cohérents avec l'effet antifracturaire de l'ibandronate. Nous avons tout d'abord confirmé que dans le cas de l'ibandronate, la dose cumulée était davantage déterminante dans son effet que son régime d'administration, renforçant l'intérêt de son utilisation dans le cas où la prise quotidienne ou hebdomadaire est un frein au suivi du traitement.

Dans le cas de l'alendronate, nos travaux ont mis en évidence que son utilisation prolongée préservait la minéralisation à un niveau supérieur à celui des patientes non traitées. Cet effet, lié à l'activité antirésorptive propre aux bisphosphonates ne conduisait pas à une hyperminéralisation mais à une homogénéisation d'une matrice plus âgée en moyenne. Indépendamment de la minéralisation, la dureté tissulaire était diminuée. Sur cette même population, à l'échelle de l'unité structurale élémentaire nos résultats ont permis de proposer un mécanisme incluant une modification de la cristallinité minérale responsable de changements complexes dans les propriétés micromécaniques de la matrice osseuse. Toutefois, aucune donnée ne permet d'avancer que ces modifications pourraient avoir un effet sur la résistance mécanique globale. Ces résultats ne sont donc pas en désaccord avec l'effet antifracturaire de l'alendronate à long terme. Pour être validé, ce modèle, montré ici pour la première fois, devra être testé sur une population plus large mais aussi dans différents contextes, notamment celui de traitements par d'autres bisphosphonates. En effet, il est essentiel de comprendre comment la chaîne latérale R2 est impliquée dans les modifications de la cristallinité de l'apatite osseuse. Ce modèle est aussi actuellement testé dans une population de patientes traitées de manière prolongée par un bisphosphonate et ayant subi une fracture atypique sous trochantérienne. A ce jour, cette complication rare est mal comprise et pourrait être compatible avec une altération de la qualité de la matrice osseuse.

Certaines limites techniques ont laissé plusieurs questions en suspens et ont motivé de nouveaux projets en perspectives. Parmi ces projets, deux sont en cours de réalisation et visent à compléter et à affiner l'étude des effets de l'alendronate prolongé sur l'ultrastructure osseuse. Le premier, par micro diffraction des rayons X, permettra de quantifier et préciser les modifications induites par l'alendronate sur les dimensions et la forme des cristaux d'apatite. Cette méthodologie permet de focaliser l'analyse sur une zone de 80 μm de diamètre, compatible avec une étude à l'échelle de l'unité structurale élémentaire. Le second par microspectroscopie

RAMAN, permettra une analyse plus fine de la carbonatation en distinguant l'effet de l'alendronate sur les différents types de substitutions ioniques.

Notre étude a évalué les propriétés micromécaniques par indentation avec un chargement monotonique. Il conviendra donc de reproduire ces essais avec un chargement cyclique plus représentatif des contraintes appliquées au tissu osseux au quotidien. Couplé à ces essais mécaniques, l'effet des bisphosphonates sur la composition et l'état de maturation de la trame collagénique devra être compris à ce même niveau de la structure osseuse. Dans ce contexte, un projet est à l'étude et envisagé, après caractérisation des propriétés mécaniques, de réaliser une microdissection pour isoler la zone testée et l'analyser par une nouvelle technique chromatographique l'UPLC (pour Ultra High Pressure Liquid Chromatography). Cette nouvelle technique permet le dosage des molécules de pontage enzymatiques et non enzymatiques du collagène à partir de 250 ng de tissu osseux, soit 10 fois moins qu'avec les techniques couramment utilisées. La réalisation de ces études conduira à une caractérisation complète des effets des bisphosphonates sur les propriétés intrinsèques du tissu osseux.

D'un point de vue plus global, ce travail de thèse a soulevé plusieurs points importants à prendre en compte dans l'étude des effets osseux des bisphosphonates mais aussi dans des démarches plus générales. Tout d'abord, il semble primordial de considérer la hiérarchie structurale de l'os pour comprendre la mécanique globale de ce matériel. Dans l'étude des effets de l'IBN et de l'ALN, notre analyse de la nano- ou de la microstructure a apporté des informations essentielles à la compréhension des résultats observés à l'échelle tissulaire. Ces observations sont donc d'autant plus importantes que cette approche intégrative « multi échelles » des propriétés de l'os semble être un élément clef de la compréhension de la fragilité osseuse. Cette démarche récente permettra à moyen et long termes de créer des modèles numériques complexes du comportement mécanique osseux. Ceci est une étape nécessaire pour l'amélioration du diagnostic et la prédiction du risque de fragilité osseuse de manière non invasive. Dans cette optique, en 2010 a été organisé le premier groupe de travail autour de cette thématique (Hierarchical Simulations of Bone for Clinical Application, University of California, Los Angeles April 2010), témoignant de l'essor pris par cette approche à l'interface de multiples domaines de recherche.

- Références bibliographiques -

- Abrahamsen B. 2010. Adverse effects of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* **86**(6): 421-35.
- Adami S., Felsenberg D., Christiansen C., Robinson J., Lorenc R.S., Mahoney P., Coutant K., Schimmer R.C. and Delmas P.D. 2004. Efficacy and safety of ibandronate given by intravenous injection once every 3 months. *Bone* **34**(5): 881-9.
- Affentranger U., Bauss F., Qin L., Cordey J., McIff T. and Rahn B.A. 1995. Mechanical properties of cancellous and cortical bone after long term ibandronate dosing in beagle dogs. *Bone* **17**(6): 604.
- Ahlborg H.G., Johnell O., Turner C.H., Rannevik G. and Karlsson M.K. 2003. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* **349**(4): 327-34.
- Akhter M.P., Lappe J., Davies K. and Recker R. 2007. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone* **41**: 111-116.
- Akkus O., Adar F. and Schaffler M.B. 2004. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone* **34**(3): 443-53.
- Allen M.R. and Burr D.B. 2007. Three years of alendronate treatment results in similar levels of vertebral microdamage as after one year of treatment. *J Bone Miner Res* **22**(11): 1759-65.
- Allen M.R. and Burr D.B. 2008a. Changes in vertebral strength-density and energy absorption-density relationships following bisphosphonate treatment in beagle dogs. *Osteoporos Int* **19**(1): 95-9.
- Allen M.R. and Burr D.B. 2008b. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg* **66**(5): 987-94.
- Allen M.R. and Burr D.B. 2011. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: What we think we know and what we know that we don't know. *Bone*.
- Allen M.R., Gineyts E., Leeming D.J., Burr D.B. and Delmas P.D. 2008a. Bisphosphonates alter trabecular bone collagen cross-linking and isomerization in beagle dog vertebra. *Osteoporos Int* **19**(3): 329-37.
- Allen M.R., Iwata K., Phipps R. and Burr D.B. 2006. Alterations in canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. *Bone* **39**(4): 872-9.
- Allen M.R., Kubek D.J. and Burr D.B. 2010. Cancer treatment dosing regimens of zoledronic acid result in near-complete suppression of mandible intracortical bone remodeling in beagle dogs. *J Bone Miner Res* **25**(1): 98-105.
- Allen M.R., Reinwald S. and Burr D.B. 2008b. Alendronate reduces bone toughness of ribs without significantly increasing microdamage accumulation in dogs following 3 years of daily treatment. *Calcif Tissue Int* **82**(5): 354-60.

- Amin D., Cornell S.A., Gustafson S.K., Needle S.J., Ullrich J.W., Bilder G.E. and Perrone M.H. 1992. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* **33**(11): 1657-63.
- Ammann P., Badoud I., Barraud S., Dayer R. and Rizzoli R. 2007. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J Bone Miner Res* **22**(9): 1419-25.
- Amprino R. 1958. Investigations on some physical properties of bone tissue. *Acta Anat (Basel)* **34**(3): 161-86.
- Amprino R. and Engstrom A. 1952. Studies on x ray absorption and diffraction of bone tissue. *Acta Anat (Basel)* **15**(1-2): 1-22.
- Anginot A., Jurdic P. and Mazzorana M. 2008. Ostéoclastes: origine et différenciation. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 10-20.
- Arlot M.E., Jiang Y., Genant H.K., Zhao J., Burt-Pichat B., Roux J.P., Delmas P.D. and Meunier P.J. 2008. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res* **23**(2): 215-22.
- Armamento-Villareal R., Napoli N., Diemer K., Watkins M., Civitelli R., Teitelbaum S. and Novack D. 2009. Bone turnover in bone biopsies of patients with low-energy cortical fractures receiving bisphosphonates: a case series. *Calcif Tissue Int* **85**(1): 37-44.
- Ascenzi A. and Bonucci E. 1967. The tensile properties of single osteons. *Anat Rec* **158**(4): 375-86.
- Ascenzi A. and Bonucci E. 1968. The compressive properties of single osteons. *Anat Rec* **161**(3): 377-91.
- Ascenzi M.G. and Lomovtsev A. 2006. Collagen orientation patterns in human secondary osteons, quantified in the radial direction by confocal microscopy. *J Struct Biol* **153**(1): 14-30.
- Ashman R.B., Cowin S.C., Van Buskirk W.C. and Rice J.C. 1984. A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomech* **17**(5): 349-61.
- Athanasίου K.A., Zhu C., Lanctot D.R., Agrawal C.M. and Wang X. 2000. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng* **6**(4): 361-81.
- Bailey D.A. 1997. The Saskatchewan Pediatric Bone Mineral Accrual Study: bone mineral acquisition during the growing years. *Int J Sports Med* **18 Suppl 3**: S191-4.
- Bala Y., Bare S., Boivin G. and Recker R. 2010a. Bone tissue quality in the years after menopause: microhardness is decreased independently of changes in the degree of mineralization. *J Bone Miner Res* **25 (supl. 1)**.

- Bala Y., Farlay D., Delmas P.D., Meunier P.J. and Boivin G. 2010b. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone* **46**(4): 1204-12.
- Bala Y., Farlay D., Simi C., Delmas P.D., Meunier P.J. and Boivin G. 2007. Time sequence of secondary mineralization and microhardness of bone in an ewe model. *J Bone Miner Res* **21** (Suppl. 1): 332.
- Balan G., Bauman J., Bhattacharya S., Castrodad M., Healy D.R., Herr M., Humphries P., Jennings S., Kalgutkar A.S., Kapinos B., Khot V., Lazarra K., Li M., Li Y., Neagu C., Oliver R., Piotrowski D.W., Price D., Qi H., Simmons H.A., Southers J., Wei L., Zhang Y. and Paralkar V.M. 2009. The discovery of novel calcium sensing receptor negative allosteric modulators. *Bioorg Med Chem Lett* **19**(12): 3328-32.
- Balena R., Toolan B.C., Shea M., Markatos A., Myers E.R., Lee S.C., Opas E.E., Seedor J.G., Klein H., Frankenfield D. and et al. 1993. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* **92**(6): 2577-86.
- Balooch M., Habelitz S., Kinney J.H., Marshall S.J. and Marshall G.W. 2008. Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization. *J Struct Biol* **162**(3): 404-10.
- Banase X., Sims T.J. and Bailey A.J. 2002. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res* **17**(9): 1621-8.
- Barrett J., Worth E., Bauss F. and Epstein S. 2004. Ibandronate: a clinical pharmacological and pharmacokinetic update. *J Clin Pharmacol* **44**(9): 951-65.
- Baudoin C., Fardellone P., Thelot B., Juvin R., Potard V., Bean K. and Sebert J.L. 1996. Hip fractures in France: the magnitude and perspective of the problem. *Osteoporos Int* **6** Suppl 3: 1-10.
- Bauss F., Lalla S., Endelev R. and Hothorn L.A. 2002. Effects of treatment with ibandronate on bone mass, architecture, biomechanical properties, and bone concentration of ibandronate in ovariectomized aged rats. *J Rheumatol* **29**(10): 2200-8.
- Bauss F. and Russell R.G. 2004. Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing. *Osteoporos Int* **15**(6): 423-33.
- Bell G.H., Dunbar O., Beck J.S. and Gibb A. 1967. Variations in strength of vertebrae with age and their relation to osteoporosis. *Calcif Tissue Res* **1**(1): 75-86.
- Benford H.L., Frith J.C., Auriola S., Monkkonen J. and Rogers M.J. 1999. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* **56**(1): 131-40.

- Bergot C., Wu Y., Jolivet E., Zhou L.Q., Laredo J.D. and Bousson V. 2009. The degree and distribution of cortical bone mineralization in the human femoral shaft change with age and sex in a microradiographic study. *Bone* **45**(3): 435-42.
- Bergstrom J.D., Bostedor R.G., Masarachia P.J., Reszka A.A. and Rodan G. 2000. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* **373**(1): 231-41.
- Bernards M.T., Qin C., Ratner B.D. and Jiang S. 2008. Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *J Biomed Mater Res A* **86**(3): 779-87.
- Bilezikian J.P. 2008. Combination anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: opening the anabolic window. *Curr Osteoporos Rep* **6**(1): 24-30.
- Black D.M., Bilezikian J.P., Ensrud K.E., Greenspan S.L., Palermo L., Hue T., Lang T.F., McGowan J.A. and Rosen C.J. 2005. One year of alendronate after one year of parathyroid hormone (1-84) for osteoporosis. *N Engl J Med* **353**(6): 555-65.
- Black D.M., Cummings S.R., Karpf D.B., Cauley J.A., Thompson D.E., Nevitt M.C., Bauer D.C., Genant H.K., Haskell W.L., Marcus R., Ott S.M., Torner J.C., Quandt S.A., Reiss T.F. and Ensrud K.E. 1996. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* **348**(9041): 1535-41.
- Black D.M., Delmas P.D., Eastell R., Reid I.R., Boonen S., Cauley J.A., Cosman F., Lakatos P., Leung P.C., Man Z., Mautalen C., Mesenbrink P., Hu H., Caminis J., Tong K., Rosario-Jansen T., Krasnow J., Hue T.F., Sellmeyer D., Eriksen E.F. and Cummings S.R. 2007. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **356**(18): 1809-22.
- Black D.M., Greenspan S.L., Ensrud K.E., Palermo L., McGowan J.A., Lang T.F., Garnero P., Bouxsein M.L., Bilezikian J.P. and Rosen C.J. 2003. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **349**(13): 1207-15.
- Black D.M., Schwartz A.V., Ensrud K.E., Cauley J.A., Levis S., Quandt S.A., Satterfield S., Wallace R.B., Bauer D.C., Palermo L., Wehren L.E., Lombardi A., Santora A.C. and Cummings S.R. 2006. Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* **296**(24): 2927-38.
- Black D.M., Thompson D.E., Bauer D.C., Ensrud K., Musliner T., Hochberg M.C., Nevitt M.C., Suryawanshi S. and Cummings S.R. 2000. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(11): 4118-24.
- Blank R.D., Baldini T.H., Kaufman M., Bailey S., Gupta R., Yershov Y., Boskey A.L., Coppersmith S.N., Demant P. and Paschalis E.P. 2003. Spectroscopically determined collagen Pyr/deH-DHLNL cross-link ratio and crystallinity indices differ markedly in

- recombinant congenic mice with divergent calculated bone tissue strength. *Connect Tissue Res* **44**(3-4): 134-42.
- Blumenthal N.C. 1990. The in vitro uptake of trace elements by hydroxyapatite. Trace metals and fluorides in bone and teeth. N. D. Priest et F. L. Van de Vyver. Boca Raton, FL, CRC Press: 307-13.
- Blumenthal N.C., Betts F. and Posner A.S. 1975. Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite. *Calcif Tissue Res* **18**(2): 81-90.
- Boivin G. 2007. The hydroxyapatite crystal: a closer look. *Medicographia* **29**(2): 126-33.
- Boivin G., Bala Y., Doublier A., Farlay D., Ste-Marie L.G., Meunier P.J. and Delmas P.D. 2008. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* **43**(3): 532-8.
- Boivin G., Farlay D., Bala Y., Doublier A., Meunier P.J. and Delmas P.D. 2009. Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporos Int* **20**(6): 1023-6.
- Boivin G., Farlay D., Khebbab M.T., Jaurand X., Delmas P.D. and Meunier P.J. 2010. In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. *Osteoporos Int* **21**(4): 667-77.
- Boivin G., Lips P., Ott S.M., Harper K.D., Sarkar S., Pinette K.V. and Meunier P.J. 2003. Contribution of raloxifene and calcium and vitamin D3 supplementation to the increase of the degree of mineralization of bone in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(9): 4199-205.
- Boivin G. and Meunier P.J. 2002a. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int* **70**(6): 503-11.
- Boivin G. and Meunier P.J. 2002b. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**(6): 538-43.
- Boivin G. and Meunier P.J. 2003a. Methodological considerations in measurement of bone mineral content. *Osteoporos Int* **14 Suppl 5**: S22-7; discussion S27-8.
- Boivin G. and Meunier P.J. 2003b. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int* **14 Suppl 3**: S19-24.
- Boivin G.Y., Chavassieux P.M., Santora A.C., Yates J. and Meunier P.J. 2000. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* **27**(5): 687-94.
- Bone H.G., Hosking D., Devogelaer J.P., Tucci J.R., Emkey R.D., Tonino R.P., Rodriguez-Portales J.A., Downs R.W., Gupta J., Santora A.C. and Liberman U.A. 2004. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* **350**(12): 1189-99.

- Bone H.G., McClung M.R., Roux C., Recker R.R., Eisman J.A., Verbruggen N., Hustad C.M., DaSilva C., Santora A.C. and Ince B.A. 2010. Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density. *J Bone Miner Res* **25**(5): 937-47.
- Bonjour J.P., Chevalley T., Ferrari S. and Rizzoli R. 2009. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Publica Mex* **51 Suppl 1**: S5-17.
- Bonnelye E., Chabadel A., Saltel F. and Jurdic P. 2008. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* **42**(1): 129-38.
- Bonser R.H. 1995. Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *J Exp Biol* **198**(Pt 1): 209-12.
- Borah B., Dufresne T.E., Ritman E.L., Jorgensen S.M., Liu S., Chmielewski P.A., Phipps R.J., Zhou X., Sibonga J.D. and Turner R.T. 2006. Long-term risedronate treatment normalizes mineralization and continues to preserve trabecular architecture: sequential triple biopsy studies with micro-computed tomography. *Bone* **39**(2): 345-52.
- Borah B., Ritman E.L., Dufresne T.E., Jorgensen S.M., Liu S., Sacha J., Phipps R.J. and Turner R.T. 2005. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone* **37**(1): 1-9.
- Boskey A.L. 2003. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int* **14 (Suppl. 5)**: 16-21.
- Boskey A.L., Spevak L. and Weinstein R.S. 2009. Spectroscopic markers of bone quality in alendronate-treated postmenopausal women. *Osteoporos Int* **20**(5): 793-800.
- Bousson V., Bergot C., Wu Y., Jolivet E., Zhou L.Q. and Laredo J.D. Greater tissue mineralization heterogeneity in femoral neck cortex from hip-fractured females than controls. A microradiographic study. *Bone* **48**(6): 1252-9.
- Bousson V., Meunier A., Bergot C., Vicaud E., Rocha M.A., Morais M.H., Laval-Jeantet A.M. and Laredo J.D. 2001. Distribution of intracortical porosity in human midfemoral cortex by age and gender. *J Bone Miner Res* **16**(7): 1308-17.
- Boutroy S., Bouxsein M.L., Munoz F. and Delmas P.D. 2005. In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(12): 6508-15.
- Bouxsein M.L. 2003. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporos Int* **14 Suppl 5**: S118-27.
- Bouxsein M.L. 2005. Determinants of skeletal fragility. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **19**(6): 897-911.

- Boyce T.M., Fyhrie D.P., Glotkowski M.C., Radin E.L. and Schaffler M.B. 1998. Damage type and strain mode associations in human compact bone bending fatigue. *J Orthop Res* **16**(3): 322-9.
- Brennan T.C., Rizzoli R. and Ammann P. 2009. Selective modification of bone quality by PTH, pamidronate, or raloxifene. *J Bone Miner Res* **24**(5): 800-8.
- Briot K. and Roux C. 2008. Définition, diagnostic et risque fracturaire. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 147-52.
- Brown J.P., Prince R.L., Deal C., Recker R.R., Kiel D.P., de Gregorio L.H., Hadji P., Hofbauer L.C., Alvaro-Gracia J.M., Wang H., Austin M., Wagman R.B., Newmark R., Libanati C., San Martin J. and Bone H.G. 2009. Comparison of the Effect of Denosumab and Alendronate on Bone Mineral Density and Biochemical Markers of Bone Turnover in Postmenopausal Women With Low Bone Mass: A Randomized, Blinded, Phase 3 Trial. *J Bone Miner Res*: 1-34.
- Burghardt A.J., Kazakia G.J., Sode M., de Papp A.E., Link T.M. and Majumdar S. 2010. A longitudinal HR-pQCT study of alendronate treatment in postmenopausal women with low bone density: Relations among density, cortical and trabecular microarchitecture, biomechanics, and bone turnover. *J Bone Miner Res* **25**(12): 2282-95.
- Burket J., Gourion-Arsiquaud S., Havill L.M., Baker S.P., Boskey A.L. and van der Meulen M.C. 2011. Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. *J Biomech* **44**(2): 277-84.
- Burr D. 2003. Microdamage and bone strength. *Osteoporos Int* **14 Suppl 5**: S67-72.
- Burr D.B. 2002. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* **30**(1): 2-4.
- Burr D.B. and Allen M.R. 2009. Mandibular necrosis in beagle dogs treated with bisphosphonates. *Orthod Craniofac Res* **12**(3): 221-8.
- Burr D.B., Martin R.B., Schaffler M.B. and Radin E.L. 1985. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech* **18**(3): 189-200.
- Burr D.B., Milgrom C., Fyhrie D., Forwood M., Nyska M., Finestone A., Hoshaw S., Saiag E. and Simkin A. 1996. In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* **18**(5): 405-10.
- Burr D.B., Schaffler M.B. and Frederickson R.G. 1988. Composition of the cement line and its possible mechanical role as a local interface in human compact bone. *J Biomech* **21**(11): 939-45.
- Busa B., Miller L.M., Rubin C.T., Qin Y.X. and Judex S. 2005. Rapid establishment of chemical and mechanical properties during lamellar bone formation. *Calcif Tissue Int* **77**(6): 386-94.

- Bushby A.J., Ferguson V.L. and Boyde A. 2004. Nanoindentation of bone: comparison of specimens tested in liquid and embedded in polymethylmetacrylate. *J Mater Res* **19**: 249-59.
- Byers P.H., Wallis G.A. and Willing M.C. 1991. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet* **28**(7): 433-42.
- Byrjalsen I., Leeming D.J., Qvist P., Christiansen C. and Karsdal M.A. 2008. Bone turnover and bone collagen maturation in osteoporosis: effects of antiresorptive therapies. *Osteoporos Int* **19**(3): 339-48.
- Canalis E. 2009. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem* **108**(4): 769-77.
- Cardoso L., Herman B.C., Verborgt O., Laudier D., Majeska R.J. and Schaffler M.B. 2009. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* **24**(4): 597-605.
- Carlstrom D. 1954. Microhardness measurements on single Haversian systems in bone. *Experientia* **10**: 171-172.
- Cazalbou S., Combes C., Eichert D., Rey C. and Glimcher M.J. 2004. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J Bone Miner Metab* **22**(4): 310-7.
- Cazalbou S., Eichert D., Ranz X., Drouet C., Combes C., Harmand M.F. and Rey C. 2005. Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med* **16**(5): 405-9.
- Cefalu C.A. 2004. Is bone mineral density predictive of fracture risk reduction? *Curr Med Res Opin* **20**(3): 341-9.
- Chambers T.J. and Fuller K. 1985. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* **76**: 155-65.
- Chapurlat R. and Chappard D. 2009. *L'ostéoporose - Mieux la comprendre pour mieux la traiter*. Rueil-Malmaison, Wolters Kluwer Health.
- Chapurlat R.D., Arlot M., Burt-Pichat B., Chavassieux P., Roux J.P., Portero-Muzy N. and Delmas P.D. 2007. Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women on long-term bisphosphonates: a bone biopsy study. *J Bone Miner Res* **22**(10): 1502-9.
- Chavassieux P., Seeman E. and Delmas P.D. 2007. Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocr Rev* **28**(2): 151-64.
- Chavassieux P.M., Arlot M.E., Reda C., Wei L., Yates A.J. and Meunier P.J. 1997. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* **100**(6): 1475-80.

