



**HAL**  
open science

# Effets de l'ostéogénèse imparfaite sur les propriétés mécaniques et minérales de l'os cortical chez l'enfant

Laurianne Imbert

► **To cite this version:**

Laurianne Imbert. Effets de l'ostéogénèse imparfaite sur les propriétés mécaniques et minérales de l'os cortical chez l'enfant. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2014. Français. NNT : 2014ECDL0042 . tel-01146241

**HAL Id: tel-01146241**

**<https://theses.hal.science/tel-01146241>**

Submitted on 28 Apr 2015

**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.

Numéro d'ordre : 2014-42

Année 2014

Thèse

présentée par

**Laurianne IMBERT**

en vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT**

de L'École Centrale Lyon

**Spécialité BIOMÉCANIQUE**

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie Civil, Acoustique (MEGA)

## **Effets de l'Ostéogénèse Imparfaite sur les propriétés mécaniques, structurales et minérales de l'os cortical chez l'enfant**

Soutenue le 16 décembre 2014 devant le jury d'examen :

P. CHABRAND, Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
H. PETITE, Professeur, Université Paris-Diderot	Rapporteur
P. JURDIC, Professeur, École Normale Supérieure de Lyon	Examinateur
G. BOIVIN, DR INSERM, Université de Lyon	Président du jury
S. AVRIL, Professeur, École des Mines de Saint-Etienne	Directeur de thèse
T. HOC, Professeur, École Centrale de Lyon	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes

UMR CNRS 5513

École Centrale Lyon



# Résumé

L'Ostéogénèse Imparfait (OI) est une maladie génétique dont une des conséquences est la fragilité accrue du squelette, lui valant ainsi le nom de « maladie des os de verre ». Il existe plusieurs phénotypes reflétant différents niveaux de sévérité, néanmoins certaines caractéristiques, comme une petite taille et des déformations des os longs, sont fréquemment observées en cas d'OI. Aujourd'hui peu de traitements existent et aucun n'est curatif. Avant d'espérer pouvoir en mettre un au point, il faut d'abord comprendre et quantifier les mécanismes impliqués et ces travaux de thèse s'inscrivent dans cette logique.

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer les effets de la pathologie sur le tissu osseux aux échelles macroscopique et tissulaire. L'intérêt majeur de ce travail est de faire une étude comparative entre un groupe d'échantillons provenant d'enfants souffrant d'OI et un groupe contrôle composé d'échantillons provenant d'enfants sains. Nous les avons comparés en termes de propriétés mécaniques, structurales et chimiques via l'utilisation de diverses techniques, à savoir la tomographie RX haute résolution, la nanoindentation, la spectroscopie Raman, la microscopie électronique à balayage, la corrélation d'images et des essais de compression. Afin d'étudier l'impact de cette maladie sur le remodelage osseux, nous avons également comparé l'activité ostéoclastique sur ces deux types de substrat par interférométrie. Ce travail de thèse avait aussi pour but d'appliquer la méthode des champs virtuels pour identifier les modules élastiques des zones interstitielle et ostéonale du tissu osseux.

Nous avons obtenu des informations importantes sur le fonctionnement de la maladie, notamment nous avons observé que la qualité du tissu, l'activité de remodelage et la microstructure étaient altérées en cas d'OI. Cette dégradation des os explique donc qu'ils puissent se déformer et se casser plus facilement.

**Mots clés :** Ostéogénèse Imparfait, propriétés mécaniques, propriétés minérales

# Abstract

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a genetic disorder, also known as the “brittle bone disease”, associated with an increased bone fragility. Several phenotypes exist, reflecting different severities but some features are frequently observed like a reduced stature and long bone deformities. A few treatments are currently used but none of them is curative. To improve those treatments there is a need for a better understanding of the mechanisms involved.

Therefore, the objective of this work is to investigate the effects of OI on the bone tissue at macroscopic and tissue scales. The main interest of this project is to perform a comparative study between a group of OI bones retrieved from children with OI and a group of control bones retrieved from healthy children. The mechanical, mineral and structural properties of those two groups were compared using high resolution computed tomography, nanoindentation, spectroscopy Raman, scanning electron microscopy, digital image correlation and compression testing. The osteoclast activity on those two types of substrates was compared by interferometry. Finally, the virtual fields method was applied to identify elastic moduli of interstitial and osteonal zones in bone tissue.

The tissue quality, the remodeling activity and the microstructure were altered in OI, those modifications can explain the increased fragility of OI bones.

**Keywords :** Osteogenesis Imperfecta, mechanical properties, mineral properties

# Remerciements

Me voilà au terme de mes trois années de thèse. Elles sont passées vite.

Ces trois années ont été très riches ; riches d'enseignements bien sûr mais également riches en rencontres. J'ai croisé la route de nombreuses personnes que je souhaite à présent remercier.

Mes premiers remerciements s'adressent à messieurs le Pr Patrick CHABRAND de l'institut des Sciences du Mouvement de l'université Aix-Marseille et le Pr Hervé PETITE, directeur du laboratoire B2OA de l'université Paris-Diderot, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également messieurs le Pr Pierre JURDIC responsable de l'équipe Biologie cellulaire et physiopathologie osseuse de l'IGFL à l'ENS Lyon et le Dr Georges BOIVIN, directeur de recherche INSERM à l'université de Lyon, d'avoir accepté d'être examinateurs. Je remercie messieurs les membres du jury d'avoir mis leur expertise au service de l'évaluation de ce travail de thèse. Je remercie aussi le Dr Georges BOIVIN de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Monsieur Frank DEBOUCK, directeur de l'Ecole Centrale Lyon, et à Monsieur Denis MAZUYER, directeur du Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes, qui m'ont permis de réaliser ma thèse au sein de ce laboratoire. Je remercie également Monsieur le Pr Hassan ZAHOUANI responsable du groupe Mécanique des Matériaux et Procédés et Monsieur le Pr Thierry HOC responsable de l'équipe Mécanique des Matériaux du Vivant dans laquelle j'ai pu réaliser ces travaux de thèse.

Je remercie beaucoup la région Rhône-Alpes et l'AOI (Association de l'Ostéogénèse Imparfait) pour leur soutien financier tout au long de cet ambitieux projet.

Je souhaite maintenant exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont accompagnée dans cet apprentissage de la recherche scientifique multidisciplinaire en commençant bien sûr par mes directeurs de thèse, Monsieur le Pr Thierry HOC du LTDS de l'Ecole Centrale de Lyon et Monsieur le Pr Stéphane AVRIL du LGF de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne, pour m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi intéressant qu'enrichissant. Je les remercie pour les méthodologies et les connaissances à l'interface de différentes disciplines que j'ai pu acquérir auprès d'eux, pour toutes ces discussions enrichissantes que nous avons partagées, pour leur motivation et leur rigueur scientifique ainsi que pour leur disponibilité. Je remercie Thierry pour ses conseils avisés, sa bienveillance au quotidien et la rapidité de ses

retours en période charnière de rédaction. Je remercie Stéphane pour la sympathie et l'attention dont il a fait preuve à chaque fois que j'ai sollicité son aide et qu'il m'a accueillie en terre Stéphanoise.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ces trois ans, je remercie le Dr Jean-Charles AUREGAN, du laboratoire B2OA de l'université Paris-Diderot, pour la collecte de tous les échantillons à l'hôpital Necker pour enfants de Paris, je remercie le Dr Kélig PERNELLE du LTDS pour son expertise sur la culture cellulaire et pour notre fructueuse collaboration, je remercie tous les ingénieurs IVTV (Catherine BOSSER, Benoît PONSARD, Ophélie POLLET et Guillaume FARGIER) ainsi que Bernard JEANPIERRE pour leurs compétences techniques. Je remercie Jean-Christophe DUPRE et Pascal DOUMALIN de l'Institut P' de l'université de Poitiers pour leur aide en corrélation d'images, je remercie la plateforme CLYM et la société Science et Surface pour la qualité des images réalisées en microscopie électronique à balayage. Je souhaite également remercier le Dr Luis CARDOSO du département d'ingénierie biomédical du City College of New York qui m'a accueillie quatre semaines au sein de son équipe où j'ai pu notamment me familiariser avec les techniques ultrasonores.

Je tiens également à remercier l'ensemble de mes collègues du G8 et d'ailleurs pour leur bonne humeur au quotidien et pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir, notamment pendant les repas ou les pauses en salle cafet. Je remercie plus particulièrement mes collègues du groupe Mécanique des Matériaux du Vivant, Magali, Kélig, Emna, Romain, Catherine, Guillaume, Hélène, Cécile, Thomas, Benoît, Ophélie et Aurélie (ainsi que ceux déjà partis et ceux tout récemment arrivés) pour tous ces moments uniques que nous avons partagés, les conférences, les discussions, les sorties, les weekends sportifs ou plus festifs. Je remercie tous ceux avec qui j'ai pu échanger sur divers problématiques scientifiques rencontrées et je remercie sincèrement ceux avec qui j'ai pu partager mes moments de doute, de tristesse mais aussi de joie et de bonheur.

Pour finir je veux remercier ma famille et mes amis pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ma thèse. Je remercie tous ceux qui ont cru en moi, jusqu'à faire le déplacement ce fameux 16 Décembre 2014, jour de la concrétisation.

Merci du fond du cœur à tous ceux qui ont fait de ma thèse trois années extraordinaires.

# Table des matières

<b>Table des figures</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xvii</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Bibliographie</b>	<b>5</b>
1.1 L'os humain sain . . . . .	9
1.1.1 De la macrostructure à la nanostructure . . . . .	9
1.1.2 Le modelage et remodelage . . . . .	14
1.1.3 Les propriétés mécaniques . . . . .	20
1.2 L'Ostéogénèse Imparfaite . . . . .	22
1.2.1 Généralités sur l'OI . . . . .	23
1.2.2 Diagnostic . . . . .	23
1.2.3 Traitements . . . . .	24
1.2.4 Les propriétés structurales et mécaniques . . . . .	25
<b>2 Etude à l'échelle du tissu des propriétés mécaniques et minérales de l'os chez l'enfant atteint d'Ostéogénèse Imparfaite</b>	<b>29</b>
2.1 Matériels et méthodes . . . . .	33
2.1.1 Les échantillons . . . . .	33

2.1.2	Préparation des échantillons . . . . .	34
2.1.3	Tomographie RX haute résolution . . . . .	34
2.1.4	Nanoindentation . . . . .	35
2.1.5	Microspectroscopie Raman . . . . .	36
2.1.6	Analyse statistique . . . . .	37
2.2	Résultats . . . . .	38
2.2.1	La densité minérale du tissu (TMD) . . . . .	38
2.2.2	Les propriétés mécaniques du tissu . . . . .	38
2.2.3	Les propriétés chimiques du tissu . . . . .	39
2.2.4	Relation entre le module d'Young et le contenu en minéral dans le groupe OI . . . . .	41
2.3	Discussion et conclusions . . . . .	42
<b>3</b>	<b>Comparaison de la microstructure et des propriétés mécaniques en compression de l'os cortical entre l'enfant atteint d'Ostéogénèse Imperfaite et l'enfant sain</b>	<b>47</b>
3.1	Matériels et méthodes . . . . .	51
3.1.1	Les échantillons . . . . .	51
3.1.2	Préparation des échantillons . . . . .	52
3.1.3	Tomographie RX haute résolution . . . . .	52
3.1.4	Essais de compression . . . . .	52
3.1.5	Microscopie électronique à balayage . . . . .	53
3.1.6	Comptage des lacunes ostéocytaires . . . . .	54
3.1.7	Comptage des lacunes ostéocytaires . . . . .	54
3.2	Résultats . . . . .	54
3.2.1	Observation des microstructures . . . . .	54

---

3.2.2	La porosité vasculaire intracorticale . . . . .	57
3.2.3	La densité minérale osseuse (BMD) et la densité minérale du tissu (TMD)	60
3.2.4	Les propriétés mécaniques macroscopiques . . . . .	61
3.3	Discussion et conclusions . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Influence de la microstructure du tissu cortical sur l'activité d'ostéoclastes humains chez l'enfant sain et pathologique</b>	<b>67</b>
4.1	Matériels et méthodes . . . . .	72
4.1.1	Les substrats : les échantillons d'os . . . . .	72
4.1.2	La préparation des échantillons . . . . .	72
4.1.3	La culture cellulaire . . . . .	72
4.1.4	Comparaisons entre OI et sains . . . . .	74
4.1.5	Identification des zones résorbées et non résorbées . . . . .	75
4.1.6	L'interférométrie . . . . .	75
4.1.7	Analyse statistique . . . . .	77
4.2	Résultats . . . . .	77
4.2.1	Comparaison qualitative et quantitative de la résorption osseuse chez l'enfant et chez l'OI . . . . .	77
4.2.2	Localisation de la résorption osseuse chez l'enfant sain . . . . .	82
4.3	Discussion et conclusions . . . . .	85
4.3.1	L'influence du substrat synthétique sur la résorption . . . . .	85
4.3.2	L'influence du substrat naturel (osseux ou dentine) sur la résorption . . . . .	86
4.3.3	La résorption osseuse chez l'OI comparé à l'os sain . . . . .	87
<b>5</b>	<b>Application de la corrélation d'images et de la méthode des champs virtuels au cas de l'os d'enfant</b>	<b>89</b>

---

5.1	Matériels et méthodes . . . . .	94
5.1.1	Les échantillons . . . . .	94
5.1.2	Essais de compression . . . . .	94
5.1.3	Détermination des zones de modules différents . . . . .	95
5.1.4	La corrélation d'images . . . . .	95
5.1.5	Calcul des déformations . . . . .	100
5.1.6	La méthode des Champs Virtuels . . . . .	101
5.2	Résultats . . . . .	106
5.2.1	Distribution des déformations . . . . .	106
5.2.2	Validation de la méthode d'analyse inverse . . . . .	108
5.2.3	Détermination des modules élastiques locaux . . . . .	110
5.3	Discussion et conclusions . . . . .	113
	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>119</b>
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>123</b>
<b>A</b>	<b>Principe de la méthode des champs virtuels et démonstration de l'équivalence de la méthode d'analyse inverse utilisée et de la méthode des champs virtuels</b>	<b>141</b>

# Table des figures

1.1	Exemples chez l'homme d'un os long (fémur), d'un os plat (omoplate) et d'un os court (vertèbre). . . . .	9
1.2	Représentation de la structure multi-échelles de l'os, de la partition os cortical / os trabéculaire à l'échelle de la macrostructure jusqu'à l'agencement des molécules de collagène et cristaux d'hydroxyapatite à l'échelle sub-nanostructurale. Extrait de [1]. . . . .	10
1.3	Schéma d'un os long à gauche, et à droite une image d'os cortical de fémur humain adulte réalisée en microscopie optique. Sur cette image un exemple d'ostéon secondaire déjà partiellement remodelé apparait en rouge. A sa droite un ostéon en cours de formation avec un canal de Havers plus important. Au dessus de cet ostéon en rouge, une zone non encore remodelée. . . . .	10
1.4	Schéma d'une coupe d'un os long où l'os cortical entoure l'os trabéculaire dans lequel se trouve la moelle osseuse. L'os cortical est formé d'ostéons constitués eux-mêmes de lamelles (en vertes) et d'un canal de Havers en leur centre. . . . .	11
1.5	Schéma de l'os cortical constitué d'os primaire et d'ostéons à plusieurs stades de renouvellement. Extrait de [10]. . . . .	12
1.6	Schéma de l'organisation des fibrilles de collagènes et des cristaux d'hydroxyapatite, la périodicité de 67 nm provient de l'assemblage des molécules mêlant des zones vides de 40 nm et des superpositions de 27 nm, repris de [1]. . . . .	13
1.7	a) Schéma qui montre la croissance de l'os et les différents types d'ostéons. b) Schéma d'un ostéon « <i>drifting</i> », extrait de [21]. . . . .	15
1.8	Image réalisée en microscopie optique d'un échantillon d'os cortical d'enfant sain présentant des ostéons « <i>drifting</i> » (croix rouge) et excentriques (croix bleue). . . . .	15
1.9	a) Ostéoclastes en migration b) ostéoclaste multinucléé polarisé. . . . .	16
1.10	a) Ostéoclaste polarisé en train de résorber par l'action combinée de protons $H^+$ pour dissoudre le minéral et d'enzymes lysosomiales pour dégrader la matrice organique. b) Phase de migration. Adaptée de [22]. . . . .	17
1.11	Image MEB extraite de [31] montrant des ostéocytes de souris interconnectés (échelle 10 $\mu\text{m}$ ). . . . .	18

1.12	Image d'un échantillon d'os cortical d'enfant où les ostéons les plus jeunes (les moins minéralisés) apparaissent les plus sombres, et les plus vieux (les plus minéralisés) apparaissent les plus clairs. . . . .	19
1.13	Caractéristiques typiques présentes en cas d'OI a) sclère bleu b) dentinogénèse imparfaite c) Michel Petrucciani était atteint d'OI et, comme de nombreux patients, il avait une taille réduite, pas plus de 1m dans son cas d) os longs déformés. . . . .	24
1.14	Formules des différents types de bisphosphonates, extrait de [100]. . . . .	25
2.1	Spectre Raman typique pour un contrôle obtenu après avoir soustrait la ligne de base, fait la moyenne sur les 5 spectres et le lissage. Le pic à $961\text{ cm}^{-1}$ correspond au phosphate, le pic à $1075\text{ cm}^{-1}$ correspond au carbonates (type B) et la bande large autour de $1667\text{ cm}^{-1}$ correspond à l'amide I. . . . .	37
2.2	a) Histogramme comparant les densités minérales moyennes pour le groupe OI et le groupe contrôle b) Histogramme comparant les modules d'Young moyens pour le groupe OI et le groupe contrôle c) Histogramme comparant les valeurs moyennes de dureté pour le groupe OI et le groupe contrôle. * : $p < 0.05$ . . . . .	39
2.3	a) Histogramme comparant le contenu en carbonates pour le groupe OI et le groupe contrôle b) Histogramme comparant la cristallinité pour le groupe OI et le groupe contrôle c) Histogramme comparant le ratio minéral/matrice pour le groupe OI et le groupe contrôle d) Histogramme comparant la maturité du collagène pour le groupe OI et le groupe contrôle e) Histogramme comparant la longueur d'onde du pic de l'amide I pour le groupe OI et le groupe contrôle f) Histogramme comparant l'intensité du pic de l'amide I pour le groupe OI et le groupe contrôle. * : $p < 0.05$ . . . . .	41
2.4	Graphe présentant le module d'Young mesuré par nanoindentation en fonction de la TMD mesurée par tomographie pour les 11 échantillons. Pour chaque point, les barres d'erreur correspondent à l'écart-type obtenu sur les mesures de nanoindentation. Les cercles noirs correspondent aux contrôles tandis que les losanges correspondent aux OI. . . . .	42
3.1	a) image MEB d'un échantillon OI à laquelle un quadrillage a été superposé b) image binaire réalisée par seuillage à partir de l'image précédente sans quadrillage. . . . .	55
3.2	Images des trois échantillons contrôles prises en microscopie électronique à balayage après compression. . . . .	56
3.3	Images de trois échantillons OI prises en microscopie électronique à balayage après compression. . . . .	57
3.4	Images de trois échantillons OI prises en microscopie électronique à balayage après compression. . . . .	58

3.5	Graphe de comparaison des moyennes de la densité en lacunes ostéocytaires pour le groupe des contrôles et le groupe des OI. . . . .	59
3.6	a) c) images d'un échantillon contrôle et d'un OI où l'on voit l'initiation d'une fissure à une cavité. b) d) images des mêmes échantillons contrôle et OI quand les fissures se sont propagées via les cavités. . . . .	59
3.7	Images 3D d'un contrôle (a) et d'un OI (b) reconstruites à partir des acquisitions tomographiques. La partie gauche de chaque échantillon a été inversée pour montrer seulement la porosité. . . . .	60
4.1	Image de la surface d'un échantillon contrôle après coloration au TRAP, les cellules apparaissent en rose. . . . .	73
4.2	Image de la surface d'un échantillon sain après coloration au TRAP (zoom de la figure), des exemples d'ostéoclastes à plus de trois noyaux sont entourés en noir. En bleu c'est un ostéoclaste fusiforme, i.e. en migration. . . . .	74
4.3	Schéma de la routine matlab de traitement des données issues de l'analyse interférométrique. . . . .	76
4.4	Illustrations des étapes du traitement des données interférométriques a) image brute avant résorption b) image brute après résorption c) image après résorption tournée et recalée grâce aux trois points positionnés sur les images brutes avant et après résorption d) différence de hauteur entre avant et après résorption e) Recalage de d) par rapport au plan moyen et exclusion des canaux et zone hors rectangle circonscrit f) seuillage pour ne garder que des z supérieurs à 2 fois l'écart-type. . . . .	77
4.5	Images prises en microscopie optique de la surface a) d'un échantillon sain et b) d'un échantillon OI présentant une majorité d'ostéoclastes fusiformes et quelques ostéoclastes polarisés. . . . .	78
4.6	Ostéoclastes polarisés sur un échantillon OI. . . . .	78
4.7	Ostéoclastes avec de nombreux noyaux sur un échantillon sain après 5 jours de culture. . . . .	79
4.8	Image en bleu de tolluidine, en microscopie électronique à balayage et en interférométrie pour un échantillon contrôle. . . . .	80
4.9	Image en bleu de tolluidine, en microscopie électronique à balayage et en interférométrie pour un échantillon OI. . . . .	81
4.10	Image en interférométrie pour un échantillon contrôle. . . . .	82
4.11	Histogrammes présentant la hauteur de résorption, le volume résorbé normalisé par la surface du tissu et le pourcentage de surface résorbée pour le groupe sain et le groupe OI. * : $p < 0,05$ . . . . .	83

4.12	Graphes des valeurs moyennes et ecart-types du module d'Young (graphe de gauche) et de la dureté (graphe de droite) pour les zones non résorbées et résorbées d'un donneur sain. * : $p < 0,05$ . . . . .	83
4.13	Valeurs de ratios obtenus en microspectroscopie Raman pour les 4 échantillons d'un même donneur sain. * : $p < 0,05$ . . . . .	84
5.1	a) Image optique d'un contrôle (C1) b) image binarisée de ce même échantillon avec les cavités en noir et le reste du tissu homogène en blanc c) image du même échantillon présentant trois matériaux, les cavités en noir, l'os interstitiel en blanc et l'os ostéonal en gris. . . . .	95
5.2	Zone de corrélation en rose avec des fenêtres de corrélation de 128 x 128 pixels. Le centre de chaque fenêtre est pris comme point de référence de la fenêtre. La corrélation consiste à apparier une fenêtre de l'image de référence avec une fenêtre de l'image déformée, le gradient de la transformation vaut $F = I + grad(u)$ . . . . .	96
5.3	Exemple de calcul de déformation en X à partir de 4 déplacements avec un pas de 1. . . . .	98
5.4	Zone de corrélation (en rose) dans laquelle on distingue les 4 fenêtres de corrélation (en pointillés) utilisées pour calculer la déformation macroscopique de cette zone. . . . .	99
5.5	Illustration de la partition de l'échantillon sous forme de bandes. . . . .	102
5.6	Schéma des étapes du code de la méthode inverse (méthode des champs virtuels) sous Matlab <sup>®</sup> . . . . .	103
5.7	A) Zone de corrélation en rose avec les fenêtres de corrélation de 32 x 32 pixels, le nombre de colonnes est NX et le nombre de lignes est NY. Le déplacement est donné au milieu de chaque fenêtre et les déformations sont calculées au milieu de quatre fenêtres. B) En bleu cadre commun aux données Correla et image en niveaux de gris. Il faudra interpoler les niveaux de gris pour avoir des valeurs sur chaque intersection du quadrillage où on a des données de déformation. Dans la zone commune, il y a en blanc la zone 1 avec un même module E1, en gris la zone 2 avec un module E2 et en noir la zone 3 avec un module E3. . . . .	104
5.8	Exemple de matrice Indicatrice construite en mettant 1 quand l'élément est dans la zone de même module. . . . .	104
5.9	Système AE=B où zone 1 et zone 2 sont les zones de même module et les colonnes sont les colonnes de la grille des fenêtres de corrélation. Le nombre de colonne est NX-1 puisqu'il y a une donnée de moins en déformation qu'en déplacement. F est la force, d le côté de l'élément, e l'épaisseur prise égale à 0,01 mm, S la surface de chaque élément et $\nu$ le coefficient de Poisson pris égal à 0,3. . . . .	105

5.10	Conditions limites et champ de déplacement pour la simulation de compression uniaxiale du modèle à 64 éléments. . . . .	105
5.11	a) Modèle de matériau hétérogène à 5 modules b) modèle de matériau hétérogène à 10 modules disposés de façon à imiter la microstructure haversienne des os. Les valeurs inscrites sont les valeurs de module imposées. . . . .	106
5.12	Cartes des déformations $\epsilon_{xx}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d). . . . .	107
5.13	Cartes des déformations $\epsilon_{xx}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque. . . . .	108
5.14	Cartes des déformations $\epsilon_{yy}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d). . . . .	109
5.15	Cartes des déformations $\epsilon_{yy}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque. . . . .	110
5.16	Cartes des déformations $\epsilon_{xy}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d). . . . .	111
5.17	Cartes des déformations $\epsilon_{xy}$ pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque. . . . .	112
5.18	Cartes des trajectoires (déplacement entre l'état initial et l'état de charge choisi) pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d). La flèche donne la direction du déplacement et la couleur son intensité (norme du déplacement). . . . .	113
5.19	Critère de corrélation pour l'échantillon contrôle C1 calculé lors de la mesure des déplacements (c et d) et des déformations (a et b). Il est tracé sous forme d'histogramme (b et d) ou en points de couleurs jaunes et rouges (a et c) sachant qu'un point jaune correspond à un critère inférieur à 0,1. . . . .	114
5.20	Critère de corrélation pour l'échantillon OI 6 calculé lors de la mesure des déplacements (c et d) et des déformations (a et b). Il est tracé sous forme d'histogramme (b et d) ou en points de couleurs jaunes et rouges (a et c) sachant qu'un point jaune correspond à un critère inférieur à 0,1. . . . .	115
5.21	Histogrammes présentant les valeurs de modules trouvés par analyse inverse et imposés pour a) le modèle à cinq modules b) le modèle à dix modules et c) le modèle à quatorze modules. . . . .	115
5.22	Courbe contrainte déformation d'un échantillon contrôle soumis à un essai de compression. . . . .	116

A.1 Solide quelconque avec une zone $S_f$ où le chargement est imposé et une zone $S_u$ où le déplacement est imposé (reprise du 1 du livre Pierron F, Grédiac M. The Virtual Fields Method, Extracting constitutive mechanical parameters from full-field deformation measurements). . . . .	142
A.2 Echantillon et mors séparés en trois zones. . . . .	143

# Liste des tableaux

1.1	Tableau des modules d'Young (en GPa) trouvés par différentes études en utilisant la nanoindentation sur de l'os cortical humain. . . . .	22
2.1	Valeurs de modules d'Young, de dureté et de densité minérale du tissu pour les 8 échantillons OI et les 3 échantillons contrôles exprimées comme la valeur moyenne (écart-type). . . . .	38
2.2	Ratios mesurés en microspectroscopie Raman pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles. . . . .	40
3.1	Valeurs de paramètres de structure (densité minérale osseuse et porosité) et de propriétés mécaniques (module d'Young macroscopique, limite d'élasticité, contrainte et déformations maximales) pour chaque échantillon. . . . .	61
3.2	Corrélations entre les propriétés mécaniques et les facteurs de microstructure. . . . .	62
4.1	Rappel des résultats de la comparaison groupe contrôle groupe OI faite en chapitre 2 à l'échelle du tissu. . . . .	74
4.2	Résumé des tests effectués sur chaque échantillon. . . . .	76
4.3	Nombre total d'ostéoclastes (OC) et densité en ostéoclastes sur les échantillons sains et OI compté à partir des images faites après coloration au TRAP. . . . .	79
5.1	Valeurs de déformations macroscopiques calculées par plusieurs méthodes. . . . .	98
5.2	Déformations moyennes mesurées par corrélation d'images pour un échantillon contrôle dues à un mouvement hors plan imposé. . . . .	100
5.3	Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 5 modules. . . . .	109
5.4	Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 10 modules. . . . .	113
5.5	Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 14 modules. . . . .	114



# Introduction

« La nature ne fait rien en vain », Aristote, *Métaphysique*

La nature serait donc bien faite.

Il existe de multiples exemples qui nous incitent à croire qu'Aristote disait vrai, c'est le cas de ces techniques de protection dont sont dotées certaines espèces comme l'hippocampe et sa tenue de camouflage, la pieuvre-mime et son incroyable talent de mimétisme ou le papillon de nuit *Betholdia Trigona* et sa capacité brouilleur de sonar. Au contraire, d'autres possèdent de redoutables techniques d'attaque comme la méduse *Chironex fleckeri* au venin mortel, la crevette pistolet et son gun supersonique ou encore le scarabée *Onthophagus Taurus* et son incroyable force. Nous sommes très envieux des oiseaux mais les lézards aussi défient la gravité grâce à leurs pattes extraordinaires leur permettant de marcher au plafond (gecko) ou de courir sur l'eau (le basilic à plumes). Autre injustice, l'espérance de vie, bien au-delà de nos tristes 80 ans, certains animaux peuvent vivre plusieurs centaines d'années, c'est le cas de nombreuses tortues géantes et des poissons Koï. Encore plus étonnant, les cas de la méduse *Turritopsis Nutricula*, biologiquement immortelle, qui peut même rajeunir si les conditions externes l'exigent, et des microscopiques Tardigrades (oursons d'eau) capables d'entrer en cryptobiose, i.e. état de stase, pendant des dizaines d'années. Toutefois, nous possédons un des « pouvoirs » les plus impressionnants présents dans la nature, le pouvoir de régénération. Même si chez nous cette capacité n'égale pas celle des poissons et des salamandres qui peuvent régénérer une partie de leurs yeux, de leur cerveau et même de leur coeur, l'Homme possède des capacités de régénération au niveau du foie et de la peau notamment. Notre squelette est également capable de se réparer, cette réparation se fait sous l'action du remodelage osseux, processus complexe qui nécessite le concours de plusieurs types cellulaires. En particulier les ostéoclastes résorbent l'os vieilli ou endommagé puis les ostéoblastes forment un nouvel os, tout cela de manière synchronisée sous le regard bienveillant des ostéocytes, véritables mécanosenseurs aux multiples rôles.

Malheureusement certaines pathologies osseuses viennent perturber l'équilibre de ce renouvellement osseux et ainsi favoriser la formation (e.g. la maladie de Paget) ou la résorption de l'os (e.g. l'ostéoporose). Le comportement mécanique ne peut être qu'impacté par ces changements de microstructure et il convient alors d'utiliser des traitements médicamenteux pour compenser le déséquilibre et redonner au squelette son intégrité mécanique.

L'Ostéogénèse Imparfaite est une pathologie osseuse où des mutations entraînent la production d'une matrice collagénique défectueuse et dont la conséquence ultime est la fragilité accrue des os. Mais d'autres traits typiques la caractérisent et la rendent identifiable, comme une sclère bleue, une dentinogénèse imparfaite, une petite taille ou encore une déformation plus ou moins importante des os longs. Il existe de nombreux phénotypes associés à cette pathologie, de nouveaux sont découverts régulièrement, ce qui la rend toujours plus complexe. Son incidence, ainsi difficile à estimer, se situerait entre 1/5000 et 1/30000 faisant de cette maladie une maladie rare. Par conséquent, elle n'est que peu étudiée et beaucoup d'informations nous manquent encore. Les connaissances que nous avons actuellement sur l'Ostéogénèse Imparfaite chez l'Homme, et en particulier chez l'enfant, proviennent surtout d'observations microscopiques et très peu sont d'ordre quantitatif. Il est nécessaire de multiplier les études pour, d'une part, rendre les conclusions faites jusqu'ici certaines, et d'autre part, quantifier les résultats et établir des corrélations qui nous permettraient d'identifier puis de classer les facteurs de la fragilité osseuse.

Les objectifs de ce travail de thèse s'inscrivent dans cette logique de compréhension et de quantification, l'intérêt majeur de ce travail est de faire une étude comparative entre un groupe d'échantillons provenant d'enfants souffrant d'Ostéogénèse Imparfaite et un groupe contrôle composé d'échantillons provenant d'enfants sains. Il s'agira de les comparer en termes de propriétés mécaniques, structurales et chimiques afin d'identifier des causes possibles de la fragilité accrue des os de patients touchés par la maladie des os de verre. Il s'agira dans un deuxième temps d'étudier les effets de cette pathologie sur l'activité ostéoclastique afin d'améliorer notre compréhension du mécanisme imparfait de remodelage osseux chez l'OI. Un dernier objectif sera d'utiliser une méthode d'analyse inverse proche de la méthode des champs virtuels pour déterminer les modules élastiques de l'os cortical chez l'enfant sain. Dans un premier temps, après un chapitre bibliographique, nous détaillerons les comparaisons faites à l'échelle du tissu (chapitre 2). En particulier, nous nous intéresserons aux propriétés du tissu osseux et nous mènerons une campagne de mesure à l'échelle du tissu, i.e. à l'échelle où l'on est capable de distinguer les ostéons (100  $\mu\text{m}$ ) et l'os interstitiel. Nous nous intéresserons alors aux propriétés mécaniques et minérales mesurées respectivement par nanoindentation et microspectroscopie Raman. Nous utiliserons également la tomographie RX haute résolution pour déterminer la densité minérale du tissu.

Dans un second temps, nous ferons des analyses à l'échelle de l'échantillon (chapitre 3), i.e. l'échelle où l'on distingue les différents types de porosité à savoir la porosité vasculaire intracor-

ticale (canaux de Havers et cavités de résorption) et la porosité lacunaire (lacune ostéocytaire), évaluées respectivement par tomographie RX haute résolution et microscopie électronique à balayage. Nous nous intéresserons également au comportement mécanique en compression et aux corrélations entre ces paramètres mécaniques et structuraux. Dans un quatrième chapitre, nous étudierons plus spécifiquement la différence de résorption osseuse entre le groupe OI et le groupe contrôle. Pour cela nous mettrons en culture des ostéoclastes humains sur des échantillons, préalablement caractérisés mécaniquement et topographiquement, provenant des deux groupes. Des analyses topographiques ou par coloration faites après résorption permettront de quantifier l'activité ostéoclastique sur ces deux types de substrats osseux humains.

Dans un dernier chapitre, nous détaillerons la méthode d'analyse inverse choisie pour tirer des informations locales à partir d'un essai macroscopique de compression. Dans un premier temps nous déterminerons les champs de déplacement et de déformation dus à la compression et nous les comparerons pour des échantillons sains et OI. Ensuite, pour le cas exemple d'un échantillon sain, nous appliquerons une méthode d'analyse inverse afin de déterminer les modules élastiques des zones interstitielle et ostéonale à partir du champ de déplacement mesuré pendant compression.



# Chapitre 1

## Bibliographie

---

<b>1.1</b>	<b>L'os humain sain</b> . . . . .	<b>9</b>
1.1.1	De la macrostructure à la nanostructure . . . . .	9
1.1.2	Le modelage et remodelage . . . . .	14
1.1.3	Les propriétés mécaniques . . . . .	20
<b>1.2</b>	<b>L'Ostéogénèse Imparfaite</b> . . . . .	<b>22</b>
1.2.1	Généralités sur l'OI . . . . .	23
1.2.2	Diagnostic . . . . .	23
1.2.3	Traitements . . . . .	24
1.2.4	Les propriétés structurales et mécaniques . . . . .	25

---



## Résumé

Le squelette est composé de 206 os dont chacun a une forme, une microstructure et une composition parfaitement adaptées à son rôle. Néanmoins, tous sont composés d'os cortical, sujet de ces travaux de thèse, et d'os trabéculaire. De même, tous sont composés d'une matrice collagénique organisée en fibres dans laquelle s'insèrent des cristaux d'hydroxyapatite. Dans le cas de l'os cortical, ces composants s'agencent pour former une structure haversienne en permanence renouvelée grâce au phénomène de remodelage osseux mêlant la contribution de trois acteurs principaux : les ostéoclastes en charge de la résorption de l'os vieux ou endommagé, les ostéoblastes en charge de la formation osseuse et les ostéocytes véritables mécanosenseurs et maîtres d'œuvre. Cette structure confère à l'os des propriétés hétérogènes, anisotropes et étonnantes, un module élastique proche de 12 GPa en compression et entre 15 et 25 GPa localement selon la méthode utilisée, la localisation et la direction. Dans le cas sain, la machine est parfaitement réglée et le remodelage équilibré, malheureusement l'os reste un matériau vivant et donc sujet aux pathologies dont les conséquences sur le comportement mécanique peuvent être désastreuses. C'est le cas de l'Ostéogénèse Imparfaite qui, à cause de mutations génétiques, va entraîner la formation d'un collagène défectueux et d'un phénotype plus ou moins sévère. Les propriétés mécaniques en sont amoindries mais les causes principales ne sont pas clairement établies faute d'études comparatives utilisant un vaste panel de techniques expérimentales.



## Introduction

Le squelette est la charpente du corps humain, l'architecture sur laquelle repose tout le reste. Chez l'Homme il est composé de 206 os dont chacun a une forme (plat, court, long) (fig. 1.1), une microstructure et une composition parfaitement adaptées à sa localisation anatomique et donc au rôle principal que cet os doit jouer dans le squelette. L'os sain est un matériau remarquable que l'on va tâcher de décrire précisément dans la première partie de ce chapitre bibliographique en termes de structure et de propriétés mécaniques. Malheureusement, comme tout matériau du vivant, il peut être touché par une pathologie qui amoindrit ses capacités. La pathologie osseuse abordée dans ce travail de thèse, l'Ostéogénèse Imparfait, fera l'objet de la seconde partie.

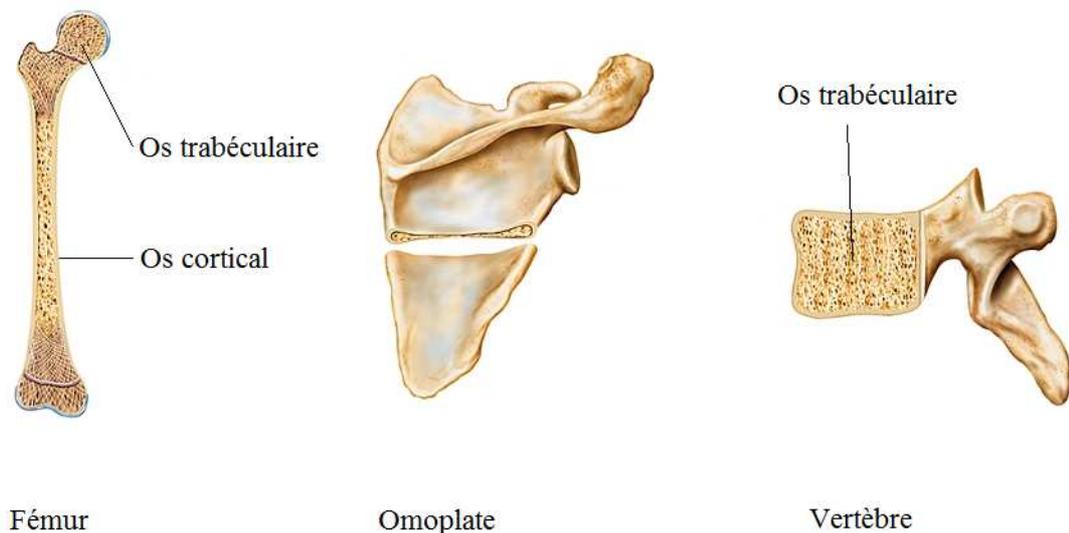


FIGURE 1.1 – Exemples chez l'homme d'un os long (fémur), d'un os plat (omoplate) et d'un os court (vertèbre).

## 1.1 L'os humain sain

### 1.1.1 De la macrostructure à la nanostructure

L'os humain est un matériau complexe dont la structure multi-échelles, mise en évidence dans de nombreuses publications[1, 2], est aujourd'hui bien connue (fig. 1.2).

La structure macroscopique est la répartition dans chaque os des deux types de tissus osseux, i.e. l'os cortical et l'os trabéculaire. L'os trabéculaire (appelé aussi os spongieux), est composé de travées osseuses, il est poreux et on le trouve pour sa part plutôt dans les épiphyses et métaphyses (fig. 1.3) des os longs, lieu de contraintes multi-directionnelles, ou dans les os plats, non porteurs (fig. 1.1). Son rôle est principalement homéostatique mais aussi de diriger

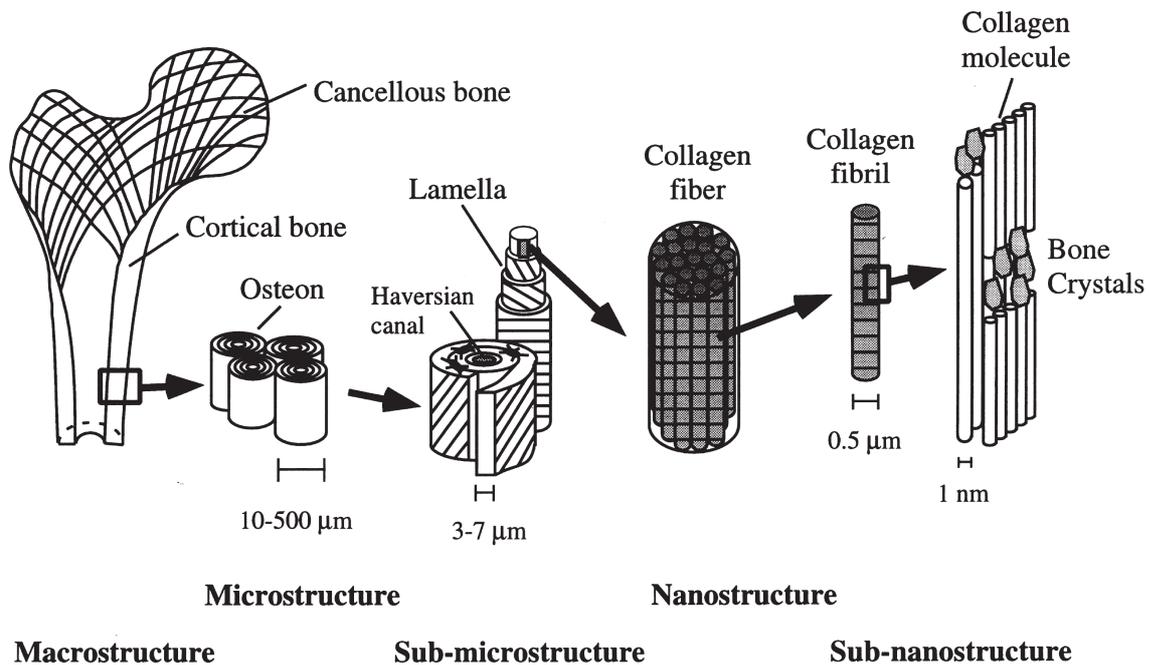


FIGURE 1.2 – Représentation de la structure multi-échelles de l'os, de la partition os cortical / os trabéculaire à l'échelle de la macrostructure jusqu'à l'agencement des molécules de collagène et cristaux d'hydroxyapatite à l'échelle sub-nanostructurale. Extrait de [1].

les contraintes vers l'os cortical[2, 3]. Ce dernier, plus dense, représente 80 % de la masse osseuse[3], on le trouve particulièrement épais aux diaphyses des os longs (fig. 1.3), car il est particulièrement résistant en compression. L'os cortical est considéré comme le principal responsable de la résistance mécanique des os, c'est pourquoi il est l'objet de ce travail de thèse.

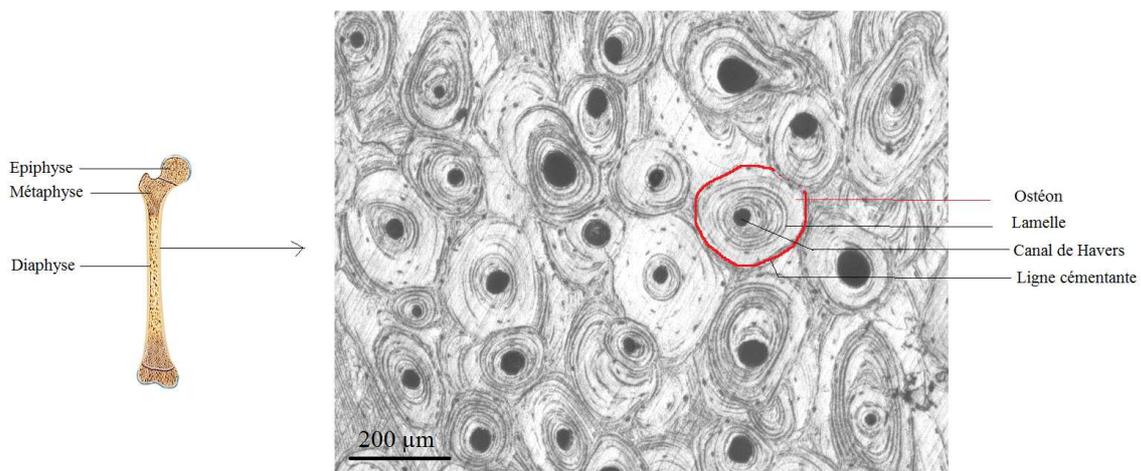


FIGURE 1.3 – Schéma d'un os long à gauche, et à droite une image d'os cortical de fémur humain adulte réalisée en microscopie optique. Sur cette image un exemple d'ostéon secondaire déjà partiellement remodelé apparaît en rouge. A sa droite un ostéon en cours de formation avec un canal de Havers plus important. Au dessus de cet ostéon en rouge, une zone non encore remodelée.

L'os cortical est composé d'unités cylindriques de 100 à 500  $\mu\text{m}$  de diamètre orientées parallèlement à l'axe de l'os et appelées ostéons (fig. 1.3), on parle ici de microstructure. Dans chaque ostéon on trouve un canal de Havers en son centre par lequel passent les nerfs et les vaisseaux qui permettent l'apport en nutriments des cellules osseuses (fig. 1.4). Les canaux de Volkmann parcourent l'os dans le sens transversal et relient les canaux de Havers. Autour de ces canaux de Havers, l'os est organisé en lamelles (jusqu'à 30 par ostéon[3]) de quelques micromètres de large dans lesquelles les fibres de collagène ont une orientation particulière qui varie d'une lamelle à l'autre, et peut-être aussi dans une même lamelle, mais aucun consensus n'a encore été trouvé à ce sujet[4–6]. Entre ces structures ostéonales se trouve le tissu interstitiel composé de morceaux d'ostéons laissés par le remodelage secondaire et l'os primaire pas encore renouvelé (fig. 1.3 et fig. 1.5). Les canaux de Havers, ainsi que les canaux de Volkmann, vont constituer la majorité de la porosité intracorticale qu'il est possible de mesurer par tomographie RX [7, 8]. Chez un sujet âgé la porosité intracorticale est proche de 10 % [7, 9] et serait le facteur clé dans la diminution des propriétés mécaniques[9].

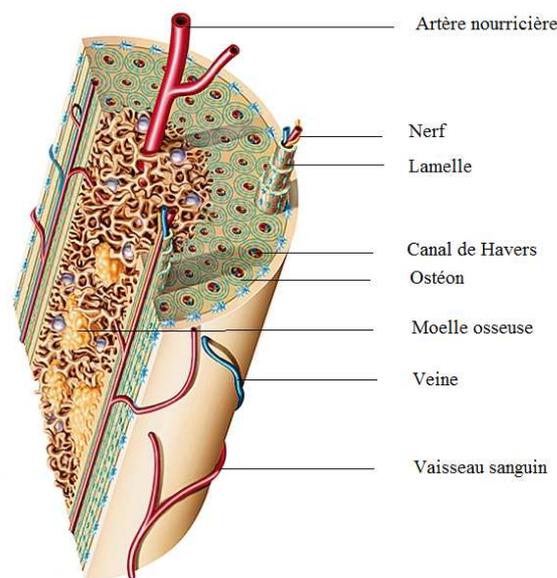


FIGURE 1.4 – Schéma d'une coupe d'un os long où l'os cortical entoure l'os trabéculaire dans lequel se trouve la moelle osseuse. L'os cortical est formé d'ostéons constitués eux-mêmes de lamelles (en vertes) et d'un canal de Havers en leur centre.

Cette structure multi-échelles est à prendre en compte lorsque l'on veut étudier la résistance mécanique de l'os mais la composition du tissu est également un élément important. En première approche, l'os est un matériau composite constitué à 70% de matrice collagénique, principalement du collagène de type I, et à 20% de minéral, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, qui constitue une réserve importante d'ions. Les 10% restants sont composés d'eau et de protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine ...) qui peuvent

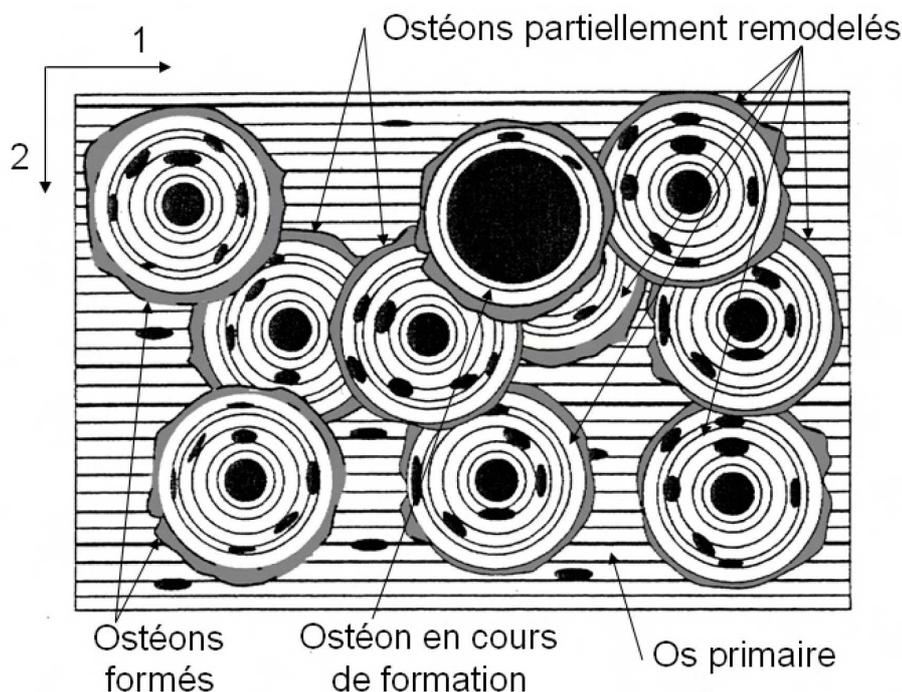


FIGURE 1.5 – Schéma de l'os cortical constitué d'os primaire et d'ostéons à plusieurs stades de renouvellement. Extrait de [10].

notamment interférer avec la croissance des cristaux[11], on ne connaît pas tous les rôles de ces protéines mais elles pourraient contrôler la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite, leur croissance et faciliter leur attachement aux fibres de collagène[3]. Ces protéines, et notamment l'ostéopontine, auraient même un effet sur les propriétés mécaniques comme la ténacité[12]. Le collagène a un impact principalement après la limite d'élasticité, sur la viscoélasticité, la ductilité et la ténacité (*toughness*) de l'os[2, 13] tandis que le minéral est important avant la limite d'élasticité, il est responsable de la rigidité, la dureté et la résistance (*strength*)[2]. Une répartition optimale des deux constituants est donc nécessaire à l'obtention des meilleures propriétés mécaniques possibles.

A l'échelle de la nanostructure et en dessous, on distingue des fibres de collagène dont l'orientation dépend du mode de chargement[2]. Ces fibres sont composées de fibrilles parallèles entre elles, elles-mêmes composées de molécules de collagène en triple hélice de 300 nm de long avec une périodicité de 67 nm[14] reliées par des *crosslinks* pour stabiliser les fibres[15]. Entre ces molécules de collagène on trouve des cristaux d'hydroxyapatite ( $Ca_5(PO_4)_3OH$ ) plats de taille variable (5-60 nm), l'axe long de ces cristaux est orienté parallèlement aux fibrilles de collagène[2, 4] (fig. 1.6). La maturité de ces cristaux implique que leur taille augmente au cours du temps à cause des substitutions en ions, par exemple un ion carbonate ( $CO_3^{2-}$ ) peut prendre la place d'un ion phosphate ( $PO_4^{3-}$ ), ce qui rend le réseau moins stable puisque les apatites carbonatés se dissolvent plus facilement[2]. Ainsi ces changements auront des effets

sur les propriétés mécaniques du tissu osseux.

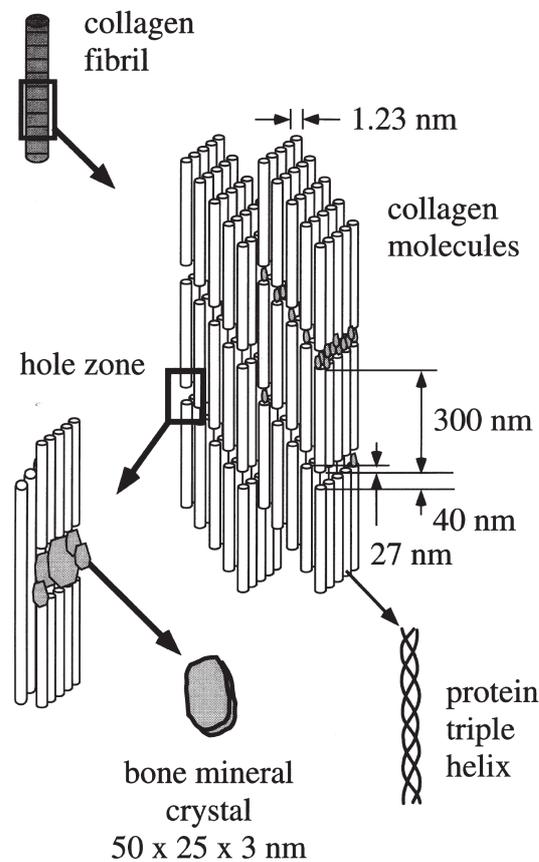


FIGURE 1.6 – Schéma de l'organisation des fibrilles de collagènes et des cristaux d'hydroxyapatite, la périodicité de 67 nm provient de l'assemblage des molécules mêlant des zones vides de 40 nm et des superpositions de 27 nm, repris de [1].

Les cristaux occupent les espaces vides d'un arrangement facilitant le transfert de forces[16], le couplage des mécanismes de déformation de ces deux constituants permettant une meilleure résistance à l'endommagement[17]. L'interaction entre ces deux constituants est l'objet de plusieurs études numériques[18, 19] ou utilisant le modèle animal[17]. Des interactions de Coulomb renforcées par l'effet pont électrostatique de l'eau permettent d'obtenir une forte résistance mécanique de l'interface[16]. Il semble également que la taille des cristaux ait un impact important sur les propriétés mécaniques du tissu[16, 18] ce qui prouve l'importance de l'échelle nanoscopique sur les propriétés mécaniques à plus grande échelle.

On constate donc que l'os est un matériau complexe qui, de part cette organisation multi-échelles, aura des propriétés anisotropes (ou isotropes transverses en première approximation[20]) et hétérogènes qui dépendront donc de l'orientation et du site anatomique[7]. Cette hétérogénéité est renforcée par le fait que l'os est un matériau vivant en perpétuel adaptation et renouvellement. Cette adaptation/régénération osseuse se fait par l'intermédiaire de processus appelés modelage/remodelage osseux. L'os se renouvelle périodi-

quement (*bone turnover*), on estime en moyenne que la totalité de notre squelette est renouvelée tous les 10 ans, l'os cortical aurait une durée de vie de 20 ans contre 1 à 4 ans seulement pour l'os trabéculaire[3].

### 1.1.2 Le modelage et remodelage

Pendant la période embryonnaire, le squelette du fœtus est formé de cartilage qui va peu à peu se minéraliser pour former de l'os fibreux (*woven bone*), i.e. non mature, dont le module d'Young est très inférieur au module d'Young d'un os mature[3]. Cet os va peu à peu voir se former de l'os spongieux primaire et des ostéons primaires. Les os vont ensuite croître et augmenter de volume par le phénomène de modelage qui consiste à apposer de la matière à un endroit (perioste), et en enlever à un autre endroit (endoste) (fig. 1.7). Le modelage contrôle la croissance, la forme, la taille et la résistance des os. Le processus de remodelage permet, quant à lui, de renouveler un os mal adapté, endommagé ou vieillissant et donc de maintenir l'intégrité mécanique des os via la formation d'os spongieux secondaire et d'ostéons secondaires dont la taille et la forme évoluent avec l'âge[21]. Le remodelage commence à 2-3 mois[21] et s'intensifie jusqu'à l'âge de 15-16 ans. Durant cette période les ostéons sont majoritairement des ostéons « *drifting* » (fig. 1.8), ils sont asymétriques et ont un canal important qui explique la porosité élevée chez les enfants, ils sont particulièrement actifs dans le remodelage osseux (car le but est de fabriquer rapidement de la matière résistante). Avec l'âge leur nombre va diminuer pour laisser place à des ostéons excentriques puis concentriques, de plus en plus petits et circulaires[21] (fig. 1.7). Le processus actif de remodelage commence par une phase de résorption, suit une phase d'inversion et enfin une phase de formation, avant de revenir à une phase de quiescence, i.e. de repos, avant la prochaine période d'activité.

#### 1.1.2.1 La phase de résorption

La phase de résorption est exécutée par un type particulier de cellules osseuses auxquelles nous nous intéresserons plus particulièrement au chapitre 4 de ce mémoire, les ostéoclastes, provenant de la lignée hématopoïétique que l'on peut voir comme des macrophages spécialisés dans la dégradation de l'os. La différenciation des pré-monocytes en précurseurs ostéoclastiques se fait dans la moelle osseuse sous l'action de nombreuses cytokines et facteurs hormonaux, mais on va simplifier le schéma à trois facteurs clés[22], M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), RANKL, ligand du récepteur RANK et son antagoniste OPG (ostéoprotégérine) exprimés à la surface des cellules stromales (dont sont issus les ostéoblastes) ou sécrétés. Alors qu'ils ne sont encore qu'au stade de précurseurs ils sont recrutés et arrivent sur site par le sang, i.e. par les vaisseaux au niveau des canaux de Havers. Ils vont migrer en formant de grands « bras » (fig. 1.9) et fusionner pour former des ostéoclastes matures exprimant ainsi certains marqueurs typiques comme Cath K ou TRAP. Ces ostéoclastes matures sont multinucléés

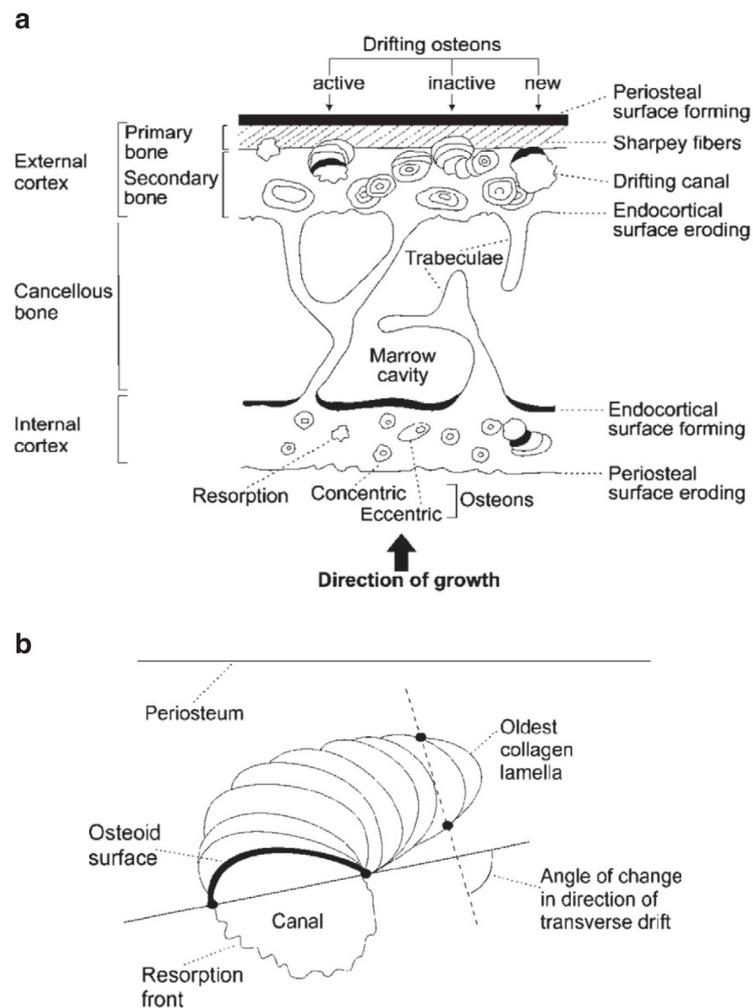


FIGURE 1.7 – a) Schéma qui montre la croissance de l'os et les différents types d'ostéons. b) Schéma d'un ostéon « drifting », extrait de [21].

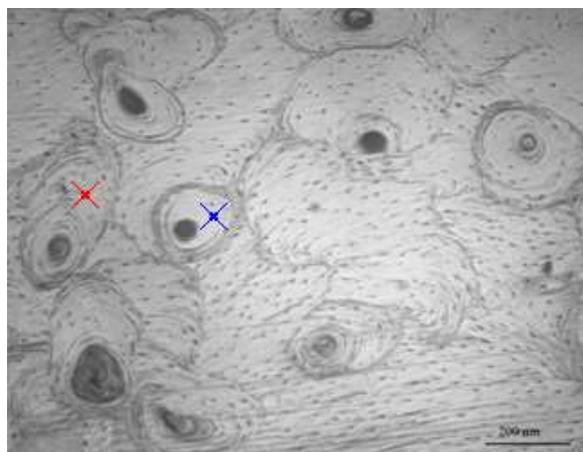


FIGURE 1.8 – Image réalisée en microscopie optique d'un échantillon d'os cortical d'enfant sain présentant des ostéons « drifting » (croix rouge) et excentriques (croix bleue).

(fig. 1.9) avec un nombre de noyaux compris généralement entre 5 et 20[23] mais ce nombre peut fortement augmenter en cas de pathologies osseuses.

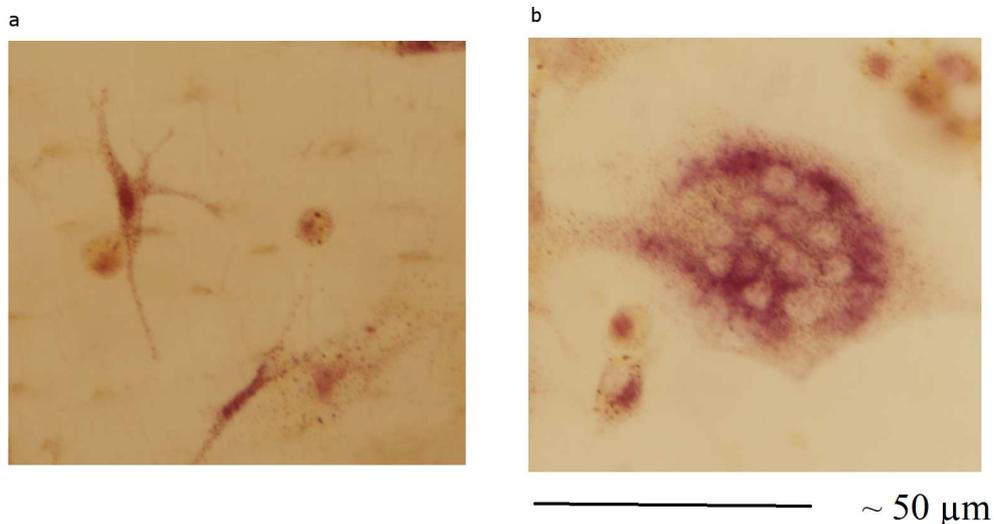


FIGURE 1.9 – a) Ostéoclastes en migration b) ostéoclaste multinucléé polarisé.

Une fois à l'endroit de la résorption, ils se polarisent (*apico-basal polarization*) et créent une cavité étanche de résorption (fig. 1.10) sellée grâce aux podosomes[24] dont l'architecture consiste en un centre de filaments d'actine entouré d'intégrines (récepteurs de protéines impliquées dans l'adhérence, la motilité et l'activation des ostéoclastes) et de protéines d'adhérence focale comme la vinculine. Ces podosomes s'interconnectent en un anneau d'actine, les plaques d'adhérence focale se réorganisent, le tout formant la zone d'attachement ou de scellement (*sealing zone*). La formation, l'expansion et la fusion de ces *sealing zones*, qui sont critiques pour une bonne résorption osseuse, dépendent des propriétés d'adhérence du substrat[25]. Ensuite, des protons  $H^+$  sont libérés par la pompe à protons ATPasique de type vacuolaire dans cette lacune de résorption (« lacune Howship ») à travers la bordure en brosse (*ruffled border*) (parallèlement à l'excrétion d'anions de chlore et à l'action d'échangeurs ioniques pour maintenir l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste) afin de diminuer le pH et dissoudre le minéral (fig. 1.10). Des enzymes lysosomiales (comme la cathepsine K) et des métalloprotéases sont ensuite libérées dans la lacune de résorption afin de dégrader la matrice organique et acheminer les déchets vers l'extérieur de la cellule[24, 26]. L'ostéoclaste alterne des phases de résorption avec des phases de migration (fig. 1.10).