- Chen T., Berenson J., Vescio R., Swift R., Gilchick A., Goodin S., LoRusso P., Ma P., Ravera C., Deckert F., Schran H., Seaman J. and Skerjanec A. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* **42**(11): 1228-36.
- Cheng Y.-T. and Cheng C.-M. 1998. Relationship between hardness, elastic modulus, and the work of indentation. *Appl. Phys. Lett.* **73**(5): 614-616.
- Cheng Y.-T. and Cheng C.-M. 2000. What is indentation hardness ? *Surface & Coatings Technology* **133**: 417-24.
- Chesnut I.C., Skag A., Christiansen C., Recker R., Stakkestad J.A., Hoiseth A., Felsenberg D., Huss H., Gilbride J., Schimmer R.C. and Delmas P.D. 2004. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **19**(8): 1241-9.
- Cheung R.K., Leung K.K., Lee K.C. and Chow T.C. 2007. Sequential non-traumatic femoral shaft fractures in a patient on long-term alendronate. *Hong Kong Med J* **13**(6): 485-9.
- Civitelli R. 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* **473**(2): 188-92.
- Coats A.M., Zioupos P. and Aspden R.M. 2003. Material properties of subchondral bone from patients with osteoporosis or osteoarthritis by microindentation testing and electron probe microanalysis. *Calcif Tissue Int* **73**(1): 66-71.
- Colucci S., Minielli V., Zambonin G., Cirulli N., Mori G., Serra M., Patella V., Zambonin Zallone A. and Grano M. 1998. Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int* **63**(3): 230-5.
- Compston J. 2006. Bone quality: what is it and how is it measured? *Arq Bras Endocrinol Metabol* **50**(4): 579-85.
- Conrad K.A. and Lee S.M. 1981. Clodronate kinetics and dynamics. *Clin Pharmacol Ther* **30**(1): 114-20.
- Consensus-Development-Conference 1993. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* **94**: 646-50.
- Coxon F.P., Helfrich M.H., Larijani B., Muzylak M., Dunford J.E., Marshall D., McKinnon A.D., Nesbitt S.A., Horton M.A., Seabra M.C., Ebetino F.H. and Rogers M.J. 2001. Identification of a novel phosphonocarboxylate inhibitor of Rab geranylgeranyl transferase that specifically prevents Rab prenylation in osteoclasts and macrophages. *J Biol Chem* **276**(51): 48213-22.
- Coxon F.P., Thompson K., Roelofs A.J., Ebetino F.H. and Rogers M.J. 2008. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone* **42**(5): 848-60.

- Coxon F.P., Thompson K. and Rogers M.J. 2006. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol* **6**(3): 307-12.
- Cummings S.R., Black D.M., Thompson D.E., Applegate W.B., Barrett-Connor E., Musliner T.A., Palermo L., Prineas R., Rubin S.M., Scott J.C., Vogt T., Wallace R., Yates A.J. and LaCroix A.Z. 1998. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *JAMA* **280**(24): 2077-82.
- Cummings S.R., Karpf D.B., Harris F., Genant H.K., Ensrud K., LaCroix A.Z. and Black D.M. 2002. Improvement in spine bone density and reduction in risk of vertebral fractures during treatment with antiresorptive drugs. *Am J Med* **112**(4): 281-9.
- Cummings S.R., San Martin J., McClung M.R., Siris E.S., Eastell R., Reid I.R., Delmas P., Zoog H.B., Austin M., Wang A., Kutilek S., Adami S., Zanchetta J., Libanati C., Siddhanti S. and Christiansen C. 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **361**(8): 756-65.
- Currey J.D. 1969. The relationship between the stiffness and the mineral content of bone. *J Biomech* **2**(4): 477-80.
- Currey J.D. 1984. Effects of differences in mineralization on the mechanical properties of bone. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **304**(1121): 509-18.
- Currey J.D. 1999. What determines the bending strength of compact bone? *J Exp Biol* **202**(Pt 18): 2495-503.
- Currey J.D. 2004. Tensile yield in compact bone is determined by strain, post-yield behaviour by mineral content. *J Biomech* **37**(4): 549-56.
- Currey J.D. 2006. The mechanical properties of Bone. *Bones: structure and mechanics*. J. D. Currey. Princeton, NJ, Princeton university press: 54-122.
- Dall'Ara E., Ohman C., Baleani M. and Viceconti M. 2007. The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone. *J Biomech* **40**(14): 3267-70.
- Dallas S.L. and Bonewald L.F. 2010. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* **1192**(1): 437-43.
- David P., Nguyen H., Barbier A. and Baron R. 1996. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* **11**(10): 1498-507.
- Davison K.S., Siminoski K., Adachi J.D., Hanley D.A., Goltzman D., Hodzman A.B., Josse R., Kaiser S., Olszynski W.P., Papaioannou A., Ste-Marie L.G., Kendler D.L., Tenenhouse A. and Brown J.P. 2006. Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts. *Semin Arthritis Rheum* **36**(1): 22-31.
- Day J.S., Ding M., Bednarz P., van der Linden J.C., Mashiba T., Hirano T., Johnston C.C., Burr D.B., Hvid I., Sumner D.R. and Weinans H. 2004. Bisphosphonate treatment affects

- trabecular bone apparent modulus through micro-architecture rather than matrix properties. *J Orthop Res* **22**(3): 465-71.
- De Mull F.F.M., Otto C., Greve J., Arends J. and Ten Bosch J.J. 1988. Calculation of the Raman line broadening on carbonation in synthetic hydroxyapatite. *J Raman Spectroscopy* **19**: 13-21.
- De Vernejoul M.C. 2008. Ostéoporose de l'homme. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 185-91.
- De Vernejoul M.C. and Marie P. 1996. Remodelage osseux et cellules osseuses. *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. D. Kuntz. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 3-16.
- DeJong W.F. 1926. La substance minérale dans les os. *Recl Trav Chim* **45**: 445-8.
- Delaisse J.M., Andersen T.L., Engsig M.T., Henriksen K., Troen T. and Blavier L. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* **61**(6): 504-13.
- Delany A.M., Amling M., Priemel M., Howe C., Baron R. and Canalis E. 2000. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* **105**(7): 915-23.
- Delmas P.D., Adami S., Strugala C., Stakkestad J.A., Reginster J.Y., Felsenberg D., Christiansen C., Civitelli R., Drezner M.K., Recker R.R., Bolognese M., Hughes C., Masanaukaite D., Ward P., Sambrook P. and Reid D.M. 2006. Intravenous ibandronate injections in postmenopausal women with osteoporosis: one-year results from the dosing intravenous administration study. *Arthritis Rheum* **54**(6): 1838-46.
- Delmas P.D., Recker R.R., Chesnut C.H., 3rd, Skag A., Stakkestad J.A., Emkey R., Gilbride J., Schimmer R.C. and Christiansen C. 2004. Daily and intermittent oral ibandronate normalize bone turnover and provide significant reduction in vertebral fracture risk: results from the BONE study. *Osteoporos Int* **15**(10): 792-8.
- Delmas P.D. and Seeman E. 2004. Changes in bone mineral density explain little of the reduction in vertebral or nonvertebral fracture risk with anti-resorptive therapy. *Bone* **34**(4): 599-604.
- Dempster D.W. 2006. Anatomy and functions of of the adult skeleton. *Primer on the bone diseases and disorders of mineral metabolism*. M. J. Favus. Washington, American Society for Bone and Mineral Research: 7-12.
- Diab T. and Vashishth D. 2005. Effects of damage morphology on cortical bone fragility. *Bone* **37**(1): 96-102.
- Dierkes C., Kreisel M., Schulz A., Steinmeyer J., Wolff J.C. and Fink L. 2009. Catabolic properties of microdissected human endosteal bone lining cells. *Calcif Tissue Int* **84**(2): 146-55.

- Ding M., Day J.S., Burr D.B., Mashiba T., Hirano T., Weinans H., Sumner D.R. and Hvid I. 2003. Canine cancellous bone microarchitecture after one year of high-dose bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* **72**(6): 737-44.
- Dobnig H., Sipos A., Jiang Y., Fahrleitner-Pammer A., Ste-Marie L.G., Gallagher J.C., Pavo I., Wang J. and Eriksen E.F. 2005. Early changes in biochemical markers of bone formation correlate with improvements in bone structure during teriparatide therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(7): 3970-7.
- Donnelly E., Baker S.P., Boskey A.L. and van der Meulen M.C. 2006a. Effects of surface roughness and maximum load on the mechanical properties of cancellous bone measured by nanoindentation. *J Biomed Mater Res A* **77**(2): 426-35.
- Donnelly E., Boskey A., Baker S.P. and Van der Meulen M.C. 2009. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J Biomed Mater Res Part A* **92**: 1048-56.
- Donnelly E., Boskey A., Lane J.M., Rebolledo B., Gladnick B. and Dennis M. 2010. Reduced Matrix Heterogeneity with Bisphosphonate Treatment in Postmenopausal Women with Proximal Femoral Fractures. *J Bone Miner Res* **25** (Suppl. 1).
- Donnelly E., Williams R.W., Downs S.A., Dickinson M.E., Baker S.P. and Van der Meulen M.C. 2006b. Quasistatic and dynamic nanomechanical properties of cancellous bone tissue relate to collagen content and organization. *J Mater Res* **21**: 2106-17.
- Drüeke T.B. and Lacour B. 1996. Homéostasie du calcium et du phosphate. Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. D. Kuntz. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 115-38.
- Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A. and Karsenty G. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**(6590): 448-52.
- Ducy P., Schinke T. and Karsenty G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**(5484): 1501-4.
- Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Pinero G., Geoffroy V., Amling M. and Karsenty G. 1999. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* **13**(8): 1025-36.
- Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L. and Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**(5): 747-54.
- Duncan R.L. and Turner C.H. 1995. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* **57**(5): 344-58.
- Dunford J.E., Kwaasi A.A., Rogers M.J., Barnett B.L., Ebetino F.H., Russell R.G., Oppermann U. and Kavanagh K.L. 2008. Structure-activity relationships among the nitrogen containing bisphosphonates in clinical use and other analogues: time-dependent inhibition of human farnesyl pyrophosphate synthase. *J Med Chem* **51**(7): 2187-95.

- Durchschlag E., Paschalis E.P., Zoehrer R., Roschger P., Fratzl P., Recker R., Phipps R. and Klaushofer K. 2006. Bone material properties in trabecular bone from human iliac crest biopsies after 3- and 5-year treatment with risedronate. *J Bone Miner Res* **21**(10): 1581-90.
- Ebetino F.H., Barnett B.L. and Russell R.G. 2005. A computational model delineates differences in hydroxyapatite binding affinities of bisphosphonates in clinical use. *J Bone Miner Res* **20** (Suppl. 1): S259.
- Einhorn A.T. 1996. Biomechanics of bone. Principles of bone biology. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz et G. A. Rodan. San Diego, CRC Press.
- Eisman J.A., Bone H.G., Hosking D.J., McClung M.R., Reid I.R., Rizzoli R., Resch H., Verbruggen N., Hustad C.M., Dasilva C., Petrovic R., Santora A.C., Avery Ince B. and Lombardi A. 2011. Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: Three-year continued therapy and resolution of effect. *J Bone Miner Res* **26**(2): 242-51.
- Eisman J.A., Civitelli R., Adami S., Czerwinski E., Recknor C., Prince R., Reginster J.Y., Zaidi M., Felsenberg D., Hughes C., Mairon N., Masanauskaite D., Reid D.M., Delmas P.D. and Recker R.R. 2008. Efficacy and tolerability of intravenous ibandronate injections in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the DIVA study. *J Rheumatol* **35**(3): 488-97.
- Emkey R., Delmas P.D., Bolognese M., Borges J.L., Cosman F., Ragi-Eis S., Recknor C., Zerbini C.A., Neate C., Sedarati F. and Epstein S. 2009. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate (150 mg) and once-weekly oral alendronate (70 mg): additional results from the Monthly Oral Therapy With Ibandronate For Osteoporosis Intervention (MOTION) study. *Clin Ther* **31**(4): 751-61.
- Emkey R., Koltun W., Beusterien K., Seidman L., Kivitz A., Devas V. and Masanauskaite D. 2005. Patient preference for once-monthly ibandronate versus once-weekly alendronate in a randomized, open-label, cross-over trial: the Boniva Alendronate Trial in Osteoporosis (BALTO). *Curr Med Res Opin* **21**(12): 1895-903.
- Engelke K., Fuerst T., Dasic G., Davies R.Y. and Genant H.K. 2010. Regional distribution of spine and hip QCT BMD responses after one year of once-monthly ibandronate in postmenopausal osteoporosis. *Bone* **46**(6): 1626-32.
- Ensrud K.E., Barrett-Connor E.L., Schwartz A., Santora A.C., Bauer D.C., Suryawanshi S., Feldstein A., Haskell W.L., Hochberg M.C., Torner J.C., Lombardi A. and Black D.M. 2004. Randomized trial of effect of alendronate continuation versus discontinuation in women with low BMD: results from the Fracture Intervention Trial long-term extension. *J Bone Miner Res* **19**(8): 1259-69.
- Eriksen E.F. 1986. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev* **7**(4): 379-408.

- Eriksen E.F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* **11**(4): 219-27.
- Eriksen E.F., Melsen F., Sod E., Barton I. and Chines A. 2002. Effects of long-term risedronate on bone quality and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone* **31**(5): 620-5.
- Ettinger B., Black D.M., Mitlak B.H., Knickerbocker R.K., Nickelsen T., Genant H.K., Christiansen C., Delmas P.D., Zanchetta J.R., Stakkestad J., Gluer C.C., Krueger K., Cohen F.J., Eckert S., Ensrud K.E., Avioli L.V., Lips P. and Cummings S.R. 1999. 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* **282**(7): 637-45.
- Everts V., Delaisse J.M., Korper W., Jansen D.C., Tigchelaar-Gutter W., Saftig P. and Beertsen W. 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* **17**(1): 77-90.
- Faibish D., Ott S.M. and Boskey A.L. 2006. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* **443**: 28-38.
- Fantner G.E., Hassenkam T., Kindt J.H., Weaver J.C., Birkedal H., Pechenik L., Cutroni J.A., Cidade G.A., Stucky G.D., Morse D.E. and Hansma P.K. 2005. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater* **4**(8): 612-6.
- Farlay D., Duclos M.-E., Gineyts E., Bertholon C., Viguet-Carrin S., Nallala J., Sockalingum G., Bertrand D., Roger T., Hartmann D., Chapurlat R. and Boivin G. 2011. Relevance of enzymatic collagen cross-links analysis by Infrared Microspectroscopy in bone tissue. **Submitted**.
- Farlay D., panczer G., Rey C., Delmas P.D. and Boivin G. 2010. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab* **28**(4): 433-45.
- Faulkner K.G., Cummings S.R., Black D., Palermo L., Gluer C.C. and Genant H.K. 1993. Simple measurement of femoral geometry predicts hip fracture: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* **8**(10): 1211-7.
- Fazzalari N.L., Forwood M.R., Smith K., Manthey B.A. and Herreen P. 1998. Assessment of cancellous bone quality in severe osteoarthritis: bone mineral density, mechanics, and microdamage. *Bone* **22**(4): 381-8.
- Ferguson V.L. 2009. Deformation partitioning provides insight into elastic, plastic, and viscous contributions to bone material behavior. *J Mech Behav Biomed Mater* **2**(4): 364-74.
- Fischer-Cripps A.C. 2005. Theory of nanoindentation. *The IBIS handbook of nanoindentation*. A. C. Fischer-Cripps. Forestville, Fischer-Cripps Laboratories Pty Ltd: 6-38.

- Fitzpatrick L.A., Brennan E., Kumar S., Matheny C., Yi B., McLaughlin M., Phillips J., Skodros L. and Ethgen D. 2008. Ronacaleret, a novel calcium-sensing receptor antagonist, demonstrates potential as an oral bone-forming therapy in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **23 (Suppl. 1)**: S50.
- Fleisch H. 2000. Bisphosphonates in bone disease - *From the laboratory to the patient*. Fourth Edition. San Diego, CA, Academic Press.
- Fleisch H., Russell R.G. and Francis M.D. 1969. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* **165(899)**: 1262-4.
- Fleisch H.A., Russell R.G., Bisaz S., Muhlbauer R.C. and Williams D.A. 1970. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* **1(1)**: 12-8.
- Folkesson J., Goldenstein J., Carballido-Gamio J., Kazakia G., Burghardt A.J., Rodriguez A., Krug R., de Papp A.E., Link T.M. and Majumdar S. 2011. Longitudinal evaluation of the effects of alendronate on MRI bone microarchitecture in postmenopausal osteopenic women. *Bone* **48(3)**: 611-21.
- Follet H., Boivin G., Rumelhart C. and Meunier P.J. 2004. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* **34(5)**: 783-9.
- Follet H., Li J., Phipps R.J., Hui S., Condon K. and Burr D.B. 2007. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* **40(4)**: 1172-7.
- Follet H., Viguet-Carrin S., Burt-Pichat B., Dépalle B., Bala Y., Gineyts E., Munoz F., Arlot M.E., Boivin G., Chapurlat R., Delmas P.D. and Bouxsein M.L. 2011. Effects of Pre-Existing Microdamage, Collagen Cross-Links, Degree of Mineralization, Age and Architecture on Compressive Mechanical Properties of Elderly Human Vertebral Trabecular Bone. *J Orthop Res* **29(4)**: 481-8.
- Francis M.D. 1969. The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. *Calcif Tissue Res* **3(2)**: 151-62.
- Francis M.D., Russell R.G. and Fleisch H. 1969. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* **165(899)**: 1264-6.
- Franz-Odendaal T.A., Hall B.K. and Witten P.E. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235(1)**: 176-90.
- Fratzl-Zelman N., Roschger P., Gourrier A., Weber M., Misof B.M., Loveridge N., Reeve J., Klaushofer K. and Fratzl P. 2009. Combination of nanoindentation and quantitative backscattered electron imaging revealed altered bone material properties associated with femoral neck fragility. *Calcif Tissue Int* **85(4)**: 335-43.

- Fratzl P., Gupta H.S., Paschalis E.P. and Roschger P. 2004. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry* **14**: 2115-23.
- Fratzl P., Roschger P., Eschberger J., Abendroth B. and Klaushofer K. 1994. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: a small-angle x-ray-scattering study. *J Bone Miner Res* **9**(10): 1541-9.
- Fratzl P., Roschger P., Fratzl-Zelman N., Paschalis E.P., Phipps R. and Klaushofer K. 2007. Evidence that treatment with risedronate in women with postmenopausal osteoporosis affects bone mineralization and bone volume. *Calcif Tissue Int* **81**(2): 73-80.
- Fratzl P. and Weinkamer R. 2007. Nature's hierarchical materials. *Progress in Material Science* **52**: 1263-1334.
- Freeman J.J., Wopenka B., Silva M.J. and Pasteris J.D. 2001. Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment. *Calcif Tissue Int* **68**(3): 156-62.
- Frost H.M. 1983. Bone histomorphometry: choice of marking agent and labeling schedule. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. R. Recker. Boca Raton, florida, CRC Press: 37-53.
- Frost H.M., Vilanueva A.R., Jett S. and Eyring E. 1969. Tetracycline-based analysis of bone remodelling in osteopetrosis. *Clin Orthop Relat Res* **65**: 203-17.
- Fuchs R.K., Allen M.R., Ruppel M.E., Diab T., Phipps R.J., Miller L.M. and Burr D.B. 2008. In situ examination of the time-course for secondary mineralization of Haversian bone using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Matrix Biol* **27**(1): 34-41.
- Gadaleta S.J., Paschalis E.P., Betts F., Mendelsohn R. and Boskey A.L. 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif Tissue Int* **58**(1): 9-16.
- Gallacher S.J. and Dixon T. 2010. Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review. *Calcif Tissue Int* **87**(6): 469-84.
- Gallagher J.C., Genant H.K., Crans G.G., Vargas S.J. and Krege J.H. 2005. Teriparatide reduces the fracture risk associated with increasing number and severity of osteoporotic fractures. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1583-7.
- Gamsjaeger S., Buchinger B., Zwettler E., Recker R., Black D., Gasser J.A., Eriksen E.F., Klaushofer K. and Paschalis E.P. 2011. Bone material properties in actively bone-forming trabeculae in postmenopausal women with osteoporosis after three years of treatment with once-yearly Zoledronic acid. *J Bone Miner Res* **26**(1): 12-8.
- Gao H., Ji B., Jager I.L., Arzt E. and Fratzl P. 2003. Materials become insensitive to flaws at nanoscale: lessons from nature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5597-600.

- Garnero P. 2000. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk. *Osteoporos Int* **11 Suppl 6**: S55-65.
- Garnero P. and Delmas P.D. 1996. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* **59 Suppl 1**: S2-9.
- Gehron Robey P. and Boskey A.L. 2006. Extracellular matrix and biomineralization of bone. Primer on the bone diseases and disorders of mineral metabolism. M. J. Favus. Washington, American Society for Bone and Mineral Research: 12-9.
- Geischke R., Hayachi N., Vis P. and Jacqmin P. 2003. Modeling the effects of ibandronate treatment on the time course of bone mineral density change in osteoporotic postmenopausal women *Calcif Tissue Int* **72**: 404.
- Gennari L., Merlotti D., De Paola V. and Nuti R. 2010. Lasofoxifene: Evidence of its therapeutic value in osteoporosis. *Core Evid* **4**: 113-29.
- Gennari L., Merlotti D., Valleggi F., Martini G. and Nuti R. 2007. Selective estrogen receptor modulators for postmenopausal osteoporosis: current state of development. *Drugs Aging* **24(5)**: 361-79.
- Gertz B.J., Holland S.D., Kline W.F., Matuszewski B.K. and Porras A.G. 1993. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int* **3 Suppl 3**: S13-6.
- Gilbert L., He X., Farmer P., Rubin J., Drissi H., van Wijnen A.J., Lian J.B., Stein G.S. and Nanes M.S. 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **277(4)**: 2695-701.
- Giraud-Guille M.M. 1988. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int* **42(3)**: 167-80.
- Giusti A., Hamdy N.A. and Papapoulos S.E. 2010. Atypical fractures of the femur and bisphosphonate therapy: A systematic review of case/case series studies. *Bone* **47(2)**: 169-80.
- Glass D.A., 2nd and Karsenty G. 2006. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol* **73**: 43-84.
- Glimcher M.J. 1984. Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **304(1121)**: 479-508.
- Glimcher M.J. 1990. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. L. V. Avioli et S. M. Krane. Philadelphia, W.B Saunders Company: 42-68.
- Gluer C.C., Scholz-Ahrens K.E., Helfenstein A., Delling G., Timm W., Acil Y., Barkmann R., Hassenpflug J., Stampa B., Bauss F. and Schrezenmeir J. 2007. Ibandronate treatment

- reverses glucocorticoid-induced loss of bone mineral density and strength in minipigs. *Bone* **40**(3): 645-55.
- Goodyear S.R., Gibson I.R., Skakle J.M., Wells R.P. and Aspden R.M. 2009. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone* **44**(5): 899-907.
- Gothlin G. and Ericsson J.L. 1976. The osteoclast: review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship. *Clin Orthop Relat Res*(120): 201-31.
- Goulet R.W., Goldstein S.A., Ciarelli M.J., Kuhn J.L., Brown M.B. and Feldkamp L.A. 1994. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* **27**(4): 375-89.
- Gourion-Arsiquaud S., Allen M.R., Burr D.B., Vashishth D., Tang S.Y. and Boskey A.L. 2010. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone* **46**(3): 666-72.
- Gourion-Arsiquaud S., Burket J.C., Havill L.M., DiCarlo E., Doty S.B., Mendelsohn R., van der Meulen M.C. and Boskey A.L. 2009. Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. *J Bone Miner Res* **24**(7): 1271-81.
- Gupta H.S., Wagermaier W., Zickler G.A., Raz-Ben Aroush D., Funari S.S., Roschger P., Wagner H.D. and Fratzl P. 2005. Nanoscale deformation mechanisms in bone. *Nano Lett* **5**(10): 2108-11.
- Guy J.A., Shea M., Peter C.P., Morrissey R. and Hayes W.C. 1993. Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in the rat results in increases in bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int* **53**(4): 283-8.
- Hadji P., Minne H., Pfeifer M., Bourgeois P., Fardellone P., Licata A., Devas V., Masanauskaite D. and Barrett-Connor E. 2008. Treatment preference for monthly oral ibandronate and weekly oral alendronate in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized, crossover study (BALTO II). *Joint Bone Spine* **75**(3): 303-10.
- Haiat G., Padilla F., Svrcekova M., Chevalier Y., Pahr D., Peyrin F., Laugier P. and Zysset P. 2009. Relationship between ultrasonic parameters and apparent trabecular bone elastic modulus: a numerical approach. *J Biomech* **42**(13): 2033-9.
- Ham A.W. and Harris W.R. 1956. Repair and transplantation of bone. The biochemistry and physiology of bone G. H. Bourne. New York, Academic press: 475-506.
- Handschin R.G. and Stern W.B. 1995. X-Ray diffraction studies on the lattice perfection of human bone apatite (Crista iliaca). *Bone* **16**: 355-63.
- Hansson T., Roos B. and Nachemson A. 1980. The bone mineral content and ultimate compressive strength of lumbar vertebrae. *Spine (Phila Pa 1976)* **5**(1): 46-55.
- Harris S.T., Watts N.B., Genant H.K., McKeever C.D., Hangartner T., Keller M., Chesnut C.H., 3rd, Brown J., Eriksen E.F., Hoseney M.S., Axelrod D.W. and Miller P.D. 1999. Effects

- of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA* **282**(14): 1344-52.
- Hauge E.M., Qvesel D., Eriksen E.F., Mosekilde L. and Melsen F. 2001. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* **16**(9): 1575-82.
- Heaney R.P. 2003. Is the paradigm shifting? *Bone* **33**(4): 457-65.
- Heaney R.P., Zizic T.M., Fogelman I., Olszynski W.P., Geusens P., Kasibhatla C., Alsayed N., Isaia G., Davie M.W. and Chesnut C.H., 3rd 2002. Risedronate reduces the risk of first vertebral fracture in osteoporotic women. *Osteoporos Int* **13**(6): 501-5.
- Hengsberger S., Kulik A. and Zysset P. 2001. A combined atomic force microscopy and nanoindentation technique to investigate the elastic properties of bone structural units. *Eur Cell Mater* **1**: 12-7.
- Hengsberger S., Kulik A. and Zysset P. 2002. Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. *Bone* **30**(1): 178-84.
- Henneman Z.J., Nancollas G.H., Ebetino F.H., Russell R.G. and Phipps R.J. 2008. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro. *J Biomed Mater Res A* **85**(4): 993-1000.
- Henriksen D.B., Alexandersen P., Hartmann B., Adrian C.L., Byrjalsen I., Bone H.G., Holst J.J. and Christiansen C. 2007. Disassociation of bone resorption and formation by GLP-2: a 14-day study in healthy postmenopausal women. *Bone* **40**(3): 723-9.
- Hernandez C.J., Beaupre G.S. and Carter D.R. 2003. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int* **14**(10): 843-7.
- Hildebrand T., Laib A., Muller R., Dequeker J. and Ruegsegger P. 1999. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* **14**(7): 1167-74.
- Hoc T., Henry L., Verdier M., Aubry D., Sedel L. and Meunier A. 2006. Effect of microstructure on the mechanical properties of Haversian cortical bone. *Bone* **38**(4): 466-74.
- Hodgkinson R., Currey J.D. and Evans G.P. 1989. Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone. *J Orthop Res* **7**(5): 754-8.
- Hoefert S., Schmitz I., Tannapfel A. and Eufinger H. 2010. Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig* **14**(3): 271-84.

- Hofbauer L.C., Gori F., Riggs B.L., Lacey D.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C. and Khosla S. 1999a. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* **140**(10): 4382-9.
- Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Spelsberg T.C. and Riggs B.L. 1999b. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* **140**(9): 4367-70.
- Hofbauer L.C., Lacey D.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Riggs B.L. and Khosla S. 1999c. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* **25**(3): 255-9.
- Hoffler C.E., Guo X.E., Zysset P.K. and Goldstein S.A. 2005. An application of nanoindentation technique to measure bone tissue Lamellae properties. *J Biomech Eng* **127**(7): 1046-53.
- Hoffler C.E., Moore K.E., Kozloff K., Zysset P.K., Brown M.B. and Goldstein S.A. 2000. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone* **26**(6): 603-9.
- Hofmann T., Heyroth F., Meinhard H., Franzel W. and Raum K. 2006. Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae. *J Biomech* **39**(12): 2282-94.
- Hoshi K. and Ozawa H. 2000. Matrix vesicle calcification in bones of adult rats. *Calcif Tissue Int* **66**(6): 430-4.
- Huang R.Y., Miller L.M., Carlson C.S. and Chance M.R. 2003. In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy. *Bone* **33**(4): 514-21.
- Hui S.L., Slemenda C.W. and Johnston C.C., Jr. 1988. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* **81**(6): 1804-9.
- Huiskes R., Ruimerman R., van Lenthe G.H. and Janssen J.D. 2000. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* **405**(6787): 704-6.
- Im G.I., Qureshi S.A., Kenney J., Rubash H.E. and Shanbhag A.S. 2004. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* **25**(18): 4105-15.
- Imai K., Ohnishi I., Matsumoto T., Yamamoto S. and Nakamura K. 2009. Assessment of vertebral fracture risk and therapeutic effects of alendronate in postmenopausal women using a quantitative computed tomography-based nonlinear finite element method. *Osteoporos Int* **20**(5): 801-10.
- Isaksson H., Malkiewicz M., Nowak R., Helminen H.J. and Jurvelin J.S. 2010. Rabbit cortical bone tissue increases its elastic stiffness but becomes less viscoelastic with age. *Bone* **47**(6): 1030-8.
- Jager I. and Fratzl P. 2000. Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys J* **79**(4): 1737-46.

- Johnson K.L. 1985. Normal contact of elastic solids: Hertz theory, contact mechanics. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Johnson W.M. and Rapoff A.J. 2007. Microindentation in bone: hardness variation with five independent variables. *J Mater Sci Mater Med* **18**(4): 591-7.
- Juillard A., Falgayrac G., Cortet B., Vieillard M.H., Azaroual N., Hornez J.C. and Penel G. 2010. Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study. *Bone*.
- Jung A., Bisaz S. and Fleisch H. 1973. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* **11**(4): 269-80.
- Jurdic P., Saltel F., Chabadel A. and Destaing O. 2006. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* **85**(3-4): 195-202.
- Karsenty G., Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Geoffroy V. and Amling M. 1999. *Cbfa1* as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* **25**(1): 107-8.
- Kasting G.B. and Francis M.D. 1992. Retention of etidronate in human, dog, and rat. *J Bone Miner Res* **7**(5): 513-22.
- Katz J.L., Yoon H.S., Lipson S., Maharidge R., Meunier A. and Christel P. 1984. The effects of remodeling on the elastic properties of bone. *Calcif Tissue Int* **36 Suppl 1**: S31-6.
- Kavanagh K.L., Guo K., Dunford J.E., Wu X., Knapp S., Ebetino F.H., Rogers M.J., Russell R.G. and Oppermann U. 2006. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7829-34.
- Kazanci M., Fratzl P., Klaushofer K. and Paschalis E.P. 2006. Complementary information on in vitro conversion of amorphous (precursor) calcium phosphate to hydroxyapatite from Raman microspectroscopy and wide-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int* **79**(5): 354-9.
- Keaveny T.M., Donley D.W., Hoffmann P.F., Mitlak B.H., Glass E.V. and San Martin J.A. 2007. Effects of teriparatide and alendronate on vertebral strength as assessed by finite element modeling of QCT scans in women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* **22**(1): 149-57.
- Kendler D.L., Roux C., Benhamou C.L., Brown J.P., Lillstol M., Siddhanti S., Man H.S., San Martin J. and Bone H.G. 2010. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women transitioning from alendronate therapy. *J Bone Miner Res* **25**(1): 72-81.
- Khan S.A., Kanis J.A., Vasikaran S., Kline W.F., Matuszewski B.K., McCloskey E.V., Beneton M.N., Gertz B.J., Sciberras D.G., Holland S.D., Orgee J., Coombes G.M., Rogers S.R. and Porras A.G. 1997. Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **12**(10): 1700-7.
- Khosla S., Burr D., Cauley J., Dempster D.W., Ebeling P.R., Felsenberg D., Gagel R.F., Gilsanz V., Guise T., Koka S., McCauley L.K., McGowan J., McKee M.D., Mohla S., Pendrys

- D.G., Raisz L.G., Ruggiero S.L., Shafer D.M., Shum L., Silverman S.L., Van Poznak C.H., Watts N., Woo S.B. and Shane E. 2007. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* **22**(10): 1479-91.
- Klein G., Martin J.-B. and Satre M. 1988. Methylendiphosphonate, a metabolic poison in *Dictyostelium discoideum*. ^{31}P NMR evidence for accumulation of adenosine 5'-(beta, gamma-Methylenetriphosphate) and diadenosine 5', 5'''- P^1, P^4 -(P^2, P^3 -Methylenetetraphosphate). *Biochemistry* **27**: 1897-1901.
- Kogianni G., Mann V. and Noble B.S. 2008. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* **23**(6): 915-27.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S. and Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**(5): 755-64.
- Kopperdahl D.L. and Keaveny T.M. 1998. Yield strain behavior of trabecular bone. *J Biomech* **31**(7): 601-8.
- Kotha S.P., DePaula C.A., Mann A.B. and Guzelsu N. 2008. High frequency ultrasound prediction of mechanical properties of cortical bone with varying amount of mineral content. *Ultrasound Med Biol* **34**(4): 630-7.
- Kousteni S., Han L., Chen J.R., Almeida M., Plotkin L.I., Bellido T. and Manolagas S.C. 2003. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* **111**(11): 1651-64.
- Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J. and Boyle W.J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**(2): 165-76.
- Lalla S., Hothorn L.A., Haag N., Bader R. and Bauss F. 1998. Lifelong administration of high doses of ibandronate increases bone mass and maintains bone quality of lumbar vertebrae in rats. *Osteoporos Int* **8**(2): 97-103.
- Lamoureux F., Baud'huin M., Duplomb L., Heymann D. and Redini F. 2007. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays* **29**(8): 758-71.
- Landis W.J. 1979. Application of electron probe X-ray microanalysis to calcification studies of bone and cartilage. *Scan Electron Microsc(2)*: 555-70.
- Launey M.E., Buehler M.J. and Ritchie R.O. 2010. On the mechanistic origins of toughness in bone. *Annual Review of Materials Research* **40**: 25-53.

- Lawson M.A., Triffitt J.T., Ebetino F.H., Barnett B.L., Phipps R.J., Locklin R.M. and Russell R.G. 2005. Potential bone mineral binding differences among bisphosphonates can be demonstrated by the use of hydroxyapatite column chromatography. *J Bone Miner Res* **20** (Suppl. 1): S396-7.
- Lawson M.A., Xia Z., Barnett B.L., Triffitt J.T., Phipps R.J., Dunford J.E., Locklin R.M., Ebetino F.H. and Russell R.G. 2010. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **92**(1): 149-55.
- Lee J.K. 2009. Bilateral atypical femoral diaphyseal fractures in a patient treated with alendronate sodium. *Int J Rheum Dis* **12**(2): 149-54.
- Lee T.C., Mohsin S., Taylor D., Parkesh R., Gunnlaugsson T., O'Brien F.J., Giehl M. and Gowin W. 2003. Detecting microdamage in bone. *J Anat* **203**(2): 161-72.
- Legeros R.Z. 1981. Apatites in biological systems. *Prog Crystal Growth Charact* **4**: 1-45.
- Lehenkari P.P., Kellinsalmi M., Napankangas J.P., Ylitalo K.V., Monkkonen J., Rogers M.J., Azhayevev A., Vaananen H.K. and Hassinen I.E. 2002. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* **61**(5): 1255-62.
- Lereim P., Goldie I. and Dahlberg E. 1974. Hardness of the subchondral bone of the tibial condyles in the normal state and in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Acta Orthop Scand* **45**(4): 614-27.
- Lespessailles E., Jullien A., Eynard E., Harba R., Jacquet G., Ildefonse J.P., Ohley W. and Benhamou C.L. 1998. Biomechanical properties of human os calcanei: relationships with bone density and fractal evaluation of bone microarchitecture. *J Biomech* **31**(9): 817-24.
- Leu C.T., Luegmayer E., Freedman L.P., Rodan G.A. and Reszka A.A. 2006. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone* **38**(5): 628-36.
- Lewiecki E.M., Keaveny T.M., Kopperdahl D.L., Genant H.K., Engelke K., Fuerst T., Kivitz A., Davies R.Y. and Fitzpatrick L.A. 2009. Once-monthly oral ibandronate improves biomechanical determinants of bone strength in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(1): 171-80.
- Lewis G. and Nyman J.S. 2008. The use of nanoindentation for characterizing the properties of mineralized hard tissues: state-of-the art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **87**(1): 286-301.
- Li Z.Y., Lam W.M., Yang C., Xu B., Ni G.X., Abbah S.A., Cheung K.M., Luk K.D. and Lu W.W. 2007. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials* **28**(7): 1452-60.
- Liberman U.A., Weiss S.R., Broll J., Minne H.W., Quan H., Bell N.H., Rodriguez-Portales J., Downs R.W., Jr., Dequeker J. and Favus M. 1995. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The

- Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med* **333**(22): 1437-43.
- Libouban H. 2008. Le remodelage osseux. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 3-8.
- Lin J.H. 1996. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* **18**(2): 75-85.
- Lin J.H., Chen I.W. and Duggan D.E. 1992. Effects of dose, sex, and age on the disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in rats. *Drug Metab Dispos* **20**(4): 473-8.
- Lips P., Courpron P. and Meunier P.J. 1978. Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age. *Calcif Tissue Res* **26**(1): 13-7.
- Lochmuller E.M., Groll O., Kuhn V. and Eckstein F. 2002. Mechanical strength of the proximal femur as predicted from geometric and densitometric bone properties at the lower limb versus the distal radius. *Bone* **30**(1): 207-16.
- Luckman S.P., Coxon F.P., Ebetino F.H., Russell R.G. and Rogers M.J. 1998. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* **13**(11): 1668-78.
- Majumdar S., Kothari M., Augat P., Newitt D.C., Link T.M., Lin J.C., Lang T., Lu Y. and Genant H.K. 1998. High-resolution magnetic resonance imaging: three-dimensional trabecular bone architecture and biomechanical properties. *Bone* **22**(5): 445-54.
- Malaval L. 2008. Matrice osseuse. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 30-43.
- Malone J.D., Teitelbaum S.L., Griffin G.L., Senior R.M. and Kahn A.J. 1982. Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* **92**(1): 227-30.
- Manolagas S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**(2): 115-37.
- Marcelli C. 2008. Les déterminants de la croissance osseuse. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 154-161.
- Marie P.J., Felsenberg D. and Brandi M.L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*.
- Marie P.J., Garba M.T., Hott M. and Miravet L. 1985. Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. *Miner Electrolyte Metab* **11**(1): 5-13.

- Marieb E.N. 1999. Le tissu osseux et les os. Anatomie et physiologie humaine. E. N. Marieb. Paris, De Boeck Université: 167-87.
- Marotti G. 1993. A new theory of bone lamellation. *Calcif Tissue Int* **53 Suppl 1**: S47-55; discussion S56.
- Marotti G., Favia A. and Zallone A.Z. 1972. Quantitative analysis on the rate of secondary bone mineralization. *Calcif Tissue Res* **10(1)**: 67-81.
- Martin R.B., Burr D. and Sharkey N.A. 1998. Analysis of bone remodeling. Skeletal tissue mechanics. R. B. Martin, D. Burr et N. A. Sharkey. New York, Springer-Verlag.
- Mashiba T., Hirano T., Turner C.H., Forwood M.R., Johnston C.C. and Burr D.B. 2000. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res* **15(4)**: 613-20.
- Mashiba T., Hui S., Turner C.H., Mori S., Johnston C.C. and Burr D.B. 2005. Bone remodeling at the iliac crest can predict the changes in remodeling dynamics, microdamage accumulation, and mechanical properties in the lumbar vertebrae of dogs. *Calcif Tissue Int* **77(3)**: 180-5.
- Mashiba T., Turner C.H., Hirano T., Forwood M.R., Johnston C.C. and Burr D.B. 2001. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* **28(5)**: 524-31.
- McCalden R.W., McGeough J.A., Barker M.B. and Court-Brown C.M. 1993. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am* **75(8)**: 1193-205.
- McClung M.R., Geusens P., Miller P.D., Zippel H., Bensen W.G., Roux C., Adami S., Fogelman I., Diamond T., Eastell R., Meunier P.J. and Reginster J.Y. 2001. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med* **344(5)**: 333-40.
- McCutchen C.W. 1975. Do mineral crystals stiffen bone by straitjacketing its collagen? *J Theor Biol* **51(1)**: 51-8.
- McHugh K.P., Hodivala-Dilke K., Zheng M.H., Namba N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F.P., Hynes R.O. and Teitelbaum S.L. 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* **105(4)**: 433-40.
- McTaggart S.J. 2006. Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* **63(3)**: 255-67.
- Melton L.J., 3rd 2000. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. *J Bone Miner Res* **15(12)**: 2309-14.
- Melton L.J., 3rd, Riggs B.L., Keaveny T.M., Achenbach S.J., Hoffmann P.F., Camp J.J., Rouleau P.A., Bouxsein M.L., Amin S., Atkinson E.J., Robb R.A. and Khosla S. 2007. Structural determinants of vertebral fracture risk. *J Bone Miner Res* **22(12)**: 1885-92.

- Meunier P., Courpron P., Giroux J.M., Edouard C., Bernard J. and Vignon G. 1976. Bone histomorphometry as applied to research on osteoporosis and to the diagnosis of "hyperosteoidosis states". *Calcif Tissue Res* **21 Suppl**: 354-60.
- Meunier P.J. and Boivin G. 1997. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone* **21**(5): 373-7.
- Meunier P.J., Roux C., Ortolani S., Diaz-Curiel M., Compston J., Marquis P., Cormier C., Isaia G., Badurski J., Wark J.D., Collette J. and Reginster J.Y. 2009. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* **20**(10): 1663-73.
- Meunier P.J., Roux C., Seeman E., Ortolani S., Badurski J.E., Spector T.D., Cannata J., Balogh A., Lemmel E.M., Pors-Nielsen S., Rizzoli R., Genant H.K. and Reginster J.Y. 2004. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* **350**(5): 459-68.
- Milgrom C., Finestone A., Novack V., Pereg D., Goldich Y., Kreiss Y., Zimlichman E., Kaufman S., Liebergall M. and Burr D. 2004. The effect of prophylactic treatment with risedronate on stress fracture incidence among infantry recruits. *Bone* **35**(2): 418-24.
- Miller P.D., Epstein S., Sedarati F. and Reginster J.Y. 2008. Once-monthly oral ibandronate compared with weekly oral alendronate in postmenopausal osteoporosis: results from the head-to-head MOTION study. *Curr Med Res Opin* **24**(1): 207-13.
- Miller P.D., McClung M.R., Macovei L., Stakkestad J.A., Luckey M., Bonvoisin B., Reginster J.Y., Recker R.R., Hughes C., Lewiecki E.M., Felsenberg D., Delmas P.D., Kendler D.L., Bolognese M.A., Mairon N. and Cooper C. 2005. Monthly oral ibandronate therapy in postmenopausal osteoporosis: 1-year results from the MOBILE study. *J Bone Miner Res* **20**(8): 1315-22.
- Misof K., Landis W.J., Klaushofer K. and Fratzl P. 1997. Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. *J Clin Invest* **100**(1): 40-5.
- Mitchell D.Y., Barr W.H., Eusebio R.A., Stevens K.A., Duke F.P., Russell D.A., Nesbitt J.D., Powell J.H. and Thompson G.A. 2001. Risedronate pharmacokinetics and intra- and inter-subject variability upon single-dose intravenous and oral administration. *Pharm Res* **18**(2): 166-70.
- Mittra E., Akella S. and Qin Y.X. 2006. The effects of embedding material, loading rate and magnitude, and penetration depth in nanoindentation of trabecular bone. *J Biomed Mater Res A* **79**(1): 86-93.
- Monier-Faugere M.C., Friedler R.M., Bauss F. and Malluche H.H. 1993. A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs. *J Bone Miner Res* **8**(11): 1345-55.

- Monier-Faugere M.C., Geng Z., Paschalis E.P., Qi Q., Arnala I., Bauss F., Boskey A.L. and Malluche H.H. 1999. Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties. *J Bone Miner Res* **14**(10): 1768-78.
- Monkkonen H., Auriola S., Lehenkari P., Kellinsalmi M., Hassinen I.E., Vepsäläinen J. and Monkkonen J. 2006. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* **147**(4): 437-45.
- Morgan E.F., Bayraktar H.H., Yeh O.C., Majumdar S., Burghardt A. and Keaveny T.M. 2004. Contribution of inter-site variations in architecture to trabecular bone apparent yield strains. *J Biomech* **37**(9): 1413-20.
- Mori S. and Burr D.B. 1993. Increased intracortical remodeling following fatigue damage. *Bone* **14**(2): 103-9.
- Muhlbauer R.C., Bauss F., Schenk R., Janner M., Bosies E., Strein K. and Fleisch H. 1991. BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* **6**(9): 1003-11.
- Mulder L., Koolstra J.H., den Toonder J.M. and van Eijden T.M. 2008. Relationship between tissue stiffness and degree of mineralization of developing trabecular bone. *J Biomed Mater Res A* **84**(2): 508-15.
- Muller R., Hannan M., Smith S.Y. and Bauss F. 2004. Intermittent ibandronate preserves bone quality and bone strength in the lumbar spine after 16 months of treatment in the ovariectomized cynomolgus monkey. *J Bone Miner Res* **19**(11): 1787-96.
- Murphy M.G., Cerchio K., Stoch S.A., Gottesdiener K., Wu M. and Recker R. 2005. Effect of L-000845704, an alphaVbeta3 integrin antagonist, on markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2022-8.
- Myllyharju J. and Kivirikko K.I. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**(1): 33-43.
- Nancollas G.H., Tang R., Phipps R.J., Henneman Z., Gulde S., Wu W., Mangood A., Russell R.G. and Ebetino F.H. 2006. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* **38**(5): 617-27.
- Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., Hodsmann A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O. and Mitlak B.H. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **344**(19): 1434-41.
- NIH 2001. Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* **285**: 785-95.

- Nishi Y., Atley L., Eyre D.E., Edelson J.G., Superti-Furga A., Yasuda T., Desnick R.J. and Gelb B.D. 1999. Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation. *J Bone Miner Res* **14**(11): 1902-8.
- Noble B.S. and Reeve J. 2000. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* **159**(1-2): 7-13.
- Nuzzo S., Peyrin F., Cloetens P., Baruchel J. and Boivin G. 2002. Quantification of the degree of mineralization of bone in three dimensions using synchrotron radiation microtomography. *Med Phys* **29**(11): 2672-81.
- Oden A., Dawson A., Dere W., Johnell O., Jonsson B. and Kanis J.A. 1998. Lifetime risk of hip fractures is underestimated. *Osteoporos Int* **8**(6): 599-603.
- Odvina C.V., Levy S., Rao S., Zerwekh J.E. and Rao D.S. 2010. Unusual mid-shaft fractures during long-term bisphosphonate therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **72**(2): 161-8.
- Odvina C.V., Zerwekh J.E., Rao D.S., Maalouf N., Gottschalk F.A. and Pak C.Y. 2005. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1294-301.
- Ogata Y. 2008. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res* **43**(2): 127-35.
- Oliver W.C. and Pharr G.M. 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus. *J Mater Res* **7**(6): 1564-83.
- Oliver W.C. and Pharr G.M. 2004. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: advances in understanding and refinements to methodology. *J Mater Res* **15**(5): 1260-75.
- Orcel P. 2008. Physiopathologie du vieillissement osseux. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 172-8.
- Ott S.M., Oleksik A., Lu Y., Harper K. and Lips P. 2002. Bone histomorphometric and biochemical marker results of a 2-year placebo-controlled trial of raloxifene in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **17**(2): 341-8.
- Ou-Yang H., Paschalis E.P., Mayo W.E., Boskey A.L. and Mendelsohn R. 2001. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃(2-). *J Bone Miner Res* **16**(5): 893-900.
- Oyen M.L. 2006. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *J Biomech* **39**(14): 2699-702.
- Oyen M.L. and Cook R.F. 2003. Load-displacement behavior during sharp indentation of viscous-elastic-plastic materials. *J Mater Res* **18**: 139-50.
- Oyen M.L. and Cook R.F. 2009. A practical guide for analysis of nanoindentation data. *J Mech Behav Biomed Mater* **2**(4): 396-407.