La résorption s'effectue du canal de Havers vers l'extérieur, le front de résorption s'arrête, sans raison apparente, à l'endroit qui sera la ligne cémentante du futur ostéon secondaire. Cette étape de résorption dure environ 3 semaines. D'après une étude réalisée sur de l'os bovin, l'ostéoclastogénèse et la résorption augmente avec l'âge sans toutefois remarquer de changement au niveau de l'adhésion ou de l'organisation du cytosquelette, cela pourrait être

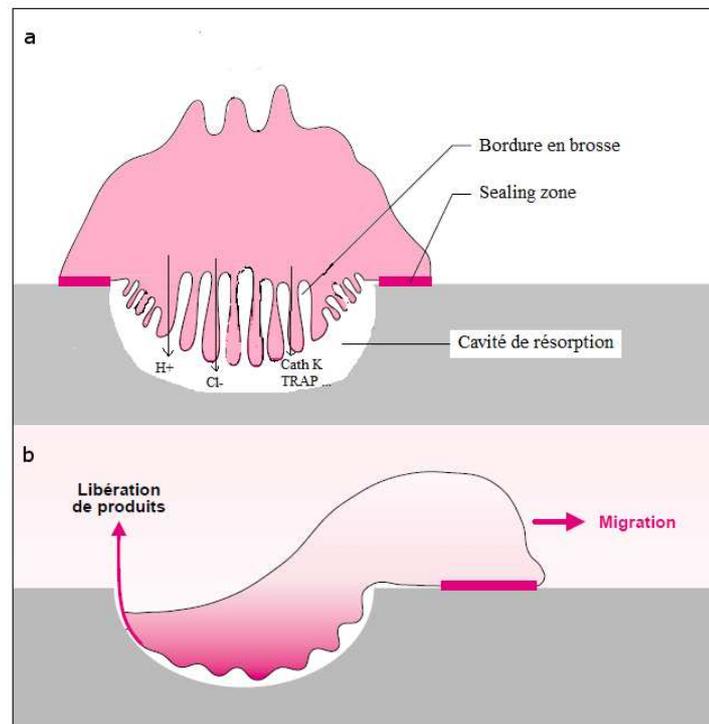


FIGURE 1.10 – a) Ostéoclaste polarisé en train de résorber par l'action combinée de protons  $H^+$  pour dissoudre le minéral et d'enzymes lysosomiales pour dégrader la matrice organique. b) Phase de migration. Adaptée de [22].

dû à l'accumulation de microdamages ou à certaines molécules de la matrice extracellulaire, les signaux qui permettent de cibler certaines zones de l'os sont encore inconnus[27].

### 1.1.2.2 La phase d'inversion

La seconde phase est une phase d'inversion où c'est au tour des pré-ostéoblastes, différenciés à partir de cellules souches mésenchymateuses, de venir sur site. Cette phase, qui dure une à deux semaines, met en évidence le couplage entre résorption et formation.

### 1.1.2.3 La phase de formation

La phase de formation est réalisée par un autre type cellulaire, les ostéoblastes. Ces cellules représentent 4 à 6 % des cellules osseuses[28] et sont issues de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ces cellules vont sécréter des protéines collagéniques, principalement de type I, et des protéines non collagéniques et protéoglycanes, de manière à former de la matrice collagénique non minéralisée appelée ostéoïde. La minéralisation se passe en plusieurs étapes, un premier crystal de tricalcium phosphate ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) se forme dans des vésicules dès que la concentration en calcium et phosphate dépasse le point de solubilité, ce crystal est ensuite hydroxylé. Ces cristaux d'hydroxyapatite sont libérés dans l'espace ex-

tracellulaire où ils comblent les trous entre les fibrilles de collagène[28]. Au bout de plusieurs mois, 50 à 60 % de la minéralisation est complète, le reste peut prendre des années. Cela entraîne des ostéons de minéralisation différente selon leur âge, les ostéons les plus jeunes étant moins minéralisés. Cette fois la formation se fait de l'extérieur vers l'intérieur (à une vitesse moyenne de 0,7  $\mu\text{m}/\text{jour}$ ), et au cours de ce processus certains ostéoblastes vont rester emmurés dans la matrice formant ainsi des ostéocytes. Les autres ostéoblastes vont soit mourir d'apoptose soit former des cellules bordantes dont le rôle serait de protéger le tissu qui n'est pas à renouveler[28]. Les ostéocytes sont de plus en plus étudiés[28-30], on ne connaît pas encore tout de ce type cellulaire mais on lui confère déjà de grandes responsabilités comme un rôle de mécanosenseur. Chaque ostéocyte se trouve interconnecté avec au plus 12 voisins par l'intermédiaire de processus cytoplasmiques (jusqu'à 60 par ostéocyte) (fig. 1.11). Ces processus passent dans des canaux appelés canaliculi dans lesquels circule du fluide et les ostéocytes seraient capables de sentir les mouvements du fluide. Toutes les cellules osseuses, sauf les ostéoclastes, sont interconnectées formant un véritable réseau capable de communiquer[31].

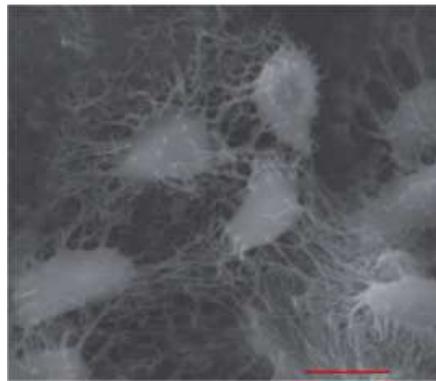


FIGURE 1.11 – Image MEB extraite de [31] montrant des ostéocytes de souris interconnectés (échelle 10  $\mu\text{m}$ ).

#### 1.1.2.4 La communication des cellules osseuses

Les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes ne sont pas des cellules passives indépendantes, bien au contraire, elles influent les unes sur les autres[30]. Les ostéoclastes régulent la formation osseuse indirectement via la libération de facteurs présents dans la matrice osseuse lors de sa dégradation mais également directement en libérant des clastokines qui participent au recrutement de précurseurs ostéoblastiques, à leur différenciation et aide à l'apposition de la matrice et la minéralisation[24].

Les ostéoblastes recrutent les ostéoclastes en sécrétant des cytokines et notamment RANKL[28], essentiel à la différenciation, fonction et survie des ostéoclastes.

On sait aujourd'hui que les ostéocytes sont aussi capables de contrôler directement l'activité ostéoblastique et ostéoclastique via la sécrétion de plusieurs protéines de signalisation, sécrétion qui se fait en réponse au flux de liquide interstitiel dans le réseau lacuno-canaliculaire

induit par un chargement mécanique[32]. La sécrétion de la glycoprotéine sclerostine (SOST) permet notamment d'inhiber la différenciation des ostéoblastes en bloquant la voie de signalisation Wnt/beta-catenine. Il a également été prouvé que les ostéocytes apoptotiques sécrètent des facteurs favorisant l'ostéoclastogénèse comme RANKL[28, 29].

#### 1.1.2.5 Effet du remodelage sur la minéralisation

Le remodelage crée une hétérogénéité de minéralisation qui est facilement observable en microscopie électronique à balayage en électrons rétrodiffusés, comme cela a été montré dans la littérature[33–36]. En effet, cette technique étant sensible au numéro atomique des éléments présents, plus il y aura de minéral, plus les électrons seront rétrodiffusés, plus le matériau correspondant apparaîtra clair. Ainsi sur la figure 1.12 on peut distinguer les ostéons jeunes plus sombres des ostéons vieux plus clairs.

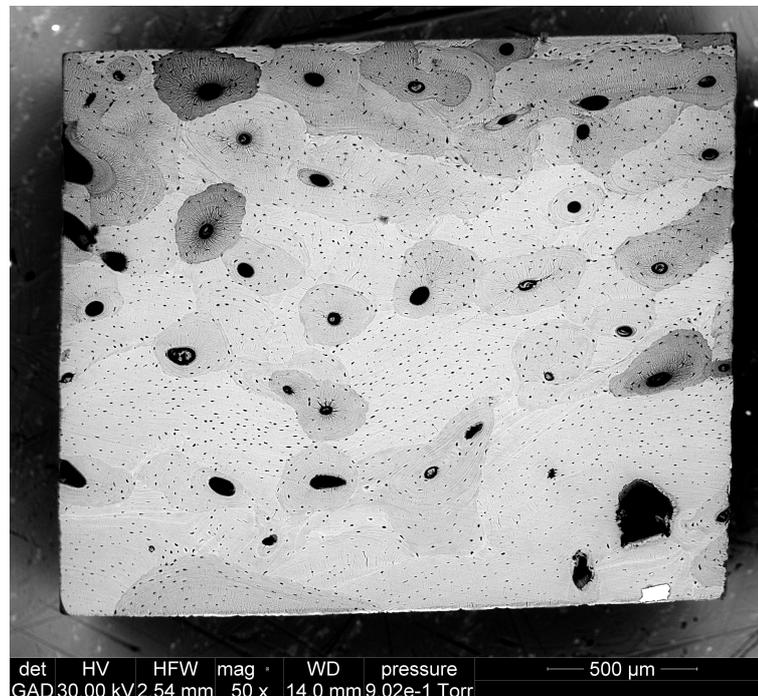


FIGURE 1.12 – Image d'un échantillon d'os cortical d'enfant où les ostéons les plus jeunes (les moins minéralisés) apparaissent les plus sombres, et les plus vieux (les plus minéralisés) apparaissent les plus clairs.

L'autofluorescence semble être également un indicateur du degré de minéralisation, un vieil ostéon étant plus autofluorescent qu'un jeune([37]. Cependant, la microscopie biphotonique, même si la SHG est parfois utilisée pour étudier le collagène de l'os[38], est plus utilisée pour étudier la peau[39, 40]. Le remodelage crée des différences de minéralisation localement mais le degré de minéralisation global ne varie pas beaucoup, il est proche de  $1 \text{ g/cm}^3$  pour un adulte ( $1,11 (0,02) \text{ g/cm}^3$ [7],  $1,13 (0,09) \text{ g/cm}^3$ [41]).

L'activité de remodelage est donc un processus complexe impliquant de nombreux facteurs et permettant la conservation de la masse osseuse. En cas de pathologie, cet équilibre peut être

perturbé, ce qui favorisera soit la formation soit la résorption osseuse. Dans le deux cas, ce déséquilibre aura des conséquences importantes sur les propriétés mécaniques de l'os et donc l'intégrité du squelette.

### 1.1.3 Les propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de l'os ont été massivement étudiées, que ce soit sur le modèle animal[42–46] ou humain, que ce soit sur de l'os trabéculaire[47–51] ou de l'os cortical. Cependant, nous allons nous restreindre à l'os cortical humain, et plus particulièrement à l'os d'enfant quand cela sera possible, puisque c'est celui auquel nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse. Notons qu'il est difficile, au vue de la littérature, d'estimer si l'os cortical est réellement plus résistant que l'os trabéculaire[52, 53]. Les propriétés de l'os cortical humain, qui dépendent du contenu minéral[54, 55], ont été étudiées à plusieurs échelles et par plusieurs techniques.

#### 1.1.3.1 A l'échelle macroscopique

A l'échelle macroscopique, des essais de compression[20, 54, 56], de traction[52, 57, 58] ou de flexion trois points[59] ont été utilisés pour étudier l'os cortical humain. Par exemple, Öhman *et al.* ont réalisé des essais de compression sur 12 échantillons d'os cortical d'enfants (atteints de tumeur osseuse) et ont pu comparer à 12 échantillons d'os cortical d'adultes sains. Ils ont trouvé un module d'Young moyen proche de 12 GPa pour l'enfant et un module d'Young moyen significativement plus élevé chez l'adulte, proche de 17 GPa. La contrainte à la rupture moyenne était proche de 120 MPa chez l'enfant alors qu'elle était significativement plus élevée chez l'adulte (200 MPa)[56]. Dong *et al.* ont réalisé des tests de compression sur 8 échantillons de femurs humains adultes dans 3 directions. Ils ont trouvé un module d'Young longitudinal de 19,1 (6,35) GPa significativement plus élevé que dans les directions circonférentielle et radiale, respectivement 5,65 (1,61) GPa et 6,49 (3,22) GPa. La limite d'élasticité était de 111 (18,6) MPa dans la direction longitudinale contre 41,8 (19,4) et 44,1 (21,1) MPa dans les deux autres directions. La contrainte à la rupture suivait la même tendance, 124 (15) MPa dans le sens longitudinal et 65,2 (13,8) et 63,1 (20,7) dans les sens circonférentiel et radial respectivement[20]. Lee *et al.* ont testé en traction de l'os cortical du tibia de 26 donneurs adultes et ont trouvé 11,3 (5,8) GPa, 70,6 (31,6) MPa et 77,0 (42,2) MPa respectivement pour le module élastique, la limite d'élasticité et la contrainte maximale[58]. Bayraktar *et al.* ont testé de l'os cortical fémoral adulte et rapportent un module d'Young de 17,8 (2,1) GPa[52]. Berteau *et al.* ont réalisé des essais de flexion trois points sur 8 fibulas d'enfants comparés à 16 échantillons similaires d'adultes, ils ont trouvé un module d'Young de 9,1 (3,5) GPa pour l'enfant et 7 (2,7) GPa pour l'adulte[59]. Ces valeurs sont plus faibles qu'en compression, cela provient de la différence de nature des tests. Certains auteurs ont mis au point

des méthodes pour calculer des paramètres élastiques à partir de données tomographiques, soit directement[55], soit par l'intermédiaire d'un modèle éléments finis[60].

Les méthodes ultrasonores macroscopiques sont également de plus en plus utilisées sur l'os car elles présentent certains avantages, c'est une technique rapide, non invasive qui ne nécessite pas différents échantillons pour tester plusieurs directions. Le principe de la méthode est d'envoyer une onde sonore sur l'échantillon à tester qui se propage dans le matériau par vibration des atomes. On récupère ensuite l'onde réfléchie (méthode pulse-echo) ou transmise (méthode en transmission) pour avoir des informations sur la vitesse ou l'amplitude, qui permettent ensuite de remonter aux propriétés élastiques du matériau ou de l'imager. Bon nombre d'études ont corrélé des données ultrasonores avec des données microarchitecturales ou mécaniques[58, 61, 62], d'autres ont utilisé ces méthodes pour prédire les fractures ou aider au diagnostic de certaines pathologies osseuses comme l'ostéoporose[63–70]. Concernant la mesure des propriétés élastiques macroscopiques, Berteau *et al.* ont trouvé respectivement, par une méthode en transmission, des valeurs de 15,5 (3,4) et 17 (2) GPa pour l'enfant et l'adulte[59], valeurs plus élevées que celles trouvées d'ordinaire par des essais mécaniques classiques.

### 1.1.3.2 A l'échelle du tissu

La technique ultrasonore est aussi largement utilisée à l'échelle du tissu cortical chez l'homme[71–74], il s'agit de la microscopie acoustique à balayage (*scanning acoustic microscopy SAM* en anglais). Par cette technique, Rohrbach *et al.* ont trouvé un module transverse de 18,5 (1,8) GPa[7] pour de l'os cortical adulte. Turner *et al.* ont utilisé cette méthode sur un fémur adulte, ils ont trouvé 14,91 (0,52) GPa dans le sens transverse et 20,55 (0,21) GPa dans le sens longitudinal[53]. Ils ont comparé ces résultats à la nanoindentation qui reste la technique la plus communément utilisée et dont le principe sera rappelé en chapitre 2.

La nanoindentation apparaît comme un moyen d'étudier les propriétés anisotropes de l'os cortical [75], ou bien d'étudier ses propriétés viscoélastiques[76, 77]. La nanoindentation a surtout été utilisée pour comparer les différences de comportement élastique entre différents sujets, différents sites anatomiques, différentes directions et différents types d'os à l'échelle du tissu[53, 78–81] que ce soit sur du tissu humain[53, 78, 79, 81] ou animal[80]. Il est clair que la méthode de nanoindentation peut apporter des informations essentielles sur le comportement de l'os à l'échelle du tissu. Zysset *et al.* ont par exemple remarqué que le module d'Young était plus élevé dans l'os interstitiel que dans les ostéons, cela probablement dû à une différence d'âge et donc à une différence de minéralisation. Cela a été constaté par d'autres auteurs[75, 79, 80]. Il semble également que le module dans le sens longitudinal soit plus important que dans le sens transversal[79, 80], qu'il soit plus important dans la diaphyse du fémur que dans le col[78] et dans l'os cortical que dans l'os trabéculaire[78–80]. Des valeurs autour de 20 GPa sont majoritairement trouvées dans la littérature (table 1.1). A cette échelle les variations de

Etude	Type d'os	Localisation anatomique	Direction	E(GPa)
[79]	O <sup>1</sup>	Tibia	Longitudinale	22,5 (1,3)
[79]	I <sup>2</sup>	Tibia	Longitudinale	25,8 (0,7)
[78]	O	Diaphyse fémur	Transversale	19,1 (5,4)
[78]	O	Col fémur	Transversale	15,8 (5,3)
[78]	I	Diaphyse fémur	Transversale	21,2 (5,3)
[78]	I	Col fémur	Transversale	17,5 (5,3)
[75]	O	Tibia humain	12 directions	14,9 (2,0) - 25,1 (2,1)
[75]	I	Tibia humain	12 directions	18,5 (1,1) - 27,1 (1,7)
[81]	O+I	Iliac jeune adulte	/	16,4 (2,2)
[81]	O+I	Iliac adulte	/	18,0 (2,2)
[81]	O+I	Iliac OP <sup>3</sup>	/	16,3 (1,3)
[81]	O+I	Iliac OP traités	/	16,6
[53]	O+I	Fémur adulte	Longitudinale	23,5 (0,2)
[53]	O+I	Fémur adulte	Transversale	16,6 (0,3)
[41]	O+I	Iliac femmes OP	/	19,4 (2,7)

TABLE 1.1 – Tableau des modules d'Young (en GPa) trouvés par différentes études en utilisant la nanoindentation sur de l'os cortical humain.

module d'Young ne peuvent être totalement expliquées par la densité minérale du tissu[82].

L'os est un matériau remarquable ayant des propriétés mécaniques élevées grâce à son organisation multi-échelles. Malheureusement, en cas de pathologie, ces facultés sont amoindries et la fracture est alors plus fréquente.

## 1.2 L'Ostéogénèse Imparfaite

Il existe de nombreuses pathologies osseuses, les deux plus communes étant l'ostéoporose et la maladie de Paget[83]. La maladie de Paget est une maladie génétique alors que l'ostéoporose est une maladie du vieillissement, reconnue aujourd'hui comme un problème de santé publique car elle touche une femme sur deux après 60 ans. C'est la conséquence d'un déséquilibre entre résorption et formation osseuse favorisant la résorption qui a pour conséquence la diminution de la masse osseuse, les travées sont de plus en plus fines jusqu'à disparition et l'os cortical s'affine. La conséquence est souvent la fracture de l'os, elle se produit généralement aux articulations, où l'os cortical est le plus fin. On tente aujourd'hui de prévenir, ou du moins retarder, les fractures en identifiant les cas à risque. La seconde stratégie est de traiter les personnes souffrant d'ostéoporose en leur administrant des bisphosphonates. Ce traitement, capable d'inhiber la résorption osseuse, est aussi celui utilisé en cas d'ostéogénèse imparfaite, puisque là encore il y a un problème de fragilité osseuse.

---

1. ostéon  
2. interstitiel  
3. ostéoporose

### 1.2.1 Généralités sur l'OI

L'Ostéogénèse Imparfaite (OI) est une maladie génétique rare due, dans 90 % des cas, à des mutations dites dominantes des gènes COL1a1 et COL1a2 codant pour les trois chaînes de collagène de type I organisées en triple hélice (2 alpha1 et 1 alpha2)[84, 85]. Ces mutations (selon le gène affecté, l'endroit sur la chaîne et l'acide aminé de substitution) entraînent un défaut de type quantitatif (quantité réduite de collagène normal) ou qualitatif (production de collagène défectueux). Les 10 % restants sont dus à des mutations dites récessives sur d'autres gènes que COL1a1 ou COL1a2 comme des gènes codant des protéines impliquées dans la structure du collagène ou même des gènes d'ostéoblaste codant des protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie[85, 86]. Les phénotypes sont ainsi très variés et associés à des sévérités différentes, mais dans tous les cas la fragilité du squelette est accrue, ce qui lui vaut le nom de la « maladie des os de verre ».

Selon la première classification, la classification de Silience[87] datant de 1979, il y avait 4 grands types dont le type I était le plus léger, le type II non viable, le type III le plus grave compatible avec la vie et le type IV un type intermédiaire. Depuis lors, d'autres mutations ont été identifiées (plusieurs centaines à ce jour) et d'autres types ont été créés, on compte désormais une dizaine de types d'OI, ce qui va très certainement encore changer dans les années à venir.

Les patients souffrant d'OI présentent des caractéristiques typiques[84, 85, 88–90] (fig. 1.13) qui peuvent varier quelque peu d'un type à un autre mais on retrouve toujours une fragilité accrue du squelette qui entraîne de nombreuses fractures notamment dans la petite enfance, et certaines peuvent même avoir lieu *in utero*. Les patients peuvent présenter une sclère bleue et une dentinogénèse imparfaite. Ils peuvent avoir une petite taille ainsi que des déformations progressives des os[89, 90] qui les obligent à utiliser un fauteuil roulant. Des problèmes respiratoires peuvent résulter de ces déformations et causer la mort prématurée des patients atteints d'OI.

On estime la fréquence mondiale entre 1 cas pour 5000 et un cas pour 30000, mais ces chiffres peuvent varier[84, 88] il est difficile de connaître exactement le nombre de personnes touchées puisque, d'une part la maladie est encore mal connue et d'autre part les types les moins sévères peuvent passer inaperçus ou être confondus avec d'autres pathologies osseuses comme le syndrome de Bruck[84] ou même avec de la maltraitance. De même, il est encore difficile d'être certain du type d'OI impliqué puisque les techniques de diagnostic ne se basent encore que trop rarement sur des analyses génétiques.

### 1.2.2 Diagnostic

Le diagnostic se fonde principalement sur l'histoire du patient et un examen physique, de nombreux facteurs sont alors pris en compte comme l'historique de la famille en termes de

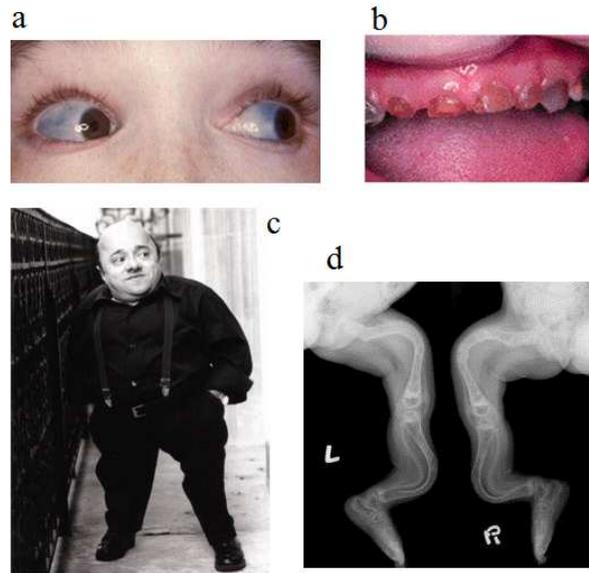


FIGURE 1.13 – Caractéristiques typiques présentes en cas d’OI a) sclère bleu b) dentinogénèse imparfaite c) Michel Petrucciani était atteint d’OI et, comme de nombreux patients, il avait une taille réduite, pas plus de 1m dans son cas d) os longs déformés.

pathologies osseuses, le nombre de fractures, la présence de défauts de croissance, la présence de caractéristiques évoquées précédemment . . . La distinction entre les formes légères, modérées ou sévères se fait également sur ces critères cliniques.

Des tests peuvent aider au diagnostic comme l’analyse moléculaire du collagène de type I et de ses gènes, la recherche de mutations connues, ou des mesures de densité minérale osseuse (*bone mineral density BMD* en anglais)[84, 89, 91]. En particulier, comme en cas d’ostéoporose, la BMD mesurée par absorption biphotonique à rayons X (*Dual energy X-ray absorptiometry DXA*) est plus faible en cas d’OI[70, 92–94] même si les résultats restent dur à interpréter à cause de la modification des os[95].

### 1.2.3 Traitements

Même s’il y a des recherches sur des traitements à base de ribozymes, d’hormones (de croissance ou parathyroïde), de cellules souches mésenchymateuses ou sur des traitements à l’aide de greffes de moelle osseuse[85, 91, 96, 97], aucun traitement curatif n’existe à ce jour. On se contente alors d’intervenir sur les conséquences de la maladie à savoir la fragilité osseuse. D’une part, il est possible d’opérer le patient afin de corriger une déformation ou de réparer une fracture[98]. D’autre part, un traitement médicamenteux est très souvent prescrit, sous forme de cures de bisphosphonates.

Les bisphosphonates (BPs), de formule  $((HO)_2P(O)CR_1R_2P(O)(OH)_2)$ , sont capables d’inhiber la résorption osseuse, cela est connu depuis les années 60. La dernière génération de BPs, les N-BPs, contiennent un atome d’azote dans la chaîne R2 particulièrement important

pour leur activité. Il semblerait que ces BPs soient notamment capables d'inhiber une enzyme essentielle au bon fonctionnement des ostéoclastes (l'enzyme FPPS), le nombre d'ostéoclastes ne changent pas mais la taille et le nombre de noyaux augmentent, ils deviennent des ostéoclastes « géants » et perdent leur fonction[99]. Ils pourraient également agir sur les ostéocytes mais la connaissance de leur mode d'action est encore incomplète[100]. Les BPs n'empêchent pas toute résorption, ils diminuent simplement fortement le taux de renouvellement[99]. De nombreux BPs ont été fabriqués et testés, l'affinité avec l'os diffère d'un BP à un autre ce qui change notamment son efficacité, son incorporation dans l'os et sa durée d'action. Cela est dû aux différences de groupes R1 et R2, par exemple l'ibandronate (fig. 1.14) serait 50 fois plus efficace que le pamidronate à cause des groupes méthyl et pentyl se trouvant sur l'azote, cette différence s'explique principalement en termes d'interactions hydrophobiques[100].

Les BPs les plus utilisés de nos jours pour traiter l'OI sont le pamidronate[93] et l'alendronate[101]. Ces traitements, donnés de manière orale[101, 102] ou intraveineuse[93, 103] permettent d'inhiber la résorption osseuse[100]. Ils ont prouvé leur efficacité en termes de diminution du taux de fractures et d'amélioration de la mobilité[101, 102].

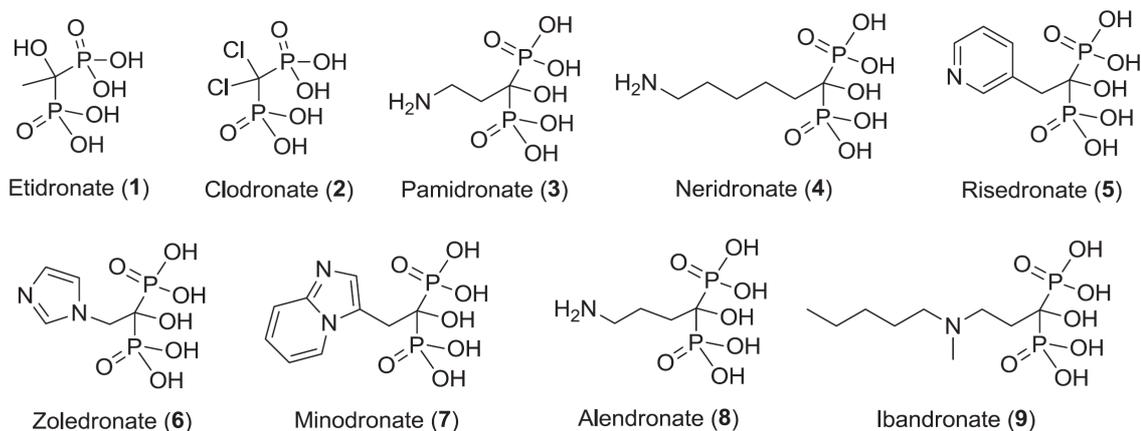


FIGURE 1.14 – Formules des différents types de bisphosphonates, extrait de [100].

#### 1.2.4 Les propriétés structurales et mécaniques

A cause de la rareté de la maladie et de la faible espérance de vie des personnes atteintes de formes sévères, peu de données sur l'OI humaine sont présentes dans la littérature, c'est pourquoi beaucoup utilisent le modèle de la souris (oim)[104–112] que nous n'allons pas détailler ici. Dans cette partie nous allons voir ce qui est connu à ce jour sur l'OI, principalement chez l'enfant, mais également chez l'adulte.

#### 1.2.4.1 Microstructure, ultrastructure et nanostructure

A l'échelle de la microstructure, de précédentes études ont observées des différences avec des microstructures normales. En particulier, la corticale était plus fine et les travées osseuses étaient moins nombreuses et plus fines[113–115]. Le système ostéonale secondaire manquait parfois[114], la densité et la morphologie des lacunes ostéocytaires étaient altérées[113, 114, 116] et la porosité intracorticale était plus importante[116, 117] avec notamment la présence de cavités « atypiques »[90], toutes ces observations sont des signes d'une activité de remodelage perturbée[92, 118].

A l'échelle ultrastructurale, des analyses histomorphométriques ont montré que les fibres de collagènes étaient irrégulières, désorganisées, de diamètre variable[119–122]. Les mutations pourraient avoir un effet direct sur le minéral à l'échelle moléculaire en perturbant la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite, l'effet des mutations peut être étudié avec des modèles moléculaires[19, 58, 123, 124]. En effet, il a été montré par plusieurs techniques et à différentes échelles que la minéralisation ne se passe pas correctement, les cristaux sont modifiés en termes de forme, de taille, de composition et de nombre[115, 120, 125–127]. En particulier, les cristaux sont plus petits, que ce soit chez l'homme[128, 129] ou chez la souris[111], mais la minéralisation augmente[115, 130], certainement une tentative pour maintenir des propriétés mécaniques aussi bonnes que possible.

#### 1.2.4.2 Les propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques du tissu cortical ont été étudiées par nanoindentation chez l'enfant OI[131, 132]. Même si, à notre connaissance, aucune comparaison avec un groupe d'enfants contrôles n'a été faite à ce jour, il semblerait que les propriétés mécaniques soient plus faibles dans le cas de l'OI et reflètent la sévérité du phénotype. Par exemple, Fan *et al.* ont trouvé pour l'os cortical un module d'Young (E) de 19,67 (2,76) GPa et une dureté (H) de 0,70 (0,17) GPa pour le type III, non significativement différents des valeurs pour le type IV (19,19 (2,4) et 0,66 (0,13) pour E et H respectivement)[132]. Albert *et al.* ont trouvé un module d'Young de 17,5 GPa pour le type I et une valeur significativement différente de 16,3 GPa pour le type III[131]. A noter qu'ils ont trouvé un module d'Young significativement plus élevé dans l'os interstitiel comparé à l'os ostéonal, ce qui était déjà connu pour l'os sain[78, 79]. De plus, ils ont noté un effet significatif du site anatomique sur le module d'Young mais pas sur la dureté. A l'inverse le genre et le traitement aux BPs avaient un effet significatif sur la dureté mais pas sur le module d'Young[131].

A notre connaissance, seules deux études très récentes (2014), portent sur les propriétés mécaniques à l'échelle macroscopique, Albert *et al.* ont utilisé la flexion trois points sur 12 échantillons d'os cortical de tibia, de femur et d'humerus provenant de 9 enfants atteints d'OI (2 types I, 5 types III et 2 types IV) dont 7 étaient traités par bisphosphonates. Ils ont mesuré

dans le sens transverse un module d'Young de 1,6 (0,4) GPa, une limite d'élasticité de 20,8 (6,0) MPa et une contrainte maximale de 26,5 (8,6) MPa. Les valeurs étaient supérieures dans le sens longitudinal avec un module d'Young de 4,4 (0,4) GPa, une limite d'élasticité de 61,4 (5,3) MPa et une contrainte maximale de 83,0 (7,8) MPa. Notons la large distribution des valeurs due à l'hétérogénéité inter et intratype. Dans cette même étude, ils ont trouvé une corrélation entre les propriétés mécaniques et la porosité corticale mais uniquement dans le sens longitudinal[116]. Vardakastani *et al.* ont trouvé une bonne corrélation entre la porosité mesurée par microscopie en lumière polarisée et les propriétés mécaniques mesurées en compression sur 5 échantillons provenant de 3 enfants atteints d'OI[117].

Ainsi, il reste beaucoup à faire pour améliorer la connaissance de cette pathologie, notamment au niveau des os corticaux d'enfant et de la comparaison avec des échantillons sains. Il faut également trouver des corrélations entre les paramètres architecturaux et les propriétés mécaniques afin de rendre compte de l'importance de chacun des facteurs dans la fragilité de ces os.