- Oyen M.L. and Ko C.C. 2007. Examination of local variations in viscous, elastic, and plastic indentation responses in healing bone. *J Mater Sci Mater Med* **18**(4): 623-8.
- Padhi D., Stouch B., Jang G., Fang L., Darling M., Glise H., Robinson M., Harris S. and Posvar E. 2007. Anti-sclerostin antibody increases markers of bone formation in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* **22** (Suppl. 1): S37.
- Parfitt A.M. 1983. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. R. Recker. Boca Raton, CRC Press: 143-224.
- Parfitt A.M. 1994a. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* **55**(3): 273-86.
- Parfitt A.M. 1994b. The two faces of growth: benefits and risks to bone integrity. *Osteoporos Int* **4**(6): 382-98.
- Parfitt A.M. 1996. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodelling. Implications for the understanding of osteoporosis. *Osteoporosis*. R. Marcus, D. Feldman et J. Kelsey. New York, Academic press: 315-329.
- Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., Kanis J.A., Malluche H., Meunier P.J., Ott S.M. and Recker R.R. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **2**(6): 595-610.
- Paschalis E.P., DiCarlo E., Betts F., Sherman P., Mendelsohn R. and Boskey A.L. 1996. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcif Tissue Int* **59**(6): 480-7.
- Paschalis E.P., Glass E.V., Donley D.W. and Eriksen E.F. 2005. Bone mineral and collagen quality in iliac crest biopsies of patients given teriparatide: new results from the fracture prevention trial. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(8): 4644-9.
- Paschalis E.P., Verdels K., Doty S.B., Boskey A.L., Mendelsohn R. and Yamauchi M. 2001. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res* **16**(10): 1821-8.
- Penel G., Leroy G., Rey C. and Bres E. 1998. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int* **63**(6): 475-81.
- Pettifor J.M. 2003. Nutritional and drug-induced rickets and osteomalacia. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* M. J. Favus. Washington, DC, American society for bone and mineral research: 399-407.
- Plotkin L.I. and Bellido T. 2001. Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43. *Cell Commun Adhes* **8**(4-6): 377-82.

- Plotkin L.I., Lezcano V., Thostenson J., Weinstein R.S., Manolagas S.C. and Bellido T. 2008. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res* **23**(11): 1712-21.
- Plotkin L.I., Mathov I., Aguirre J.I., Parfitt A.M., Manolagas S.C. and Bellido T. 2005. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(3): C633-43.
- Plotkin L.I., Weinstein R.S., Parfitt A.M., Roberson P.K., Manolagas S.C. and Bellido T. 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* **104**(10): 1363-74.
- Posner A.S. 1985. The structure of bone apatite surfaces. *J Biomed Mater Res* **19**(3): 241-50.
- Prockop D.J. 1992. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mutations in collagen genes as a cause of connective-tissue diseases. *N Engl J Med* **326**(8): 540-6.
- Qiu S., Rao D.S., Fyhrie D.P., Palnitkar S. and Parfitt A.M. 2005. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. *Bone* **37**(1): 10-5.
- Rauch F. and Glorieux F.H. 2004. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* **363**(9418): 1377-85.
- Rauch F. and Glorieux F.H. 2005. Bisphosphonate treatment in osteogenesis imperfecta: which drug, for whom, for how long? *Ann Med* **37**(4): 295-302.
- Rauch F. and Schoenau E. 2001. Changes in bone density during childhood and adolescence: an approach based on bone's biological organization. *J Bone Miner Res* **16**(4): 597-604.
- Ravn P., Clemmesen B., Riis B.J. and Christiansen C. 1996. The effect on bone mass and bone markers of different doses of ibandronate: a new bisphosphonate for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: a 1-year, randomized, double-blind, placebo-controlled dose-finding study. *Bone* **19**(5): 527-33.
- Recker R., Lappe J., Davies K. and Heaney R. 2000. Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study. *J Bone Miner Res* **15**(10): 1965-73.
- Recker R., Lappe J., Davies K. and Heaney R. 2004a. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *J Bone Miner Res* **19**(10): 1628-1633.
- Recker R.R. and Saville P.D. 1973. Intestinal absorption of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) using a deconvolution technique. *Toxicol Appl Pharmacol* **24**(4): 580-9.
- Recker R.R., Ste-Marie L.G., Langdahl B., Czerwinski E., Bonvoisin B., Masanauskaite D., Rowell L. and Felsenberg D. 2010. Effects of intermittent intravenous ibandronate injections on bone quality and micro-architecture in women with postmenopausal osteoporosis: the DIVA study. *Bone* **46**(3): 660-5.

- Recker R.R., Ste-Marie L.G., Langdahl B., Masanouskaite D., Ethgen D. and Delmas P.D. 2009. Oral ibandronate preserves trabecular microarchitecture: micro-computed tomography findings from the oral iBandronate Osteoporosis vertebral fracture trial in North America and Europe study. *J Clin Densitom* **12**(1): 71-6.
- Recker R.R., Weinstein R.S., Chesnut C.H., 3rd, Schimmer R.C., Mahoney P., Hughes C., Bonvoisin B. and Meunier P.J. 2004b. Histomorphometric evaluation of daily and intermittent oral ibandronate in women with postmenopausal osteoporosis: results from the BONE study. *Osteoporos Int* **15**(3): 231-7.
- Reginster J., Minne H.W., Sorensen O.H., Hooper M., Roux C., Brandi M.L., Lund B., Ethgen D., Pack S., Roumagnac I. and Eastell R. 2000. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *Osteoporos Int* **11**(1): 83-91.
- Reginster J. and Neuprez A. 2010. Strontium ranelate: a look back at its use for osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* **11**(17): 2915-27.
- Reginster J.Y., Adami S., Lakatos P., Greenwald M., Stepan J.J., Silverman S.L., Christiansen C., Rowell L., Mairon N., Bonvoisin B., Drezner M.K., Emkey R., Felsenberg D., Cooper C., Delmas P.D. and Miller P.D. 2006a. Efficacy and tolerability of once-monthly oral ibandronate in postmenopausal osteoporosis: 2 year results from the MOBILE study. *Ann Rheum Dis* **65**(5): 654-61.
- Reginster J.Y., Bruyere O., Sawicki A., Roces-Varela A., Fardellone P., Roberts A. and Devogelaer J.P. 2009. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone* **45**(6): 1059-64.
- Reginster J.Y., Felsenberg D., Cooper C., Stakkestad J.A., Miller P.D., Kendler D.L., Adami S., McClung M.R., Bolognese M.A., Civitelli R., Dumont E., Bonvoisin B., Recker R.R. and Delmas P.D. 2006b. A new concept for bisphosphonate therapy: a rationale for the development of monthly oral dosing of ibandronate. *Osteoporos Int* **17**(2): 159-66.
- Reginster J.Y., Seeman E., De Vernejoul M.C., Adami S., Compston J., Phenekos C., Devogelaer J.P., Curiel M.D., Sawicki A., Goemaere S., Sorensen O.H., Felsenberg D. and Meunier P.J. 2005. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(5): 2816-22.
- Reginster J.Y., Wiese C., Wilson K. and Schimmer R.C. 2003. Oral monthly ibandronate decreases bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: results from the monthly oral pilot study (MOPS). *Osteoporos Int* **14**(Suppl 7): S5.
- Reid I.R., Miller P., Lyles K., Fraser W., Brown J.P., Saidi Y., Mesenbrink P., Su G., Pak J., Zelenakas K., Luchi M., Richardson P. and Hosking D. 2005. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. *N Engl J Med* **353**(9): 898-908.

- Reid S.A. and Boyde A. 1987. Changes in the mineral density distribution in human bone with age: image analysis using backscattered electrons in the SEM. *J Bone Miner Res* **2**(1): 13-22.
- Reilly D.T. and Burstein A.H. 1975. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech* **8**(6): 393-405.
- Reinholz G.G., Getz B., Pederson L., Sanders E.S., Subramaniam M., Ingle J.N. and Spelsberg T.C. 2000. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* **60**(21): 6001-7.
- Renders G.A., Mulder L., Langenbach G.E., van Ruijven L.J. and van Eijden T.M. 2008. Biomechanical effect of mineral heterogeneity in trabecular bone. *J Biomech* **41**(13): 2793-8.
- Rey C., Collins B., Goehl T., Dickson I.R. and Glimcher M.J. 1989. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int* **45**(3): 157-64.
- Rey C., Combes C., Drouet C. and Glimcher M.J. 2009. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int* **20**(6): 1013-21.
- Rey C., Hina A., Tofighi A. and Glimcher M.J. 1995. Maturation of poorly crystalline apatites: chemical and structural aspects in vivo and in vitro. *Cells and Mater* **5**: 345-56.
- Rey C., Renugopalakrishnan V., Shimizu M., Collins B. and Glimcher M.J. 1991a. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃(²⁻) ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcif Tissue Int* **49**(4): 259-68.
- Rey C., Shimizu M., Collins B. and Glimcher M.J. 1990. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the ν_4 PO₄ domain. *Calcif Tissue Int* **46**(6): 384-94.
- Rey C., Shimizu M., Collins B. and Glimcher M.J. 1991b. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the ν_3 PO₄ domain. *Calcif Tissue Int* **49**(6): 383-8.
- Rho J.Y., Kuhn-Spearing L. and Zioupos P. 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* **20**(2): 92-102.
- Rho J.Y. and Pharr G.M. 1999. Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation. *J Mater Sci Mater Med* **10**(8): 485-8.
- Rho J.Y., Tsui T.Y. and Pharr G.M. 1997. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* **18**(20): 1325-30.

- Rho J.Y., Zioupos P., Currey J.D. and Pharr G.M. 1999. Variations in the individual thick lamellar properties within osteons by nanoindentation. *Bone* **25**(3): 295-300.
- Riches P.E., Everitt N.M., Heggie A.R. and McNally D.S. 1997. Microhardness anisotropy of lamellar bone. *J Biomech* **30**(10): 1059-61.
- Riis B.J., Ise J., von Stein T., Bagger Y. and Christiansen C. 2001. Ibandronate: a comparison of oral daily dosing versus intermittent dosing in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **16**(10): 1871-8.
- Ritchie R.O. 2010. How does human bone resist fracture? *Ann N Y Acad Sci* **1192**(1): 72-80.
- Roelofs A.J., Coxon F.P., Ebetino F.H., Lundy M.W., Henneman Z.J., Nancollas G.H., Sun S., Blazewska K.M., Bala J.L., Kashemirov B.A., Khalid A.B., McKenna C.E. and Rogers M.J. 2010. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* **25**(3): 606-16.
- Rogers M.J., Brown R.J., Hodkin V., Blackburn G.M., Russell R.G. and Watts D.J. 1996. Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **224**(3): 863-9.
- Rogers M.J., Gordon S., Benford H.L., Coxon F.P., Luckman S.P., Monkkonen J. and Frith J.C. 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* **88**(12 Suppl): 2961-78.
- Roschger P., Fratzl P., Eschberger J. and Klaushofer K. 1998. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone* **23**(4): 319-26.
- Roschger P., Lombardi A., Misof B.M., Maier G., Fratzl-Zelman N., Fratzl P. and Klaushofer K. 2010. Mineralization density distribution of postmenopausal osteoporotic bone is restored to normal after long-term alendronate treatment: qBEI and sSAXS data from the fracture intervention trial long-term extension (FLEX). *J Bone Miner Res* **25**(1): 48-55.
- Roschger P., Plenk H., Jr., Klaushofer K. and Eschberger J. 1995. A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning Microsc* **9**(1): 75-86; discussion 86-8.
- Roschger P., Rinnerthaler S., Yates J., Rodan G.A., Fratzl P. and Klaushofer K. 2001. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone* **29**(2): 185-91.
- Roseberry H.H., Hastings A.B. and Morse J.K. 1931. X-Ray analysis of bone mineral: Is the ACP Theory valid? *J Biol Chem* **90**: 395-407.
- Rosen C.J., Hochberg M.C., Bonnick S.L., McClung M., Miller P., Broy S., Kagan R., Chen E., Petruschke R.A., Thompson D.E. and de Papp A.E. 2005. Treatment with once-weekly alendronate 70 mg compared with once-weekly risedronate 35 mg in women with

- postmenopausal osteoporosis: a randomized double-blind study. *J Bone Miner Res* **20**(1): 141-51.
- Ross F.P. and Teitelbaum S.L. 2005. α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* **208**: 88-105.
- Roux J.P., Wegrzyn J., Arlot M.E., Guyen O., Delmas P.D., Chapurlat R. and Bouxsein M.L. 2010. Contribution of trabecular and cortical components to biomechanical behavior of human vertebrae: an ex vivo study. *J Bone Miner Res* **25**(2): 356-61.
- Roux S. 2010. New treatment targets in osteoporosis. *Joint Bone Spine* **77**(3): 222-8.
- Rupin F., Saïed A., Dalamas D., Peyrin F., Hauptert S., Raum K., Boivin G. and Laugier P. 2009. Assessment of microelastic properties of bone using scanning acoustic microscopy: a face-to-face comparison with nanoindentation. *Jpn J Appl Phys* **48**: 1-6.
- Russell R.G. 2006. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 367-401.
- Russell R.G., Muhlbauer R.C., Bisaz S., Williams D.A. and Fleisch H. 1970. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* **6**(3): 183-96.
- Russell R.G. and Rogers M.J. 1999. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* **25**(1): 97-106.
- Russell R.G., Watts N.B., Ebetino F.H. and Rogers M.J. 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* **19**(6): 733-59.
- Russell R.G., Xia Z., Dunford J.E., Oppermann U., Kwaasi A., Hulley P.A., Kavanagh K.L., Triffitt J.T., Lundy M.W., Phipps R.J., Barnett B.L., Coxon F.P., Rogers M.J., Watts N.B. and Ebetino F.H. 2007. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci* **1117**: 209-57.
- Sakai M. 1999. The Meyer Hardness: A measure for plasticity ? *J. Mater. Res* **14**(9): 3630-9.
- Sambrook P., Cranney A. and Adachi J.D. 2010. Risk reduction of non-vertebral fractures with intravenous ibandronate: post-hoc analysis from DIVA. *Curr Med Res Opin* **26**(3): 599-604.
- Sarkar S., Mitlak B.H., Wong M., Stock J.L., Black D.M. and Harper K.D. 2002. Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Miner Res* **17**(1): 1-10.
- Sato M., Grasser W., Endo N., Akins R., Simmons H., Thompson D.D., Golub E. and Rodan G.A. 1991. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* **88**(6): 2095-105.

- Sato M., Grese T.A., Dodge J.A., Bryant H.U. and Turner C.H. 1999. Emerging therapies for the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Med Chem* **42**(1): 1-24.
- Sato Y., Sakai H., Kobayashi Y., Shibasaki Y. and Sasaki T. 2000. Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H(+)-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Rec* **260**(1): 72-80.
- Schaffler M.B. 2003. Role of bone turnover in microdamage. *Osteoporos Int* **14 Suppl 5**: S73-7; discussion S77-80.
- Schaffler M.B., Burr D.B. and Frederickson R.G. 1987. Morphology of the osteonal cement line in human bone. *Anat Rec* **217**(3): 223-8.
- Schimmer R.C. and Bauss F. 2003. Effect of daily and intermittent use of ibandronate on bone mass and bone turnover in postmenopausal osteoporosis: a review of three phase II studies. *Clin Ther* **25**(1): 19-34.
- Schwartz A.V., Bauer D.C., Cummings S.R., Cauley J.A., Ensrud K.E., Palermo L., Wallace R.B., Hochberg M.C., Feldstein A.C., Lombardi A. and Black D.M. 2010. Efficacy of continued alendronate for fractures in women with and without prevalent vertebral fracture: the FLEX trial. *J Bone Miner Res* **25**(5): 976-82.
- Sebba A.I., Emkey R.D., Kohles J.D. and Sambrook P.N. 2009. Ibandronate dose response is associated with increases in bone mineral density and reductions in clinical fractures: results of a meta-analysis. *Bone* **44**(3): 423-7.
- Sedghizadeh P.P., Kumar S.K., Gorur A., Schaudinn C., Shuler C.F. and Costerton J.W. 2008. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* **66**(4): 767-75.
- Seeman E. 2001. Clinical review 137: Sexual dimorphism in skeletal size, density, and strength. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(10): 4576-84.
- Seeman E. 2009. To stop or not to stop, that is the question. *Osteoporos Int* **20**(2): 187-95.
- Seeman E. and Delmas P.D. 2006. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* **354**(21): 2250-61.
- Shahnazari M., Yao W., Dai W., Wang B., Ionova-Martin S.S., Ritchie R.O., Heeren D., Burghardt A.J., Nicolella D.P., Kimiecik M.G. and Lane N.E. 2009. Higher doses of bisphosphonates further improve bone mass, architecture, and strength but not the tissue material properties in aged rats. *Bone*.
- Shane E., Burr D., Ebeling P.R., Abrahamsen B., Adler R.A., Brown T.D., Cheung A.M., Cosman F., Curtis J.R., Dell R., Dempster D., Einhorn T.A., Genant H.K., Geusens P., Klaushofer K., Koval K., Lane J.M., McKiernan F., McKinney R., Ng A., Nieves J., O'Keefe R., Papapoulos S., Sen H.T., van der Meulen M.C., Weinstein R.S. and Whyte M. 2010. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* **25**(11): 2267-94.

- Shemesh A. 1990. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim Cosmochim Acta* **54**: 2433-38.
- Silva M.J. and Gibson L.J. 1997. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. *Bone* **21**(2): 191-9.
- Silver I.A., Murrills R.J. and Etherington D.J. 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* **175**(2): 266-76.
- Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Luthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R. and Boyle W.J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**(2): 309-19.
- Sirohi B. and Powles R. 2004. Multiple myeloma. *Lancet* **363**(9412): 875-87.
- Skedros J.G., Holmes J.L., Vajda E.G. and Bloebaum R.D. 2005. Cement lines of secondary osteons in human bone are not mineral-deficient: new data in a historical perspective. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **286**(1): 781-803.
- Skedros J.G., Sorenson S.M., Takano Y. and Turner C.H. 2006. Dissociation of mineral and collagen orientations may differentially adapt compact bone for regional loading environments: results from acoustic velocity measurements in deer calcanei. *Bone* **39**(1): 143-51.
- Smith-Mungo L.I. and Kagan H.M. 1998. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* **16**(7): 387-98.
- Smith L.J., Schirer J.P. and Fazzalari N.L. 2010. The role of mineral content in determining the micromechanical properties of discrete trabecular bone remodeling packets. *J Biomech* **epub ahead of print**.
- Smith S.Y., Recker R.R., Hannan M., Muller R. and Bauss F. 2003. Intermittent intravenous administration of the bisphosphonate ibandronate prevents bone loss and maintains bone strength and quality in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* **32**(1): 45-55.
- Somford M.P., Draijer F.W., Thomassen B.J., Chavassieux P.M., Boivin G. and Papapoulos S.E. 2009. Bilateral fractures of the femur diaphysis in a patient with rheumatoid arthritis on long-term treatment with alendronate: clues to the mechanism of increased bone fragility. *J Bone Miner Res* **24**(10): 1736-40.
- Stea S., Visentin M., Savarino L., Ciapetti G., Donati M.E., Moroni A., Caja V. and Pizzoferrato A. 1995. Microhardness of bone at the interface with ceramic-coated metal implants. *J Biomed Mater Res* **29**(6): 695-9.

- Stepan J.J., Burr D.B., Pavo I., Sipos A., Michalska D., Li J., Fahrleitner-Pammer A., Petto H., Westmore M., Michalsky D., Sato M. and Dobnig H. 2007. Low bone mineral density is associated with bone microdamage accumulation in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* **41**(3): 378-85.
- Sutton-Smith P., Beard H. and Fazzalari N. 2008. Quantitative backscattered electron imaging of bone in proximal femur fragility fracture and medical illness. *J Microsc* **229**(Pt 1): 60-6.
- Svensson R.B., Hassenkam T., Hansen P. and Peter Magnusson S. 2010. Viscoelastic behavior of discrete human collagen fibrils. *J Mech Behav Biomed Mater* **3**(1): 112-5.
- Szulc P., Garnero P., Claustrat B., Marchand F., Duboeuf F. and Delmas P.D. 2002. Increased bone resorption in moderate smokers with low body weight: the Minos study. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(2): 666-74.
- Tai K., Qi H.J. and Ortiz C. 2005. Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. *J Mater Sci Mater Med* **16**(10): 947-59.
- Takami M., Suda K., Sahara T., Itoh K., Nagai K., Sasaki T., Udagawa N. and Takahashi N. 2003. Involvement of vacuolar H⁺ -ATPase in incorporation of risedronate into osteoclasts. *Bone* **32**(4): 341-9.
- Tang S.Y., Allen M.R., Phipps R., Burr D.B. and Vashishth D. 2009. Changes in non-enzymatic glycation and its association with altered mechanical properties following 1-year treatment with risedronate or alendronate. *Osteoporos Int* **20**(6): 887-94.
- Tang S.Y., Zeenath U. and Vashishth D. 2007. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone* **40**(4): 1144-51.
- Teitelbaum S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**(5484): 1504-8.
- Termine J.D. and Posner A.S. 1966. Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates. *Nature* **211**(5046): 268-70.
- Thiebaud D., Burckhardt P., Kriegbaum H., Huss H., Mulder H., Juttman J.R. and Schoter K.H. 1997. Three monthly intravenous injections of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* **103**(4): 298-307.
- Thompson J.B., Kindt J.H., Drake B., Hansma H.G., Morse D.E. and Hansma P.K. 2001. Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature* **414**(6865): 773-6.
- Thompson K. and Rogers M.J. 2004. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* **19**(2): 278-88.
- Thompson K., Rogers M.J., Coxon F.P. and Crockett J.C. 2006. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* **69**(5): 1624-32.

- Tortora G.J. and Grabowski S.R. 2000. Les principes du soutien et du mouvement. Principes d'anatomie et de physiologie. G. J. Tortora et S. R. Grabowski. Bruxelles, De Boeck université: 174-5.
- Traub W., Arad T., Vetter U. and Weiner S. 1994. Ultrastructural studies of bones from patients with osteogenesis imperfecta. *Matrix Biol* **14**(4): 337-45.
- Trémollières F. and Ribot C. 2008. Ostéoporoses secondaires de la femme. Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. M. C. De Vernejoul et P. Marie. Paris, Flammarion Médecine-Sciences: 227-38.
- Turner C.H. 1995. Is yield strain in cancellous bone isotropic? *J Biomech* **28**(6): 763, 765.
- Turner C.H. 2002. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* **13**(2): 97-104.
- Turner C.H. and Burr D.B. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* **14**(4): 595-608.
- Turner C.H., Chandran A. and Pidaparti R.M. 1995. The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications. *Bone* **17**(1): 85-9.
- Turner C.H., Rho J., Takano Y., Tsui T.Y. and Pharr G.M. 1999. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J Biomech* **32**(4): 437-41.
- Udagawa N., Takahashi N., Akatsu T., Tanaka H., Sasaki T., Nishihara T., Koga T., Martin T.J. and Suda T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7260-4.
- Van Beek E., Lowik C., Que I. and Papapoulos S. 1996. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Miner Res* **11**(10): 1492-7.
- van der Linden J.C., Birkenhager-Frenkel D.H., Verhaar J.A. and Weinans H. 2001. Trabecular bone's mechanical properties are affected by its non-uniform mineral distribution. *J Biomech* **34**(12): 1573-80.
- Van der Meulen M.C., Carter D.R. and Beaupré G.S. 2001. Skeletal Development: Mechanical consequences of growth, Aging, and disease. Osteoporosis. R. Marcus, D. Feldman et J. Kelsey. San Diego, Academic Press: 471-488.
- Van der Rest M. and Garrone R. 1991. Collagen family of proteins. *Faseb J* **5**(13): 2814-23.
- van der Rijt J.A., van der Werf K.O., Bennink M.L., Dijkstra P.J. and Feijen J. 2006. Micromechanical testing of individual collagen fibrils. *Macromol Biosci* **6**(9): 697-702.

- Vashishth D., Gibson G.J., Khoury J.I., Schaffler M.B., Kimura J. and Fyhrie D.P. 2001. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone* **28**(2): 195-201.
- Vashishth D., Verborgt O., Divine G., Schaffler M.B. and Fyhrie D.P. 2000. Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone* **26**(4): 375-80.
- Verborgt O., Gibson G.J. and Schaffler M.B. 2000. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* **15**(1): 60-7.
- Vetter U., Pontz B., Zauner E., Brenner R.E. and Spranger J. 1992. Osteogenesis imperfecta: a clinical study of the first ten years of life. *Calcif Tissue Int* **50**(1): 36-41.
- Vico L., Zouch M., Amirouche A., Frere D., Laroche N., Koller B., Laib A., Thomas T. and Alexandre C. 2008. High-resolution pQCT analysis at the distal radius and tibia discriminates patients with recent wrist and femoral neck fractures. *J Bone Miner Res* **23**(11): 1741-50.
- Viguet-Carrin S., Garnero P. and Delmas P.D. 2006a. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* **17**(3): 319-36.
- Viguet-Carrin S., Roux J.P., Arlot M.E., Merabet Z., Leeming D.J., Byrjalsen I., Delmas P.D. and Buxsein M.L. 2006b. Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone* **39**(5): 1073-9.
- Visekruna M., Wilson D. and McKiernan F.E. 2008. Severely suppressed bone turnover and atypical skeletal fragility. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(8): 2948-52.
- Waldorff E.I., Goldstein S.A. and McCreadie B.R. 2007. Age-dependent microdamage removal following mechanically induced microdamage in trabecular bone in vivo. *Bone* **40**(2): 425-32.
- Wang X., Allen M.R., Burr D.B., Lavernia E.J., Jeremic B. and Fyhrie D.P. 2008a. Identification of material parameters based on Mohr-Coulomb failure criterion for bisphosphonate treated canine vertebral cancellous bone. *Bone* **43**(4): 775-80.
- Wang X., Li X., Bank R.A. and Agrawal C.M. 2002. Effects of collagen unwinding and cleavage on the mechanical integrity of the collagen network in bone. *Calcif Tissue Int* **71**(2): 186-92.
- Wang X., Shanbhag A.S., Rubash H.E. and Agrawal C.M. 1999. Short-term effects of bisphosphonates on the biomechanical properties of canine bone. *J Biomed Mater Res* **44**(4): 456-60.
- Wang X., Sudhaker Rao D., Ajdelsztajn L., Ciarelli T.E., Lavernia E.J. and Fyhrie D.P. 2008b. Human iliac crest cancellous bone elastic modulus and hardness differ with bone formation rate per bone surface but not by existence of prevalent vertebral fracture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **85**(1): 68-77.

- Weaver J.K. 1966. The microscopic hardness of bone. *J Bone Joint Surg Am* **48**(2): 273-88.
- Wegrzyn J., Roux J.P., Arlot M.E., Boutry S., Vilayphiou N., Guyen O., Delmas P.D., Chapurlat R. and Bouxsein M.L. 2010. Role of trabecular microarchitecture and its heterogeneity parameters in the mechanical behavior of ex-vivo human L3 vertebrae. *J Bone Miner Res*.
- Weiner S., Traub W. and Wagner H.D. 1999. Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol* **126**(3): 241-55.
- Weinstein R.S. 2000. True strength. *J Bone Miner Res* **15**(4): 621-5.
- WHO 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group. WHO technical report series **843**: 1-29.
- Whyte M.P. 2003. Sclerosing bone disorders. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism M. J. Favus. Washington, DC, American society for bone and mineral research: 449-466.
- Wolff J. 1892. Das gasetz der transformation der knochen. Berlin.
- Wu W., Gerard D.E. and Nancollas G.H. 1999. Nucleation at surfaces: the importance of interfacial energy. *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 14**: S355-8.
- Wu W. and Nancollas G.H. 1999. Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods. *Adv Colloid Interface Sci* **79**(2-3): 229-79.
- Wu Y., Bergot C., Jolivet E., Zhou L.Q., Laredo J.D. and Bousson V. 2009. Cortical bone mineralization differences between hip-fractured females and controls. A microradiographic study. *Bone* **45**(2): 207-12.
- Xu J., Rho J.Y., Mishra S.R. and Fan Z. 2003. Atomic force microscopy and nanoindentation characterization of human lamellar bone prepared by microtome sectioning and mechanical polishing technique. *J Biomed Mater Res A* **67**(3): 719-26.
- Yeni Y.N., Kim D.G., Dong X.N., Turner A.S., Les C.M. and Fyhrie D.P. 2006. Do sacrificial bonds affect the viscoelastic and fracture properties of bone? *Clin Orthop Relat Res* **443**: 101-8.
- Yeni Y.N. and Norman T.L. 2000. Fracture toughness of human femoral neck: effect of microstructure, composition, and age. *Bone* **26**(5): 499-504.
- Yerramshetty J.S. and Akkus O. 2008. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone* **42**(3): 476-82.
- Zebaze R.M., Ghasem-Zadeh A., Bohte A., Iuliano-Burns S., Mirams M., Price R.I., Mackie E.J. and Seeman E. 2010. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet* **375**(9727): 1729-36.

- Zhao L.J., Liu P.Y., Recker R. and Deng H.W. 2006. Correlation of transmenopausal bone mass in healthy white women: a long-term longitudinal study. *Osteoporos Int* **17**(10): 1501-5.
- Ziopoulos P., Currey J.D. and Casinos A. 2000. Exploring the effects of hypermineralisation in bone tissue by using an extreme biological example. *Connect Tissue Res* **41**(3): 229-48.
- Ziopoulos P., Currey J.D. and Hamer A.J. 1999. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biomed Mater Res* **45**(2): 108-16.
- Ziv V., Wagner H.D. and Weiner S. 1996. Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone* **18**(5): 417-28.
- Zysset P.K. 2009. Indentation of bone tissue: a short review. *Osteoporos Int* **20**(6): 1049-55.
- Zysset P.K., Guo X.E., Hoffler C.E., Moore K.E. and Goldstein S.A. 1999. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech* **32**(10): 1005-12.

- Annexes -

- Annexes -

1. Publications scientifiques

- 1.1. Articles
- 1.2. Communications orales
- 1.3. Communications affichées

1. Publications scientifiques (*issues directement de ce travail de thèse*)

1.1. Articles

[2011] **Y. Bala**, B. Depalle, T. Douillard, S. Meille, H. Follet, R. Chapurlat, J. Chevalier, G. Boivin. Bone tissue micromechanical properties are altered in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate, independently of mineralization. *Soumis*.

[2011] **Y. Bala**, B. Depalle, T. Douillard, S. Meille, P. Clément, H. Follet, J. Chevalier, G. Boivin. Respective roles of organic and mineral components of bone matrix in micromechanical behavior : an instrumented indentation study. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*: doi. 10.1016/j.jmbbm.2011.05.017. (*Exemplaire joint page 267*).

[2011] B. Mognetti, S. Marino, A. Barberis, A-S. Bravo Martin, **Y. Bala**, F. Di Carlo, G. Boivin, M. Portigliatti Barros. Experimental stimulation of bone healing with teriparatide : histomorphometric and microhardness analysis in a mouse model of closed fracture. *Calcified Tissue International*: *In press*.

[2011] **Y. Bala**, D. Farlay, R.D. Chapurlat, G. Boivin. Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate. *Soumis*.

[2010] H.C. Follet, S. Viguet-Carrin, B. Burt-Pichat, B. Dépalle, **Y. Bala**, E. Gynest, M. Arlot, G. Boivin, R.D. Chapurlat, P.D. Delmas, M.L. Bouxsein. Effects of pre-existing microdamage, collagen cross-links, secondary mineralization, age, bone volume fraction and architecture on compressive mechanical properties of elderly human vertebral trabecular bone. *Journal of orthopaedic research* 2011, 29(4): 481-8.

[2009] **Y. Bala**, D. Farlay, P.J. Meunier, P.D. Delmas, G. Boivin. Time Sequence of Secondary Mineralization and Microhardness in Cortical and Cancellous Bone from Ewes. *Bone* 2010, 46:1204-12.

[2009] A. Bentmann, N. Kawelke, D. Moss, H. Zentgraf, **Y. Bala**, J. Gasser, I. A. Nakchbandi. Circulating fibronectin affects bone matrix while osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *Journal of bone and mineral research* 2010, 25(4):706-15.

[2009] G. Boivin, D. Farlay, **Y. Bala**, A. Doublier, P.J. Meunier, P.D. Delmas. The mineralization of bone tissue. *Osteoporos. Int.* 2009, 20(6):1023-6.

[2008] G. Boivin, **Y. Bala**, A. Doublier, D. Farlay, L.G. Ste-Marie, P.J. Meunier, P.D. Delmas. Secondary mineralization and microhardness of bone tissue in control and osteoporotic humans. *Bone* 2008, 43:532-8.

[2008] S. Viguet-Carrin, D. Farlay, **Y. Bala**, F. Munoz, M.L. Bouxsein, P.D. Delmas. An *in vitro* model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties. *Bone* 2008, 42:139-49.

1.2. Communications orales

[2010] **Y. Bala**, S. Bare, G. Boivin, R. Recker. Bone Tissue Quality in the Years after Menopause: Micro-hardness is Decreased Independently of Changes in the Degree of Mineralization. *American Society for Bone and Mineral Research 32nd annual meeting*. Toronto, Canada, 15-19 October.

[2010] G.Boivin, A. Doublier, **Y. Bala**, A-S. Bravo Martin, D. Farlay. Fluoride, strontium and bone quality. *XIth International Congress on micro-nutriments and degenerative pathologies*. Monastir, Tunisia September 22-24.

[2009] L.Cueru, A-M. Trunfio-Sfarghiu, **Y. Bala**, B. Depalle, A. Descamps, G. Boivin, Y. Berthier, H. Follet. Correlation between microstructure and nanomechanical properties of lamellar bone. *Third International Conference on Mechanics of Biomaterials & Tissues*. Clearwater Beach, Florida, USA December 13-17.

[2009] L. Cueru, A-M. Trunfio-Sfarghiu, **Y. Bala**, B. Depalle, A. Descamps, G. Boivin, Y. Berthier, H. Follet. Correlation between microstructure and nanomechanical properties of lamellar bone. *The International Symposium on Assistive and Recuperative Technologies for Injured, ill, Pregnant, Elderly and people with Disabilities*. Faculty of Medical Bioengineering, Iasi, Romania July 23-25.

[2009] **Y. Bala**, D. Farlay, P.J. Meunier, P.D. Delmas, G. Boivin. Time Sequence of Secondary Mineralization of Bone in an Ewe Model having a Haversian Remodeling Activity Close to Humans. *The XIth Congress of the International Society of Bone Morphometry*. Zell am See, Austria, 28-30 May.

[2008] **Y. Bala**, D. Farlay, P.J. Meunier, P.D. Delmas, G. Boivin. La chronologie de la minéralisation secondaire chez la brebis, un modèle de remodelage osseux proche de celui de l'homme. *XXVI^{èmes} Journées des maladies osseuses*. Lyon, France, 10 October.

[2008] G. Boivin, **Y. Bala**, Chapurlat RD, Delmas PD. Long-Term Treatment with Oral Bisphosphonates in Postmenopausal Women: Effects on the Degree of Mineralization and Microhardness of Bone. *American Society for Bone and Mineral Research 30th annual meeting*. Montreal, Canada, 12-16 September.

[2007] G. Boivin, D. Farlay, **Y. Bala**, P.D. Delmas. Nouvelles approches du minéral osseux *XXV^{èmes} Journées des maladies osseuses*. Geneva, Switzerland, 22 November.

[2007] **Y. Bala**, D. Farlay, C. Simi, P.D. Delmas, P.J. Meunier, G. Boivin. Time sequence of secondary mineralization and microhardness of bone in an ewe model. *American Society for Bone and Mineral Research 29th annual meeting*. Honolulu, Hawaii, USA, 16-19 September.

[2006] G. Boivin, **Y. Bala**, A. Doublier, C. Simi, L.G. Ste-Marie, P.D. Delmas, P.J. Meunier. Microhardness measured with a Vickers indenter: an approach of bone quality. *10th Congress of the International Society of Bone Morphometry*. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 19-22 September.

1.3. Communications affichées

[2011] **Y. Bala**, B. Dépalle, T. Douillard, S. Meille, H. Follet, J.Chevalier, G. Boivin. Respective roles of organic and mineral components of bone tissue in micromechanical behaviour of human cortical bone. 3rd Joint meeting of the *European Calcified Tissue Society & the International Bone and Mineral Society*. Athens, Greece, 7-11 May 2011.

[2011] **Y. Bala**, B. Dépalle, T. Douillard, S. Meille, H. Follet, J.Chevalier, G. Boivin. Micromechanical behavior of Human cortical bone: elasticity is related to mineral while plasticity is related to organic matrix. 11th *European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Valencia, Spain, 23-26 March 2011.

[2011] **Y. Bala**, S. Bare, G. Boivin, R. Recker. Bone Tissue Quality in the Years after Menopause: Micro-hardness is Decreased Independently of Changes in the Degree of Mineralization. 11th *European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Valencia, Spain, 23-26 March 2011.

[2011] A. Doublier, D. Farlay, **Y. Bala**, X. Jaurand, D. Bertrand, G. Boivin. Bone Mineral Quality Assessed at Bone Structural Unit Level in *Macaca fascicularis* Monkeys is not modified by a 52-week treatment with Strontium Ranelate. *European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Valencia, Spain, 23-26 March 2011.

[2011] D. Farlay, **Y. Bala**, B. Burt-Pichat, R.D. Chapurlat, G. Boivin, H. Follet. Relationship Between Age, Mineral Characteristics, Mineralization, Microhardness, And Microcracks In Human Vertebral Trabecular Bone. 11th *European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Valencia, Spain, 23-26 March 2011.

[2010] M. Portigliatti Barbos, S. Marino, A. Barberis, A.S. Bravo Martin, **Y. Bala**, G. Boivin, B. Mognetti. Biomechanics of fracture healing stimulation with teriparatide. 95th *National Congress of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology*. Rome, Italy, 20-24 November.

[2010] **Y. Bala**, B. Dépalle, T. Douillard, S. Meille, H. Follet, J.Chevalier, G. Boivin. Contribution of bone microstructural characteristics to mechanical properties evaluated at bone structural unit level. *American Society for Bone and Mineral Research 32nd annual meeting*. Toronto, Canada, 15-19 October.

[2010] D. Farlay, **Y. Bala**, B. Burt-Pichat, R. Chapurlat, G. Boivin, H. Follet. Relationship Between Age, Mineral Characteristics, Mineralization, Microhardness, And Microcracks In Human Vertebral Trabecular Bone. *American Society for Bone and Mineral Research 32nd annual meeting*. Toronto, Canada, 15-19 October.

[2010] A. Doublier, D. Farlay, **Y. Bala**, X. Jaurand, D. Bertrand, G. Boivin. Bone Mineral Quality Assessed at Bone Structural Unit Level in *Macaca fascicularis* Monkeys is not modified by a 52-week treatment with Strontium Ranelate. *American Society for Bone and Mineral Research 32nd annual meeting*. Toronto, Canada, 15-19 October.

[2010] **Y. Bala**, S. Bare, G. Boivin, R.R. Recker. Bone tissue mineralization is maintained in early postmenopausal women while tissue hardness is decreased. 10th *European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Florence, Italy, 5-8 May.

[2010] **Y. Bala**, C.E. Barr, G. Boivin. Daily and intermittent oral ibandronate improve bone tissue hardness and maintained its mineralization. *10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Florence, Italy, 5-8 May.

[2009] **Y. Bala**, C.E. Barr, G. Boivin. Effects of oral daily or intermittent ibandronate on bone quality: secondary mineralization and microhardness of bone. *American Society for Bone and Mineral Research 31th annual meeting*. Denver, Colorado, USA, 11-15 September.

[2009] **Y. Bala**, S. Bare, G. Boivin, R.R. Recker. Secondary mineralization and the microhardness of bone measured across menopause in women. *American Society for Bone and Mineral Research 31th annual meeting*. Denver, Colorado, USA, 11-15 September.

[2009] M. Forwood, J.P. Roux, M.E. Arlot, B. Burt-Pichat, H. Follet, **Y. Bala**, P.D. Delmas. Bone quality in vertebral fracture : microdamage, mineralization and microarchitecture of the cortical shell in lumbar vertebrae. *Meeting of the International Bone & Mineral Society (Annual Meeting)*, Sydney, Australia, 21-25 March.

[2009] **Y. Bala**, R.D. Chapurlat, G. Boivin. There is no hypermineralization among postmenopausal women receiving long-term oral bisphosphonates. *9th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Athens, Greece, 18-21 March.

[2008] **Y. Bala**, D. Farlay, P.J. Meunier, P.D. Delmas, G. Boivin. Time Sequence of Secondary Mineralization of Bone in an Animal Model (Ewe) Having a Haversian Remodeling Activity Close to Humans. *8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis*. Istanbul, Turkey, 9-12 April.

[2007] **Y. Bala**, D. Farlay, C. Simi, P.D. Delmas, P.J. Meunier, G. Boivin. Time sequence of secondary mineralization and microhardness of bone in an ewe model. *9th International Conference on the Chemistry & Biology of Mineralized Tissues*. Austin, Texas, USA, 4-8 November.

[2006] G. Boivin, **Y. Bala**, C. Simi, L.G. Ste-Marie, P.J. Meunier. Bone microhardness in control and osteoporotic men: relationship with the mean degree of mineralization of bone tissue. *IOF World Congress on Osteoporosis*. Toronto, Canada, 2-6 June.

[2006] G. Boivin, **Y. Bala**, C. Simi, L.G. Ste-Marie, P.J. Meunier. Degree of mineralization and microhardness of bone tissue in control and osteoporotic Men. *33rd European Calcified Tissue Society*, Prague, Czech Republic, 10-14 May.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/jmbbm

Research paper

Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: An instrumented indentation study

Y. Bala^{a,b,c,*}, B. Depalle^{a,b,c,1}, T. Douillard^d, S. Meille^d, P. Clément^d, H. Follet^{a,b,c}, J. Chevalier^d, G. Boivin^a

^aINSERM, UMR1033, F-69008, Lyon, France

^bUniversité de Lyon, Lyon, France

^cHospices Civils de Lyon, France

^dUniversité de Lyon, INSA-Lyon, MATEIS, CNRS UMR 5510, F-69621, Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2011

Received in revised form

14 April 2011

Accepted 7 May 2011

Keywords:

Human cortical bone

Mineralization

Indentation

Hardness

Collagen maturity

ABSTRACT

Bone is a multiscale composite material made of both a type I collagen matrix and a poorly crystalline apatite mineral phase. Due to remodeling activity, cortical bone is made of Bone Structural Units (BSUs) called osteons. Since osteon represents a fundamental level of structural hierarchy, it is important to investigate the relationship between mechanical behavior and tissue composition at this scale for a better understanding of the mechanisms of bone fragility. The aim of this study is to analyze the links between ultrastructural properties and the mechanical behavior of bone tissue at the scale of osteon.

Iliac bone biopsies were taken from untreated postmenopausal osteoporotic women, embedded, sectioned and microradiographed to assess the degree of mineralization of bone (DMB). On each section, BSUs of known DMB were indented with relatively high load (~500 mN) to determine local elastic modulus (E), contact hardness (H_c) and true hardness (H) of several bone lamellae. Crystallinity and collagen maturity were measured by Fourier Transform InfraRed Microspectroscopy (FTIRM) on the same BSUs. Inter-relationships between mechanical properties and ultrastructural components were analyzed using multiple regression analysis.

This study showed that elastic deformation was only explained by DMB whereas plastic deformation was more correlated with collagen maturity. Contact hardness, reflecting both elastic and plastic behaviors, was correlated with both DMB and collagen maturity. No relationship was found between crystallinity and mechanical properties at the osteon level.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding address: INSERM UMR 1033 Equipe "Qualité Osseuse et Marqueurs Biologiques", Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Claude Bernard (Domaine Laennec), 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France. Tel.: +33 4 78 78 57 35; fax: +33 4 78 77 86 63.

E-mail addresses: yohannbala@gmail.com, yohann.bala@univ-lyon1.fr (Y. Bala).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

1751-6161/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jmbbm.2011.05.017

1. Introduction

Bone is a living multiscale composite material made of an organic matrix (organized network of type I collagen fibrils) filled with a mineral component (apatite crystals bound to the collagen fibrils) (Rho et al., 1998). Bone tissue is in a continuous remodeling process consisting in a succession of resorption and formation phases. This process intends to repair the microdamaged matrix, to adapt the microarchitecture to the mechanical environment, and to regulate calcium homeostasis (Cowin, 2001; Hadjidakis and Androulakis, 2006). At the microscopic scale in cortical bone, remodeling leads to the formation of osteons, tubular microstructures ranging from 10 to 500 μm in diameter and about 2.5 mm in length (Cowin, 2001). Osteons are made of 5 to 30 concentric lamellae with different collagen fibrils orientations (Ascenzi and Bonucci, 1968) and arranged around Haversian canals ensuring blood supply and innervation of bone. Osteons are oriented in the same direction, along the diaphysis in long bones, and separated by interstitial bone tissue that is made up of former partially remodeled osteons. Both osteons and interstitial bone represent Bone Structural Units (BSUs). Depending mainly on time since deposition, each mature BSU has a fairly uniform mineral content (Hadjidakis and Androulakis, 2006). The mineral content is considered to play a major role in bone strength (Boivin et al., 2008; Follet et al., 2004; Roschger et al., 2008). The role of collagen component remains barely known and it may play a role in plastic deformation (Currey, 2003).

Indentation techniques have been widely used to study bone tissue micromechanical properties. Since the early 1950's, it has been demonstrated that osteon microhardness was strongly related to its mineral content (Amprino, 1958; Carlstrom, 1954; Weaver, 1966). These pioneering works suggested that indentation was a relevant methodology for bone tissue mechanical behavior assessment. The results found in these initial studies have been confirmed many times on cortical and trabecular bone from various animal models as well as human bone (Bala et al., 2010; Boivin et al., 2008; Hodgkinson et al., 1989). However, interpreting microhardness values is complicated because this parameter is related to both elastic and plastic deformations (Evans et al., 1990).

In the early 1990's, Oliver and Pharr (1992) developed an innovative technique to measure directly, on small indented areas, both elastic modulus (E) and contact hardness (H_c). Contact Hardness corresponds to the ratio between indentation load and the contact area of the indentation print. The determination of H_c is easy, and H_c is often used in materials science to characterize the resistance to surface damage. However, indentation leads to elasto-plastic deformations and H_c is therefore related to both elastic and plastic properties of a given material. In the case of bone, the authors found that H_c was linearly dependent on E (Ferguson, 2009; Oyen, 2006; Smith et al., 2010). Therefore H_c cannot be used to distinguish and characterize only the plastic behavior of the material.

More recently, Sakai (1999) has analyzed the explicit interdependence between H_c and E by assuming an in-series two-element mechanical model to dissociate elastic and

plastic contributions to deformation. He developed a method to calculate a variable reflecting exclusively the resistance to plastic deformations, called *true hardness* (H) (Oyen, 2006; Sakai, 1999). Using this approach in bone, E and H were moderately or not correlated (Smith et al., 2010). E , H_c and H are strongly influenced by the amount of mineral but their link to the organic matrix remains unclear.

Very few studies have specifically investigated the role of crystallinity in the mechanical behavior of bone. Vibrational spectroscopies such as Raman or Fourier Transform InfraRed Microspectroscopy (FTIRM) are valuable tools to assess mineral properties in terms of crystallinity (i.e., crystal size/strain) and maturity ("age" of crystals) (Carden and Morris, 2000; Farlay et al., 2010). Such methodologies have also been used to characterize parameters reflecting the collagen properties which seem to be responsible for the viscous micromechanical properties (Isaksson et al., 2010; Paschalis et al., 1996).

To understand the mechanical properties of bone material, and the mechanisms involved in bone fragility (Osteoporosis), it is important to study the mechanical properties of its different components, and the relationships between them at the various levels of hierarchical structural organization (Landis, 1995; Rho et al., 1998). Osteon being the BSU of cortical bone, it represents a major level of cortical structure at which the relationship between mechanical competence and composition needs to be investigated. The aim of the present study is to determine the impact of multiscale determinants of mineral and organic components in micromechanical behavior of osteoporotic human iliac cortical bone tissue. Thus, using an innovative experimental set up, we measured elastic and plastic behavior of bone tissue (E and H , respectively) and bone ultrastructural properties (degree of mineralization, mineral crystallinity and maturity of collagen) in the same BSUs. Two main hypotheses were tested: First, the degree of mineralization is a major determinant of both elastic and plastic deformation; second, crystallinity, reflecting mineral quality, and collagen maturity also have a significant impact on micromechanical behavior.