## Chapitre 2

# Etude à l'échelle du tissu des propriétés mécaniques et minérales de l'os chez l'enfant atteint d'Ostéogénèse Imparfait

---

<b>2.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>33</b>
2.1.1	Les échantillons	33
2.1.2	Préparation des échantillons	34
2.1.3	Tomographie RX haute résolution	34
2.1.4	Nanoindentation	35
2.1.5	Microspectroscopie Raman	36
2.1.6	Analyse statistique	37
<b>2.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>38</b>
2.2.1	La densité minérale du tissu (TMD)	38
2.2.2	Les propriétés mécaniques du tissu	38
2.2.3	Les propriétés chimiques du tissu	39
2.2.4	Relation entre le module d'Young et le contenu en minéral dans le groupe OI	41
<b>2.3</b>	<b>Discussion et conclusions</b>	<b>42</b>

---



## Résumé

L'Ostéogénèse Imparfait est une pathologie osseuse, due à des mutations génétiques, caractérisée notamment par une fragilité accrue des os à l'échelle macroscopique. Mais trop peu de données existent pour nous permettre de décrire précisément les mécanismes mis en jeu à l'échelle du tissu et les possibles corrélations entre les échelles. Pour permettre une meilleure compréhension des effets de l'OI sur les propriétés des os humains, nous avons étudié les propriétés mécaniques et chimiques de huit échantillons d'os d'enfants atteints d'OI que nous avons comparées aux propriétés de trois échantillons contrôles. Pour mesurer ces propriétés nous avons utilisé de la tomographie RX haute résolution, de la nanoindentation et de la microspectroscopie Raman. Nous avons trouvé une densité minérale du tissu significativement plus élevée chez les OI ( $1,131 \text{ gHA/cm}^3$  vs.  $1,032 \text{ gHA/cm}^3$ ,  $p=0,032$ ) alors que le module d'Young était significativement plus faible ( $17,6 \text{ GPa}$  vs.  $20,5 \text{ GPa}$ ,  $p=0,024$ ). De plus, les différences de cristallinité et de ratio minéral/matrice mesurées en microspectroscopie Raman suggéraient que les cristaux étant plus petits, ils devaient également être plus nombreux. Ces différences de qualité des cristaux contribuent à la fragilité des os des patients atteints d'OI.



## Introduction

Comme nous venons de le voir dans la partie bibliographique, l'OI a des effets considérables, tant à l'échelle du squelette dans son ensemble, qu'à des échelles beaucoup plus petites. On sait désormais que la production défectueuse de fibres de collagène a pour conséquence une minéralisation à son tour anormale[119], en particulier la densité minérale, ainsi que la forme, la taille et la composition des cristaux sont modifiées, comme cela a déjà été observé par diverses techniques[35, 115, 120, 125–128, 130]. Cependant, les conséquences de ces changements sur les propriétés mécaniques locales restent controversées.

De précédentes études faites à l'échelle du tissu ont montré que l'OI engendrait une modification du module d'Young local d'une part[131, 132], et de la minéralisation, en termes de densité minérale et de taille de cristaux, d'autre part mais ces paramètres n'ont jamais été étudiés ensemble sur des patients humains.

Le but de cette étude était donc d'investiguer la qualité du tissu des os de patients souffrant d'OI et de comparer aux propriétés obtenues pour des os contrôles. La densité minérale du tissu, les propriétés mécaniques locales et la composition du tissu ont été évaluées respectivement par tomographie RX haute résolution, nanoindentation et microspectroscopie Raman.

## 2.1 Matériels et méthodes

### 2.1.1 Les échantillons

Les échantillons d'os cortical humain dont nous disposons pour ce travail provenaient d'enfants sains et d'enfants atteints d'OI. Ils ont été collectés (avec consentement des familles) sur une année environ à l'hôpital Necker pour enfants malades de Paris lors d'opérations faisant suite à une fracture ou visant à corriger des déformations. Les donneurs pathologiques, au nombre de 7 (4 garçons, 3 filles), étaient atteints d'OI qualifiée de légère à sévère selon des critères cliniques, comme le nombre de fractures. Pour les patients impliqués dans cette étude, le nombre minimum de fractures était de 6 et tous ont eu au moins une cure de bisphosphonates. Les donneurs sains, au nombre de trois (un garçon, deux filles), étaient d'âge et d'indice de masse corporelle comparables aux patients atteints d'OI (respectivement  $p=0,23$  et  $p=1$ ). Pour cette étude 11 échantillons d'os cortical ont été utilisés, 8 provenaient d'os longs de patients atteints d'OI et 3 des patients sains, destinés à servir de contrôles. Deux échantillons étaient issus du même patient mais pas du même fémur, ce patient ayant été opéré une fois sur chaque fémur à deux mois d'intervalle. Cette étude a été menée en accord avec les recommandations du comité d'éthique (IRB 00003835 2010/28NI). Les os ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour des tests.

### 2.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons ont été coupés avec une scie diamantée (Secotom-15, Struers A/S, Ballerup, Denmark) en petits prismes de taille variable selon la quantité d'os. Les surfaces à analyser par nanoindentation et microspectroscopie Raman ont été polies avec des feuilles de silice (grain # 2400) puis avec de la pâte diamantée 1  $\mu\text{m}$  en présence de lubrifiant à base aqueuse. La normale à cette surface était parallèle à l'axe des ostéons.

### 2.1.3 Tomographie RX haute résolution

La tomographie RX haute résolution est une méthode d'imagerie qui permet de visualiser un objet en 3D. Cette technique, particulièrement employée dans le milieu médical, consiste à envoyer un faisceau de rayons X à travers l'échantillon à imager et calculer l'absorption en récupérant sur un détecteur le faisceau transmis. Le faisceau de rayons X est créé en plusieurs étapes, des électrons sont arrachés du filament et envoyés vers la cible (en tungstène ou molybdène) par l'action d'un couple anode-cathode. Lorsque ces électrons arrivent sur la cible il se produit deux phénomènes : un rayonnement principal dit de freinage dont une partie est dans le domaine des rayons X, et un rayonnement par fluorescence X dû à l'excitation des atomes de la cible. Le faisceau de rayons X est ensuite envoyé à travers l'échantillon à imager, lequel va tourner afin de récupérer des projections à chaque pas d'angle. L'ensemble de ces projections permet de reconstruire l'échantillon en 3D.

Chaque échantillon d'os a été placé dans un cryotube rempli de solution physiologique (NaCl 0,9%) puis imagé par un tomographe RX haute résolution (Phoenix Nanotom S, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Allemagne) équipé avec un tube nanofocus high-power et une cible en molybdène. Une tension de 70 kV, une intensité de 130  $\mu\text{A}$  et une résolution de 4  $\mu\text{m}$  ont été utilisées pour imager simultanément l'échantillon et deux fantômes. Une projection est enregistrée sur la caméra CCD tous les  $0,18^\circ$ , donnant lieu à des séries de 2000 images. Le logiciel Phoenix Datasx 2 (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Allemagne) utilisait ensuite cette série de projections pour reconstruire une série d'images 2D de sections perpendiculaires à la longueur des échantillons enregistrées en format TIFF et dont les niveaux de gris s'échelonnaient de 0 (noir) à 255 (blanc). Deux fantômes de concentration 0,25 et 0,75  $\text{gHA}/\text{cm}^3$  ont été imagés en même temps que les échantillons et leur niveau de gris moyen a été mesuré comme le maximum de la distribution des niveaux de gris. Une relation linéaire entre le niveau de gris et la densité minérale a été déduite de l'analyse des deux phantoms à 0,25  $\text{gHA}/\text{cm}^3$  et 0,75  $\text{gHA}/\text{cm}^3$ . La densité minérale du tissu (*tissue mineral density TMD*) de chaque échantillon a été calculée à partir de son niveau de gris et de la relation linéaire trouvée précédemment.

### 2.1.4 Nanoindentation

La nanoindentation est aujourd'hui une méthode très utilisée pour déterminer les propriétés mécaniques de l'os à l'échelle du tissu. La méthode consiste à enfoncer une pointe en diamant à force ou déplacement contrôlé dans une zone identifiée de l'échantillon et de se servir de la formule universellement utilisée d'Oliver et Pharr[78, 133] pour remonter au module d'Young (équations 2.1 et 2.2).

$$S = \beta \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{AE_r} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu_o^2)}{E_o} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i} \quad (2.2)$$

où  $S$  est la raideur de contact,  $A$  l'aire de contact,  $E_i$  et  $\nu_i$  sont le module d'Young et le coefficient de Poisson pour l'indenteur,  $E_o$  et  $\nu_o$  sont le module d'Young et le coefficient de Poisson pour l'os, et  $\beta$  dépend de la géométrie de l'indenteur. La raideur de contact se calcule comme la pente de la partie linéaire à la décharge de la courbe force déplacement résultante de l'essai de nanoindentation. L'aire de contact se détermine à partir de cette même courbe à condition de bien connaître la forme de l'indenteur, pour cela des systèmes de calibration sont utilisés. Il est aussi possible de calculer des valeurs de dureté en divisant la charge maximale par la surface de contact[79]. Il est important de garder à l'esprit que cette formule fait l'hypothèse d'un matériau homogène et isotrope, ce qui n'est pas rigoureusement le cas de l'os. Dans le cas d'un matériau anisotrope, le module d'Young dans une direction spécifique dépend de tous les coefficients élastiques. Si l'anisotropie n'est pas un paramètre pris en compte on doit se contenter de dire que le module trouvé est un module moyen des coefficients élastiques anisotropes[78, 79].

La nanoindentation a été réalisée sur des échantillons entourés de solution saline physiologique à température ambiante à l'aide d'un nanoindenteur commercial (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France). Un échantillon de silice était utilisé pour la calibration du contact avec la surface de la pointe Berkovich. Les tests d'indentation ont été réalisés sur une grille couvrant la majeure partie de la surface avec un espacement minimum de 150  $\mu\text{m}$  entre chaque indent. Une vitesse de déformation constante de 0,05  $s^{-1}$  et une profondeur maximale de 2000 nm ont été imposées. La méthode CSM (*Continuous Stiffness Measurement*) permet déterminer le module d'Young et la dureté comme fonctions du déplacement dans la surface. Dans cette étude, la méthode d'Oliver et Pharr[133] a été utilisée avec les hypothèses pour un matériau linéaire élastique isotrope. Les propriétés élastiques de la pointe diamantée étaient  $\nu_i = 0,07$  et  $E_i = 1131$  GPa. De plus, l'os était considéré comme isotrope avec un coefficient de Poisson de 0,3[10, 45]. Le module d'Young et la dureté ont été mesurés en chaque point sur le plateau de la courbe entre 600 nm et 1200 nm. Les indentations ayant lieu dans des trous

ou donnant de mauvaises courbes n'étaient pas incluses dans l'analyse. Le nombre de points conservés par échantillon était de 50 et 25 minimum pour les contrôles et les OI respectivement.

### 2.1.5 Microspectroscopie Raman

Avant de décrire les paramètres utilisés pour ce test, il convient de donner quelques explications sur le principe de cette méthode. La spectroscopie Raman est une technique non destructive utilisée pour étudier la composition moléculaire d'un matériau. On parle de microspectroscopie quand cette technique est utilisée en microscopie, c'est-à-dire que l'on va sonder un très petit volume dans l'échantillon et ce microscope peut être confocal s'il est capable de se positionner très précisément en profondeur grâce à une très faible profondeur de champ. Le principe de la spectroscopie Raman est le suivant, on envoie un faisceau de lumière monochromatique (trois choix de longueurs d'onde pour notre appareil 500 nm, 632 nm ou 785 nm) sur l'échantillon à étudier, ce qui va exciter les molécules présentes et induire de la diffusion Raman. C'est une diffusion inélastique où les photons incidents échangent de l'énergie avec les molécules du matériau, la lumière émise n'a donc pas la même longueur d'onde que la lumière incidente. Ce phénomène d'échange d'énergie se fait grâce aux mouvements de vibration des liaisons moléculaires via la création (processus Stokes) ou la destruction (processus anti-Stokes) de phonons et concerne seulement une faible portion de la lumière incidente (1 photon sur  $10^7$  [134]), le reste étant diffusé de manière élastique (diffusion Rayleigh). La différence de longueur d'onde entre le rayonnement diffusé et incident correspond donc aux vibrations moléculaires, ce qui entraîne l'apparition de bandes caractéristiques de ces modes de vibration des liaisons sur les spectres.

Un spectroscope Raman (LabRAM HR 800, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) a été utilisé sur les échantillons maintenus hydratés, la surface d'intérêt étant la même que celle utilisée en nanoindentation. Le laser de longueur d'onde 785 nm a été utilisé pour exciter les électrons à l'intérieur de l'échantillon. L'objectif 50x et une ouverture numérique (*numerical aperture*) de 0,75 ont produit un spot d'approximativement 2  $\mu\text{m}$  de diamètre sur l'échantillon. Les acquisitions ont été effectuées sur l'intervalle spectral  $750\text{ cm}^{-1}$  -  $1750\text{ cm}^{-1}$ , avec un temps d'intégration de 45 s et une seule accumulation. Cinq spectres ont été acquis en chaque point et nous avons fait 30 points sur chacun des 11 échantillons. Le logiciel LabSpec (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) a été utilisé pour supprimer les pics aberrants des spectres et soustraire la ligne de base. Nous avons réalisé une moyenne des cinq spectres puis un lissage par l'algorithme de la moyenne glissante sur 3 points grâce à des routines écrites dans Matlab<sup>®</sup> (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA).

Trois ratios de maximum d'intensité ont été calculés à partir du spectre lissé (fig. 2.1), i) le ratio minéral/matrice, comme le ratio du maximum des pics  $\nu_1\text{PO}_4$  ( $961\text{ cm}^{-1}$ ) et amide I ( $1667\text{ cm}^{-1}$ ), ii) le ratio carbonate/phosphate, comme le ratio entre  $\text{CO}_3$  ( $1075\text{ cm}^{-1}$ ) et  $\nu_1\text{PO}_4$

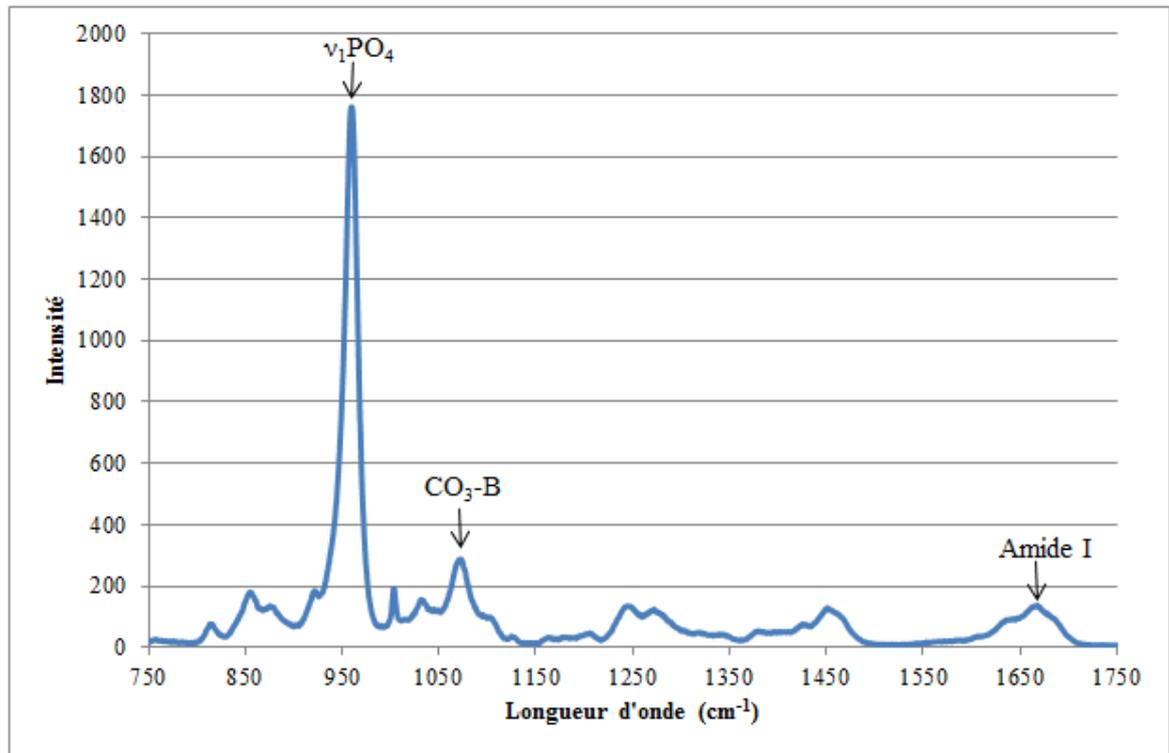


FIGURE 2.1 – Spectre Raman typique pour un contrôle obtenu après avoir soustrait la ligne de base, fait la moyenne sur les 5 spectres et le lissage. Le pic à  $961\text{ cm}^{-1}$  correspond au phosphate, le pic à  $1075\text{ cm}^{-1}$  correspond au carbonates (type B) et la bande large autour de  $1667\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'amide I.

( $961\text{ cm}^{-1}$ ), traduisant le taux de substitution en carbonates et iii) le ratio entre le maximum d'intensité des pics à  $1667\text{ cm}^{-1}$  et  $1685\text{ cm}^{-1}$ , décrit par plusieurs auteurs[109, 134, 135] comme le ratio entre les liaisons trivalentes dites non-réductibles (matures) et les liaisons divalentes dites réductibles (immatures). La cristallinité ainsi que l'intensité maximum et le shift Raman pour chaque pic ont été étudiés également. La cristallinité correspond à l'inverse de la largeur à mi-hauteur du pic  $\nu_1PO_4$  ( $961\text{ cm}^{-1}$ ); et plus la cristallinité est élevée plus la taille des cristaux le long de leur axe c est grande[136]. Les pics à  $1667\text{ cm}^{-1}$  et  $1685\text{ cm}^{-1}$  provenaient de la déconvolution de la bande de l'amide I à l'aide du logiciel LabSpec. La méthode de déconvolution des pics a tout d'abord été abordée dans des études utilisant la spectroscopie infrarouge (*Fourier Transform Infrared FTIR*)[137, 138] et a été utilisée plus récemment dans quelques études qui utilisaient la spectroscopie Raman sur de l'os[109, 135, 136, 139].

### 2.1.6 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel libre R (The R foundation), avec un seuil de 5 % pour le risque alpha. Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les variables des os pathologiques et des contrôles. Les corrélations ont été identifiées comme significatives ou non via le calcul du coefficient de

Echantillons	E <sup>1</sup> (GPa)	H <sup>2</sup> (GPa)	TMD <sup>3</sup> (gHA/cm <sup>3</sup> )
OI <sup>4</sup> 1	18,2 (2,7)	0,71 (0,12)	1,139
OI 2	13,6 (2,3)	0,54 (0,11)	1,042
OI 3	16,7 (2,8)	0,57 (0,11)	1,106
OI 4	20,3 (2,5)	0,70 (0,11)	1,159
OI 5	19,3 (2,7)	0,72 (0,11)	1,194
OI 6	18,1 (1,9)	0,70 (0,11)	1,188
OI 7	17,0 (2,1)	0,60 (0,11)	1,111
OI 8	17,9 (2,1)	0,65 (0,11)	1,111
<b>Moyenne (Ec<sup>5</sup>)</b>	<b>17,6 (2,0)<sup>a 6</sup></b>	<b>0,65 (0,07)</b>	<b>1,131 (0,050)<sup>a</sup></b>
C <sup>7</sup> 1	20,0 (2,6)	0,66 (0,13)	1,042
C 2	20,9 (2,6)	0,68 (0,14)	1,015
C 3	20,5 (1,9)	0,69 (0,01)	1,040
<b>Moyenne (Ec)</b>	<b>20,5 (0,5)</b>	<b>0,68 (0,02)</b>	<b>1,032 (0,015)</b>

TABLE 2.1 – Valeurs de modules d'Young, de dureté et de densité minérale du tissu pour les 8 échantillons OI et les 3 échantillons contrôles exprimées comme la valeur moyenne (écart-type).

corrélation de Spearman.

## 2.2 Résultats

### 2.2.1 La densité minérale du tissu (TMD)

La TMD a été mesurée par tomographie RX haute résolution, les résultats, pour chacun des deux groupes, sont présentés en table 2.1. Les valeurs moyennes (écart-type) de TMD pour les huit échantillons OI et les trois contrôles étaient respectivement, 1,131 (0,050) gHA/cm<sup>3</sup> et 1,032 (0,015) gHA/cm<sup>3</sup>. La TMD moyenne pour le groupe OI était significativement plus élevée (p=0,032) que pour le groupe contrôle (fig. 2.2).

### 2.2.2 Les propriétés mécaniques du tissu

Le module d'Young et la dureté ont été mesurés par nanoindentation. Les valeurs moyennes (écart-type) de modules d'Young pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles étaient 17,6 (2,0) GPa et 20,5 (0,5) GPa, respectivement. Les valeurs moyennes (écart-type) de dureté pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles étaient 0,65 (0,07) GPa et 0,68 (0,02) GPa, respectivement. Seul le module d'Young était, de façon significative, plus faible (p=0,024) chez les individus atteints d'OI que chez les contrôles (fig. 2.2).

---

1. Modele d'Young  
 2. Dureté  
 3. Densité minérale du tissu  
 4. Ostéogénèse Imparfait  
 5. Ecart-type  
 6. Le résultat pour le groupe OI est significativement différent du résultat pour le groupe contrôle, avec un risque alpha de 0,05  
 7. Contrôle

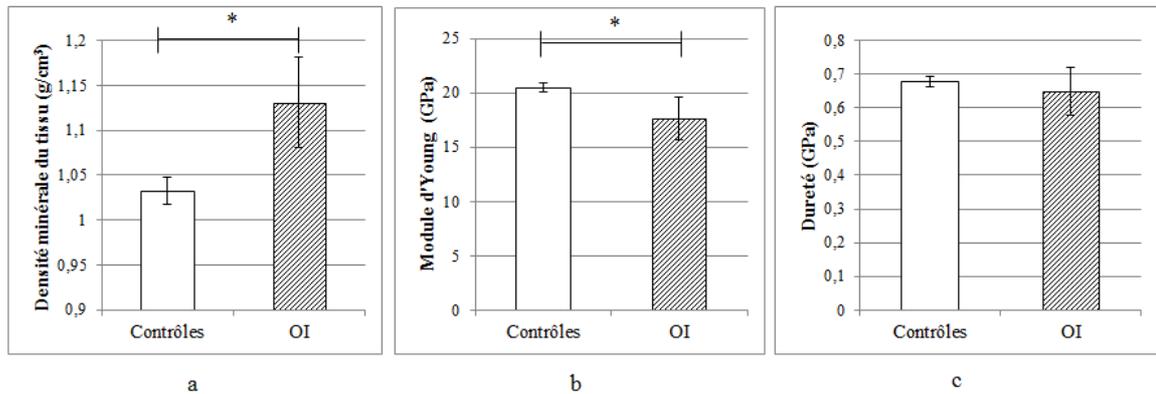


FIGURE 2.2 – a) Histogramme comparant les densités minérales moyennes pour le groupe OI et le groupe contrôle b) Histogramme comparant les modules d'Young moyens pour le groupe OI et le groupe contrôle c) Histogramme comparant les valeurs moyennes de dureté pour le groupe OI et le groupe contrôle. \* :  $p < 0.05$ .

### 2.2.3 Les propriétés chimiques du tissu

La composition du tissu a été évaluée par spectroscopie Raman. Les valeurs pour les quatre ratios présentés plus haut se trouvent en table 2.2. Les valeurs moyennes (écart-type) du ratio minéral/matrice ( $\nu_1 PO_4$ /Amide I) pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles étaient respectivement 21,0 (2,2) et 16,1 (0,1). Les valeurs moyennes (écart-type) de cristallinité pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles étaient respectivement de 0,057 (0,001) et 0,059 (0,0004). Le ratio minéral/matrice était significativement plus élevé ( $p=0,012$ ) pour le groupe OI comparé au groupe contrôle, alors que la cristallinité était significativement plus faible ( $p=0,019$ ).

La large bande de l'amide I pour un os contrôle et un OI est montrée en figure ???. L'intensité maximale du pic de l'amide I ( $1667 \text{ cm}^{-1}$ ) observée entre les deux groupes était différente. Les valeurs moyennes (écart-type) étaient 63,2 (10,7) pour le groupe OI et 92,1 (5,6) pour le groupe contrôle. Les valeurs moyennes (écart-type) du shift du pic de l'amide I était  $1667,4 (0,9) \text{ cm}^{-1}$  pour les échantillons OI et  $1666,1 (0,2) \text{ cm}^{-1}$  pour les contrôles. L'intensité maximale du pic de l'amide I et le nombre d'onde correspondant étaient significativement différents ( $p=0,012$  pour les deux) entre les deux groupes. Il n'y avait pas de différence significative pour les autres ratios. Même si le taux de substitution en carbonates et la maturité du collagène n'étaient pas significativement différents, il y avait une tendance vers une plus forte maturité du collagène pour les os OI (fig. 2.3).

Echantillons	Ratio minéral/matrice	Contenu en carbonates	Cristallinité	Maturité du collagène	Longueur d'onde, pic amide I	Intensité, pic amide I
OI 1	20,3	0,171	0,056	3,099	1667,2	70,6
OI 2	19,4	0,165	0,056	4,203	1666,5	69,7
OI 3	18,2	0,171	0,058	3,132	1667,5	58,9
OI 4	21,1	0,164	0,056	4,385	1668,0	53,6
OI 5	25,1	0,167	0,055	4,325	1669,2	43,6
OI 6	19,5	0,182	0,056	3,400	1667,6	70,2
OI 7	22,7	0,164	0,057	3,109	1666,4	76,0
OI 8	21,4	0,167	0,058	4,147	1666,9	62,9
<b>Moyenne (Ec)</b>	<b>21,0 (2,2)<sup>a 8</sup></b>	<b>0,170 (0,006)</b>	<b>0,057 (0,001)<sup>a</sup></b>	<b>3,725 (0,589)</b>	<b>1667,4 (0,9)<sup>a</sup></b>	<b>63,2 (10,7)<sup>a</sup></b>
C 1	16,0	0,168	0,059	3,990	1666,0	89,1
C 2	16,0	0,162	0,060	2,759	1666,3	98,6
C 3	16,2	0,166	0,059	3,565	1666,0	88,7
<b>Moyenne (Ec)</b>	<b>16,1 (0,1)</b>	<b>0,165 (0,003)</b>	<b>0,059 (0,0004)</b>	<b>3,438 (0,625)</b>	<b>1666,1 (0,2)</b>	<b>92,1 (5,6)</b>

TABLE 2.2 – Ratios mesurés en microspectroscopie Raman pour les huit échantillons OI et les trois échantillons contrôles.

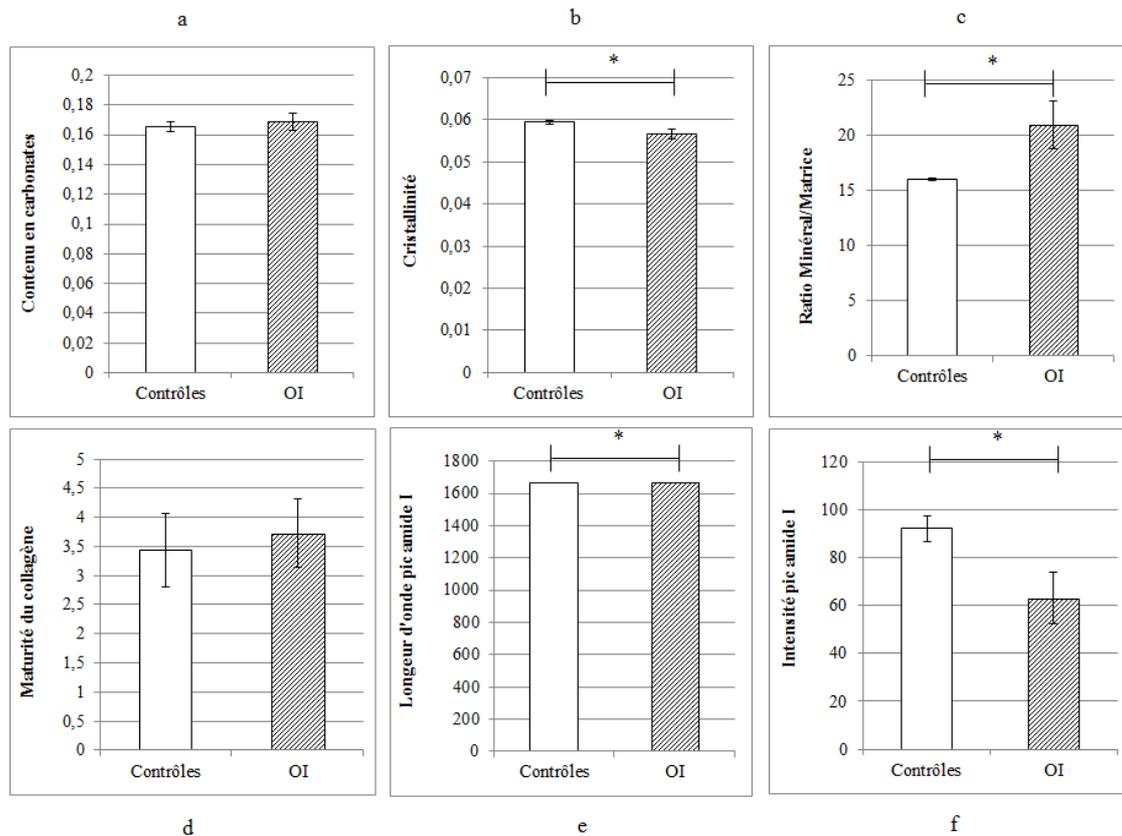


FIGURE 2.3 – a) Histogramme comparant le contenu en carbonates pour le groupe OI et le groupe contrôle b) Histogramme comparant la cristallinité pour le groupe OI et le groupe contrôle c) Histogramme comparant le ratio minéral/matrice pour le groupe OI et le groupe contrôle d) Histogramme comparant la maturité du collagène pour le groupe OI et le groupe contrôle e) Histogramme comparant la longueur d'onde du pic de l'amide I pour le groupe OI et le groupe contrôle f) Histogramme comparant l'intensité du pic de l'amide I pour le groupe OI et le groupe contrôle. \* :  $p < 0,05$ .

#### 2.2.4 Relation entre le module d'Young et le contenu en minéral dans le groupe OI

Les corrélations entre les valeurs moyennes de module d'Young et de TMD, mesurées respectivement par nanoindentation et tomographie, ont été examinées pour les individus OI (fig. 2.4). Ces paramètres étaient corrélés linéairement avec un coefficient de corrélation raisonnablement élevé ( $r = 0,874$ ,  $p = 0,005$ ), ce qui indique qu'une augmentation du module élastique des patients souffrant d'OI est principalement reliée à une augmentation du contenu minéral. La corrélation n'était pas pertinente dans le groupe contrôle à cause des faibles variations de modules élastiques et de TMD des patients contrôles. De plus, la figure 2.4 montre une évidente différence entre les comportements des os OI et des os contrôles.

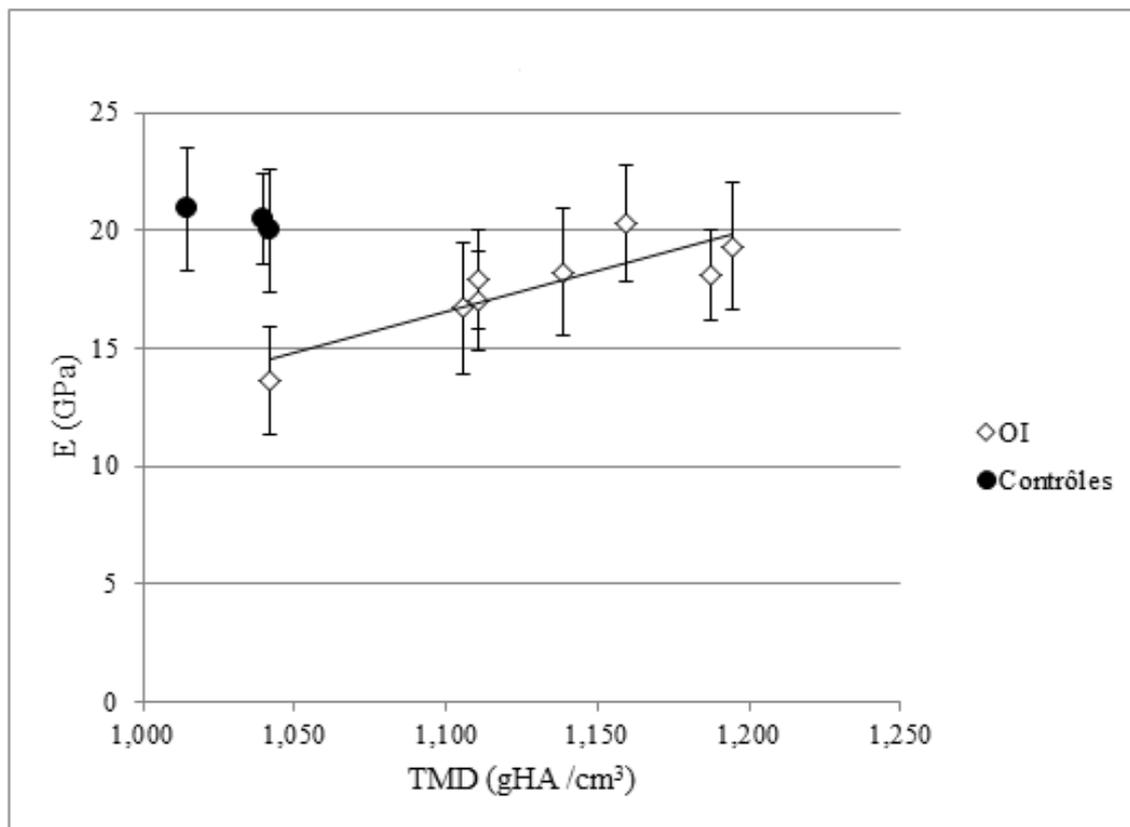


FIGURE 2.4 – Graphe présentant le module d'Young mesuré par nanoindentation en fonction de la TMD mesurée par tomographie pour les 11 échantillons. Pour chaque point, les barres d'erreur correspondent à l'écart-type obtenu sur les mesures de nanoindentation. Les cercles noirs correspondent aux contrôles tandis que les losanges correspondent aux OI.