2. Material and methods

2.1. Iliac bone samples

Five transiliac bone samples taken from 69 ± 2 year-old post-menopausal osteoporotic women were used. Osteoporosis was defined as a lumbar and/or hip bone mineral density of at least -2.5 standard deviations below the mean for young adult or at least two moderate ($>25\%$ vertebral height loss) vertebral fractures. Undecalcified samples were fixed in 70% alcohol, dehydrated in absolute alcohol, and then embedded in methyl methacrylate (MMA). For quantitative microradiography, 150 μm -thick sections were cut, in a perpendicular plan to the Haversian canals with a precision diamond wire saw (Well, Escil, Chassieu, France). Sections were progressively ground (silicium carbides) to a thickness of $100 \pm 1 \mu\text{m}$ and polished with a diamond suspension (0.25 μm) (Boivin and Meunier, 2002). These sections were microradiographed, indented and then re-sectioned into 2 μm -thick sections for infrared spectroscopy using a Polycut E microtome (Leica, Wetzlar, Germany).

2.2. Quantitative microradiography (Boivin et al., 2008)

Contact microradiography of 100 μm -thick bone sections was performed to assess the degree of mineralization of bone (DMB) using an X-ray diffraction unit PW 1830/40 (Philips, Limeil Brévannes, France). The nickel-filtered copper $K\alpha$ radiation was used under 25 kV and 25 mA. Both bone sample and an aluminum standard X-ray absorption was recorded on a high-resolution film exposed for 20 min (Geola, Slavich International Wholesale Office, Vilnius, Lithuania). Acquisitions of microradiographs were performed with a digital camera (image pixel size: 5.64 μm). After calibration using the aluminum standard, the mean gray level of BSUs were converted into degree of mineralization values (in g mineral/cm^3). From the microradiographs of the 5 bone samples, a total of 150 BSUs (osteons and interstitial areas) were selected and analyzed to obtain the largest range of DMB values.

2.3. Instrumented indentation testing

Nanoindentation tests were carried out using a Nano Indenter II machine (Nano Instruments Inc., USA) equipped with a Berkovich diamond tip. Indentation tests were performed under displacement control according the following protocol: A 0.05 s^{-1} constant strain rate was applied to a peak of displacement of 5000 nm, followed by a 10 s dwell at peak displacement to limit the viscous behavior of bone tissue, a 45 s withdrawal to 10% of maximum displacement, a 50-s hold period for thermal drift calculation and final withdrawal to zero displacement (Fig. 1). The measurements were done at relatively high load ($\sim 500 \text{ mN}$) to overcome the effects related to the heterogeneity of bone tissue at lamellar level and in Continuous Stiffness Mode (CSM), to measure the mechanical properties continuously along the depth of the sample and assure the homogeneity of bone tissue. The system was calibrated with fused silica according Oliver and Pharr (1992) protocol. The 150 BSUs selected for DMB measurements were indented. The indent location was chosen at sites distant from visible lacunae or other discontinuities.

2.4. Indentation analysis

Indentation curves were analyzed using a homemade program developed with Matlab R2010a (The MathWorks Inc., Natick MA, USA). For each indent, elastic modulus, E and contact hardness, H_c were calculated according the method described by Oliver and Pharr (1992). Assuming bone as an isotropic material, the elastic modulus was calculated from the following equation:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu^2}{E_i}$$

where E_i and ν_i are the elastic modulus and Poisson's ratio of the diamond indenter (1140 GPa and 0.07 respectively). For isotropic models, the Poisson modulus of bone ν is usually assumed to be 0.3 (Zysset et al., 1999). E_r is the reduced modulus, calculated using the formula:

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\beta\sqrt{A}}$$

where A is the projected contact area, β is an empirical indenter shape factor Berkovich tip (1.034) and S the stiffness of the sample derived from the initial tangent of the

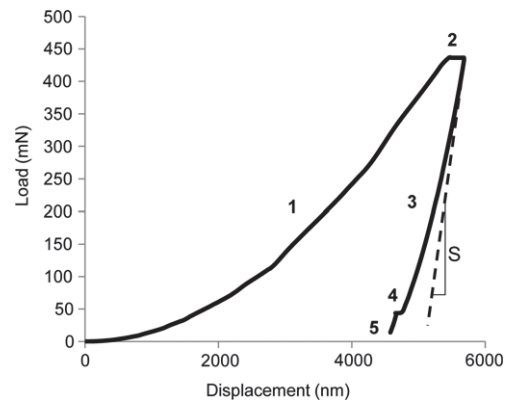


Fig. 1 – Typical load-depth curve obtained with indentation testing. The curve shows regions related to loading (1), 10 s holding segment (2), 90% unloading (3), 50 s holding segment allowing the thermal drift correction (4) and complete unloading (5). S is the contact stiffness corresponding to the slope of the unloading curve tangent.

unloading segment of the load/depth curve. The stiffness was calculated from a power fit to the unloading curve. The regression was performed with a Levenberg–Marquardt algorithm. Contact hardness was calculated from the equation:

$$H_c = \frac{P_{\max}}{A}$$

where P_{\max} is the maximum load. The values of E and H_c given by Oliver and Pharr method were highly correlated. Based on the Sakai model, Oyen and Cook dissociate elastic and plastic deformations in mineralized tissue (Oyen, 2006; Oyen and Cook, 2003; Sakai, 1999). In this model, bone is considered to be an elasto-plastic material and its mechanical behavior during loading of the indentation test is modeled as a purely elastic element connected to a purely plastic element in series in a sense of the Maxwell combination. The elastic element is characterized by the elastic modulus E , and the plastic one by the true hardness H . Developing the constitutive relationships for pyramidal indentation for both components allow to derive H_c as a function of E and H (Sakai, 1999):

$$H_c = \frac{1}{\alpha_1((\alpha_2 E^*)^{-1/2} + (\alpha_1 H)^{-1/2})^2}$$

where $\alpha_1 = 24.5$ and $\alpha_2 = 4.4$ are adimensional constants associated with Berkovich indentation tip and E^* was the plain strain modulus ($E^* = \frac{E}{1-\nu^2}$). The true hardness has been calculated based on this equation.

The work of indentation has also been obtained from the loading and unloading curves. The total work of indentation (W_{tot}) is defined as the area under the loading curve, the reversible work (W_{U}) as the area under the unloading curve and the irreversible work (W_{P}) as the area enclosed by the loading and unloading curve.

2.5. Fourier transform infrared microspectroscopy

FTIRM was performed on $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ area on 55 BSUs tested with instrumented indentation (Fig. 2(A)). The cutting

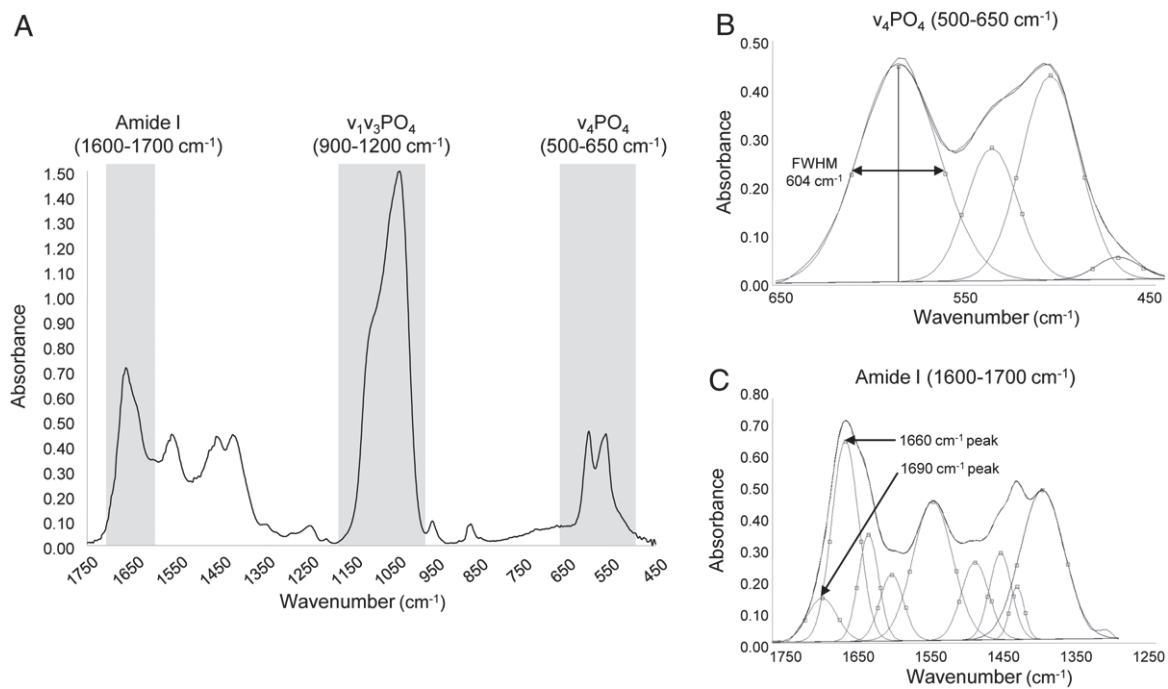


Fig. 2 – Infrared spectra of a 30 $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ area assessed on a cortical bone structural unit (A). Detail of the calculation of the crystallinity index defined by the full width at half maximum (FWHM) of 604 cm^{-1} peak is given in (B). (C) represents the deconvoluted peaks allowing to deduce the collagen maturity (1660/1690 cm^{-1} area peak ratio).

of the 100 μm -thick sections into 2 μm -thick ones led to a loss of material, explaining the fact that only 55 BSUs were analyzed by FTIRM (among the 150 tested with indentation). The collection of spectra was performed in transmission mode with a Spectrum 100 spectrometer equipped with an Auto-IMAGE microscope (Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut, USA). Each spectrum corresponded to 150 cumulated scans. The contributions of air and MMA were subtracted from the individual spectra, and a baseline correction and normalization at absorbance 1.5 on the $\nu_3\text{PO}_4$ were done. The spectra were then curve-fitted using GRAMS/AI software (Thermo galactic, Salem, New Hampshire, USA) to analyze the peaks $\nu_4\text{PO}_4$ (500–650 cm^{-1}) and amides I (1600–1700 cm^{-1}). The mineral crystallinity index was measured as the FWHM of the 604 cm^{-1} band in the $\nu_4\text{PO}_4$ domain (Fig. 2(B)). The mineral crystallinity index was inversely proportional to both crystal size and how well the ions of the crystal were ordered in the unit cells, that is, the perfection and extent of the ordered disposition of the individual ions in the crystal (Farlay et al., 2010). Collagen maturity was evaluated by the area ratio 1660 cm^{-1} over 1690 cm^{-1} peaks (Fig. 2(C)).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed under SPSS v16.0 (SPSS inc., Chicago Illinois, USA) using an alpha risk set at 5%. Results were reported as mean \pm standard deviation (SD). The distribution of the variables was tested with the Shapiro–Wilk procedure. All variables were normally distributed and a parametric approach was used. The influence of the microstructure on the micromechanical behavior was studied using linear regression analyses (r corresponds to Pearson's

correlation coefficient). To explain how micromechanical variables are affected by those reflecting mineral and organic matrix, stepwise forward multiple regression models including partial correlations were used. Values of β correspond to the standardized regression coefficient if the predictor enters the equation at the next step of the stepwise analysis.

3. Results

3.1. Role of tissue mineral density in micromechanical properties of cortical bone

A total of 150 cortical osteons and interstitial fragments were identified from the microradiographs, based on a large range of DMB (Fig. 3). Mean DMB was $1.13 \pm 0.09 \text{ g/cm}^3$. Micromechanical variables deduced from load–displacement curves measured on the same 150 BSUs were $19.41 \pm 2.70 \text{ GPa}$, $0.63 \pm 0.11 \text{ GPa}$ and $1.81 \pm 0.39 \text{ GPa}$ for E , H_c and H , respectively (Table 1).

Linear regression revealed strong and positive correlations between DMB and micromechanical variables (Fig. 4). DMB was significantly correlated with E ($r = 0.64$, $p < 0.0001$), H_c ($r = 0.79$, $p < 0.0001$) and H ($r = 0.74$, $p < 0.0001$). E reflecting elastic behavior was strongly correlated with H_c ($r = 0.79$, $p < 0.0001$) and also more moderately with H ($r = 0.59$, $p < 0.005$), reflecting a purely plastic hardness (Fig. 5). The ratio of irreversible work to total work for a complete loading–unloading cycle ($(W_{\text{tot}} - W_{\text{ul}})/W_{\text{tot}}$) was strongly correlated to the ratio H/E^* ($r = 0.92$, $p < 0.001$) (Fig. 6).

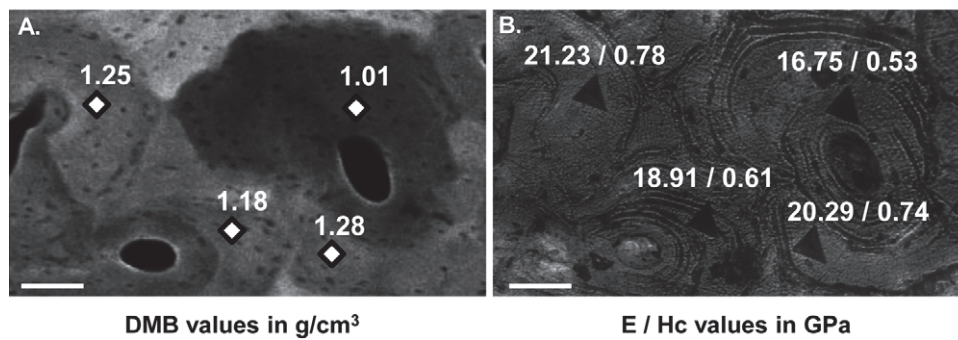


Fig. 3 – Degree of mineralization of bone (DMB) measured on a microradiograph illustrating various cortical bone structural units (A). (B) Indents left at bone surface on the same region of interest and values obtained for elastic modulus (E) and contact hardness (H_c), respectively. Bar scale: 50 μm .

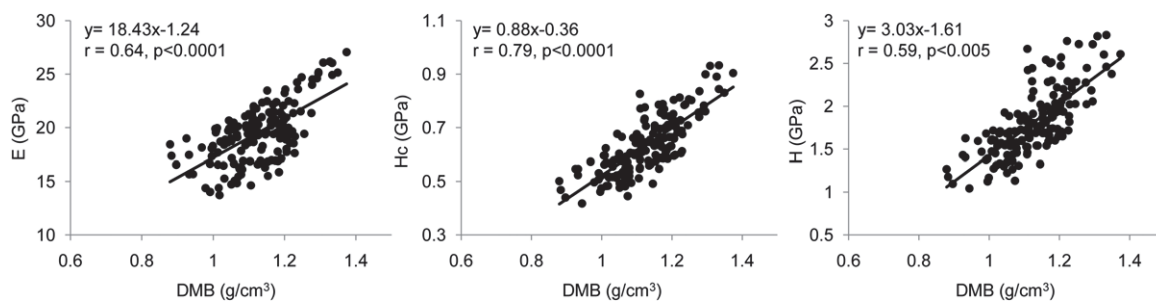


Fig. 4 – Correlations obtained between the degree of mineralization of bone (DMB) and the micromechanical properties: elastic modulus (E), contact hardness (H) and true hardness (H). These linear regression plots show the strong influence of mineral content in mechanical behavior of bone at the bone structural unit level of organization.

Table 1 – Mean values and standard deviation (SD) for degree of mineralization (DMB), elastic modulus (E), contact hardness (H_c), true hardness (H), collagen maturity and crystallinity index measured at bone structural unit (BSU) level.

Variables		Mean	SD	Range	
				Minimum	Maximum
Whole population of BSUs ($n = 150$)	DMB (g/cm^3)	1.13	0.09	0.88	1.37
	E (GPa)	19.41	2.70	13.64	26.62
	H_c (GPa)	0.63	0.11	0.42	0.93
	H (GPa)	1.81	0.39	1.04	2.83
BSUs analyzed in FTIRM ($n = 55$)	DMB (g/cm^3)	1.10	0.08	0.93	1.29
	Crystallinity index	24.79	0.70	22.85	26.09
	Collagen maturity	4.69	0.76	2.78	5.99
	E (GPa)	18.49	2.58	13.94	24.25
	H_c (GPa)	0.63	0.09	0.48	0.84
	H (GPa)	1.81	0.34	1.22	2.67

3.2. Role of mineral and collagen quality in micromechanical behavior

Due to technical limitations, 55 of the 150 indented BSUs were also analyzed by FTIRM. Crystallinity index and collagen maturity were 24.7 ± 0.7 and 4.7 ± 0.8 , respectively (Table 1). Linear regression analysis demonstrated a moderate positive correlation between collagen maturity and E ($r = 0.39$, $p < 0.0001$) and a positive correlation between collagen maturity and H_c and H ($r = 0.59$ and $r = 0.58$, respectively, $p < 0.0001$). However, the crystallinity index was not correlated with any of the mechanical parameter E , H_c and H ($r = -0.15$, $r = -0.25$ and $r = -0.25$, respectively, $p > 0.05$).

3.3. Multiple regression analysis

This statistical analysis was performed on the 55 BSUs in which all parameters were measured. Three stepwise regression analyses were performed using one of the mechanical parameters (E , H_c or H) as dependent variable and the structural parameters (DMB, collagen maturity and crystallinity index) as independent variables. Depending on these results, a multiple regression analysis was performed using the same dependent variables but only with the independent variables that were significant in the stepwise regression model. The multiple regression analysis gave the associated part correlation for each independent variable and the final correlation coefficient of the model (Table 2). In this

Table 2 – Multiple regression analysis describing micromechanical variables (elastic modulus (E), contact hardness (H_c) and true hardness (H)) as a function of the degree of mineralization of bone (DMB), collagen maturity and crystallinity index. Results highlight the importance of mineral in elastic behavior of bone tissue while collagen maturity is related to plastic deformation.

Dependent	Variables		Stepwise regression rank	Final R	Part correlation (β)	p-value
	Independent					
E	DMB		1		0.68	<0.001
	Collagen maturity		Out	0.68	–	–
	Crystallinity index		Out	–	–	–
H_c	DMB		1		0.46	<0.001
	Collagen maturity		2	0.74	0.33	0.004
	Crystallinity index		Out	–	–	–
H	DMB		Out		–	–
	Collagen maturity		1	0.58	0.58	<0.001
	Crystallinity index		Out	–	–	–

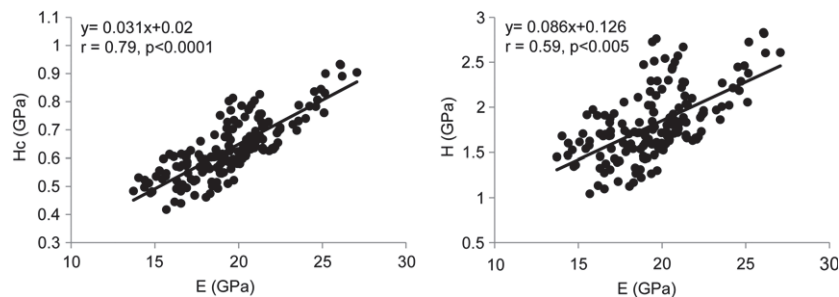


Fig. 5 – Significant relationship obtained between contact hardness (H_c), true hardness (H) and elastic modulus (E). Those plots show the strong linear dependence of H_c with elastic properties whereas H , reflecting plastic deformation is moderately linked to E .

analysis, E was correlated only with DMB ($\beta = 0.68, p < 0.001$), H_c was correlated with both DMB ($\beta = 0.46, p < 0.001$) and collagen maturity ($\beta = 0.33, p = 0.004$), and H was only correlated with collagen maturity ($\beta = 0.58, p < 0.001$) (Table 2).

4. Discussion

4.1. Correlation between mechanical and microstructural variables

In this study, the relationships between bone components and their micromechanical behavior were examined at the level of cortical BSUs in postmenopausal osteoporotic women. The statistical model used was based on three independent parameters of bone ultrastructure reflecting mineral quantity (DMB), mineral quality (crystallinity index) and the age of collagen matrix (collagen maturity). These variables are the minimal ones required to define the microstructure of bone tissue, and are likely to be the best predictor of bone mechanical properties at osteon level. The results of micromechanical properties (E, H and H_c), DMB and ultrastructural variables (crystallinity index and collagen maturity) were consistent with previous studies (Boivin et al., 2008; Farlay et al., 2010; Hengsberger et al., 2002; Hoffler et al., 2005; Paschalis et al., 1996; Smith et al., 2010; Zysset, 2009). It is known that elastic deformation is related to the

mineral but, to our knowledge, this study is the first to clearly establish a link between plastic deformation and collagen at the osteon level.

Indentation tests were performed at relatively high load/depth in order to avoid lamellae heterogeneity. Even if it has been proven that mechanical properties are different from one lamella to another in a single osteon (Fratzl and Weinkamer, 2007; Hengsberger et al., 2002), this choice was made for several reasons. First, at lamella level, measurements are sensitive to surface roughness and to potential mechanical alteration due to surface preparation; by indenting several lamellae simultaneously, those risks of error were reduced. Furthermore, if one orientation of the lamellae is favored when testing bone at lamella level, the

bone tissue. Due to a rotated plywood-like structure (Ascenzi and Bonucci, 1968; Giraudguille, 1988; Weiner et al., 1999) and/or variation in collagen and mineral density between successive lamellae (Marotti et al., 1993), osteon lamellar structure is periodic along its diameter. Considering one orientation of the lamellae, the mechanical properties do not vary significantly across the osteon (Burket et al., 2011; Hengsberger et al., 2001). Thus, indentation of several lamellae allowed an average measurement of the mechanical response of bone tissue. Roughness measurements made by atomic force microscopy on similar bone sections showed a mean variation of 200 nm in a single osteon (data not shown). Therefore, indentation tests were performed with

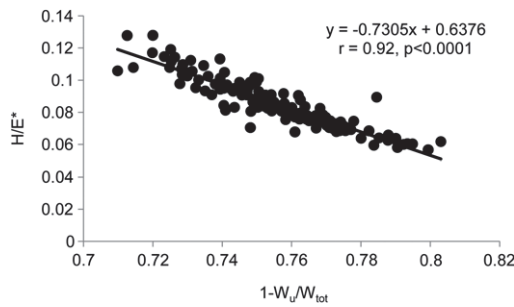


Fig. 6 – Regression plot of H/E^* versus the ratio of irreversible work to total work for a complete loading-unloading cycle ($[W_{tot} - W_u]/W_{tot}$).

a depth of 5 μm in order to exceed by 20 times the mean roughness (norm ISO 14577-4) and to indent simultaneously 4–6 lamellae. Continuous stiffness measurements were done to testify of the homogeneity of the BSU along its depth.

According to Hertz's contact theory, the mechanical properties measured by nanoindentation concern a semiellipsoidal volume extending to about nine times the indentation depth in vertical direction and about seven times the depth in radial direction (Hengsberger et al., 2002; Johnson, 1985). For an indentation depth of 5 μm , this represents a volume of 45 μm in depth and 35 μm in the lateral direction. The first value was consistent with the length of osteon structure and with the thickness of bone section ($100 \pm 1 \mu\text{m}$). Thus, indents positions were chosen to match the lateral deformation as best as possible. Moreover, indent locations were also chosen at sites distant from visible lacunae or other discontinuities in order to better satisfy the continuum assumption.

Since E and H_c were strongly correlated, the model developed by Sakai was used to obtain a purely plastic variable H (Oyen, 2006; Sakai, 1999). Unlike Smith et al. (2010), we found a moderate correlation between E and H . This correlation could be explained by a larger range in DMB. Since both DMB and collagen maturity are determined by common factors (i.e., time since deposition, mineral apposition rate), these parameters evolve jointly, explaining the moderate correlation between them. Besides, elastic deformation (E) was mainly described by DMB and plastic deformation (H) was mainly explained by collagen maturity. Therefore, a moderate correlation between E and H seems to be legitimate. Correlations between mineral quantity (DMB) and micromechanical variables (E , H_c and H) were consistent with other studies made at nano-, micro- and macro- scales (Boivin et al., 2008; Burket et al., 2011; Hoc et al., 2006; Mulder et al., 2008; Smith et al., 2010). Since elastic modulus is mainly explained by mineral density, its heterogeneity is mainly due to the distribution of BSU as their mineral composition is rather homogeneous (Smith et al., 2010). Besides, the strong correlation between the ratio of irreversible work to total work for a complete loading-unloading cycle ($[W_{tot} - W_u]/W_{tot}$) and the ratio H/E^* is in agreement with previous work (Cheng and Cheng, 1998).