### 2.3 Discussion et conclusions

Dans cette étude, les propriétés mécaniques et chimiques du tissu osseux de patients souffrant d'OI et du tissu osseux de contrôles ont été comparées à l'échelle du tissu, via l'utilisation des techniques de tomographie RX haute résolution, de nanoindentation et de microspectroscopie Raman. Tous les échantillons récupérés de patients OI provenaient d'os longs, quel que soit le genre des patients. La pathologie étant rare, le nombre d'échantillons était faible, et cela peut expliquer le fait que certains résultats ne soient pas significatifs. Les échantillons collectés pour le groupe contrôle provenaient également d'os longs, sans égard pour le genre. Cependant, tous les résultats mesurés dans le groupe contrôle étaient très homogènes, avec un très faible écart-type.

Dans cette étude, tous les patients OI ont reçu au moins une cure de bisphosphonates (BPs), traitement classiquement utilisé en cas d'OI. Les résultats obtenus sont donc cliniquement pertinents mais, dû à ce traitement, les deux groupes inclus dans cette étude diffèrent en deux points. Il est désormais connu que les BPs préviennent efficacement les fractures et augmentent

la densité minérale[84, 85, 93, 101]. Ils n'affectent pas significativement la taille des cristaux, comme cela a été mesuré par différentes techniques[140–142]. Une étude de Boyde *et al.* a montré l'augmentation de la densité minérale chez des patients OI non traités par BPs[130], on peut donc en conclure que la tendance observée pour la densité minérale entre OI et sains n'a pas été affectée, mais l'effet dû à la pathologie a simplement été surestimé. Du point de vue des propriétés mécaniques, des études réalisées sur des rats et des souris traitées aux BPs ont montré que les BPs augmentent les propriétés mécaniques des os longs. En ce qui concerne plus particulièrement l'OI, Albert *et al.* ont montré une petite augmentation de la dureté sous l'effet du traitement aux BPs mais aucun effet significatif sur le module d'Young[131]. Les tendances observées pour les propriétés mécaniques n'ont pas été modifiées avec l'utilisation des BPs mais les valeurs ont pu être encore une fois surestimées.

Les fibres de collagène observées en cas d'OI diffèrent morphologiquement des fibres normales, en particulier elles ont un diamètre plus petit[143]. De la même manière, la densité de liaisons entre les fibres de collagène est réduite[124]. Ces changements observés sur des os humains ont été intensivement étudiés sur les modèles murins d'OI, qui ont montré une quantité réduite de collagène[108], des fibrilles désorganisées[105, 109] et de qualité altérée[109]. La spectroscopie Raman utilisée dans cette étude a montré la modification de la qualité et de la structure du collagène. En particulier, nous avons observé une intensité maximale du pic de l'amide I significativement plus faible, ce qui correspond à un contenu en collagène significativement réduit. Un déplacement de ce pic, lié à la rupture des liaisons entre les fibres de collagène[134, 144], suggère également la modification de la qualité du collagène dans les os OI. Cette modification du collagène conduit à l'augmentation de la fragilité du tissu osseux chez les patients atteints d'OI. De manière similaire, il est bien connu que le comportement mécanique des os sains, et particulièrement le risque de fracture, dépend de la densité minérale[57, 145, 146]. Cependant, cette affirmation atteint ses limites dans les cas pathologiques où la distribution et la morphologie du minéral sont très différentes. Dans ces cas, la connaissance de la densité minérale seule ne suffit pas à prédire le comportement mécanique. Dans ce contexte, le but de cette étude était d'investiguer le minéral et les propriétés mécaniques d'échantillons d'OI comparativement à des contrôles.

Dans notre étude, la densité minérale du tissu (TMD) a été mesurée par tomographie RX haute résolution. Nous avons mesuré une TMD significativement plus élevée chez les OI (1,131 (0,050)  $gHA/cm^3$ ) comparés aux contrôles (1,032 (0,015)  $gHA/cm^3$ ,  $p=0,032$ ). Ces résultats étaient en accord avec des études précédentes[115, 127, 130] montrant que la minéralisation était qualitativement plus élevée dans les os humains OI comparés à des os sains. Il est bon de rappeler que dans notre étude tous les patients OI ont reçu un traitement aux BPs, ce qui réduit l'activité de résorption. Dans les os de souris oi (oim), un niveau de minéralisation plus élevé a également été détecté par microscopie électronique en électrons rétrodiffusés[104, 105]. D'un point de vue quantitatif, la TMD a été mesurée par tomographie sur des souris OI et

comparée à des contrôles ( $0,956 \text{ gHA/cm}^3$  pour des souris OI de 6 mois vs.  $0,921 \text{ gHA/cm}^3$  pour les contrôles)[109]. L'ordre de grandeur et la tendance de ce résultat étaient en accord avec les valeurs trouvées dans notre étude.

L'augmentation de la TMD était associée à une diminution significative des propriétés mécaniques mesurées par nanoindentation. Le module d'Young est passé de 20,5 (0,5) GPa à 17,6 (2,0) GPa pour les OI, la dureté, quant à elle, est passée de 0,68 (0,02) GPa à 0,65 (0,07) GPa. Précédemment, quelques auteurs ont étudié les propriétés mécaniques locales d'os humains OI par nanoindentation, ils ont trouvé des valeurs en accord avec les nôtres. Fan *et al.* ont mesuré une valeur moyenne de 19,67 GPa pour des os corticaux humains d'OI type III[132], et Albert *et al.* ont trouvé une valeur moyenne de 16,3 GPa pour le même type d'OI[131]. Néanmoins, aucune de ces deux études ne comparaient leurs résultats à des échantillons contrôles humains. Le module d'Young local de souris OI était également inférieur à celui des souris sauvages[105]. Dans notre étude, nous avons analysé la relation entre la densité minérale du tissu et le module d'Young à l'intérieur du groupe OI. Comme pour les os sains, le module élastique et la dureté augmentaient avec la minéralisation (fig.2.4). Ces résultats suggéraient que l'OI modifiaient considérablement les propriétés mécaniques du composite constitué d'une matrice de collagène et de cristaux d'hydroxyapatite via la qualité du minéral ou la qualité de l'adhésion au niveau de l'interface entre les cristaux et la matrice. Par exemple, une mauvaise adhésion pourrait entraîner des régions avec un faible contenu minéral, ce qui pourrait entraîner à son tour une modification de l'organisation du tissu à une échelle plus grande. L'augmentation de la densité minérale du tissu permettait alors d'augmenter les propriétés mécaniques chez l'OI, mais pas suffisamment pour pouvoir compenser la diminution du module d'Young due à la pathologie.

Dans notre étude, le minéral des os OI comparé aux os contrôles a été étudié par microspectroscopie Raman. A notre connaissance, cette technique n'a pas encore été utilisée sur des os humains OI. La microspectroscopie Raman fournit des informations sur la composition du matériau ainsi que sur la taille des cristaux via la mesure de cristallinité[136], avec plusieurs avantages sur la spectroscopie infrarouge. Par exemple, il n'y a pas besoin de préparer les échantillons et les échantillons biologiques peuvent être analysés dans un état hydraté puisque l'eau ne disperse que très faiblement les signaux Raman. Cependant, cette technique est sensible à la localisation des mesures et requière donc plusieurs acquisitions afin d'en faire la moyenne. Dans notre étude, la microspectroscopie Raman a montré des différences significatives du ratio minéral/matrice entre les os OI et les contrôles (21,0 (2,2) vs. 16,1 (0,1),  $p=0,012$ ), similaires aux résultats obtenus par plusieurs auteurs sur des souris oi, en utilisant soit FTIR[109, 112] soit la spectroscopie Raman[108]. Par contre, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux groupes sur le ratio carbonate / phosphate, alors que ces trois mêmes études ont montré un ratio plus petit chez les souris OI par rapport aux contrôles.

La cristallinité était significativement plus faible pour le groupe OI comparé au groupe

contrôle (respectivement 0,057 (0,001) and 0,059 (0,0004), et  $p=0,019$ ). Ce résultat était en accord avec l'étude de Vetter *et al.* qui a montré, à l'aide de la diffraction RX, une plus petite cristallinité chez les os OI, correspondant à de plus petits cristaux[128]. Ces auteurs ont ainsi fait l'hypothèse que la pathologie de l'OI jouait un rôle important sur la croissance des cristaux. De la même manière, plusieurs études réalisées par microscopie électronique en transmission[105], diffraction RX[109] ou dispersion RX (*small-angle X-ray scattering*)[104, 111] ont observé de plus petits cristaux chez les souris OI en comparaison avec les souris sauvages. Toutes ont conclu que les fibres de collagène altérées ne permettaient pas aux cristaux de nucléer et croître correctement, possiblement à cause de protéines non-collagéniques impliquées dans le dysfonctionnement de la minéralisation[147].

Dans notre étude comparant des os OI et contrôles, une plus faible cristallinité et un ratio minéral/matrice plus élevé étaient associés à des propriétés mécaniques plus faibles. Dans de précédentes études, des auteurs ont étudiés cette corrélation entre la qualité du minéral mesurée par spectroscopie Raman et les propriétés mécaniques d'échantillons d'os non OI[148–152]. Toutes ont montré que les propriétés mécaniques à différentes échelles étaient en partie expliquées par la substitution en carbonates et la cristallinité. Des propriétés mécaniques plus faibles des os normaux étaient corrélées avec de plus petits cristaux et une substitution en ions carbonates plus élevée. Par exemple, à l'échelle microscopique, le module d'Young obtenu par nanoindentation était négativement corrélé avec la substitution en ions carbonates, mais sa corrélation avec la cristallinité n'était pas significative[150]. Cependant, à l'échelle de l'os entier, le module d'Young obtenu par flexion trois points ou essais de traction était positivement corrélé à la cristallinité[149, 150]. D'un point de vue numérique, des études ont montré l'effet de la taille des cristaux sur les propriétés mécaniques, en particulier de plus petits cristaux entraînaient un plus faible module en traction de la surface[18], suggérant que la taille des cristaux jouait un rôle important sur le comportement de l'interface collagène–hydroxyapatite.

En conclusion, cette étude s'intéressait aux propriétés mécaniques et chimiques d'os d'enfants souffrant d'OI comparativement aux propriétés d'os normaux, mesurées par tomographie RX haute résolution, nanoindentation et microspectroscopie Raman. Nos résultats ont montré une diminution significative du module d'Young et de la cristallinité et une augmentation significative de la densité minérale du tissu. Cette pathologie est associée à une augmentation de la fragilité osseuse et a été caractérisée par une taille de cristaux significativement plus petite, ce qui indique que l'altération de la qualité du collagène empêche la bonne croissance des cristaux d'hydroxyapatite. Par conséquent, la modification du collagène a modifié à son tour, de manière significative, le processus de minéralisation, qui a eu pour conséquence un comportement mécanique déficient. L'augmentation de la TMD dans les os OI a permis d'augmenter le module d'Young de ces mêmes os mais ce n'était pas suffisant pour compenser la baisse de module observée chez les patients souffrant d'OI par rapport aux contrôles. A ce niveau, il serait intéressant de corroborer nos résultats obtenus en spectroscopie Raman par une ana-

lyse en spectroscopie infrarouge. De plus, renforcer notre connaissance de l'interface entre les cristaux et la matrice de collagène serait des plus pertinents pour comprendre totalement les mécanismes impliqués dans la diminution de la qualité du tissu. Même si cette qualité du tissu est un paramètre important à prendre en compte pour expliquer la diminution des propriétés mécaniques, il est pertinent de penser que le risque fracturaire est également affecté par des échelles plus grandes où l'étude de la microstructure prend tout son sens. L'étude de la microstructure et des propriétés mécaniques à l'échelle macroscopique pourrait donc nous permettre de clarifier l'importance de chacun de ces facteurs dans la fragilité des os des patients atteints d'OI.

## Chapitre 3

# Comparaison de la microstructure et des propriétés mécaniques en compression de l'os cortical entre l'enfant atteint d'Ostéogénèse Imparfaite et l'enfant sain

---

<b>3.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>51</b>
3.1.1	Les échantillons	51
3.1.2	Préparation des échantillons	52
3.1.3	Tomographie RX haute résolution	52
3.1.4	Essais de compression	52
3.1.5	Microscopie électronique à balayage	53
3.1.6	Comptage des lacunes ostéocytaires	54
3.1.7	Comptage des lacunes ostéocytaires	54
<b>3.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>54</b>
3.2.1	Observation des microstructures	54
3.2.2	La porosité vasculaire intracorticale	57
3.2.3	La densité minérale osseuse (BMD) et la densité minérale du tissu (TMD)	60
3.2.4	Les propriétés mécaniques macroscopiques	61
<b>3.3</b>	<b>Discussion et conclusions</b>	<b>61</b>

---



## Résumé

L'Ostéogénèse Imparfait est une maladie génétique dont l'effet à l'échelle du tissu est une dégradation évidente de sa qualité. Néanmoins, la qualité du tissu n'est peut-être pas le seul facteur à prendre en compte lorsque l'on s'intéresse à la tenue mécanique du squelette. Trop peu de données existent à l'échelle macroscopique pour décrire précisément tous les mécanismes impliqués dans la fragilité des os de patients atteints d'OI. Afin d'améliorer la compréhension de ces mécanismes, en particulier l'effet de la microstructure sur les propriétés mécaniques, nous avons étudié les propriétés mécaniques et structurales de six échantillons d'os provenant de patients souffrant d'OI et nous les avons comparés à trois échantillons contrôles. Ces propriétés ont été mesurées à l'aide de la microscopie électronique à balayage, de la tomographie RX haute résolution et d'essais de compression macroscopique. Nous avons observé plus de cavités de résorption et de lacunes ostéocytaires chez l'OI comparé au groupe contrôle. De plus, une porosité plus importante a été mesurée chez les OI, ainsi qu'une limite d'élasticité et une contrainte à la rupture plus faibles. La microstructure est clairement modifiée en cas d'OI, notamment au niveau des porosités vasculaires et lacunaires, probablement à cause d'un défaut de remodelage osseux. Ces changements impactent les propriétés mécaniques de manière négative et augmentent ainsi le risque fracturaire.



## Introduction

L'Ostéogénèse Imparfait est une maladie génétique qui entraîne une diminution de la qualité du tissu comme cela a été vu aux chapitres 1 et 2. Les deux constituants de l'os sont alors impactés, en particulier les fibres de collagène sont désorganisées et les cristaux d'hydroxyapatite sont plus petits. Les conséquences à l'échelle du tissu sont des propriétés mécaniques plus faibles. Nous avons notamment vu dans la partie précédente que le module d'Young mesuré en nanoindentation passait de 20,5 (0,5) GPa pour les contrôles à seulement 17,6 (2,0) GPa pour les OI.

Des études ont aussi investigué l'effet de l'OI sur la microstructure montrant que l'activité de remodelage est perturbée[70, 90, 113, 115, 118], ce qui entraîne une densité en ostéons plus faible[90, 114] et la formation de cavités « atypiques »[90]. Cependant, les effets de ces changements de microstructure sur les propriétés mécaniques n'ont été que partiellement étudiés. Récemment, Albert *et al.* ont lié la porosité vasculaire intracorticale aux propriétés mécaniques mesurées en flexion trois points dans la direction longitudinale mais ils n'ont trouvé aucune corrélation significative dans le sens transverse[116].

Cependant, à notre connaissance, à l'échelle macroscopique aucune étude comparative n'a encore été réalisée à ce jour. Donc le but de cette étude était double, nous voulions d'une part comparer les propriétés mécaniques et la microstructure entre des enfants souffrant d'OI et des enfants sains, et d'autre part établir des corrélations entre ces paramètres mécaniques et des paramètres de microstructure pour la population OI afin de déterminer des facteurs clés impliqués dans la fragilité osseuse. La densité en lacunes ostéocytaires, la porosité vasculaire et les propriétés mécaniques macroscopiques ont été mesurées respectivement par microscopie électronique à balayage, tomographie RX haute résolution et essais de compression.

## 3.1 Matériels et méthodes

### 3.1.1 Les échantillons

Comme pour l'étude précédente, les échantillons d'os cortical humain dont nous disposions pour ce travail de thèse provenaient d'enfants sains et d'enfants atteints d'OI qualifiée de légère à sévère. Ils ont également été collectés à l'hôpital Necker pour enfants malades de Paris lors d'opérations faisant suite à une fracture ou visant à corriger des déformations. Les donneurs pathologiques étaient au nombre de 5 (2 garçons, 3 filles d'âge compris entre 7 et 21 ans) et pour les patients impliqués dans cette étude, le nombre minimum de fractures était de 7 et tous ont eu au moins une cure de bisphosphonates. Les donneurs sains, au nombre de trois (un garçon, deux filles), étaient d'âge et d'indice de masse corporelle comparables aux patients atteints d'OI (respectivement  $p=0,55$  et  $p=0,85$ ). Pour cette étude macroscopique, 9 échantillons d'os cortical ont été utilisés, 6 provenaient de patients atteints d'OI et 3 des

patients sains, destinés à servir de contrôles. Deux échantillons étaient issus du même patient mais pas du même fémur, ce patient ayant été opéré une fois sur chaque fémur à deux mois d'intervalle. Cette étude a été menée en accord avec les recommandations du comité d'éthique (IRB 00003835 2010/28NI). Les os ont été conservés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour des tests.

### 3.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons d'os ont été coupés à l'aide d'une scie diamantée (Secotom-15, Struers A/S, Ballerup, Danemark) en parallélépipèdes de taille variable selon la quantité d'os à disposition, et proche de 3 mm de long, 1,6 mm de large et 1,6 mm de haut. Les échantillons ont été préparés afin d'être testés en compression transversalement, i.e. dans la direction perpendiculaire à l'axe des ostéons.

### 3.1.3 Tomographie RX haute résolution

Le principe de cette technique se trouve au chapitre 2. Les mêmes paramètres d'acquisitions ont été utilisés dans cette étude. Seul le calcul des densités diffère puisque cette fois le logiciel CT-Analyser (Bruker-microCT, Kartuizersweg 3B, Belgique) a été utilisé pour calculer la porosité vasculaire (canaux de Havers, canaux de Volkmann et cavités) et la densité minérale de l'échantillon incluant la porosité (*bone mineral density BMD*). La densité minérale du tissu (*tissue mineral density TMD*) a ensuite été calculée en divisant la BMD par (1- porosité).

### 3.1.4 Essais de compression

Chaque échantillon parallélépipédique a été testé en compression à l'aide d'une micromachine développée en interne, contrôlée par ordinateur via une carte d'acquisition LabView (National Instrument Corporation, Austin, Texas, US). L'échantillon était disposé entre les deux mors cylindriques de la machine et maintenu en place grâce à une précontrainte de 10 N. Une vitesse du mors mobile de  $0,7\text{ }\mu\text{m/s}$  a été imposée. L'essai se composait d'une première charge jusqu'à 100 N, puis d'une décharge avant de recharger jusqu'à fissuration. La force était mesurée à l'aide d'un capteur de force 2,5 kN et le déplacement à l'aide d'un extensomètre fixé sur les mors cylindriques. La courbe contrainte-déformation, a été déduite de la courbe force-déplacement, en normalisant la force par la section initiale et le déplacement par la longueur initiale de l'échantillon. Le module d'Young ( $E$ ) a été mesuré comme la pente de la partie linéaire à la décharge, le point d'inflexion à la frontière entre la partie linéaire et la partie non linéaire a été défini comme la limite d'élasticité ( $\sigma_y$ ). La contrainte à la rupture ( $\sigma_{max}$ ) a été définie comme la contrainte maximale atteinte lors de l'essai et la déformation à la rupture était la déformation correspondant à cette contrainte maximale.

### 3.1.5 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) (*scanning electron microscopy SEM*) est une méthode d'imagerie de surface fondée sur l'interaction électron-matière. Cette technique, largement répandue pour l'analyse surfacique des matériaux, est souvent utilisée pour étudier le tissu osseux[33–36, 81], les effets des médicaments comme les bisphosphonates[140] ou même l'OI[104, 127]. Le principe général est le suivant : un filament (de tungstène ou de hexaborure de lanthane) est chauffé par effet joule pour créer des électrons, ces électrons sont accélérés par une tension d'accélération due à une différence de potentiel entre une anode et une cathode. Le faisceau d'électrons traverse ensuite plusieurs dispositifs optiques (diaphragme et lentilles électromagnétiques) qui vont modifier la taille du faisceau en fonction de la résolution souhaitée, ceci est notamment commandé par la valeur du courant. Au contact de l'échantillon (dont la surface a été rendue conductrice pour une configuration de MEB traditionnelle) situé dans une chambre sous vide de haute qualité (ou un peu plus dégradé par la présence de gaz dans le cas d'un MEB environnemental), le faisceau incident va donner lieu à plusieurs sortes d'émission : les électrons secondaires ( $< 100$  nm, analyse topographique), les électrons rétrodiffusés ( $< 1$   $\mu\text{m}$ , dépend du numéro atomique  $Z$ ), les électrons Auger ( $< 1$  nm, information chimique et type de liaisons) et les rayons X (quelques microns, analyse chimique). Un détecteur adapté permet de récupérer le rayonnement émis souhaité et un balayage de la surface plus ou moins rapide permet de récupérer une image plus ou moins contrastée au grossissement souhaité.

Dans cette étude, seuls les électrons rétrodiffusés ont été utilisés, ce sont les électrons incidents qui sont réémis quasi élastiquement de manière rectiligne suite au choc avec les atomes de la surface de l'échantillon. Ils proviennent d'une profondeur de l'ordre du micron et le nombre d'électrons rétrodiffusés récupérés dépend donc de l'orientation de la surface et du numéro atomique des éléments de cette surface. Ainsi, dans le cas de l'os, les parties les plus minéralisées apparaîtront plus claires car plus d'électrons du rayonnement incident ont pu être réémis vers le détecteur, et les parties les moins minéralisées apparaîtront plus sombres. Il est connu que l'intensité en électrons rétrodiffusés est proportionnelle à la concentration massique en minéral, et donc en calcium, dans le volume scanné. Plusieurs études ont utilisé une méthode de calibration pour relier le niveau de gris donné par MEB et la concentration en Ca[104, 127, 140].

La face d'intérêt de chaque échantillon a été imagée à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type FEG (Quanta 250 FEG microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA)) dans des conditions environnementales qui ne nécessitaient pas de préparations préalables. Les images (d'une zone d'intérêt par échantillon) ont été acquises en mode rétrodiffusé à un grossissement 50x, une tension d'accélération de 30 kV et une pression hydrostatique de 0,9 Torr (120 Pa). Afin d'obtenir une très bonne statistique de comptage, les acquisitions ont été réalisées avec un balayage lent (30  $\mu\text{s}$  / point). Les images obtenues en format TIF (24 bit couleur) avaient

une résolution de 4096 x 3536 pixels.

### 3.1.6 Comptage des lacunes ostéocytaires

Les images réalisées en MEB ont permis de compter le nombre de lacunes ostéocytaires sur la surface de l'échantillon. Afin de faciliter le comptage, un quadrillage a été superposé sur chaque échantillon et les cavités ostéocytaires ont été comptées par carré puis sommées (fig. 3.1). Un seuillage, à l'aide du logiciel libre imageJ, a permis de distinguer le tissu et la porosité macroscopique de l'image analysée et ainsi de déterminer l'aire du tissu définie comme l'aire totale de l'image moins l'aire de la porosité macroscopique. La densité de lacunes ostéocytaires ( $\# / \text{mm}^2$ ) a alors été définie comme le rapport du nombre de lacunes sur l'aire du tissu.

### 3.1.7 Comptage des lacunes ostéocytaires

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel libre R (The R foundation), avec un seuil de 5 % pour le risque alpha. Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les variables des os pathologiques et des contrôles. Les corrélations ont été identifiées comme significatives ou non via le calcul du coefficient de corrélation de Spearman.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Observation des microstructures

Les microstructures des échantillons contrôles et pathologiques ont été observées par microscopie optique avant et pendant compression et par microscopie électronique à balayage (MEB) en électrons rétrodiffusés après compression. Les figures 3.2, 3.3 et 3.4 montrent les microstructures obtenues au MEB pour les os d'enfants sains et pour les os d'enfants atteints d'OI.

Ces images montrent deux échelles de porosité i) la porosité vasculaire intracorticale qui correspond aux canaux de Havers chez les patients sains alors que les échantillons d'OI présentent des cavités ne correspondant pas nécessairement à des canaux de Havers, ii) la porosité des lacunes ostéocytaires montrant un plus grand nombre de lacunes dans le cas des OI. Afin de quantifier cet effet, nous avons calculé la densité de lacunes ostéocytaires (nombre de lacunes par unité de surface). La figure 3.5 montre que cette densité est significativement supérieure chez les OI ( $640 (195,5) \# / \text{mm}^2$ ) comparés aux contrôles ( $395,8 (15,8) \# / \text{mm}^2$ ,  $p=0,024$ ).

Les images MEB réalisées après compression ont également permis d'observer la taille des fissures. Il semblait que le type de fissuration était différent, en effet une grande fissure était présente dans les échantillons contrôles alors que les fissures paraissaient plus nombreuses

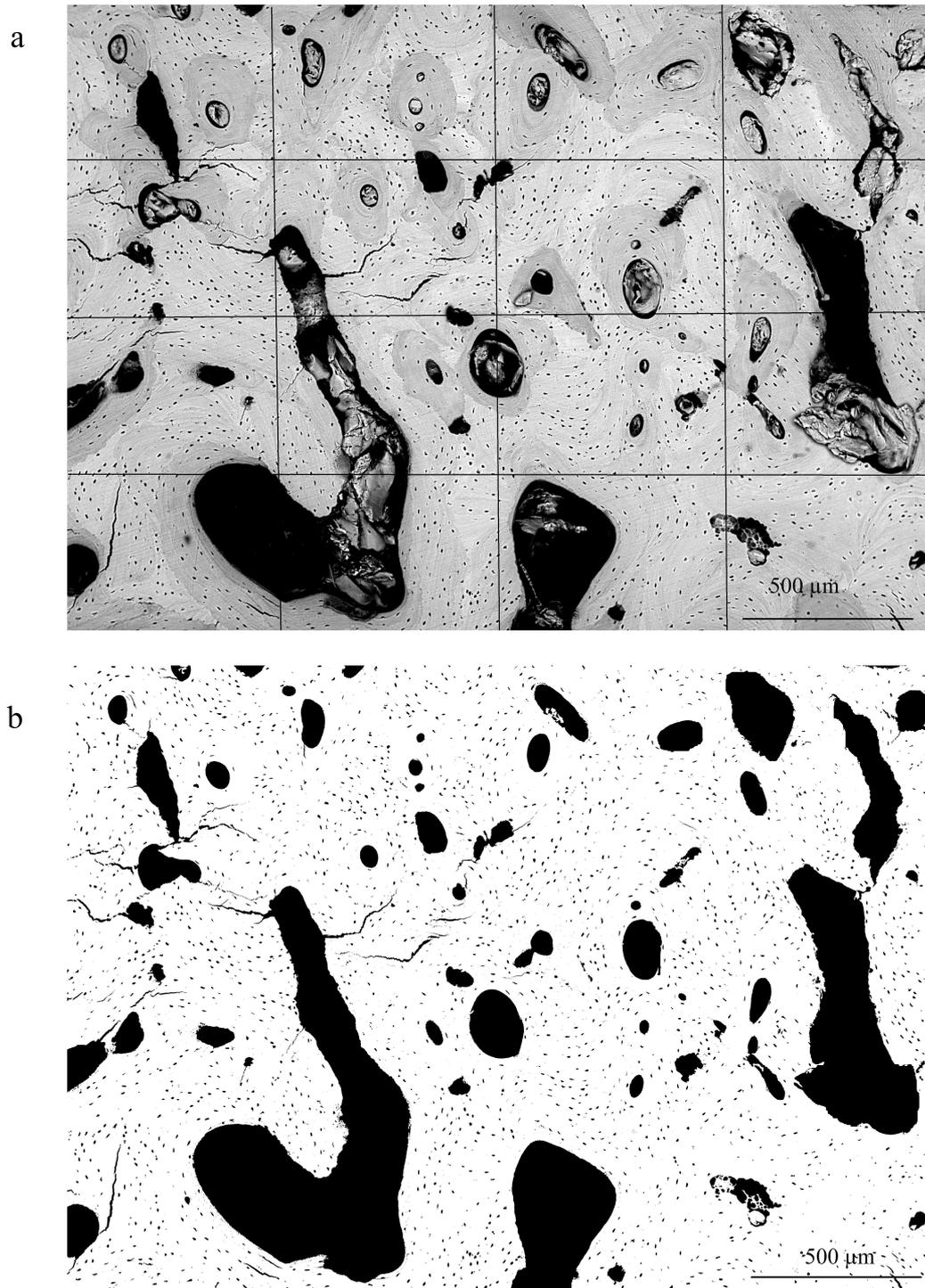


FIGURE 3.1 – a) image MEB d'un échantillon OI à laquelle un quadrillage a été superposé b) image binaire réalisée par seuillage à partir de l'image précédente sans quadrillage.

et plus petites chez les OI. Les images optiques réalisées pendant compression ont permis d'observer l'initiation et la propagation des fissures, et pour les deux groupes, les fissures s'initiaient aux canaux et cavités et se propageaient ensuite de porosité en porosité (fig. 3.6).

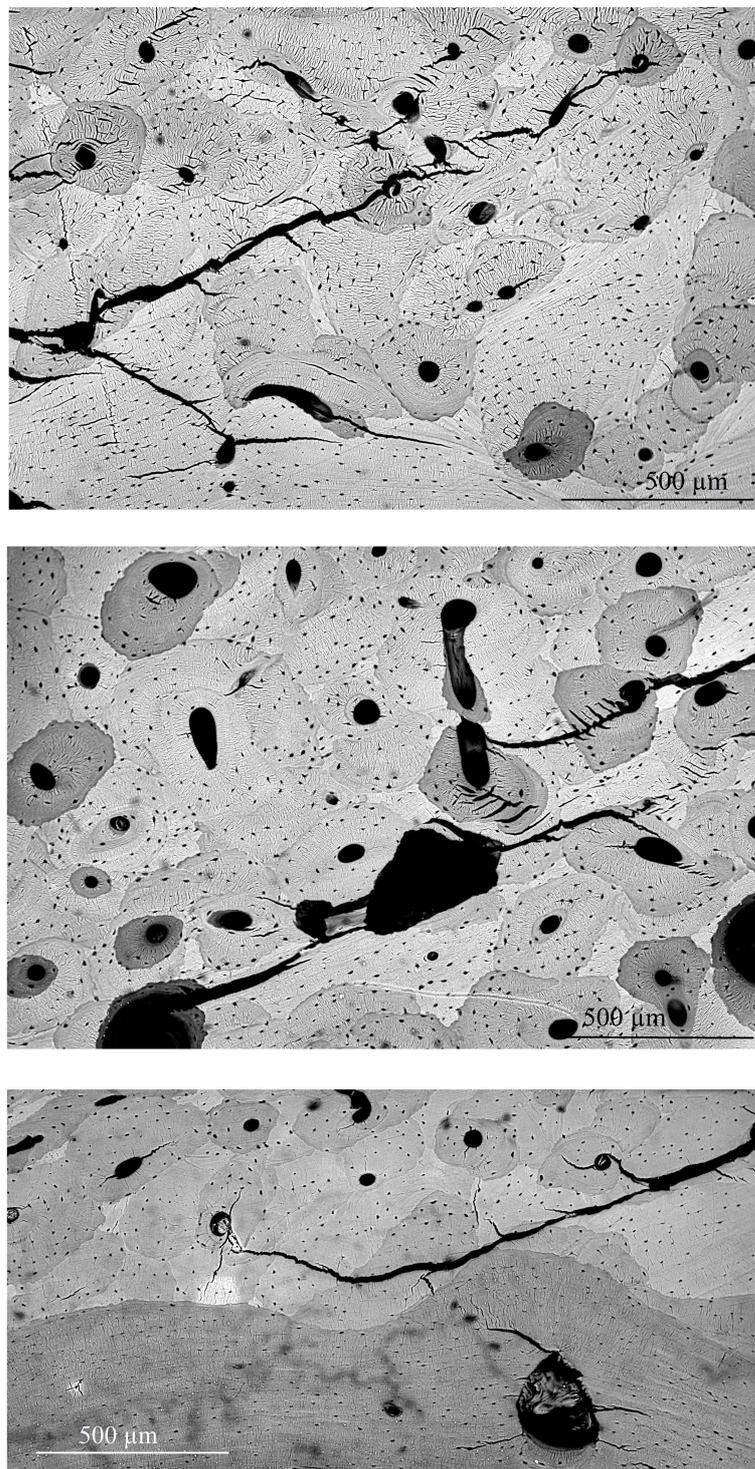


FIGURE 3.2 – Images des trois échantillons contrôles prises en microscopie électronique à balayage après compression.

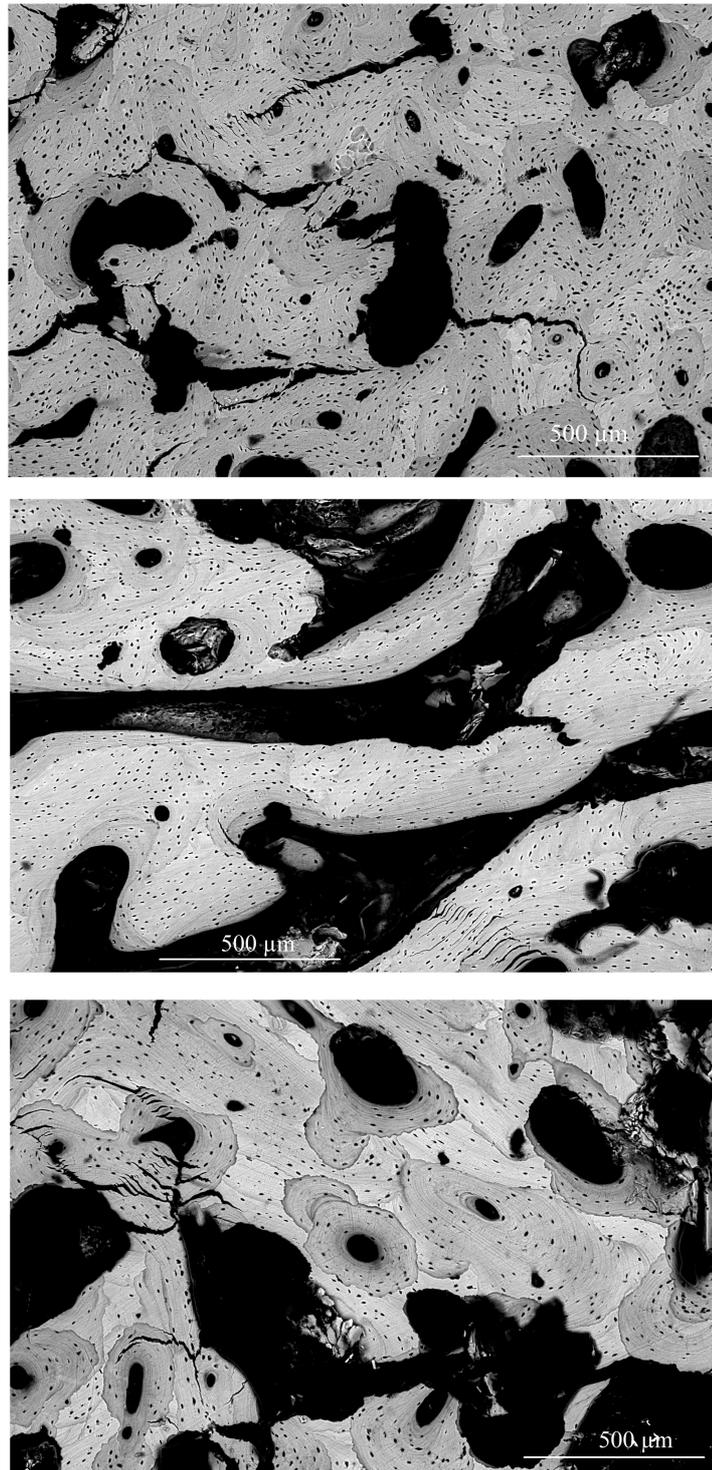


FIGURE 3.3 – Images de trois échantillons OI prises en microscopie électronique à balayage après compression.

### 3.2.2 La porosité vasculaire intracorticale

La porosité vasculaire intracorticale a été mesurée par tomographie RX haute résolution. La différence de porosité vasculaire intracorticale a été montrée sur des images 3D reconstruites

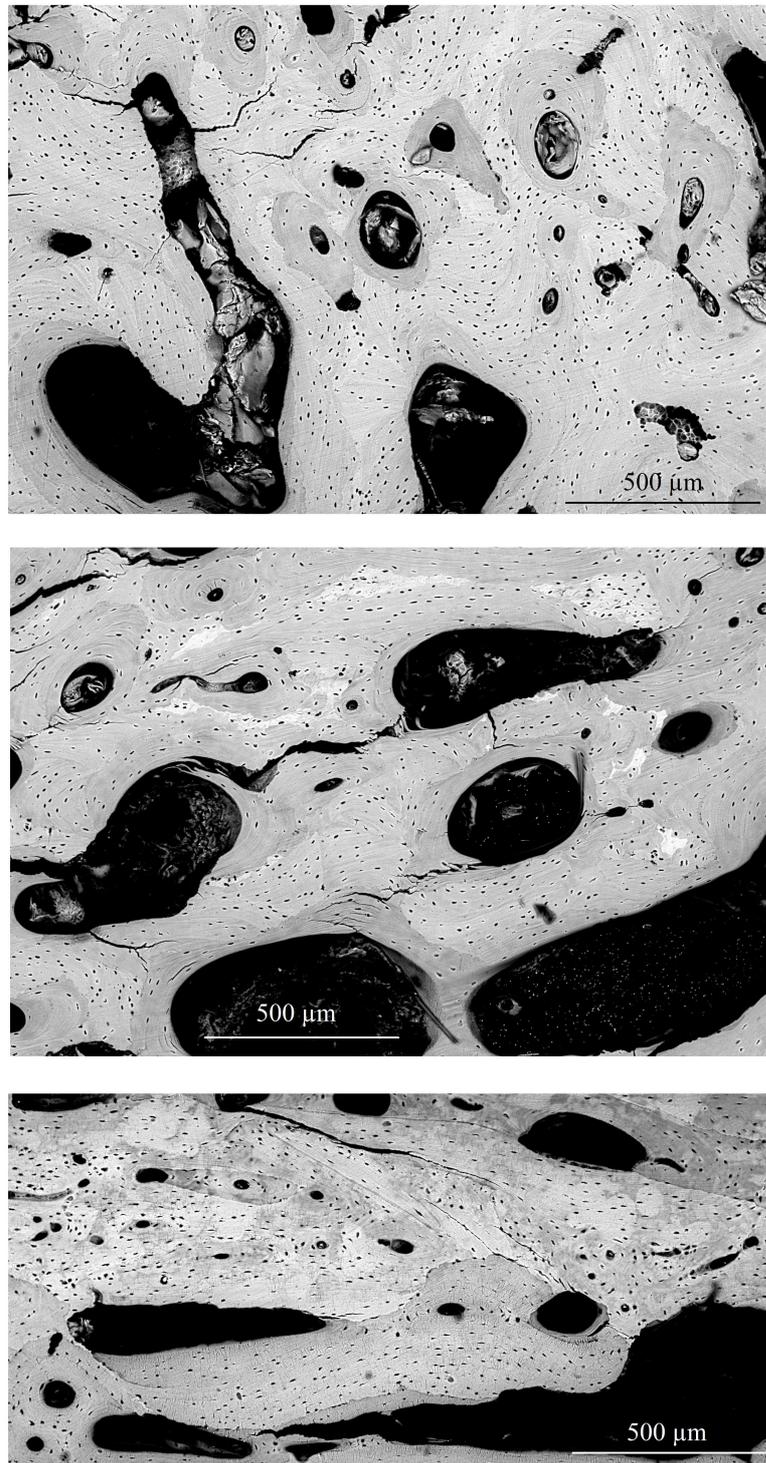


FIGURE 3.4 – Images de trois échantillons OI prises en microscopie électronique à balayage après compression.

à partir des acquisitions tomographiques où une partie de l'image est inversée pour révéler la porosité. La figure 3.7 montre des images 3D typiques pour un échantillon contrôle et un OI.

Les cavités visibles à la surface sont présentes dans la totalité de la structure. La microar-

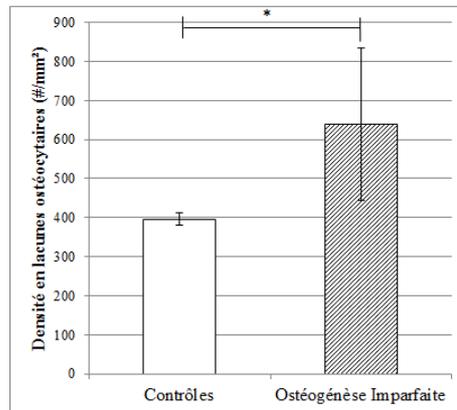


FIGURE 3.5 – Graphe de comparaison des moyennes de la densité en lacunes ostéocytaires pour le groupe des contrôles et le groupe des OI.

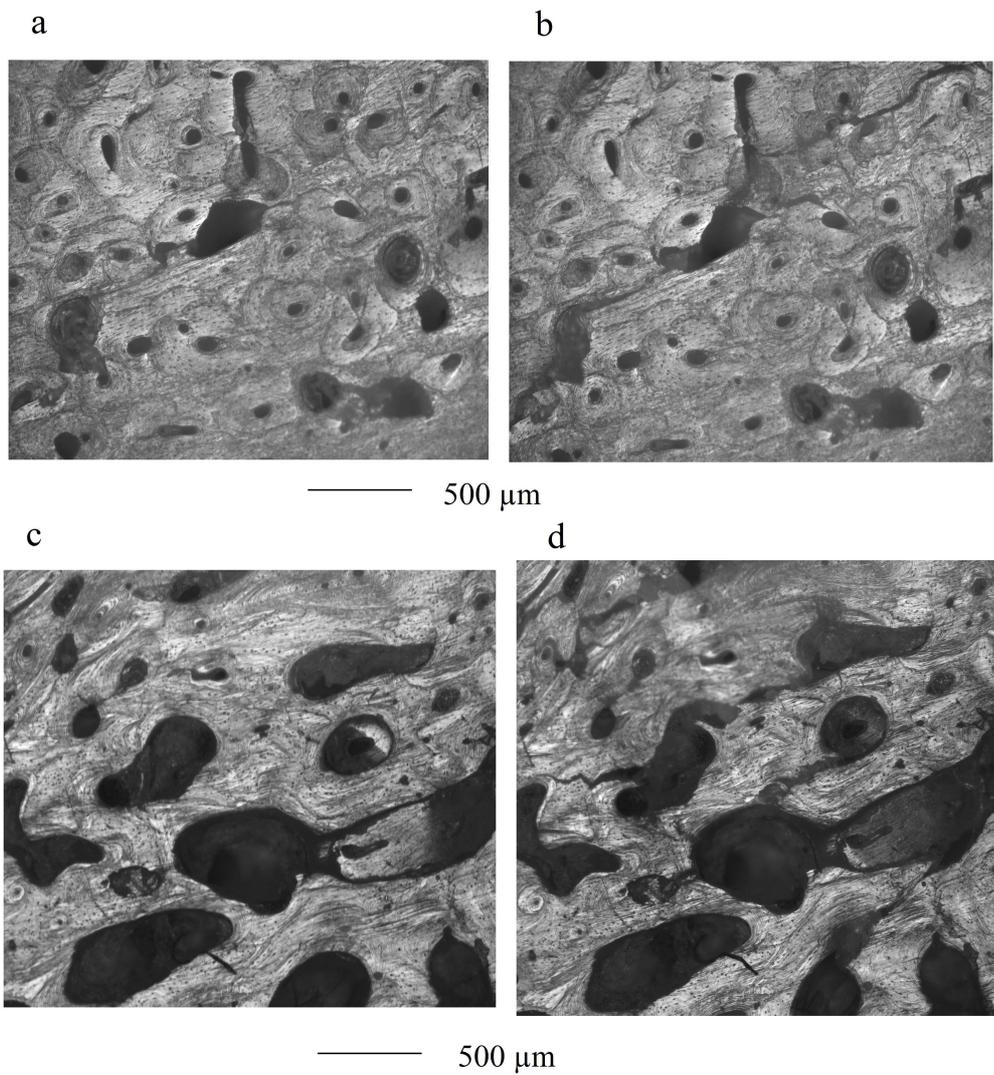


FIGURE 3.6 – a) c) images d'un échantillon contrôle et d'un OI où l'on voit l'initiation d'une fissure à une cavité. b) d) images des mêmes échantillons contrôle et OI quand les fissures se sont propagées via les cavités.

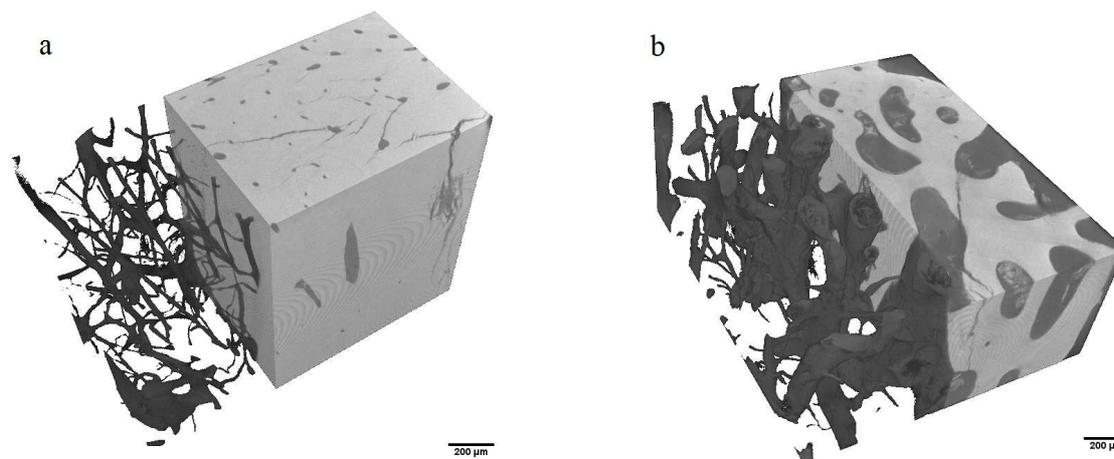


FIGURE 3.7 – Images 3D d'un contrôle (a) et d'un OI (b) reconstruites à partir des acquisitions tomographiques. La partie gauche de chaque échantillon a été inversée pour montrer seulement la porosité.

chitecture de la porosité présentant des canaux fins dans le cas de contrôles a été remplacée par une microarchitecture avec des canaux plus larges dans le cas de l'OI. Les valeurs de porosité vasculaire intracorticale pour chaque échantillon sont présentées en table 3.1. Comme attendu, la porosité des échantillons d'os OI est significativement plus élevée que celle des échantillons d'os sains ( $p=0,024$ ).

### 3.2.3 La densité minérale osseuse (BMD) et la densité minérale du tissu (TMD)

La BMD (la densité en hydroxyapatite de l'échantillon porosité incluse) a été calculée à partir des acquisitions en tomographie RX haute résolution, la densité minérale du tissu (TMD) a été déduite de la BMD et de la porosité, les résultats se trouvent en table 3.1. La BMD pour les échantillons d'os OI est significativement plus basse que la BMD pour les contrôles ( $0,819 (0,109) \text{ gHA/cm}^3$  vs.  $0,952 (0,041) \text{ gHA/cm}^3$ ,  $p=0,024$ ). Au contraire, la TMD pour les échantillons d'os OI est significativement plus élevée que la TMD pour le groupe contrôle ( $1,103 (0,045) \text{ gHA/cm}^3$  vs.  $0,988 (0,028) \text{ gHA/cm}^3$ ,  $p=0,028$ ). La porosité et la BMD pour les OI étaient négativement corrélées et de façon significative ( $r^2=0,89$ ,  $p=0,017$ ).

1. densité minérale osseuse de l'échantillon incluant la porosité
2. densité minérale du tissu seul
3. module d'Young macroscopique
4. limite d'élasticité
5. déformation atteinte pour la contrainte maximale atteinte
6. densité en lacunes ostéocytaires
7. différence significative entre les OI et les contrôles avec un seuil de 0,05

Echantillons	BMD <sup>1</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	Porosité (%)	TMD <sup>2</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	E <sup>3</sup> (GPa)	$\sigma_{max}$ <sup>4</sup> (MPa)	$\epsilon_{max}$ <sup>5</sup>	$\sigma_y$ (MPa)	Lc_Ar <sup>6</sup> (#/mmš)
OI 1	0,621	45,2	1,133	3,9	49,1	0,043	33	861,5
OI 9	0,859	16,6	1,030	3,3	78,6	0,081	57	891,0
OI 6	0,771	33	1,151	4	58,9	0,048	49	449,7
OI 7	0,909	16,5	1,089	4,7	87,9	0,101	70	515,3
OI 10	0,854	24,6	1,133	2,5	51,7	0,117	38	475,3
OI 11	0,901	16,7	1,082	5,5	79	0,028	60	647,5
<b>Moyenne</b>	<b>0,819<sup>a 7</sup></b>	<b>25,4<sup>a</sup></b>	<b>1,103<sup>a</sup></b>	<b>4,0<sup>a</sup></b>	<b>67,5<sup>a</sup></b>	<b>0,070</b>	<b>51<sup>a</sup></b>	<b>640,0<sup>a</sup></b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,109</b>	<b>11,7</b>	<b>0,045</b>	<b>1,0</b>	<b>16,3</b>	<b>0,035</b>	<b>14</b>	<b>195,5</b>
C 1	0,918	6,0	0,977	10,5	114,2	0,051	90	386,1
C 2	0,94	1 2,7	0,967	9,6	163,9	0,079	105	387,1
C 3	0,998	2,2	1,020	6,8	151,9	0,101	80	414,1
<b>Moyenne</b>	<b>0,952</b>	<b>3,6</b>	<b>0,988</b>	<b>9,0</b>	<b>143,3</b>	<b>0,077</b>	<b>92</b>	<b>395,8</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,041</b>	<b>2,1</b>	<b>0,028</b>	<b>1,9</b>	<b>25,9</b>	<b>0,025</b>	<b>13</b>	<b>15,8</b>

TABLE 3.1 – Valeurs de paramètres de structure (densité minérale osseuse et porosité) et de propriétés mécaniques (module d'Young macroscopique, limite d'élasticité, contrainte et déformations maximales) pour chaque échantillon.

### 3.2.4 Les propriétés mécaniques macroscopiques

Les valeurs de modules d'Young macroscopiques, de limites d'élasticité et de contraintes maximales atteintes pour les os sains et les os provenant de patients atteints d'OI sont présentées dans le tableau 3.1. On constate que ces valeurs de propriétés mécaniques sont significativement plus faibles dans le cas d'OI comparé au cas contrôle (4,0 (1,0) GPa vs. 9,0 (1,9) GPa p=0,024, 51 (14) MPa vs. 92 (13) MPa p=0,024, 67,5 (16,3) MPa vs. 143,3 (25,9) MPa p=0,024, pour le module d'Young, la limite d'élasticité et la contrainte à la rupture respectivement). En revanche, il n'y a pas de différence significative pour la déformation à la rupture.

Il existe une forte corrélation négative entre la contrainte à la rupture et la porosité et entre la limite d'élasticité et la porosité chez les OI ( $r^2=0,78$ , p=0,033 pour les deux) (table 3.2). On retrouve une corrélation significative mais positive entre ces mêmes propriétés mécaniques et la BMD ( $r^2=0,89$ , p=0,017 pour les deux). De plus, il n'y a pas de corrélation entre le module d'Young et les facteurs de microstructure, de même pour la déformation à la rupture. Notons que, dû au faible nombre de contrôles, aucune de ces corrélations n'était significative pour ce groupe, néanmoins la tendance entre la contrainte à la rupture et la porosité était la même avec une pente dix fois plus élevée.

## 3.3 Discussion et conclusions

Les os des patients souffrant d'OI sont connus pour être plus fragiles que les os de personnes saines, il a été montré dans la littérature que le tissu osseux est de moins bonne qualité en cas

Propriétés mécaniques	Facteurs de microstructure	Pente	R	p-value
Module d'Young	Porosité vasculaire	-0,02	-0,257	0,6583
	BMD	2,12	0,486	0,3556
	TMD	-3,82	-0,145	0,7841
	Densité en lacunes ostéocytaires	-0,0001	-0,086	0,9194
Limite d'élasticité	Porosité vasculaire	-0,9687	-0,886	0,03333
	BMD	99,614	0,943	0,01667
	TMD	-191,53	-0,580	0,2278
	Densité en lacunes ostéocytaires	-0,0118	0,0291	1
Contrainte à la rupture	Porosité vasculaire	-1,17	-0,886	0,03333
	BMD	113,7	0,943	0,01667
	TMD	-276,6	-0,580	0,2278
	Densité en lacunes ostéocytaires	0,0026	0,029	1
Déformation à la rupture	Porosité vasculaire	-0,0011	-0,371	0,4972
	BMD	0,1333	0,200	0,7139
	TMD	-0,0844	0,087	0,8699
	Densité en lacunes ostéocytaires	-0,00006	-0,314	0,5639

TABLE 3.2 – Corrélations entre les propriétés mécaniques et les facteurs de microstructure.

d'OI, que ce soit sur le modèle de la souris[104–106, 108, 109, 111, 112] ou chez l'homme[33, 70, 90, 92, 113–115, 119, 120, 128–130, 143]. En revanche les études s'intéressant à l'aspect macroscopique sont moins nombreuses. Dans cette partie nous nous sommes intéressés à cette échelle, identifiée comme l'échelle de l'échantillon, afin d'analyser l'impact de la microstructure sur les propriétés mécaniques, i.e. y a-t-il un autre facteur que la qualité du tissu capable d'expliquer la fragilité des os chez les personnes atteintes d'OI ?

Dans cette étude également, nous avons des échantillons provenant d'enfants souffrant d'OI ayant tous reçu un traitement aux bisphosphonates. Ainsi les os pathologiques et les contrôles diffèrent en deux points, mais comme ce traitement est très communément employé chez les enfants atteints d'OI, nos résultats rendent compte de la réalité clinique. Il est aujourd'hui connu que les BPs empêchent efficacement les fractures et augmentent la densité minérale[84, 85, 93, 101]. Une étude de Boyde *et al.* a montré que la densité minérale augmentait chez les OI sans BPs[130], ainsi la tendance observée dans cette étude est correcte, l'effet de la pathologie est simplement surestimé. Des études ont montré que ce traitement réduisait également la porosité corticale[93, 140]. Les valeurs de porosité corticale obtenues dans cette étude sont donc sous-estimées. Pour ce qui est des propriétés mécaniques, pour les os d'enfants OI il n'y a, à notre connaissance, qu'une seule étude très récente ayant fait des tests mécaniques sur des enfants OI traités et non traités par des BPs. Albert *et al.* n'ont pas pu conclure sur l'effet des BPs sur les propriétés mécaniques macroscopiques car ils n'avaient que deux échantillons non traités dont un avait une valeur de résistance comprise dans l'intervalle des valeurs pour

les traités[116]. Il est donc possible que les BPs aient modifié les propriétés des os OI mais il est improbable qu'ils soient la cause de telles différences significatives.

Dans cette étude nous avons comparé les microstructures et les propriétés mécaniques macroscopiques d'os cortical chez des enfants sains et des enfants atteints d'OI. Pour cela plusieurs techniques d'observation et de mesure ont été employées. Les microstructures observées en MEB en mode rétrodiffusé étaient différentes entre les échantillons sains et pathologiques. En particulier la densité en lacunes ostéocytaires était significativement plus élevée chez l'OI (640 (195,5)  $\#/mm^2$  et 395,8 (15,8)  $\#/mm^2$  respectivement). D'autres auteurs se sont intéressés à la densité en lacunes ostéocytaires qualitativement chez l'adulte OI[113, 114] ou quantitativement chez l'enfant OI[116], chez l'animal sain[153, 154] ou chez l'adulte sain[155–158] et les valeurs trouvées dans cette étude étaient du même ordre de grandeur que les résultats présents dans la littérature. Les lacunes ostéocytaires correspondent à des ostéoblastes emmurés dans la matrice, leur nombre est donc lié à l'activité ostéoblastique. A notre connaissance les seules analyses quantitatives et comparatives entre OI et sains ont été réalisées sur le modèle de la souris[107]. Une analyse quantitative 3D a permis à Carriero *et al.* de montrer cette augmentation significative de densité en lacunes ostéocytaires chez la souris oim comparée au groupe sain (127 365 vs. 72 981  $\#/mm^3$ )[107].

De plus, nous avons observé de larges et nombreuses cavités de résorption chez l'OI. Dans cette étude, l'observation de ces grosses cavités s'est traduite par une porosité vasculaire, mesurée par tomographie RX haute résolution, significativement plus élevée chez l'OI. A notre connaissance, il existe actuellement peu de données de porosité corticale chez l'OI humain. Pour le cas pédiatrique, Albert *et al.* ont mesuré la porosité chez neuf donneurs OI et ont trouvé une porosité vasculaire corticale de 21 (10) %, en accord avec nos résultats, mais sans toutefois comparer à des contrôles[116]. Pazzaglia *et al.* ont mesuré une plus importante fraction d'aire vasculaire/de résorption chez des enfants (entre 3 et 8 ans) atteints d'OI par rapport à des contrôles (44,3 % vs. 13,6 %)[90]. Cette comparaison a aussi été faite dans le cas du modèle oim où la porosité vasculaire a été mesurée par tomographie simple[109] ou par tomographie synchrotron[107], et récemment Carriero *et al.* n'ont pas trouvé de différence de porosité corticale significative entre la souris oim et la souris WT (6,1 (4,6) vs. 7,8 (2,7))[107]. La formation de ces cavités pourraient s'expliquer par la combinaison d'un taux de renouvellement élevé[70, 113] une formation osseuse plus lente chez l'OI due à des ostéoblastes moins performants[113, 115] et des paramètres de résorption plus élevés chez l'OI[113, 115] donnant lieu à une résorption non suivie d'une formation. Cette modification du processus de remodelage osseux, qui entraîne des modifications de la microstructure osteonale, ne peut être transposée au cas du tissu homogène de la souris. De plus, la différence de porosité vasculaire et lacunaire pourrait expliquer les plus petites fissures observées chez l'OI. En effet, les fissures ne se propagent pas aussi bien dans l'OI que dans le contrôle car elles rencontrent plus fréquemment des cavités sur leur passage. Ma *et al.* ont aussi vu une corrélation négative

tive entre la densité en lacunes ostéocytaires et la longueur des fissures chez le rat[154] ce qui suggère que les lacunes sont capables d'arrêter les cracks ou d'en initier afin de dissiper de l'énergie. On peut donc penser que l'augmentation de la densité en lacunes chez l'OI sert à compenser la fragilité du matériau. D'autres auteurs ont observé une relation entre la densité en lacunes ostéocytaires et la densité en microcracks[156] mais ils n'ont pas pu conclure sur la cause. Nous avons fait l'hypothèse que la mauvaise qualité du minéral chez l'OI entraînait une densité de fissures plus importante, ces cracks entraînaient la mort des ostéocytes par rupture de la cellule directement ou de leur apport en nutrition, ce qui causait ensuite un taux de renouvellement plus élevé. La connaissance de la densité en ostéocytes vivant comparée à la densité en lacunes pourrait permettre de valider cette hypothèse. Comme mentionné par d'autres[92], l'augmentation de la porosité est la principale cause de la diminution de la BMD. Donc, comme attendu, la BMD pour l'os cortical, mesurée par tomographie RX haute résolution, était significativement différente entre les os sains et les OI (0,95 (0,04)  $g/cm^3$  vs 0,82 (0,11)  $g/cm^3$ ,  $p=0,024$ ). En ce qui concerne le tissu seul, la TMD, déduite de la BMD et de la porosité, était significativement plus élevée chez les OI comparé aux sains. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont montré que l'os OI est plus minéralisé que des os contrôles chez l'homme [115, 130] et chez la souris[104, 105].

Le module d'Young macroscopique, la limite d'élasticité et la contrainte à la rupture ont été mesurés lors d'un essai de compression, ces paramètres mécaniques étaient significativement plus faibles chez les os des patients atteints d'OI comme attendu (4,0 (1,0) GPa vs. 9,0 (1,9) GPa  $p=0,024$ , 51 (14) MPa vs. 92 (13) MPa  $p=0,024$ , 67,5 (16,3) MPa vs. 143,3 (25,9) MPa  $p=0,024$ , pour le module d'Young, la limite d'élasticité et la contrainte à la rupture respectivement). Dans la littérature, les propriétés mécaniques des os de patients atteints d'OI ont été principalement mesurées à l'échelle du tissu par nanoindentation[131, 132] mais peu de données macroscopiques existent et aucune comparaison directe des propriétés mécaniques à l'échelle de l'échantillon entre un groupe contrôle et un groupe OI n'a encore été réalisée. Dans cette étude, les résultats obtenus pour les enfants sains étaient en accord avec les résultats de plusieurs travaux[56, 59]. Sur l'os cortical OI, Albert *et al.* ont réalisé des essais de flexion trois points qui nécessite le recours à un modèle pour extraire le comportement mécanique du matériau. Ils ont trouvé 1,6 (0,4) GPa, 20,8 (6,0) MPa et 26,5 (8,6) MPa pour respectivement le module d'Young, la limite d'élasticité et la contrainte maximale dans le sens transverse. Ces résultats sont clairement plus faibles que nos valeurs obtenues en compression. Cette différence peut s'expliquer par la nature du test de flexion trois points où le champ de contrainte n'est pas uniforme et mêle des zones de traction et de compression. De plus, la limite d'élasticité et la contrainte à la rupture sont fortement sensibles au type de chargement[52]. Des données de flexion trois points existent également pour la souris oim[105, 106, 108]. Cependant, Vanleene *et al.* ont mesuré une différence non significative entre oim et WT (7,0 (1,2) GPa et 6,9 (0,7) GPa respectivement)[106]. Ces valeurs sont plus élevées que dans le cas humain et montrent

encore la nécessité de prendre en compte la microstructure quand il s'agit du cas humain.

La seconde partie de cette étude consistait à établir des corrélations entre propriétés mécaniques et paramètres de microstructure au sein de la population OI afin d'identifier des facteurs responsables de la fragilité osseuse. Nous avons trouvé une forte corrélation entre limite d'élasticité et porosité et contrainte à la rupture et porosité. Nous avons également trouvé une forte corrélation entre la BMD et ces deux mêmes paramètres mécaniques. La BMD, qui prend en compte la porosité et la densité minérale du tissu, expliquait 89 % de la limite d'élasticité et de la contrainte à la rupture alors que la porosité seule n'en expliquait que 78 %. Ces résultats ont donc montré que la qualité du tissu n'est pas le seul facteur responsable de la fragilité osseuse mais la porosité est importante également. A notre connaissance, seules deux études ont fait ces corrélations pour des os d'enfants souffrant d'OI, Albert *et al.* n'ont obtenu aucune corrélation significative entre les paramètres de microstructure et propriétés mécaniques dans le sens transverse[116] et Vardakastani *et al.* ont trouvé une très bonne corrélation entre les propriétés mécaniques et la porosité (entre 96 % et 98 %) mais la porosité était une valeur 2D mesurée par microscopie en lumière polarisée[117]. L'influence de la porosité sur la résistance mécanique a aussi été étudiée pour le modèle de souris oim[107]. Par exemple, Carriero *et al.* ont montré que les régions à risque se situent principalement autour des canaux, ce qui est en accord avec les cartes de déformation tracées à partir des images prises pendant la compression où l'on a vu des déformations beaucoup plus importantes autour des canaux (résultats présentés en chapitre 5), les canaux sont donc des zones où les fissures peuvent s'initier et se propager comme cela a été observé dans cette étude.

En conclusion, cette étude portait sur la mesure de paramètres de structure et de propriétés mécaniques d'échantillons d'os cortical provenant d'enfants atteints d'OI et la comparaison avec des échantillons sains. Les résultats ont montré que les propriétés mécaniques étaient significativement plus faibles chez les OI d'une part et la porosité était significativement plus élevée d'autre part. La corrélation entre les deux restait limitée d'où l'importance d'étudier aussi la qualité du tissu osseux, comme cela a été fait au chapitre 2 précédent. Nous avons également montré une différence significative de densité en lacunes ostéocytaires suggérant que le remodelage osseux est altéré en cas d'OI. Bien que les propriétés mécaniques diminuent avec une porosité croissante, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la densité en lacunes ostéocytaires et les propriétés mécaniques. De nouvelles études sont donc nécessaires pour établir une relation entre le renouvellement osseux et la fragilité osseuse. En particulier, la mise en culture d'ostéoclastes humains sur des os OI et des os sains pourrait aider à la compréhension des mécanismes d'altération de la microstructure comme la formation de cavités de résorption atypiques.