4.2. Influence of collagen maturity

Collagen matrix maturity was more linked to plastic deformation (H) than with elastic deformation (E). This was

consistent with the recent findings of Boivin et al. (2008) concluding from their observations in human iliac bone that osteoid tissue represented about one third of the H_c of mineralized matrix. Besides, in Osteogenesis imperfecta (OI), a disease associated with an altered collagen structure, an increase in brittleness of bone tissue has been reported. Since collagen alone has a reduced strength, this suggests that the reduction in post-yield behavior of bone in OI arises directly from changes in organic matrix (Fratzl et al., 2004). Since, Fratzl et al. (2004) have suggested that as hydroxyapatite is a rigid material not capable of dissipating much energy, collagen would play a key role in bone toughness. However, a single type I collagen fibril has a quasi perfectly-elastic tensile behavior, or a viscoelastic behavior in hydrated state (Svensson et al., 2010; van der Rijt et al., 2006). These results suggested that the association between mineral and organic matrix, two mostly elastic components, needs to be considered to understand the complex visco-elasto-plastic behavior of bone matrix (Oyen and Cook, 2009; Oyen and Ko, 2007; Launey et al., 2010).

Even though the deformation mechanisms of bone at micro- and nanoscale remain unclear, several hypotheses have been proposed. Many studies revealed that collagen network integrity and crosslinking is implied in the ability to absorb energy and undergo deformation after yielding at various levels of the structural hierarchy (Reilly and Burstein, 1975; Thompson et al., 2001; Wang et al., 2002; Zioupos et al., 1999). Fantner et al. (2005) suggested that collagen fibrils are held together by a non-fibrillar organic matrix acting as a glue and may be partially responsible for the bone toughness. Following this model, Gupta et al. (2005) suggested that shearing occurs in the interfibrillar thin matrix layers. When the glue is sheared, energy is dissipated in the glue (through rupture of sacrificial bonds). Even if this model was presented for tensile deformation, the same mechanism seems consistent in compression and could support the results of this study.

Using nanoindentation on demineralized bovine cortical bone, Tai et al. (2005) observed that collagen fibrils lost their supramolecular banding structure close to the junction edge of the faces of the indenter, corresponding to regions where plastic deformations obtained from FEA simulation were maximal. In parallel, there is also evidence showing the role of collagen maturity in the time-dependent deformation of bone under loading, (i.e., the viscous and viscoelastic behavior) during indentation testing (Isaksson et al., 2010). These results highlight the major and complex impact of collagen maturity in the viscoplastic behavior of bone matrix.

4.3. Influence of the crystallinity of the mineral phase

Recently, Yerramshetty and Akkus (2008) showed that the crystallinity (i.e., the size and the stoichiometry of apatite crystals) is an important variable in the macromechanical behavior of human cortical bone. Indeed, combination of Raman spectroscopy to assess the crystallinity and monotonic and fatigue tension tests, revealed that crystallinity may explain 7 to 48% of the monotonic and 11%–64% of fatigue mechanical properties in human femoral cortical bone. Surprisingly, our data did not show correlations between crystallinity

index and micromechanical properties determined using indentation testing. This could reflect that mechanical behavior is differently modulated by structural variables at BSU and tissue levels. Also, this latter work was done in tensile conditions and in a healthy loaded bone, limiting the comparison with our study where the results should be considered only for indentation loading along the transversal direction of BSUs (Yerramshetty and Akkus, 2008). Postmenopausal osteoporosis involves a high level of bone remodeling Recker et al. (2004). At BSU level, osteoporosis leads to changes in the distribution of mineral and organic contents and quality variables as it acts on the probability for a given osteon to be resorbed before its complete maturation (Boivin et al., 2009). A previous study of the mineralization time course at BSU level in ewes has revealed that crystallinity did not increase linearly with time, while DMB and H_c , which were positively correlated ($R^2 = 0.52$, $p < 0.0001$), did. Furthermore, in this latter study, crystallinity significantly increased first during primary mineralization, then a second time after 18 months of mineralization, when DMB and H_c reached their physiological upper limit (Bala et al., 2010). Present results are consistent with this dissociation between mineral quantity, mineral crystallinity and micromechanics properties at BSU level. This suggests that the mean crystallinity, which depends on the mean tissue age (influenced by remodeling activity), plays a role in whole bone strength (Yerramshetty and Akkus, 2008). In contrast at the BSU level, micromechanical properties are mostly related to mineral content and collagen matrix maturity.

4.4. Limitations

The sample preparation is the main limitation of this study. Bone biopsies were prepared for a prior histological study. First, dehydration in alcohol is known to increase by 10% the hardness and by 15%–20% the elastic modulus (Bushby et al., 2004; Dall'Ara et al., 2007; Donnelly et al., 2006). Second, the embedding in MMA with preliminary infusion increases substantially the properties measured using indentation (Bushby et al., 2004). However, as all samples were prepared following the same protocol, this should not affect comparative trends. Moreover, the use of a prior dehydration and embedding is essential to enable the control of the experimental environment (Lewis and Nyman, 2008). From the infrared spectrum, the bands corresponding to MMA seemed to be more intense in young BSUs, suggesting a differential infusion of the resin depending on the DMB. We assume that the effects on the infrared results are minors as we corrected each spectrum by the MMA trace, but this could introduce some noise in the correlations between mechanical variables and FTIRM variables.

It would be interesting to repeat these experiments in an environment mimicking the physiologic one (constant controlled temperature, hydrated state). However, our experimental setup did not allow such analyses. Diez-Perez et al. (2010) have recently reported on an indentation technique *in vivo*, so-called ‘reference point indentation (RPI)’, allowing measurement of bone tissue toughness. Using this technology, the authors highlighted significant changes in

micromechanical behavior between fractured and non-fractured patients (Diez-Perez et al., 2010). *In vivo* indentation is well adapted to test parameters reflecting the whole tissue mechanical behavior while our approach allows to mechanically test bone at structural unit level, formed during a bone remodeling cycle. To our knowledge, it is not possible to study such a level of organization with RPI, *in vivo*. It would be thus of interest to perform our analysis in similar patient groups on fresh samples, *ex vivo* (unembedded, hydrated) to study how our parameters could reflect the fracture risk as assessed with *in vivo* indentation testing.

Moreover, the values of indentation modulus assume an isotropic, elastic–plastic behavior of bone tissue with a defined Poisson’s ratio ($\nu = 0.3$). Although it is known that bone tissue has a more complex behavior, unfortunately this technique requires such an assumption. Indeed, as observed during the 10 s holding segment from load–displacement curves, bone exhibits a viscous behavior. This has not been taken into account in our analysis but we believe this will not affect the trends highlighted in this study.

5. Conclusions

The combination of microradiography, Fourier transform infrared microspectroscopy and nanoindentation is a valuable tool to characterize, at BSU level, both the micromechanical properties and the quality of mineral and organic components of bone matrix. In cortical bone from patients suffering from postmenopausal osteoporosis, interactions between mechanical parameters reflecting elastic and plastic deformations and a multiscale definition of matrix quality were obtained. This model supported the idea of a link between elastic properties and mineral content and between plastic behavior and collagen maturity at osteon level.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Dr. Delphine Farlay for helpful discussions and comments during the preparation of the manuscript; and Anne-Sophie Bravo Martin for her technical expertise and assistance.

REFERENCES

- Amprino, R., 1958. Investigations on some physical properties of bone tissue. *Acta Anat.* 34, 161–186.
- Ascenzi, A., Bonucci, E., 1968. The compressive properties of single osteons. *Anat. Rec.* 161, 377–391.
- Bala, Y., Farlay, D., Delmas, P.D., Meunier, P.J., Boivin, G., 2010. Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone* 46, 1204–1212.
- Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L.G., Meunier, P.J., Delmas, P.D., 2008. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* 43, 532–538.
- Boivin, G., Farlay, D., Bala, Y., Doublier, A., Meunier, P.J., Delmas, P.D., 2009. Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporosis Int.* 20, 1023–1026.

- 1 Boivin, G., Meunier, P.J., 2002. The degree of mineralization of
2 bone tissue measured by computerized quantitative contact
3 microradiography. *Calcif. Tissue Int.* 70, 503–511.
- 4 Burket, J., Gourion-Arsiquaud, S., Havill, L.M., Baker, S.P., Boskey,
5 A.L., van der Meulen, M.C.H., 2011. Microstructure and
6 nanomechanical properties in osteons relate to tissue and
7 animal age. *J. Biomech.* 44, 277–284.
- 8 Bushby, A.J., Ferguson, V.L., Boyde, A., 2004. Nanoindentation of
9 bone: comparison of specimens tested in liquid and embedded
10 in polymethylmethacrylate. *J. Mater. Res.* 19, 249–259.
- 11 Carden, A., Morris, M.D., 2000. Application of vibrational
12 spectroscopy to the study of mineralized tissues (review).
13 *J. Biomed. Opt.* 5, 259–268.
- 14 Carlstrom, D., 1954. Micro-hardness measurements on single
15 haversian systems in bone. *Experientia* 10, 171–172.
- 16 Cheng, Y.-T., Cheng, C.-M., 1998. Relationships between hardness,
17 elastic modulus, and the work of indentation. *Appl. Phys. Lett.*
18 73, 614–616.
- 19 Cowin, S.C., 2001. *Bone Mechanics Handbook*, 2nd ed. CRC Press
20 LLC, Boca Raton, FL.
- 21 Currey, J.D., 2003. Role of collagen and other organics in the
22 mechanical properties of bone. *Osteoporosis Int.* 14, S29–S36.
- 23 Dall’Ara, E., Ohman, C., Baleani, M., Viceconti, M., 2007. The effect
24 of tissue condition and applied load on Vickers hardness of
25 human trabecular bone. *J. Biomech.* 40, 3267–3270.
- 26 Diez-Perez, A., Güerri, R., Nogues, X., Cáceres, E., Pena, M.J.,
27 Mellibovsky, L., Randall, C., Bridges, D., Weaver, J.C., Proctor,
28 A., Brimer, D., Koester, K.J., Ritchie, R.O., Hansma, P.K., 2010.
29 Microindentation for in vivo measurement of bone tissue
30 mechanical properties in humans. *J. Bone Miner. Res.* 25,
31 1877–1885.
- 32 Donnelly, E., Baker, S.P., Boskey, A.L., van der Meulen, M.C.,
33 2006. Effects of surface roughness and maximum load on
34 the mechanical properties of cancellous bone measured by
35 nanoindentation. *J. Mater. Res. Part A* 77, 426–435.
- 36 Evans, G.P., Behiri, J.C., Currey, J.D., Bonfield, W., 1990. Microhard-
37 ness and Young’s modulus in cortical bone exhibiting a wide
38 range of mineral volume fractions, and in bone analogue.
39 *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1, 38–43.
- 40 Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H., Weaver, J.C., Birkedal, H.,
41 Pechenik, L., Cutroni, J.A., Cidade, G.A.G., Stucky, G.D., Morse,
42 D.E., Hansma, P.K., 2005. Sacrificial bonds and hidden length
43 dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone
44 fracture. *Nat. Mater.* 4, 612–616.
- 45 Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P.D., Boivin, G.,
46 2010. Mineral maturity and crystallinity index are distinct
47 characteristics of bone mineral. *J. Bone Miner. Metab.* 28,
48 433–445.
- 49 Ferguson, V.L., 2009. Deformation partitioning provides insight
50 into elastic, plastic, and viscous contributions to bone material
51 behavior. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2, 364–374.
- 52 Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C., Meunier, P.J., 2004. The degree
53 of mineralization is a determinant of bone strength: a study on
54 human calcanei. *Bone* 34, 783–789.
- 55 Fratzl, P., Gupta, H.S., Paschalis, E.P., Roschger, P., 2004. Structure
56 and mechanical quality of the collagen-mineral nano-
57 composite in bone. *J. Mater. Chem.* 14, 2115–2123.
- 58 Fratzl, P., Weinkamer, R., 2007. Nature’s hierarchical materials.
59 *Prog. Mater. Sci.* 52, 1263–1334.
- 60 Giraudguille, M.M., 1988. Twisted plywood architecture of collagen
61 fibrils in human compact-bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* 42,
62 167–180.
- 63 Gupta, H.S., Wagermaier, W., Zickler, G.A., Aroush, D.R.B., Funari,
64 S.S., Roschger, P., Wagner, H.D., Fratzl, P., 2005. Nanoscale
65 deformation mechanisms in bone. *Nano Lett.* 5, 2108–2111.
- 66 Hadjidakis, D.J., Androulakis II, 2006. Bone remodeling. *Ann. New*
67 *York Acad. Sci.* 1092, 385–396.
- Hengsberger, S., Kulik, A., Zysset, P., 2001. A combined
atomic force microscopy and nanoindentation technique to
investigate the elastic properties of bone structural units. *Eur.*
Cells Mater. 1, 12–17.
- Hengsberger, S., Kulik, A., Zysset, P., 2002. Nanoindentation
discriminates the elastic properties of individual human bone
lamellae under dry and physiological conditions. *Bone* 30,
178–184.
- Hoc, T., Henry, L., Verdier, M., Aubry, D., Sedel, L., Meunier, A.,
2006. Effect of microstructure on the mechanical properties of
Haversian cortical bone. *Bone* 38, 466–474.
- Hodgskinson, R., Currey, J.D., Evans, G.P., 1989. Hardness, an
indicator of the mechanical competence of cancellous bone.
J. Orthop. Res. 7, 754–758.
- Hoffler, C.E., Guo, X.E., Zysset, P.K., Goldstein, S.A., 2005. An
application of nanoindentation technique to measure bone
tissue Lamellae properties. *J. Biomech. Eng.* 127, 1046–1053.
- Isaksson, H., Malkiewicz, M., Nowak, R., Helminen, H.J., Jurvelin,
J.S., 2010. Rabbit cortical bone tissue increases its elastic
stiffness but becomes less viscoelastic with age. *Bone* 47,
1030–1038.
- Johnson, K.L., 1985. *Normal Contact of Elastic Solids: Hertz*
Theory, Contact Mechanics. Cambridge University Press,
Cambridge, UK.
- Landis, W.J., 1995. The strength of a calcified tissue depends
in part on the molecular structure and organization of its
constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 16,
533–544.
- Launey, M.E., Buehler, M.J., Ritchie, R.O., 2010. On the mechanistic
origins of toughness in bone. *Annu. Rev. Mater. Res.* 40, 25–53.
- Lewis, G., Nyman, J.S., 2008. The use of nanoindentation for
characterizing the properties of mineralized hard tissues:
state-of-the art review. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 87,
286–301.
- Marotti, G., Lees, , Reeve, , 1993. A new theory of bone lamellation.
Calcif. Tissue Int. 53, S47–S56.
- Mulder, L., Koolstra, J.H., den Toonder, J.M.J., van Eijden, T.,
2008. Relationship between tissue stiffness and degree of
mineralization of developing trabecular bone. *J. Biomed. Mater.*
Res. Part A 84A, 508–515.
- Oliver, W.C., Pharr, G.M., 1992. An improved technique for
determining hardness and elastic modulus. *J. Mater. Res.* 7,
1564–1583.
- Oyen, M.L., 2006. Nanoindentation hardness of mineralized
tissues. *J. Biomech.* 39, 2699–2702.
- Oyen, M.L., Cook, R.F., 2003. Load-displacement behavior during
sharp indentation of viscous-elastic-plastic materials. *J. Mater.*
Res. 18, 139–150.
- Oyen, M.L., Cook, R.F., 2009. A practical guide for analysis of
nanoindentation data. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2,
396–407.
- Oyen, M.L., Ko, C.C., 2007. Examination of local variations in
viscous, elastic, and plastic indentation responses in healing
bone. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 623–628.
- Paschalis, E.P., DiCarlo, E., Betts, F., Sherman, P., Mendelsohn, R.,
Boskey, A.L., 1996. FTIR microspectroscopic analysis of human
osteonal bone. *Calcif. Tissue Int.* 59, 480–487.
- Recker, R., Lappe, J., Davies, K., Heaney, R., 2004. Bone remodeling
increases substantially in the years after menopause and
remains increased in older osteoporosis patients. *J. Bone*
Miner. Res. 19, 1628–1633.
- Reilly, D.T., Burstein, A.H., 1975. The elastic and ultimate
properties of compact bone tissue. *J. Biomech.* 8, 393–405.
- Rho, J.Y., Kuhn-Spearing, L., Zioupos, P., 1998. Mechanical
properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng.*
Phys. 20, 92–102.
- Roschger, P., Paschalis, E.P., Fratzl, P., Klaushofer, K., 2008. Bone
mineralization density distribution in health and disease.
Bone 42, 456–466.

- 1 Sakai, M., 1999. The Meyer hardness: a measure for plasticity. 19
2 J. Mater. Res. 14, 3630-3639. 20
- 3 Smith, L.J., Schirer, J.P., Fazzalari, N.L., 2010. The role of mineral 21
4 content in determining the micromechanical properties of 22
5 discrete trabecular bone remodeling packets. J. Biomech. 43, 23
6 3144-3149. 24
- 7 Svensson, R.B., Hassenkam, T., Hansen, P., Magnusson, S.P., 25
8 2010. Viscoelastic behavior of discrete human collagen fibrils. 26
9 J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 3, 112-115. 27
- 10 Tai, K., Qi, H.J., Ortiz, C., 2005. Effect of mineral content on 28
11 the nanoindentation properties and nanoscale deformation 29
12 mechanisms of bovine tibial cortical bone. J. Mater. Sci. Mater. 30
13 Med. 16, 947-959. 31
- 14 Thompson, J.B., Kindt, J.H., Drake, B., Hansma, H.G., Morse, D.E., 32
15 Hansma, P.K., 2001. Bone indentation recovery time correlates 33
16 with bond reforming time. Nature 414, 773-776. 34
- 17 van der Rijt, J.A., van der Werf, K.O., Bennink, M.L., Dijkstra, P.J., 35
18 Feijen, J., 2006. Micromechanical testing of individual collagen 36
fibrils. Macromol. Biosci. 6, 697-702. 37
- Wang, X., Li, X., Bank, R.A., Agrawal, C.M., 2002. Effects of collagen 19
unwinding and cleavage on the mechanical integrity of the 20
collagen network in bone. Calcif. Tissue Int. 71, 186-192. 21
- Weaver, J.K., 1966. The microscopic hardness of bone. J. Bone Joint 22
Surg. Am. 48, 273-288. 23
- Weiner, S., Traub, W., Wagner, H.D., 1999. Lamellar bone: 24
structure-function relations. J. Struct. Biol. 126, 241-255. 25
- Yerramshetty, J.S., Akkus, O., 2008. The associations between 26
mineral crystallinity and the mechanical properties of human 27
cortical bone. Bone 42, 476-482. 28
- Zioupou, P., Currey, J.D., Hamer, A.J., 1999. The role of collagen in 29
the declining mechanical properties of aging human cortical 30
bone. J. Biomed. Mater. Res. 45, 108-116. 31
- Zysset, P.K., 2009. Indentation of bone tissue: a short review. 32
Osteoporosis Int. 20, 1049-1055. 33
- Zysset, P.K., Guo, X.E., Hoffler, C.E., Moore, K.E., Goldstein, S.A., 34
1999. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular 35
bone lamellae measured by nanoindentation in the human 36
femur. J. Biomech. 32, 1005-1012. 37

Effects of Preexisting Microdamage, Collagen Cross-Links, Degree of Mineralization, Age, and Architecture on Compressive Mechanical Properties of Elderly Human Vertebral Trabecular Bone

Helene Follet,¹ Stéphanie Viguet-Carrin,¹ Brigitte Burt-Pichat,¹ Baptiste Dépalle,¹ Yohann Bala,¹ Evelyne Gineyts,¹ Françoise Munoz,¹ Monique Arlot,¹ Georges Boivin,¹ Roland D. Chapurlat,¹ Pierre D. Delmas,¹ Mary L. Bouxsein²

¹INSERM U831, University of Lyon, Lyon F-69008, France, ²Orthopedic Biomechanics Laboratory, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Received 15 March 2010; accepted 2 September 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.21275

ABSTRACT: Previous studies have shown that the mechanical properties of trabecular bone are determined by bone volume fraction (BV/TV) and microarchitecture. The purpose of this study was to explore other possible determinants of the mechanical properties of vertebral trabecular bone, namely collagen cross-link content, microdamage, and mineralization. Trabecular bone cores were collected from human L2 vertebrae ($n = 49$) from recently deceased donors 54–95 years of age (21 men and 27 women). Two trabecular cores were obtained from each vertebra, one for preexisting microdamage and mineralization measurements, and one for BV/TV and quasi-static compression tests. Collagen cross-link content (PYD, DPD, and PEN) was measured on surrounding trabecular bone. Advancing age was associated with impaired mechanical properties, and with increased microdamage, even after adjustment by BV/TV. BV/TV was the strongest determinant of elastic modulus and ultimate strength ($r^2 = 0.44$ and 0.55 , respectively). Microdamage, mineralization parameters, and collagen cross-link content were not associated with mechanical properties. These data indicate that the compressive strength of human vertebral trabecular bone is primarily determined by the amount of trabecular bone, and notably unaffected by normal variation in other factors, such as cross-link profile, microdamage and mineralization. © 2010 Orthopaedic Research Society Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res*

Keywords: bone strength; microdamage; microarchitecture; mineralization; collagen cross-links; vertebral trabecular bone

Several studies have shown that the mechanical properties of trabecular bone are influenced by bone volume fraction (BV/TV) and microarchitecture.^{1,2} However, additional factors, such as degree of mineralization, pre-existing microdamage, and collagen cross-link profile may also play a role, yet the contribution of these factors to human trabecular bone mechanical properties remains incompletely understood.

Increased mineralization of cortical bone is exponentially related to increased stiffness, but decreased energy absorption.³ A similar trend was seen in human trabecular bone from the calcaneus, with a positive relationship between mineralization and elastic modulus, after adjusting for BV/TV.⁴ It has also been suggested that a reduction in the heterogeneity of mineralization density distribution leads to increased bone fragility,⁵ but there are few data to support this assertion.

Microdamage has been largely studied in animal models and in human cortical bone, with only a few studies reporting microdamage in human trabecular bone either naturally occurring^{6–11} or due to loading ex-vivo.¹² In cortical bone, microdamage accumulation leads to decreased mechanical properties,^{13,14} and therefore has been implicated in skeletal fragility and stress fractures.¹⁵ However, the association between microdamage and cortical bone fracture toughness was weak,¹⁶ raising questions as to the role of microdamage in cortical bone. Increased microdamage has also been associated with decreased strength in human vertebral cancellous bone,^{12,13} however, Allen and Burr reported that in dogs treated with bisphosphonates, vertebral

mechanical properties were unrelated to microdamage levels.¹⁷ Thus, the contribution of microdamage to bone mechanical properties remains controversial. Recently, it has been suggested that microdamage levels and morphology may reflect alterations in collagen cross-linking.¹⁸ Altogether, the relationships between in vivo microdamage and the mechanical behavior of vertebral trabecular bone remain ill-defined.

Collagen characteristics have also been shown to contribute to bone mechanical properties, often independently of bone mass and density.^{19,20} In vivo, collagen cross-link abnormalities have been shown to contribute to skeletal fragility in studies using lathyric model, which is deficient in immature enzymatic and mature trivalent enzymatic cross-links, and in individuals suffering of mild hyperhomocysteinemia, who are thought to be deficient in enzymatic cross-links.^{21,22} Furthermore, in vitro models showed that both enzymatic pyridinoline (PYD) and deoxypyridinoline (DPD) and the nonenzymatic advanced glycation end products (AGEs) contribute to bone mechanical behavior.^{23–27} Whereas the content of PYD and DPD in bone matrix were related to bone strength in the lathyric model, in ex vivo studies, the role of these enzymatic cross-links remains unclear.^{25,26,28,29} In comparison, the accumulation AGEs such as pentosidine (PEN) in the bone matrix is consistently associated with impairment of the postyield properties of trabecular and cortical bone.^{24,25,29,30} Few of these studies were performed on human trabecular bone, thus the role of collagen cross-links on trabecular bone mechanical behavior remains unknown.

Altogether, the determinants of vertebral trabecular bone mechanical properties are not completely known.