## Chapitre 4

# Influence de la microstructure du tissu cortical sur l'activité d'ostéoclastes humains chez l'enfant sain et pathologique

---

<b>4.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>72</b>
4.1.1	Les substrats : les échantillons d'os	72
4.1.2	La préparation des échantillons	72
4.1.3	La culture cellulaire	72
4.1.4	Comparaisons entre OI et sains	74
4.1.5	Identification des zones résorbées et non résorbées	75
4.1.6	L'interférométrie	75
4.1.7	Analyse statistique	77
<b>4.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>77</b>
4.2.1	Comparaison qualitative et quantitative de la résorption osseuse chez l'enfant et chez l'OI	77
4.2.2	Localisation de la résorption osseuse chez l'enfant sain	82
<b>4.3</b>	<b>Discussion et conclusions</b>	<b>85</b>
4.3.1	L'influence du substrat synthétique sur la résorption	85
4.3.2	L'influence du substrat naturel (osseux ou dentine) sur la résorption	86
4.3.3	La résorption osseuse chez l'OI comparé à l'os sain	87

---



## Résumé

Au cours des chapitres précédents nous avons mis en évidence une différence de microstructure entre les os corticaux d'enfants sains et ceux d'enfants souffrant d'OI. Ces derniers présentaient notamment de grosses cavités probablement dues à une résorption trop importante chez l'OI. Il apparaissait donc que l'activité de remodelage était perturbée en cas d'OI. Dans cette étude nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'influence du tissu osseux d'enfants sains sur l'activité d'ostéoclastes humains en termes de propriétés mécaniques et chimiques à l'aide de la nanoindentation et de la microspectroscopie Raman. Dans un second temps, nous avons étudié les différences d'activité ostéoclastique entre des os sains et des os OI par observations microscopiques optiques et électroniques, coloration au TRAP, et bleu de tolluidine ainsi que par interférométrie. Les résultats indiquaient que la résorption ne se produisait pas de façon aléatoire mais les ostéoclastes ciblaient les zones de faibles propriétés mécaniques où la minéralisation était plus faible et le minéral présentait de petits cristaux. Malgré une minéralisation plus élevée, les OI présentaient une résorption plus importante que les contrôles, suggérant alors que la qualité des cristaux était plus importante que leur quantité.



---

## Introduction

Une des causes de la fragilité accrue des os de patients atteints d'OI est une porosité vasculaire intracorticale plus élevée[116, 117] due notamment à la présence de grosses cavités « atypiques »[90], comme observées au chapitre 3. Ce dérèglement du remodelage osseux avait déjà été identifié dans la littérature, en particulier il a été observé chez l'OI humain un taux de renouvellement élevé[70, 113] une formation osseuse plus lente chez l'OI due à des ostéoblastes moins performants[113, 115] et des paramètres de résorption plus élevés chez l'OI[113, 115].

Cette résorption est effectuée par des cellules osseuses à caractère macrophage nommées ostéoclastes. Ces dernières arrivent sur site par le sang, se polarisent, et créent une cavité étanche de résorption par l'action des podosomes. Des ions  $H^+$  et des enzymes lysosomiales sont libérés dans la cavité pour dissoudre le minéral et ensuite digérer le collagène[24]. Cette résorption est permise par la présence de cytokines et autres protéines non-collagéniques comme l'ostéopontine.

La communication entre les cellules osseuses pour réguler le renouvellement osseux est aujourd'hui une certitude. La présence de RANKL, sécrétée par les ostéoblastes, et, c'est désormais avéré, par les ostéocytes également[28], est essentielle à la résorption. Les ostéoclastes peuvent aussi résorber en l'absence des autres cellules osseuses[26]. Ainsi, même si l'ostéoclaste n'est pas capable de reconnaître seul les zones endommagées[159], il est sensible à la structure, la composition et la topographie du substrat[26, 159, 160].

On comprend alors que la résorption peut raisonnablement dépendre du substrat. Dans la littérature, la majorité des études s'intéresse à l'activité d'ostéoclastes humains sur des substrats inorganiques comme la dentine, les verres[25] les substituts osseux (HA,TCP)[23] ou les os bovins[23, 26, 27, 159]. A ce jour et à notre connaissance, l'activité d'ostéoclastes humains sur des os humains, en particulier d'enfants, n'a jamais été étudiée.

Dans cette partie nous avons voulu caractériser l'influence du tissu osseux sur la résorption en mettant en culture des ostéoclastes humains sur des échantillons d'os cortical d'enfants. Il est intéressant d'utiliser de l'os d'enfant comme substrat pour les ostéoclastes car le remodelage osseux est particulièrement actif à cette période de la vie. Nous avons également voulu comparer avec la résorption dans le cas pathologique des OI pour analyser l'influence du tissu sur l'activité des ostéoclastes. Pour cela, les propriétés mécaniques et chimiques de différents échantillons d'os ont été étudiées respectivement par nanoindentation et microspectroscopie Raman, tandis que l'observation et la quantification de la résorption ont été réalisées par observations optique et électronique, coloration au TRAP et bleu de tolluidine et par interférométrie.

## 4.1 Matériels et méthodes

### 4.1.1 Les substrats : les échantillons d'os

Deux classes d'échantillons ont été utilisées comme substrat pour les ostéoclastes dans cette étude, des os d'enfants sains et des os d'enfants souffrant d'OI. Tous les échantillons étaient issus des mêmes prélèvements que ceux utilisés pour les études aux chapitres 2 et 3. Ils ont été collectés (avec consentement des familles) sur une année environ à l'hôpital Necker pour enfants malades de Paris lors d'opérations faisant suite à une fracture ou visant à corriger des déformations. Au total trois donneurs sains (2 filles, 1 garçon) ont été utilisés, d'âge moyen 15,0 (1,4) ans et d'indice de masse corporelle 24,3 (6,8). Les donneurs pathologiques, au nombre de 5 dans cette étude (3 filles, 2 garçons), souffraient d'OI qualifiée de légère à sévère. Pour ces patients, l'âge et l'indice de masse corporelle étaient similaires (10,8 (8,3) ans,  $p=0,63$ , 21,4 (4,8),  $p=0,8$ ), tous ont eu au moins une cure de bisphosphonates. Pour cette étude 17 échantillons d'os cortical ont été utilisés, 10 provenaient de patients atteints d'OI et 7 des patients sains. Parmi les 10 échantillons d'OI, 5 provenaient des études détaillées aux chapitres 2 et 3. Cette étude a été menée en accord avec les recommandations du comité d'éthique (IRB 00003835 2010/28NI). Les os ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour des tests.

### 4.1.2 La préparation des échantillons

Des parallélépipèdes de taille variable (selon la quantité d'os disponible) ont été coupés à l'aide d'une scie diamantée (Secotom-15, Struers A/S, Ballerup, Denmark) sous irrigation. Une des faces perpendiculaires à l'axe des ostéons a ensuite été polie avec un disque SiC (grain # 2400) puis avec de la pâte diamantée  $1\ \mu\text{m}$  en présence d'un lubrifiant à base aqueuse. C'est cette surface qui a été caractérisée puisensemencée avec des ostéoclastes.

### 4.1.3 La culture cellulaire

Deux sources d'ostéoclastes humains ont été utilisées afin de pouvoir généraliser les résultats, les poches de sang humain (environ 380 mL) étaient fournies par l'établissement français du sang (EFS) (sous couvert d'une convention entre les établissements). Une première étape a permis de séparer les globules rouges et les globules blancs pour ne garder que ces derniers (Ficoll (Eurobio<sup>®</sup>)). Une seconde séparation a été réalisée (50% Percoll gradient (GE Healthcare<sup>®</sup>)) pour éliminer les lymphocytes et ne conserver que les cellules d'intérêt, les monocytes, précurseurs des ostéoclastes. Cette population de cellules a été purifiée par déplétion (sélection négative) à l'aide de billes magnétiques (Dynal, Invitrogen<sup>®</sup>) et l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Immunotech, Beckman Coulter<sup>®</sup>) CD19 (J3-119), CD3 (UCHT1), CD56 (C218) and CD235a (11E4B-7-6) pour éliminer les lymphocytes B, lymphocytes T, natural killers et globules rouges restants, ne gardant que les précurseurs monocytaires.

Les monocytes ont ensuite été ensemencés en présence de milieu  $\alpha - MEM$  ( $\alpha - MEM$ , Life technologies<sup>®</sup>) enrichi en sérum 10% (FBS, Pan biotech Dutscher<sup>®</sup>), 2 mM L-glutamine (Gibco<sup>®</sup>), 100 U/mL pénicilline (Gibco<sup>®</sup>) auquel des cytokines (MCSF (PeproTech<sup>®</sup>) et RANKL (PeproTech<sup>®</sup>)) ont été ajoutées afin d'induire la prolifération des monocytes. À 72h, le milieu a été changé avec une autre combinaison de concentration de cytokines induisant la différenciation des monocytes en ostéoclastes. Au cinquième jour les cellules différenciées en ostéoclastes ont été décollées pour ensuite être ensemencées sur les échantillons d'os, à raison de 50 000 cellules par échantillon. L'excédent des cellules a été congelé.

Après 72h (ou 5 jours suivant le test) de résorption, les ostéoclastes ont été fixés avec du PFA. Ils ont ensuite été colorés au TRAP (fig. 4.1) (*tartrate-resistant acid phosphatase*) (Leukocyte Acid Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)), enzyme spécifique des ostéoclastes, afin de compter le nombre d'ostéoclaste présentant plus de 3 noyaux compétents à la résorption (fig. 4.2). Les cellules ont été retirées de la surface des os et les échantillons ont été colorés au bleu de toluidine afin de mettre en évidence les zones où le collagène était dénudé, i.e. où le minéral avait été dissout, par observation au microscope optique et lumière rasante.

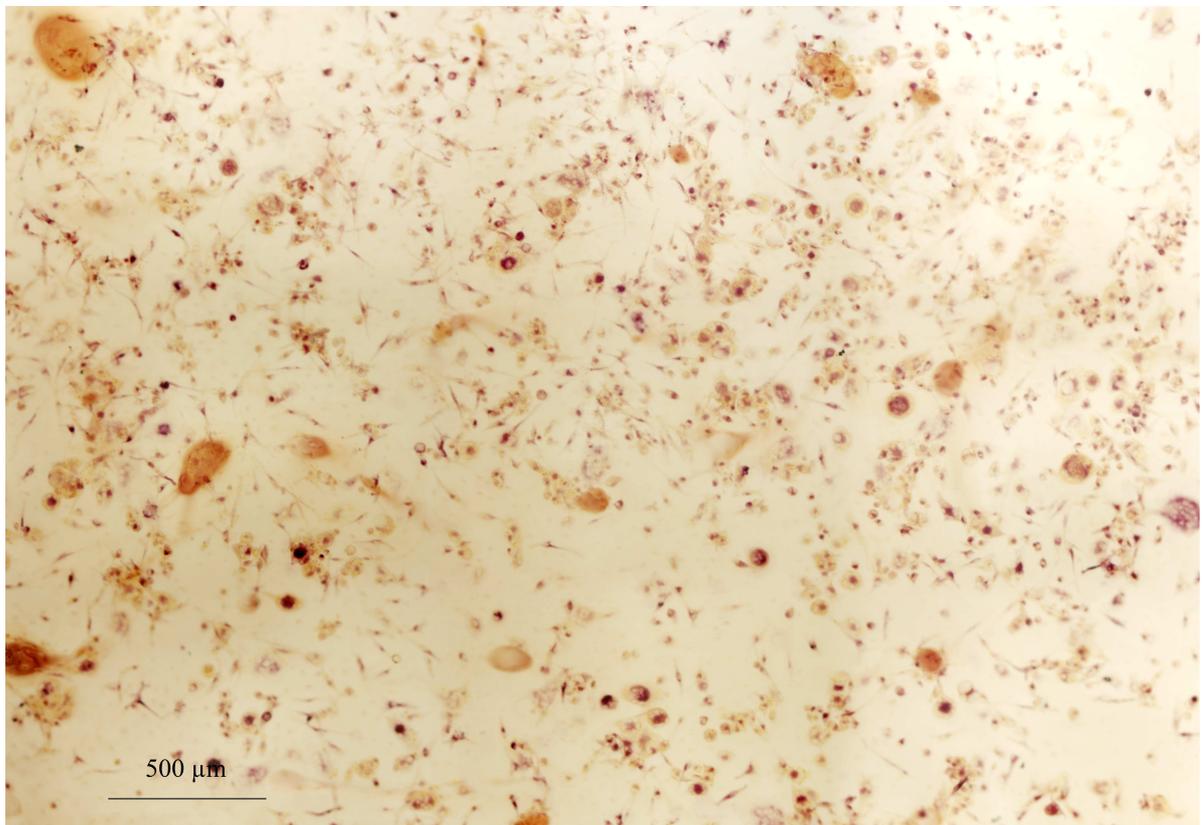


FIGURE 4.1 – Image de la surface d'un échantillon contrôlé après coloration au TRAP, les cellules apparaissent en rose.

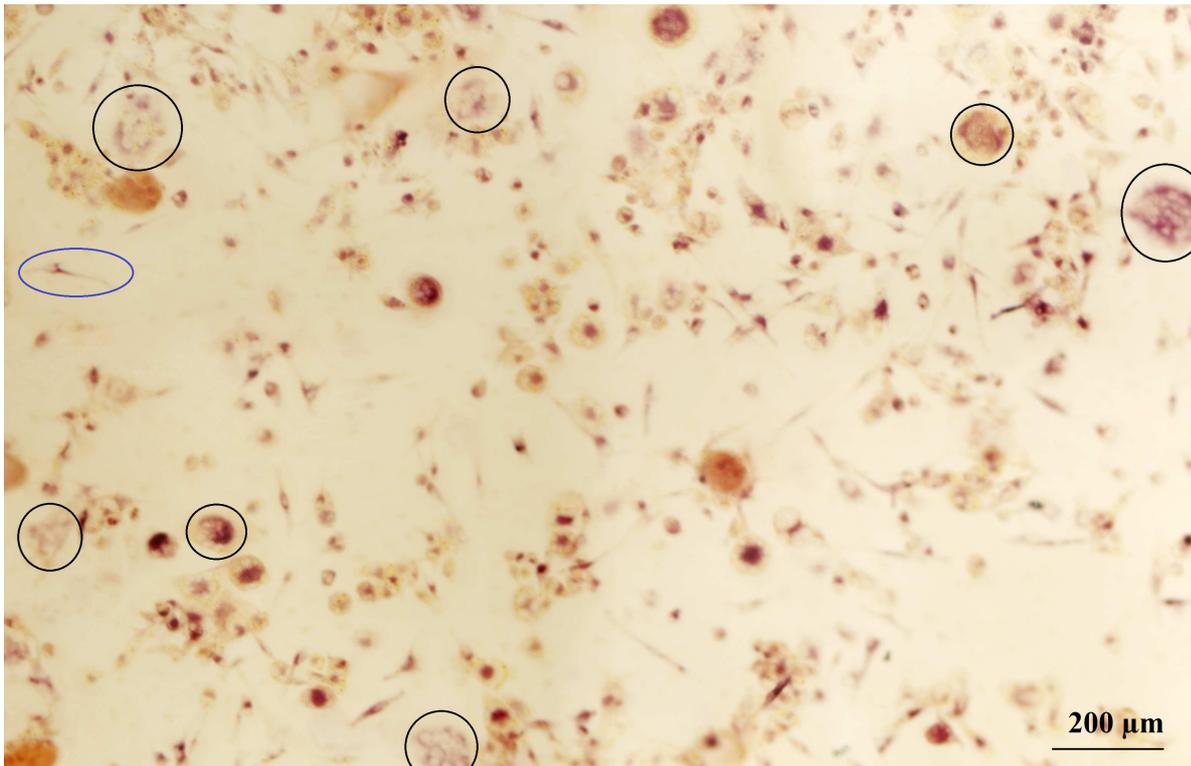


FIGURE 4.2 – Image de la surface d'un échantillon sain après coloration au TRAP (zoom de la figure), des exemples d'ostéoclastes à plus de trois noyaux sont entourés en noir. En bleu c'est un ostéoclaste fusiforme, i.e. en migration.

#### 4.1.4 Comparaisons entre OI et sains

Nous avons déjà étudié les différences de propriétés mécaniques et chimiques entre ces donneurs OI et sains au chapitre 2, pour rappel ces résultats se trouvent en table 4.1.

Propriétés	Groupe contrôle	Groupe OI	p<0,05
Module d'Young	+	-	*
Dureté	+	-	
Densité minérale du tissu (TMD)	-	+	*
Ratio minéral/matrice	-	+	*
Cristallinité	+	-	*
Taux de substitution en carbonates	-	+	
Maturité du collagène	-	+	

TABLE 4.1 – Rappel des résultats de la comparaison groupe contrôle groupe OI faite en chapitre 2 à l'échelle du tissu.

L'ensemble des échantillons utilisés pour ensemercer les ostéoclastes ont été caractérisés et nous avons vérifié que les résultats obtenus donnaient des tendances similaires à celles décrites dans la table 4.1. De plus, l'ensemble des échantillons ont été analysés en microscopie électronique à balayage en mode rétrodiffusé afin de distinguer les zones de minéralisation différente. De la même manière, à partir de l'ensemble des spectres Raman, un ratio supplémentaire a été

calculé lors de cette étude qui montrait un taux de protéines non collagéniques plus élevé chez les OI en comparaison avec les sains. Or, même si toutes les fonctions de ces protéines ne sont pas clairement connues, il est fortement soupçonné que ces protéines jouent un rôle important sur la nucléation et la croissance des cristaux ainsi que sur leur attachement aux fibres de collagène. Cela aurait un impact sur les propriétés mécaniques de l'os, en particulier Thurner *et al.* ont montré que des souris n'exprimant pas l'ostéopontine avait une ténacité réduite[12]. On peut ainsi supposer que les protéines non collagéniques ont un impact important sur la fragilité des os des patients souffrant d'OI.

#### 4.1.5 Identification des zones résorbées et non résorbées

Il nous a semblé intéressant d'analyser les zones de résorption au regard des propriétés mécaniques et chimiques locales. Pour cela, pour quatre échantillons d'un donneur enfant sain, les valeurs de modules d'Young et de dureté ont été rangées en deux classes : les points appartenant aux zones résorbées et ceux appartenant aux zones non résorbées. La détermination des zones a été réalisée à partir des images obtenues après coloration au bleu de tolluidine. Au total, sur les quatre échantillons réalisés le même jour et provenant du même donneur, 151 points ont été classés dans la zone non résorbée et 48 points ont été considérés comme faisant partie de la zone résorbée.

Pour ces mêmes quatre échantillons, les acquisitions de spectroscopie Raman faites après résorption ont été divisées en zones résorbées et zones non résorbées. Nous avons fait des acquisitions en 30 points de chaque échantillon. En chacun des points, les mesures étaient réalisées à un minimum de 6  $\mu\text{m}$  sous la surface pour être certain de caractériser la matière sous la zone résorbée. Le laser ainsi que les paramètres d'acquisition employés étaient les mêmes que ceux décrits au chapitre 2. Nous avons pris soin de réaliser 15 points dans chaque zone, identiques à celles identifiées précédemment pour classer les mesures de nanoindentation.

#### 4.1.6 L'interférométrie

Avant et après résorption, la surface de chaque échantillon a été caractérisée par interférométrie en lumière blanche (Wyko NT, Veeco) afin d'obtenir des données topographiques et de pouvoir en déduire des données quantitatives sur la résorption.

Le principe de l'interférométrie en lumière blanche est le suivant, une source de lumière blanche émet un rayonnement qui passe dans différents filtres et lentilles avant d'être séparé en deux par un *beamsplitter*. Une partie de ce rayonnement incident va être réfléchié par l'échantillon tandis que l'autre va être réfléchié par un miroir. Ces deux rayonnements réfléchis de part et d'autre vont ensuite se recombiner pour former des franges d'interférence. Ces franges claires ou foncées (constructives ou destructives) dépendent de la différence de chemin optique et cette différence de chemin optique est liée à la topographie de la surface.

L'acquisition était constituée de plusieurs interférogrammes pris entre 50  $\mu\text{m}$  sous la surface et 20  $\mu\text{m}$  au-dessus avec un pas de 2 nm. L'image brute récupérée, d'une taille de 736 x 480 pixels (soit environ 1200  $\mu\text{m}$  x 920  $\mu\text{m}$ ), était une image en niveaux de gris enregistrée en format SDF puis convertie en format ASCII afin d'être lue par Matlab<sup>®</sup>. Nous avons réalisé des acquisitions en quatre zones par échantillon avant résorption et nous avons refait les quatre mêmes acquisitions après résorption. L'exploitation des images avant et après résorption a été réalisée avec une routine Matlab<sup>®</sup> faite en interne.

Cette routine se décompose en plusieurs étapes résumées en figure 4.3.

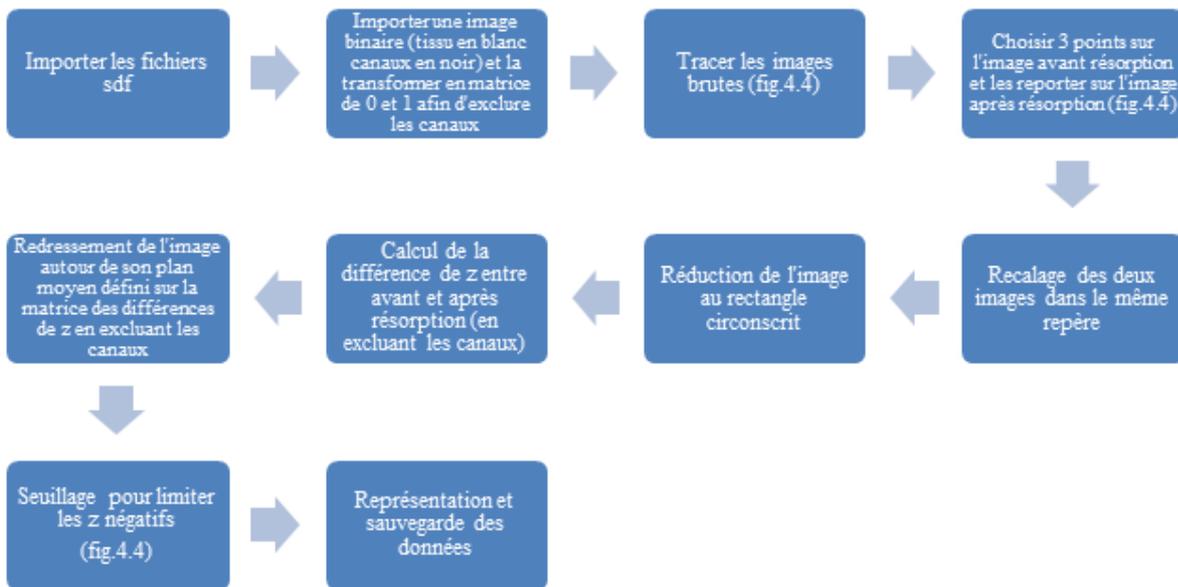


FIGURE 4.3 – Schéma de la routine matlab de traitement des données issues de l'analyse interférométrique.

La table 4.2 résume l'ensemble des tests effectués sur chaque échantillon.

Echantillons	C/OI <sup>1</sup>	Provenance	Nanoindentation	Tomographie	Raman	Interférométrie	Classification R/NR <sup>2</sup>
don 4-1 <sup>3</sup>	C	m1 <sup>4</sup>	o <sup>5</sup>	o	o	o	o
don 4-2	C	m1	o	o	o	o	o
don 4-3	C	m1	o	o	o	o	o
don 4-4	C	m1	o	o	o	o	o
don 5-1	C	m2 <sup>6</sup>	o	o	o	o	
don 5-2	C	m2	o	o	o	o	
don 6-1	C	m2	o	o	o	o	
don 7-1	OI	m2	o	o	o	o	
don 7-2	OI	m2 chap2 <sup>7</sup>	o* <sup>8</sup>	o*	o*	o	
OI 11 <sup>9</sup> (don 7)	OI	m2 chap3	o*	o*	o	o	
OI 4 (don 8)	OI	m2 chap2	o*	o*	o*	o	
OI 5 (don 9)	OI	m2 chap2	o*	o*	o*	o	
OI 2 (don 10)	OI	m2 chap2	o*	o*	o*	o	
don 11-1	OI	m1	o	o	o	o	
don 11-2	OI	m1	o	o	o	o	
don 11-3	OI	m1	o	o	o	o	
don 11-4	OI	m1	o	o	o	o	

TABLE 4.2 – Résumé des tests effectués sur chaque échantillon.

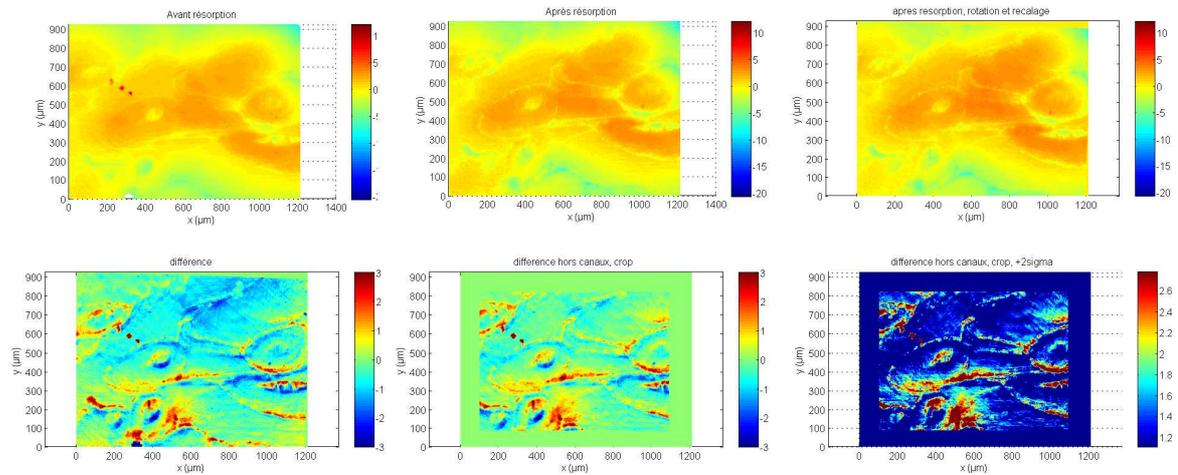


FIGURE 4.4 – Illustrations des étapes du traitement des données interférométriques a) image brute avant résorption b) image brute après résorption c) image après résorption tournée et recalée grâce aux trois points positionnés sur les images brutes avant et après résorption d) différence de hauteur entre avant et après résorption e) Recalage de d) par rapport au plan moyen et exclusion des canaux et zone hors rectangle circonscrit f) seuillage pour ne garder que des  $z$  supérieurs à 2 fois l'écart-type.

### 4.1.7 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel libre R (The R foundation), avec un seuil de 5 % pour le risque alpha. Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les variables des os pathologiques et des contrôles.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Comparaison qualitative et quantitative de la résorption osseuse chez l'enfant et chez l'OI

#### 4.2.1.1 Morphologie des ostéoclastes

Nous n'avons pas observé de différence notable entre les ostéoclastes 72h après leur mise en culture sur les os sains et pathologiques. Nous avons observé une majorité d'ostéoclastes fusiformes dans les deux groupes (fig. 4.5), prouvant qu'à 72h ils n'étaient pas tous matures et beaucoup migraient encore pour pouvoir fusionner. Nous avons également observé des ostéoclastes ronds chez les deux populations (fig. 4.2 et 4.6) donc finalement la morphologie des

1. C contrôle, OI ostéogénèse imparfaite
2. R : zone résorbée, NR : zone non résorbée
3. don a – b signifie échantillon b du donneur a
4. manip avec source 1 d'ostéoclastes
5. test effectué
6. manip avec source 2 d'ostéoclastes
7. échantillon utilisé au chapitre 2/ 3
8. test effectué lors d'une étude précédente
9. OI2, OI4, OI5 et OI11 font références à des échantillons OI cités dans les chapitres 2 et 3

ostéoclastes ne dépendait pas beaucoup de la qualité pathologique ou non du substrat.

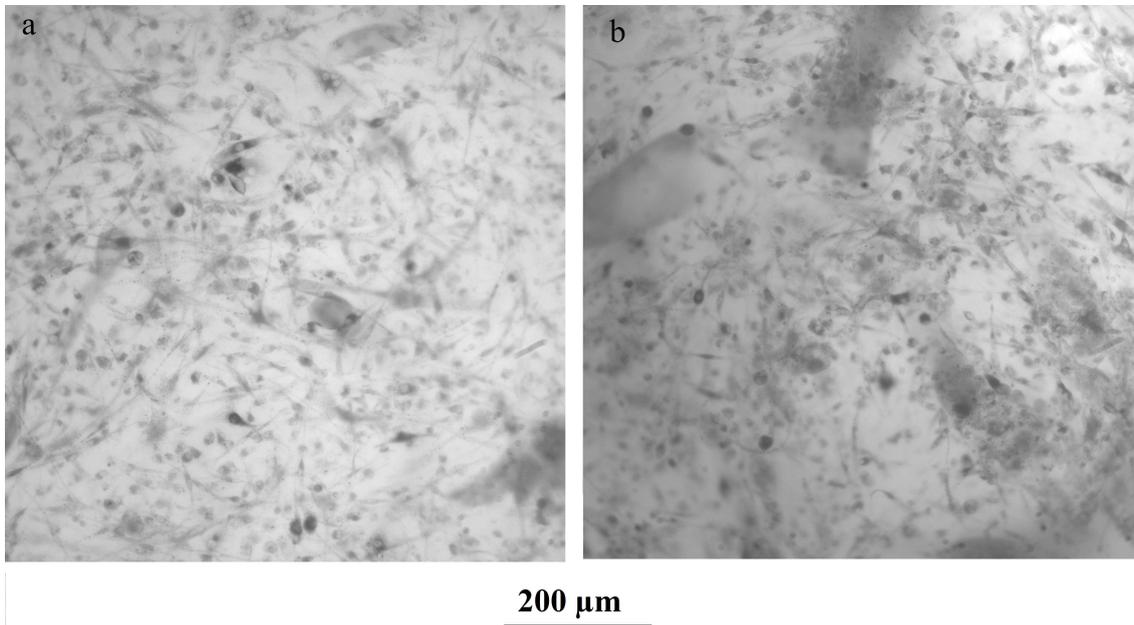


FIGURE 4.5 – Images prises en microscopie optique de la surface a) d'un échantillon sain et b) d'un échantillon OI présentant une majorité d'ostéoclastes fusiformes et quelques ostéoclastes polarisés.

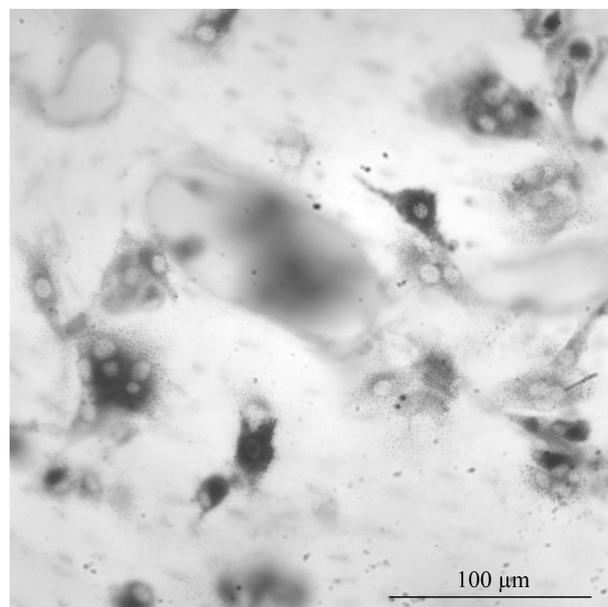


FIGURE 4.6 – Ostéoclastes polarisés sur un échantillon OI.

Nous avons laissé certains contrôles jusqu'à 5 jours de culture et nous avons alors logiquement observé beaucoup plus d'ostéoclastes polarisés avec un nombre de noyaux plus important (fig. 4.7).

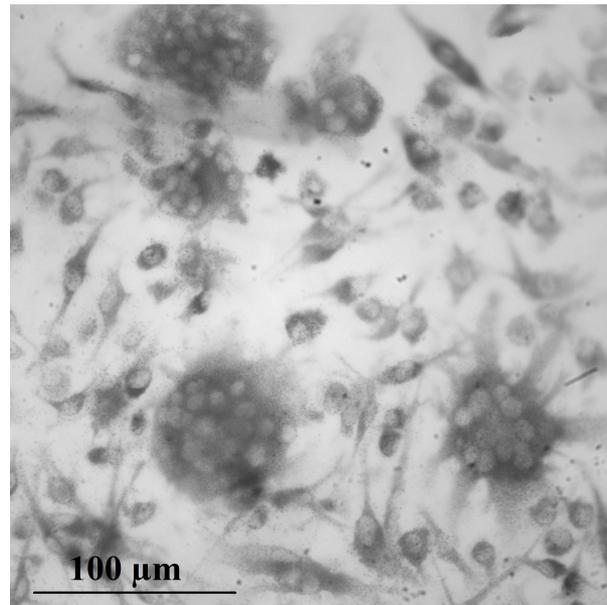


FIGURE 4.7 – Ostéoclastes avec de nombreux noyaux sur un échantillon sain après 5 jours de culture.