Correspondence to: Helene Follet (T: 33-4-78-78-57-26; F: 33-4-78-77-86-63; E-mail: helene.follet@inserm.fr)



Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes

Yohann Bala^{*}, Delphine Farlay, Pierre D. Delmas[†], Pierre J. Meunier, Georges Boivin

INSERM Unité 831, Faculté de Médecine Laennec, 69372 Lyon Cedex 08, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2009

Revised 24 November 2009

Accepted 26 November 2009

Available online 5 December 2009

Edited by: R. Rizzoli

Keywords:

Bone mineralization

Vickers microhardness

FTIRM

Degree of mineralization of bone

Ewe

ABSTRACT

Bone mineral is a major determinant of the mechanical resistance of bones. In bone structural units (BSUs), mineralization of osteoid tissue begins with a rapid primary mineralization followed by a secondary mineralization phase, i.e., a slow and gradual maturation of the mineral component leading to complete mineralization during an unknown period. The aim of this study was to determine the chronology of secondary bone mineralization in ewes, an animal model with a remodeling activity close to humans. Eighteen ewes received different fluorescent labels every 6 months to date the “age” of each labeled BSU. The degree of mineralization of bone (DMB) and Vickers microhardness were measured in labeled BSUs, while mineralization at the crystal level was assessed by Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM). During the first 6 months of mineralization, degree of mineralization and microhardness significantly increased. They then increased more slowly until at 30 months they reach their maximal values. This progression during secondary mineralization was associated with an improvement of both the maturation and the crystal perfection of the mineral part of bone matrix. Finally, secondary mineralization in BSUs is completed after a period of 30 months. This observation should be taken into account for understanding the effects of long-term treatments of bone diseases.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Bone tissue is a composite material made up of an organic matrix in which a mineral phase is deposited and then undergoes a gradual maturation of its components. Bone strength depends on various variables such as bone mass and microarchitecture, but also bone quality [1]. Among the properties reflecting bone quality, mineralization is a major determinant of bone stiffness and maximal strength, but is inversely related to toughness [2,3]. In humans, bones are shaped or reshaped during growth by a mechanism of modeling which is distinguished from bone remodeling by the fact that bone formation is not coupled to prior bone resorption. In humans, as in many animals, bone tissue undergoes a cyclic mechanism of bone remodeling in which bone formation follows a prior bone resorption, resulting in the formation of bone structural units (BSU). This maintains its mechanical properties and contributes to calcium and phosphorous homeostasis. Bone formation is a multistep process. First, the organic matrix (osteoid) is synthesized and laid down at specific sites. Second, the new matrix begins to mineralize about 5–10 days from the time of deposition [4,5].

Mineralization of the bone matrix involves two successive steps: a rapid primary mineralization, on the mineralization front, followed by a slow process of secondary mineralization [5–8]. Primary mineralization is defined as a step during which 50% to 70% of the maximal mineralization is reached within a few days [5,9,10]. Secondary mineralization is considered as a slow and gradual maturation of the mineral component, including an increase in the amount of crystals and an increase of crystal size, i.e., an increase of crystal perfection [4,8]. After the achievement of secondary mineralization, the maximal level of mineralization, corresponding to the upper physiological limit of the mineral content at the tissue level, is reached.

At the BSU level in human bone tissue there is heterogeneity in the degree of mineralization between BSUs [9–12]. This heterogeneity reflects the activity of bone remodeling, which is asynchronous in bone tissue and explains the presence of BSUs of various ages and so presenting various degrees of mineralization. In the case of an increased bone turnover, the lifespan of the BSUs is shortened because they do not have enough time to complete their secondary mineralization before being resorbed by a new remodeling sequence [9,13,14]. In contrast, when the bone remodeling rate is reduced, the lifespan of the BSU is prolonged and then the degree of mineralization may reach its highest level [10,12,14].

The chronology of primary mineralization, measured at the calcification front using tetracycline double labeling, has been described in humans and several animal models. Its duration can be from a few days to less than 3 months [10,15]. In contrast, the duration

^{*} Corresponding author. Fax: +33 4 78 77 86 63.

E-mail addresses: yohann.bala@sante.univ-lyon1.fr (Y. Bala), delphine.farlay@sante.univ-lyon1.fr (D. Farlay), pierre.meunier@sante.univ-lyon1.fr (P.J. Meunier), georges.boivin@sante.univ-lyon1.fr (G. Boivin).

[†] Pierre Delmas died on July 23, 2008.

Circulating Fibronectin Affects Bone Matrix, Whereas Osteoblast Fibronectin Modulates Osteoblast Function

Anke Bentmann,^{1,2} Nina Kawelke,^{1,2} David Moss,³ Hanswalter Zentgraf,⁴ Yohann Bala,⁵ Irina Berger,⁶ Juerg A Gasser,⁷ and Inaam A Nakchbandi^{1,2}

¹Max-Planck Institute for Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany

²Institute for Immunology, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany

³Research Center Karlsruhe, ANKA Facility, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

⁴Electron Microscopy, German Cancer Research Center, 69120 Heidelberg, Germany

⁵INSERM Unit 831, University of Lyon, Faculty of Medicine R. Laennec, 69372 Lyon Cedex 08, France

⁶Pathology Institute, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany

⁷Novartis Institutes for Biomedical Research, Musculoskeletal Diseases, 4002 Basel, Switzerland

ABSTRACT

The bone matrix is composed mostly of collagen, but the initial and continuous presence of fibronectin was found to be crucial for collagen matrix integrity in vitro. It has been assumed that osteoblasts produce the fibronectin required for bone matrix formation. Using transgenic mice, we conditionally deleted fibronectin in the osteoblasts and in the liver using the *cre-loxP* system. We also used mice with mutated fibronectin and conditionally deleted β_1 -integrin in osteoblasts to identify the receptor involved in fibronectin effects on osteoblasts. Conditional deletion of fibronectin in the differentiating osteoblasts [using the 2.3 kb collagen- $\alpha 1(I)$ promoter] failed to show a decrease in fibronectin amount in the bone matrix despite evidence of successful deletion. Using these mice we established that osteoblast-derived fibronectin solely affects osteoblast function. This effect was not mediated by integrins that bind to the *RGD* motif. Conditional deletion of fibronectin in the liver showed a marked decrease in fibronectin content in the matrix associated with decreased mineral-to-matrix ratio and changed biomechanical properties but had no effect on osteoblasts or osteoclasts. In conclusion, osteoblast fibronectin affects osteoblasts function. This does not seem to be mediated by the *RGD* motif on fibronectin. In contrast, liver-derived fibronectin affects bone matrix properties without affecting osteoblast or osteoclast function. A novel role for liver-derived circulating fibronectin thus was defined and delineated from that of locally produced fibronectin. © 2010 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: FIBRONECTIN; OSTEOBLAST; LIVER; BONE MATRIX; BONE FORMATION

Introduction

The extracellular matrix of bone is the scaffold on which mineral is deposited.⁽¹⁾ The osteoblasts lay down the extracellular matrix and then mineralize it, which results in new bone formation.^(2,3) The most abundant protein in the extracellular matrix is collagen type I, which comprises up to 90% of the proteinaceous matrix.⁽²⁾ Collagen type I is secreted as triple helices, which then assemble to form fibrils and fibers.^(2,4) This is not, as originally thought, a self-assembly process. In vitro studies had shown a key role for fibronectin (FN), a protein found in small amounts in bone matrix, in the assembly of collagen.⁽⁵⁾ Fibroblasts unable to produce FN and cultured in the absence of FN failed to assemble collagen unless FN was added to the

medium.⁽⁴⁾ Furthermore, it was shown that not only is FN needed during the initial steps of the polymerization of collagen, but the continuous presence of FN is also required for the integrity of the matrix.⁽⁶⁾ The importance of FN in collagen matrix assembly suggests that its absence results in matrix defects resembling those seen in osteogenesis imperfecta. This disease is caused by either quantitative or qualitative abnormalities in collagen type I resulting in abnormal matrix formation, and its severity ranges from stillbirth owing to multiple fractures to osteoporosis in adulthood.⁽⁷⁾

Osteoblasts produce FN during proliferation and differentiation at the same time that they produce collagen type I, which implies that the osteoblasts are responsible for the provision of FN during active bone formation.⁽⁵⁾ The source of continuous FN

Received in original form January 15, 2009; revised form August 11, 2009; accepted October 9, 2009. Published online October 12, 2009.

Address correspondence to: Inaam A Nakchbandi, MD, FACP, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 305, 2. OG, 69120 Heidelberg, Germany

E-mail: inaam.nakchbandi@urz.uni-heidelberg.de

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 25, No. 4, April 2010, pp 706–715

DOI: 10.1359/jbmr.091011

© 2010 American Society for Bone and Mineral Research

Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue

G. Boivin · D. Farlay · Y. Bala · A. Doublier ·
P. J. Meunier · P. D. Delmas

Published online: 2 April 2009

© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2009

The dynamics of mineralization

To better understand the mechanisms of action of therapies that reduce the risk of fracture, increase bone mineral density, or change the biochemical markers of remodeling, it is necessary not only to analyze their tissue and cellular effects on bone remodeling, bone mass, and microarchitecture but also to discuss their influence on bone mineralization, one of the major parameters reflecting bone quality [1].

Mineralization is known to vary over microscopic regions, with age of the bone structural units (BSUs), the recently deposited ones being much less calcified than the older ones (Fig. 1). During bone remodeling, after bone resorption, bone formation is a multi-step process. Following its deposition, the new matrix begins to mineralize after about 5 to 10 days from the time of deposition and the linear rate of this *primary mineralization* can be measured directly in vivo using double tetracycline labeling. After full completion of the BSUs (osteons in cortical bone or cancellous packets), a *secondary mineralization* begins. This process consists of a slow and gradual maturation of the mineral component, including an increase in the number of crystals and/or an augmentation of crystal size toward their maximum dimensions and/or an increase of the perfection at crystal level [2–4]. The secondary mineraliza-

tion progressively augments the mineral content of bone matrix deposited during primary mineralization, the latter phase representing only about 50 % of the maximum degree of mineralization (DMB) obtained at the end of the secondary mineralization phase [3, 5, 6]. Recent studies [7] in a ewe model—whose bone remodeling rate is similar to that in humans—show that secondary mineralization lasts approximately for 24 to 30 months. This could mean that, beyond 3 years of use of an anti-osteoporotic treatment, the secondary mineralization does not increase.

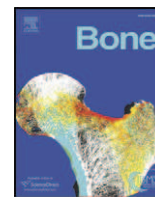
Bone mineralization influences the mechanical strength of bone tissue [8, 9] and its contribution to bone microhardness is well known [4]. The heterogeneity index of mineralization also influences bone strength. A homogenization of the mineralization makes the bone tissue more brittle [5].

Bone mineralization and microhardness in humans: reference values

Contact microradiography of 100- μ m-thick bone sections was performed [3, 4] using an X-ray diffraction unit PW 1830/40 equipped with a diffraction tube PW 2273/20 (Philips, Limeil Brévannes, France). The nickel-filtered copper K α radiation was used under 25 kV and 25 mA. The mineralization of bone is quantified using a microdensitometry computerized method and automated analyses of gray levels are used (MorphoExpert and Mineralization, ExploraNova, La Rochelle, France). A digital camera (pixel size, 2.83 μ m at $\times 2.5$) captures the microscopic image of the microradiograph; the values of the gray levels are obtained at the pixel level, and they are converted into DMB values expressed in gram per cubic centimeter. Measured separately in cortical, cancellous, and total (cortical + cancellous) bone

Data presented at the Third Meeting on Bone Quality, France, 24–25 June 2008: Bone Ultrastructure

G. Boivin (✉) · D. Farlay · Y. Bala · A. Doublier · P. J. Meunier ·
P. D. Delmas
INSERM Unité 831, Université de Lyon,
Faculté de Médecine R. Laennec,
69372 Lyon, Cedex 08, France
e-mail: Georges.Boivin@sante.univ-lyon1.fr



The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients

G. Boivin^{a,*}, Y. Bala^a, A. Doublier^a, D. Farlay^a, L.G. Ste-Marie^b, P.J. Meunier^a, P.D. Delmas^a

^a INSERM Unité 831, Université de Lyon, Faculté de Médecine R. Laennec, Lyon, France

^b Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc, Université de Montréal, Montréal, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2008

Revised 27 May 2008

Accepted 28 May 2008

Available online 10 June 2008

Edited by: Rene Rizzoli

Keywords:

Microhardness

Bone mineralization

Osteoporosis

Vickers indentation

Quantitative microradiography

ABSTRACT

Degree of mineralization of bone (DMB) is a major intrinsic determinant of bone strength at the tissue level but its contribution to the microhardness (Vickers indentation) at the intermediary level of organization of bone tissue, i.e., Bone Structural Units (BSUs), has never been assessed. The purpose of this study was to analyze the relationship between the microhardness, the DMB and the organic matrix, measured in BSUs from human iliac bone biopsies. Iliac bone samples from controls and osteoporotic patients (men and women), embedded in methyl methacrylate, were used. Using a Vickers indenter, microhardness (kg/mm^2) was measured, either globally on surfaced blocks or focally on $100\ \mu\text{m}$ -thick sections from bone samples (load of 25 g applied during 10 sec; CV=5%). The Vickers indenter was more suited than the Knoop indenter for a tissue like bone in which components are diversely oriented. Quantitative microradiography performed on $100\ \mu\text{m}$ -thick sections, allowed measurement of parameters reflecting the DMB (g/cm^3). Assessed on the whole bone sample, both microhardness and DMB were significantly lower ($\sim 10\%$ and $\sim 7\%$, respectively) in osteoporotic patients versus controls ($p < 0.001$). When measured separately at the BSU level, there were significant positive correlations between microhardness and DMB in controls ($r^2 = 0.36$, $p < 0.0001$) and osteoporotic patients ($r^2 = 0.43$, $p < 0.0001$). Mineralization is an important determinant of the microhardness, but did not explain all of its variance. To highlight the role of the organic matrix in bone quality, microhardness of both osteoid and adjacent calcified matrix were measured in iliac samples from subjects with osteomalacia. Microhardness of organic matrix is 3-fold lower than the microhardness of calcified tissue. In human calcanei, microhardness was significantly correlated with DMB ($r^2 = 0.33$, $p = 0.02$) and apparent Young's modulus ($r^2 = 0.26$, $p = 0.03$). In conclusion, bone microhardness measured by Vickers indentation is an interesting methodology for the evaluation of bone strength and its determinants at the BSU level. Bone microhardness is linked to Young's modulus of bone and is strongly correlated to mineralization, but the organic matrix accounts for about one third of its variance.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Bone strength is influenced by a number of different determinants, in addition to mass, size, geometry and microarchitecture, bone strength is also influenced by the intrinsic material properties of the tissue. These include the mineralization of bone and the characteristics of the organic matrix (orientation and chemical structure of the collagen fibers), the accumulation of microdamage, and indirectly the apoptosis of osteocytes [1–4]. Bone “quality” is profoundly influenced by the rate of bone turnover [5]. The major role of mineralization has been emphasized by the fact that fracture risk and bone mineral density were changed in osteoporotic patients treated with antiresorptive agents, without modifications of bone

matrix volume or bone microarchitecture. This was largely, if not totally, due to modifications of the duration of secondary mineralization [6–13].

The degree of mineralization of bone (DMB) not only influences the mechanical resistance of bone [14] but also partly determines the bone mineral density [6]. From microradiographic observations [15–17], it is clear that DMB varies over bone structural units (BSUs, namely the osteons in cortical bone and the trabecular packets in cancellous bone), with the recently deposited ones being much less mineralized than the older ones (Fig. 1). This heterogeneity in the DMB is explained by the fact that bone formation, which follows bone resorption in the remodeling sequence is a multi-step process. Following its deposition, the new matrix begins to mineralize after about 5 to 10 days from the time of deposition, and the linear rate of this primary mineralization can be measured directly *in vivo* using double tetracycline labeling. After full completion of the BSUs, a phase of secondary mineralization begins [16–18]. This process consists of a slow and gradual maturation of the mineral component, including an

* Corresponding author. INSERM Unité 831, Université de Lyon, Faculté de Médecine R. Laennec, 69372 Lyon Cedex 08, France. Fax: +33 4 78 77 86 63.

E-mail address: Georges.Boivin@sante.univ-lyon1.fr (G. Boivin).

An *in vitro* model to test the contribution of advanced glycation end products to bone biomechanical properties

S. Viguet-Carrin^a, D. Farlay^a, Y. Bala^a, F. Munoz^a, M.L. Bouxsein^b, P.D. Delmas^{a,*}

^a INSERM Research Unit 831 University of Lyon, Lyon, France

^b Orthopedic Biomechanics Laboratory, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Received 19 February 2007; revised 21 August 2007; accepted 29 August 2007

Available online 19 September 2007

Abstract

We developed an *in vitro* model which provides the ability to test the effects of advanced glycation end products (AGEs), specifically pentosidine (PEN) and one of its inhibitors, the aminoguanidine (AMG), on cortical bone. This model allows modification of the extent of collagen cross-linking, while controlling other factors known to influence bone strength. In this *in vitro* model, young bovine cortical bone specimens were incubated in phosphate-buffered saline (PBS)±ribose (RIB, an inducer of AGEs formation)±AMG for 15 days at 37 °C. The mineral and organic matrix as well as biomechanical properties were examined.

We found that (i) incubation±treatments did not induce collagen denaturation compared to specimens that were not incubated; (ii) neither treatment or incubation time effected the concentration of trivalent enzymatic cross-links pyridinoline and deoxypyridinoline. The non-enzymatic cross-link PEN was undetectable in specimens that were not incubated or that were incubated in PBS or AMG alone. However, PEN concentration increased significantly in specimens incubated with RIB, whereas ribose-induced PEN formation was markedly inhibited by AMG. (iii) Incubation±treatments did not change the mineral maturity, crystallinity or microhardness assessed by X-ray diffraction, X-ray microscopy analyses, FTIRM and micro-indentation tests. (iv) PEN concentration was not associated with biomechanical properties assessed by 3-point bending.

In conclusion, this *in vitro* incubation model of young bovine cortical bone induced physiologic concentrations of PEN in the RIB+AMG group and is the first to show that AMG inhibits ribose-induced formation of PEN cross-links in bone while not affecting the organic and mineral phases. AGE concentration did not influence bending mechanical properties; however, the simple 3-point bending test we used was likely inadequate to demonstrate effects of AGEs on mechanical properties.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bone strength; Enzymatic cross-links of collagen; Pentosidine; Aminoguanidine; Mineral

Introduction

In the extracellular matrix, collagen molecules undergo different modifications: (i) formation of trivalent mature cross-links (pyridinoline (PYD), deoxypyridinoline (DPD) and pyrrole) due to an enzymatic process resulting in a link between two telopeptides and the helix part of another collagen molecule and, (ii) formation of advanced glycation end products (AGEs) that result from a non-enzymatic process. Some of these AGEs form cross-link–crosslinks proteins such as pentosidine (PEN) [3,18,60]. Several studies have shown that intrinsic properties

of bone matrix, such as collagen characterization and micro-damage accumulation, may play an important role in the biomechanical properties of bone tissue [10,58,59,63]. However, the effect of each specific collagen cross-link on bone strength has not been fully characterized.

To study the contribution of collagen cross-links to bone strength, we developed an *in vitro* model using fetal bovine bone, in which the degree of maturation of collagen could be modified, while keeping the size and the mineral content of bone tissue constant [27]. Incubation of fetal bovine cortical bone specimens, characterized by a low concentration of collagen cross-links in PBS at 37 °C induced the maturation of collagen *in vitro*. We used this model to show that in fetal bovine bone, the increased formation of either the enzymatic (PYD, DPD) or the

* Corresponding author. Fax: +33 4 72117483.

E-mail address: delmas@lyon.inserm.fr (P.D. Delmas).

RESUME

L'ostéoporose ménopausique par une accélération du remodelage osseux, conduit à une masse osseuse basse et à des altérations de la microarchitecture, augmentant ainsi le risque de fracture. Les bisphosphonates diminuent l'activité du remodelage osseux en inhibant la résorption osseuse qui conduit à un maintien de la densité minérale osseuse et à une diminution du risque fracturaire. Ce traitement étant la plupart du temps chronique, l'étude de ses effets sur les différents niveaux d'organisation de l'os, du cristal à sa macrostructure, est primordiale. A travers deux études portant sur l'ibandronate et l'alendronate, nous avons montré que leur utilisation préservait la minéralisation osseuse tissulaire. Cependant, une utilisation prolongée (6,4 ans) de l'alendronate, nous a permis de mettre en évidence un mécanisme d'action impliquant des modifications de la structure des cristaux avec un effet sur les propriétés mécaniques locales. Si l'efficacité anti fracturaire de l'alendronate est démontrée après dix ans de traitement, nos résultats suggèrent des altérations de la qualité osseuse à une échelle plus locale.

TITLE: Multiscale study of the effects of bisphosphonates on bone quality in postmenopausal osteoporotic women

SUMMARY

Postmenopausal osteoporosis is characterized by an increase in remodelling activity leading to a low bone mass and alterations in microarchitecture, increasing the risk of fracture. Bisphosphonates slowdown remodeling inhibiting bone resorption, thus bone mineral density is preserved with a decrease in the risk of fracture. Such a treatment is often chronic, making the study of their long-term effects on multiscale bone quality (from the crystal to the macrostructure) of clinical relevance. Thank to two different studies on ibandronate and alendronate, we showed that these treatments preserved the mineralization of bone tissue. However, we firstly described that a long-term treatment with alendronate alter the structure of bone mineral crystals with a direct effect on micromechanical properties. Even if, the reduction in the risk of fracture under alendronate has been established after a ten year treatment, our results suggest alterations in bone quality at tissular and sub-tissular levels of organization.

DISCIPLINE Biologie Humaine

MOTS-CLES : Ostéoporose, Qualité osseuse, Bisphosphonates, Minéralisation, biomécanique.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM UMR 1033 « Physiopathologie, Diagnostic et Traitement des Maladies Osseuses »
Equipe « Qualité Osseuse et Marqueurs Biologiques »
Faculté de Médecine Lyon est (Domaine Laennec)
7-11 Rue Guillaume Paradin
69372 Lyon Cedex 08

RESUME

L'ostéoporose ménopausique par une accélération du remodelage osseux, conduit à une masse osseuse basse et à des altérations de la microarchitecture, augmentant ainsi le risque de fracture. Les bisphosphonates diminuent l'activité du remodelage osseux en inhibant la résorption osseuse qui conduit à un maintien de la densité minérale osseuse et à une diminution du risque fracturaire. Ce traitement étant la plupart du temps chronique, l'étude de ses effets sur les différents niveaux d'organisation de l'os, du cristal à sa macrostructure, est primordiale. A travers deux études portant sur l'ibandronate et l'alendronate, nous avons montré que leur utilisation préservait la minéralisation osseuse tissulaire. Cependant, une utilisation prolongée (6,4 ans) de l'alendronate, nous a permis de mettre en évidence un mécanisme d'action impliquant des modifications de la structure des cristaux avec un effet sur les propriétés mécaniques locales. Si l'efficacité anti fracturaire de l'alendronate est démontrée après dix ans de traitement, nos résultats suggèrent des altérations de la qualité osseuse à une échelle plus locale.

TITLE: Multiscale study of the effects of bisphosphonates on bone quality in postmenopausal osteoporotic women

SUMMARY

Postmenopausal osteoporosis is characterized by an increase in remodelling activity leading to a low bone mass and alterations in microarchitecture, increasing the risk of fracture. Bisphosphonates slowdown remodeling inhibiting bone resorption, thus bone mineral density is preserved with a decrease in the risk of fracture. Such a treatment is often chronic, making the study of their long-term effects on multiscale bone quality (from the crystal to the macrostructure) of clinical relevance. Thank to two different studies on ibandronate and alendronate, we showed that these treatments preserved the mineralization of bone tissue. However, we firstly described that a long-term treatment with alendronate alter the structure of bone mineral crystals with a direct effect on micromechanical properties. Even if, the reduction in the risk of fracture under alendronate has been established after a ten year treatment, our results suggest alterations in bone quality at tissular and sub-tissular levels of organization.

DISCIPLINE Biologie Humaine

MOTS-CLES : Ostéoporose, Qualité osseuse, Bisphosphonates, Minéralisation, biomécanique.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM UMR 1033 « Physiopathologie, Diagnostic et Traitement des Maladies Osseuses »
Equipe « Qualité Osseuse et Marqueurs Biologiques »
Faculté de Médecine Lyon est (Domaine Laennec)
7-11 Rue Guillaume Paradin
69372 Lyon Cedex 08