#### 4.2.1.2 Densité des ostéoclastes

La mesure de la densité en ostéoclastes (nombre d'ostéoclastes / surface de l'échantillon) a été réalisée par microscopie optique suite à un marquage au TRAP. A cause de la grande variabilité pour les deux groupes il n'y avait pas de différence significative, la densité en ostéoclastes était de 13,0 (6,4) /mm<sup>2</sup> pour les OI et elle était de 13,5 (3,9) / mm<sup>2</sup> pour les contrôles (table 4.3). Remarquons que nous avons fait des moyennes par donneur afin d'affecter le même poids à chaque donneur. Nous n'avons pas distingué les sources d'ostéoclastes car il n'y avait pas beaucoup de différence entre les moyennes obtenues par source.

Donneurs	Nombre total d'OC	Densité OC (#/mm <sup>2</sup> )
don 7	73	12,3
don 8	32	21,3
don 9	56	15,1
don 10	143	12,7
don 11	40	3,6
<b>Moyenne</b>	<b>69</b>	<b>13,0</b>
<b><i>Ecart-type</i></b>	<b><i>44</i></b>	<b><i>6,4</i></b>
don 4	86	9,8
don 5	94	13,2
don 6	91	17,5
<b>Moyenne</b>	<b>90</b>	<b>13,5</b>
<b><i>Ecart-type</i></b>	<b><i>4</i></b>	<b><i>3,9</i></b>

TABLE 4.3 – Nombre total d'ostéoclastes (OC) et densité en ostéoclastes sur les échantillons sains et OI compté à partir des images faites après coloration au TRAP.

### 4.2.1.3 Profils de résorption

Les profils de résorption ont été analysés par interférométrie et coloration au bleu de tolluidine. Les images à 72 h pour un contrôle et un OI sont présentées respectivement en figures 4.8 et 4.9.

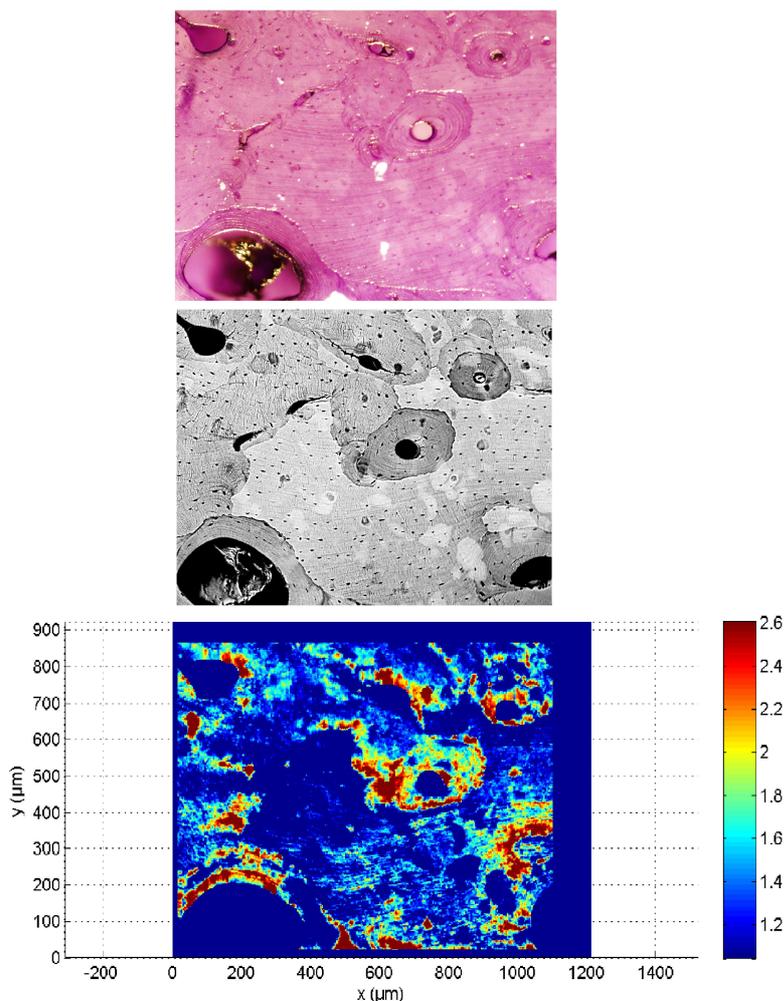


FIGURE 4.8 – Image en bleu de tolluidine, en microscopie électronique à balayage et en interférométrie pour un échantillon contrôle.

Sur ces figures on constate une différence de profil de résorption entre le contrôle et l'OI. En effet, pour l'OI la résorption est plus uniforme que celle observée sur les échantillons contrôles qui présentent de la résorption majoritairement au niveau des ostéons. Ceci est particulièrement visible en topographie (fig. 4.10). Pour les OI la résorption paraît recouvrir approximativement la même surface de l'échantillon mais elle paraît ponctuellement plus profonde (comme identifié sur la barre d'échelle). Notons que pour les échantillons OI, les lacunes ostéocytaires paraissent localement plus affectées par l'activité des ostéoclastes que chez les sains, les lacunes devenaient plus grosses et irrégulières.

A 5 jours de cultures, la résorption paraissait se faire de manière différente, des *pits* étaient

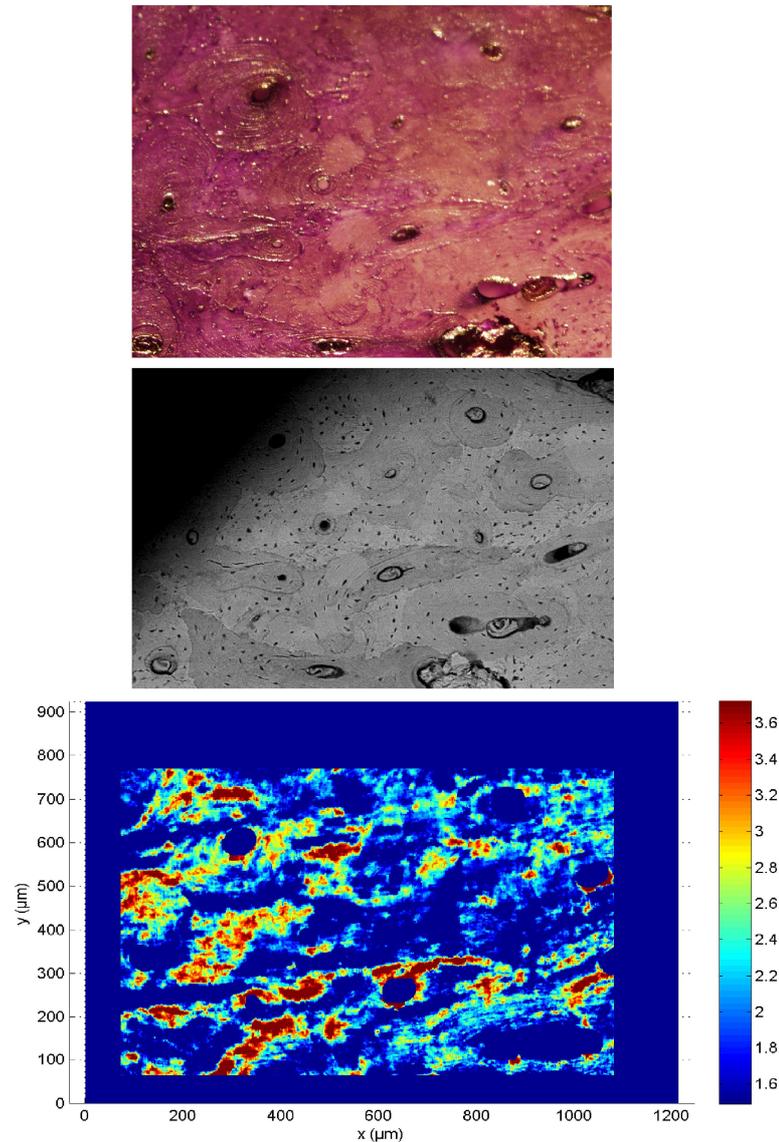


FIGURE 4.9 – Image en bleu de tolluidine, en microscopie électronique à balayage et en interférométrie pour un échantillon OI.

alors observables.

#### 4.2.1.4 Quantification de la résorption

La résorption a été quantifiée par analyses interférométriques. Les résultats sont présentés en figure 4.11. La moyenne des hauteurs de résorption est significativement plus élevée chez l’OI comparé au groupe contrôle (2,59 (1,13)  $\mu\text{m}$  vs. 1,81 (0,89)  $\mu\text{m}$ ,  $p=0,0027$ ). Le volume de résorption normalisé par l’aire du tissu est plus élevé chez l’enfant OI comparé à l’enfant sain (0,51 (0,24) vs. 0,35 (0,12),  $p=0,0089$ ). Le pourcentage de surface résorbé n’est pas significativement différent entre ces deux groupes (10,95 (3,37) % pour le groupe OI et 10,85 (2,98) %

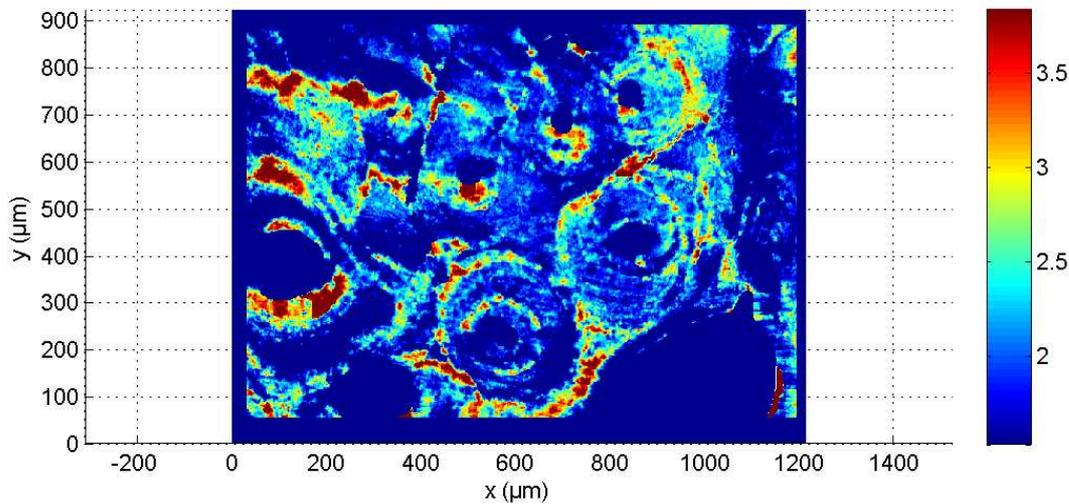


FIGURE 4.10 – Image en interférométrie pour un échantillon contrôlé.

pour le groupe contrôle,  $p=0,57$ ). Pour résumer la résorption est plus importante chez l'OI, due principalement à une résorption en profondeur plutôt qu'à une plus grande surface résorbée.

L'observation d'un profil de résorption ciblant les ostéons, notamment dans les échantillons contrôlés, suggérerait une résorption non aléatoire, la distinction de zones résorbées et de zones non résorbées devrait permettre de mettre en évidence des facteurs guidant la résorption osseuse chez l'enfant sain.

## 4.2.2 Localisation de la résorption osseuse chez l'enfant sain

Quatre échantillons d'un même enfant sain ont été analysés pour appréhender l'effet de la microstructure sur la résorption osseuse. Les propriétés mécaniques et chimiques obtenues respectivement par nanoindentation et microspectroscopie Raman, ont été classées en deux grandes catégories suivant que les mesures provenaient d'une zone résorbée ou d'une zone non résorbée. Les résultats donnés ci-dessous présentent les moyennes sur l'ensemble des points pour les quatre échantillons du même donneur sain.

### 4.2.2.1 Propriétés mécaniques

Les valeurs moyennes de module d'Young et de dureté obtenues par nanoindentation pour la zone résorbée des quatre échantillons sont 19,2 (1,9) GPa et 0,59 (0,09) GPa respectivement (fig. 4.12). Pour la zone non résorbée le module d'Young et la dureté valent en moyenne 21,2 (1,7) GPa et 0,68 (0,09) GPa, respectivement (fig. 4.12). Les propriétés mécaniques de la zone résorbée sont donc significativement plus faibles ( $p = 6,4 \cdot 10^{-9}$  et  $p = 1,5 \cdot 10^{-7}$  pour le module d'Young et la dureté respectivement) que les propriétés mécaniques de la zone non résorbée.

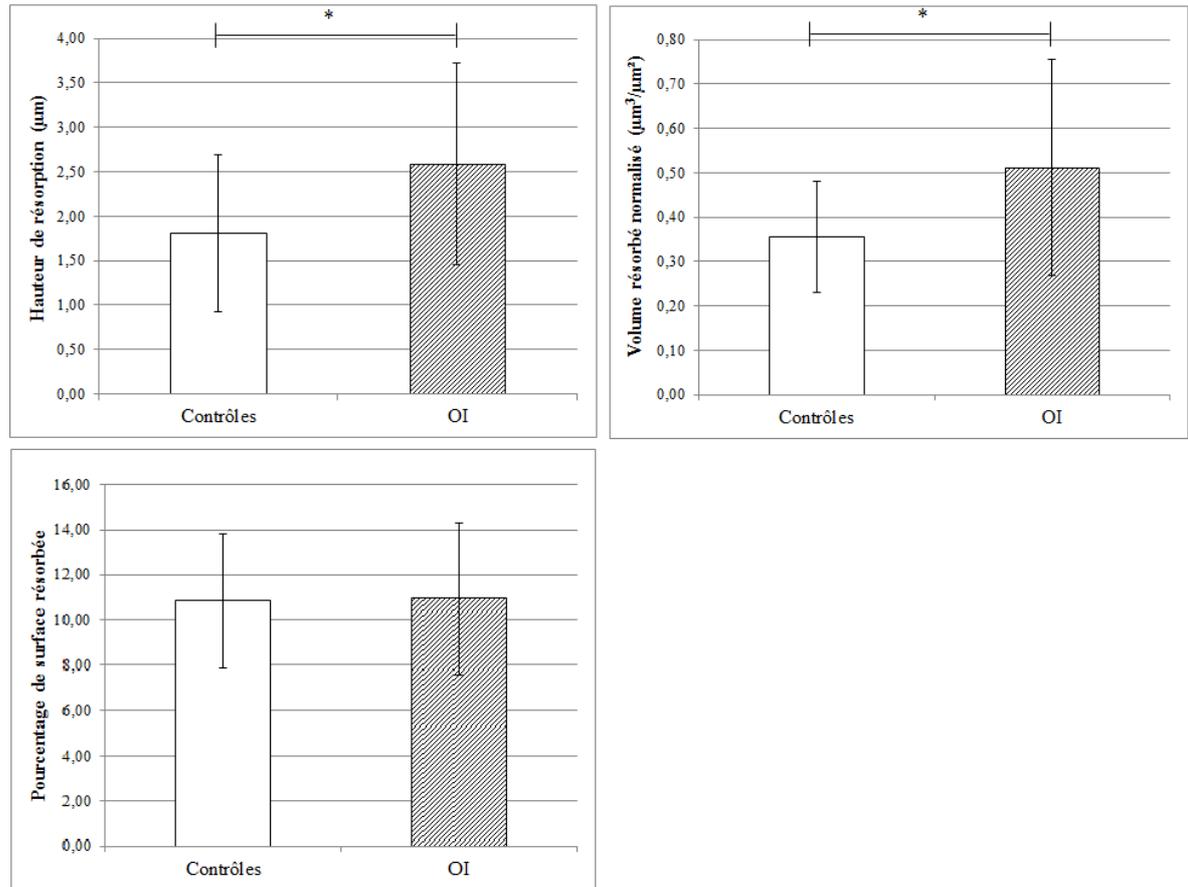


FIGURE 4.11 – Histogrammes présentant la hauteur de résorption, le volume résorbé normalisé par la surface du tissu et le pourcentage de surface résorbée pour le groupe sain et le groupe OI. \* :  $p < 0,05$ .

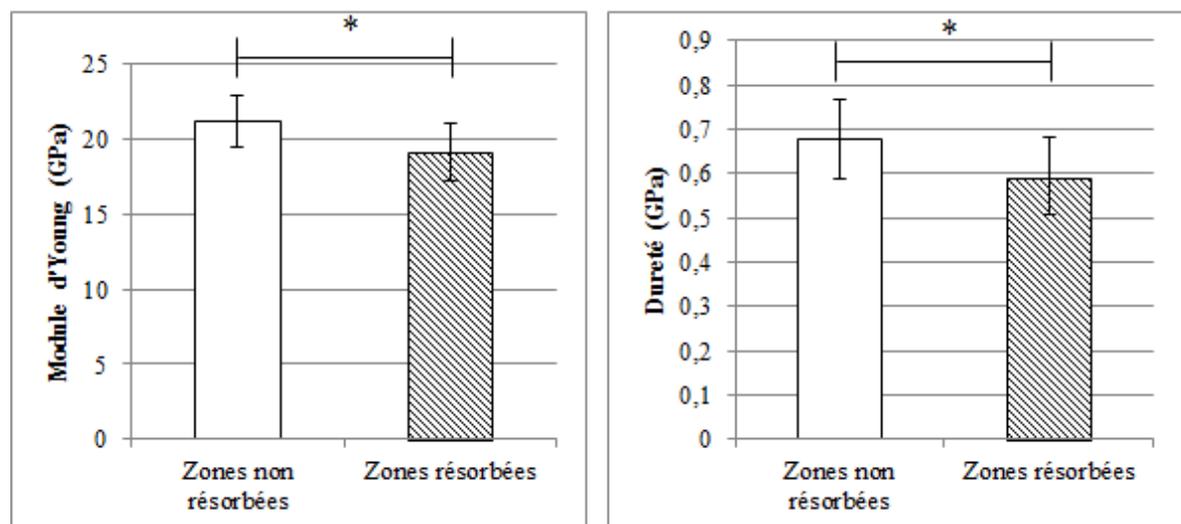


FIGURE 4.12 – Graphes des valeurs moyennes et écart-types du module d'Young (graphe de gauche) et de la dureté (graphe de droite) pour les zones non résorbées et résorbées d'un donneur sain. \* :  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.2 Propriétés chimiques

De la même manière des mesures de spectroscopie Raman ont été effectuées sur les 4 échantillons en distinguant les zones résorbées et des zones non résorbées. Les résultats pour les quatre ratios étudiés sont présentés en figure 4.13.

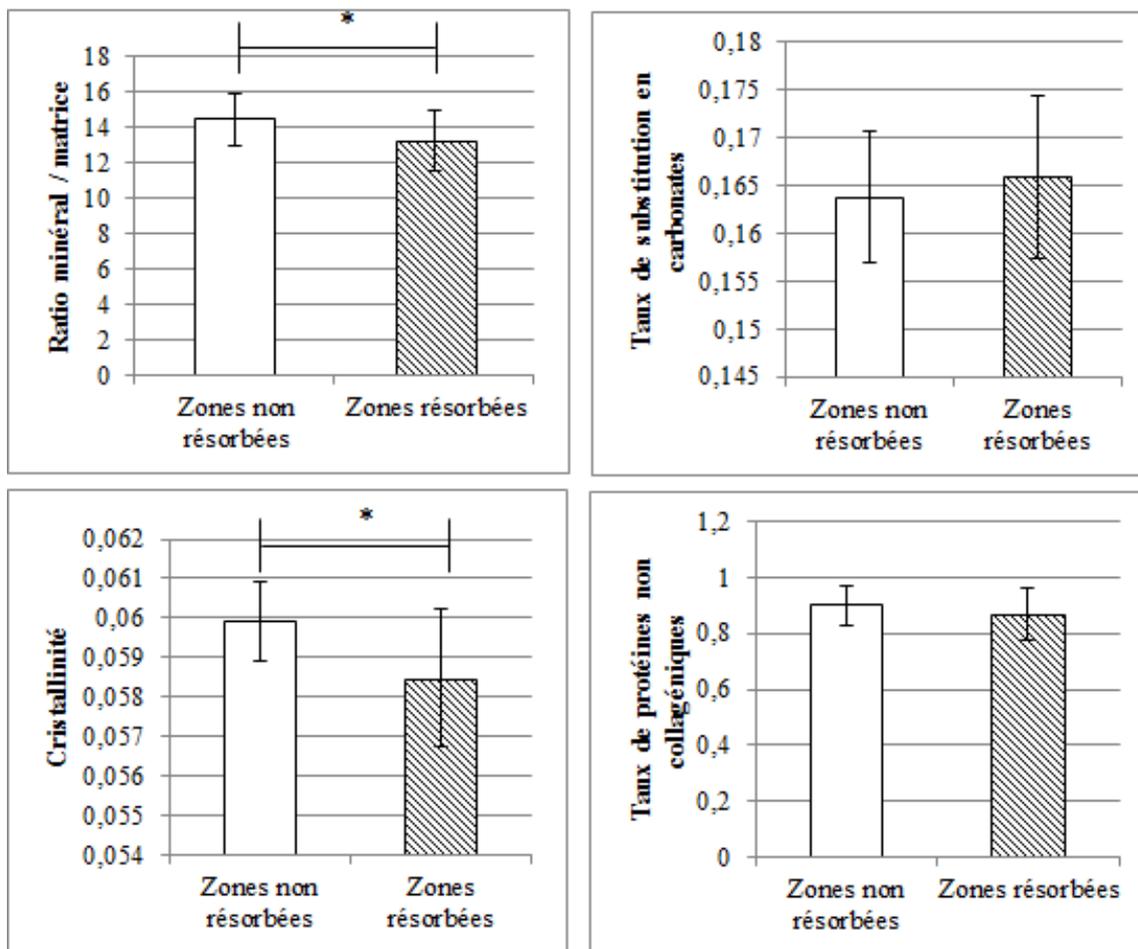


FIGURE 4.13 – Valeurs de ratios obtenus en microspectroscopie Raman pour les 4 échantillons d'un même donneur sain. \* :  $p < 0,05$ .

Le ratio minéral/matrice est significativement plus faible dans les zones résorbées comparativement aux zones non résorbées (13,2 (1,7) vs. 14,4 (1,5),  $p = 9,6 \cdot 10^{-5}$ ). La cristallinité est significativement plus faible dans les zones résorbées par rapport aux zones non résorbées (0,0585 (0,0017) vs. 0,0599 (0,0010),  $p = 3,3 \cdot 10^{-7}$ ).

Pour le taux de substitution et le taux de protéines non collagéniques, les différences ne sont pas significatives ( $p = 0,14$  et  $p = 0,069$  respectivement). Cependant les zones qui seront résorbées montrent une tendance vers une plus grande maturité du minéral (plus de substitutions en carbonates) et un taux de protéines non collagéniques plus élevé.

## 4.3 Discussion et conclusions

### 4.3.1 L'influence du substrat synthétique sur la résorption

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'activité de résorption d'ostéoclastes humains sur des os d'enfants sains. Nous avons étudié les propriétés du substrat en termes de propriétés mécaniques et chimiques par nanoindentation et microspectroscopie Raman respectivement. Nous avons constaté que la résorption ne se faisait pas aléatoirement, certains paramètres mécaniques et chimiques guidaient la résorption osseuse. En particulier, les ostéoclastes résorbaient préférentiellement les zones où les propriétés mécaniques du tissu, i.e. le module d'Young et la dureté, étaient les plus faibles et les zones de faible minéralisation où les cristaux étaient plus petits. Ces résultats montrent tout d'abord l'importance des propriétés du substrat, comme cela avait été suggéré par de précédentes études, en particulier Anderegg *et al.* avaient montré l'importance des propriétés d'adhérence d'un substrat sur l'architecture et la dynamique des zones de scellement des ostéoclastes[25].

Notre étude a également montré l'importance du minéral dans la résorption osseuse, ce qui est en accord avec de précédentes études. Par exemple, il a été observé que les ostéoclastes ne résorbent pas s'ils sontensemencés sur de l'os déminéralisé, i.e. de la matrice de collagène seule[27, 161]. Au-delà de la simple présence de minéral, il a également été montré que sa structure, sa topographie et sa composition sont des facteurs importants[23, 160]. Par exemple, Nakamura *et al.* ont comparé la résorption sur différents types de minéral à savoir de l'hydroxyapatite synthétique et du bêta-tricalcium phosphate et ils ont comptabilisé des différences de différenciation et de fusion des ostéoclastes notamment[23]. Autre exemple, Costa *et al.* ont montré qu'en contrôlant la topographie d'un revêtement d'hydroxyapatite ils pouvaient favoriser plutôt l'attachement et la différenciation des ostéoblastes (plus rugueux) ou plutôt l'attachement et l'activité des ostéoclastes (plus lisse)[160].

Dans notre étude, il n'y avait pas de différence significative, mais nos résultats de microscopie Raman indiquaient une tendance vers un taux de substitutions en carbonates plus élevé dans les zones résorbées. Ce résultat est en accord avec l'étude de Nakamura *et al.* dans laquelle ils ont montré que l'incorporation d'ions carbonates dans une matrice d'hydroxyapatite synthétique augmentait la résorption, via une ostéoclastogénèse plus élevée et une efficacité de résorption plus importante (anneaux d'actine plus épais et plus courts permettant la création de cavités étanches de meilleure qualité)[23]. En effet, il semblerait que la meilleure solubilité des hydroxyapatites substitués avec des ions carbonates permettent la libération d'ions favorisant ensuite la différenciation en ostéoclastes résorbants. Ces derniers auteurs ont également souligné la possibilité que les substitutions créent une différence d'énergie de surface, elle-même ayant un impact sur la conformation des protéines et donc la reconnaissance des surfaces à résorber. Dans toutes ces études, ils ont montré l'importance des composants inorganiques dans la résorption osseuse[23]. Ainsi, de nombreuses études réalisées *in vitro* ont utilisé des

composants inorganiques mais finalement moins d'études ont utilisé un substrat provenant d'un être vivant.

#### 4.3.2 L'influence du substrat naturel (osseux ou dentine) sur la résorption

Dans la littérature, les études s'intéressaient principalement à l'activité d'ostéoclastes humains sur des os bovins ou de la dentine pour modéliser le substrat osseux[26, 27, 159], plus facilement accessibles que de l'os humain. Par exemple, Rumpler *et al.* ont montré que les ostéoclastes résorbaient l'os bovin et la dentine d'éléphant sous forme de *pits* ou de *trails* de manière à atteindre une profondeur limite. La formation des *trails* correspondrait à de la résorption par couches associée à la migration de l'ostéoclaste. De plus, ils ont montré un effet de dépendance au matériau puisque la quantification de la résorption, en termes de nombre de *pits* et de pourcentage de surface résorbée, montrait qu'elle était bien plus conséquente sur la dentine en comparaison avec de l'os bovin alors que la composition et la structure était semblable. Au niveau moléculaire, l'adhésion cellulaire était meilleure sur la dentine et des gènes liés à la fusion ou caractéristiques des ostéoclastes matures étaient plus fortement exprimés sur la dentine[26]. Cela montrait l'importance du substrat et le rôle des protéines non collagéniques comme l'ostéopontine. Deux résultats de la littérature trouvés sur des substrats non humains semblent en désaccord avec les nôtres, d'une part l'ostéoclastogénèse et la résorption se fait préférentiellement sur les os plus âgés[27], et d'autre part la résorption sur l'os bovin et sur la dentine se fait aléatoirement. Pour la première étude, l'âge est une caractéristique générale de l'os et non simplement une idée de maturation de l'os, certains de nos résultats non montrés ici sur des os d'adultes prouvent effectivement que la résorption augmente avec l'âge. En revanche, le second résultat est effectivement en contradiction avec nos observations indiquant que la résorption ne se fait pas aléatoirement mais est guidée par des paramètres mécaniques et chimiques notamment. Cela prouve la nécessité d'étudier la résorption sur de l'os humain dont la microstructure diffère des os bovins et de la dentine.

C'est, à ce jour et à notre connaissance, la première fois qu'une étude s'intéresse à l'influence du tissu osseux d'enfant sur l'activité d'ostéoclastes humains. Nous avons observé des profils de résorption montrant que chez l'enfant sain les ostéoclastes résorbaient préférentiellement les ostéons, des zones de minéralisation plus faible, ou alors la ligne cémentante. Ils résorbaient également les zones où les cristaux étaient les plus petits, dans tous les cas cette résorption ne se faisait pas au hasard. Ces observations sont en contradiction avec l'étude de Reid *et al.* réalisée avec des ostéoclastes provenant d'os longs de poussins et d'os provenant de côtes et de fémurs humains. Ils ont montré que les ostéoclastes résorbaient indifféremment l'ostéoïde et des zones de la matrice minéralisée de densités différentes[162]. Ils ont observé que les zones de résorption pouvaient traverser la ligne cémentante et atteindre l'os interstitiel pourtant plus minéralisé. Il est difficile de connaître avec certitude les raisons de ces différences, il y a beaucoup de facteurs

qui diffèrent entre nos études à commencer par la source des ostéoclastes. En effet, nous avons récupéré des précurseurs d'ostéoclastes directement du sang humain, tandis que Reid *et al.* ont broyé les os et ont donc utilisé en partie des ostéoclastes différenciés. Avant le milieu des années 90 ils ne connaissaient pas les facteurs nécessaires à la différenciation et utilisaient donc les os broyés afin de s'assurer d'avoir des ostéoclastes fonctionnels. Ils ne contrôlaient ainsi pas tous les paramètres comme c'est le cas aujourd'hui. Il a également été montré que le potentiel de résorption était une donnée intrinsèque des ostéoclastes et dépendait donc du donneur[26].

### 4.3.3 La résorption osseuse chez l'OI comparé à l'os sain

Dans cette étude nous avons comparé la résorption osseuse par des ostéoclastes humains sur des échantillons contrôles et des échantillons provenant de patients souffrant d'OI. Nous avons analysé la résorption osseuse en termes de morphologie et densité en ostéoclastes et en termes de profil et volume de résorption par l'intermédiaire de coloration au TRAP, de coloration au bleu de tolluidine et d'analyses interférométriques.

Tous les patients OI inclus dans cette étude ont reçu au moins une cure de bisphosphonates (BPs) dont la fonction est d'inhiber la résorption osseuse. Les bisphosphonates ont une demi-vie de plusieurs années[89] ce qui suggère la présence de BPs dans tous nos échantillons. Néanmoins, nous avons trouvé un volume de résorption normalisé plus important chez l'OI comparé au sain. D'après d'autres auteurs, les bisphosphonates, qui agissent principalement sur l'enzyme FPPS indispensable à l'action de résorption des ostéoclastes, l'inhibent en formant un complexe *in vivo*[100] et les ostéoclastes en présence de bisphosphonates deviennent « géants » et inactifs (même chez l'OI traité par bisphosphonates)[99], or nous n'avons pas remarqué de tels ostéoclastes sur les échantillons. Il peut y avoir plusieurs explications pour cet apparent paradoxe, première hypothèse les bisphosphonates n'ont plus cette capacité d'inhibition *in vitro*, deuxième hypothèse, il n'y a pas ou plus de bisphosphonates dans les échantillons que nous avons récupérés (la cause peut être une répartition progressivement non uniforme des bisphosphonates dans le squelette). Dernière hypothèse, il est également possible de considérer que les BPs soient actifs et réduisent quelque peu la résorption mais pas suffisamment pour atteindre un taux normal.

Dans cette étude, nous avons vu d'une part que les ostéoclastes résorbaient préférentiellement et de manière significative les zones de faibles propriétés mécaniques où la minéralisation était plus faible et présentait de petits cristaux. Les échantillons OI présentent une microstructure et des propriétés différentes de l'os sain, en particulier, ils ont des propriétés mécaniques plus faibles, ils sont plus minéralisés et ils ont des plus petits cristaux. La faiblesse des propriétés mécaniques et la petite taille des cristaux observés chez les OI semblent favoriser une plus grande densité en ostéoclastes. Néanmoins, concernant la densité minérale, les résultats sont contradictoires. En effet, chez les enfants sains la résorption a lieu dans les zones les moins

minéralisées alors que les os OI sont plus minéralisés que les os contrôles. La qualité du cristal, plus que la quantité, semble donc jouer un rôle important dans la résorption osseuse, les petits cristaux de moins bonne qualité, i.e. les plus fragiles, sont préférentiellement ciblés (ce sont les moins matures chez les OI et les plus matures chez les sains). Les effets des protéines non collagéniques et de la maturation des cristaux ne peuvent être exclus, même si dans le cas de notre étude ces deux paramètres ne présentaient pas de différence significative.

En conclusion, cette étude, qui présentait pour la première fois la mise en culture d'ostéoclastes humains sur des os d'enfants sains, nous a permis de montrer que la résorption osseuse ne se fait pas aléatoirement. En effet, elle se fait préférentiellement dans des zones où les propriétés mécaniques sont les plus faibles et où les cristaux d'hydroxyapatite sont plus petits. La comparaison avec la résorption sur des échantillons d'os OI a permis de confirmer l'importance de la qualité du minéral dans la résorption osseuse. On sait que cette qualité évolue avec l'âge, la comparaison de ces résultats avec de la résorption sur des os d'adultes nous permettrait de voir l'influence de l'âge et d'approfondir notre connaissance du mécanisme de résorption osseuse.

## Chapitre 5

# Application de la corrélation d'images et de la méthode des champs virtuels au cas de l'os d'enfant

---

<b>5.1</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>94</b>
5.1.1	Les échantillons	94
5.1.2	Essais de compression	94
5.1.3	Détermination des zones de modules différents	95
5.1.4	La corrélation d'images	95
5.1.5	Calcul des déformations	100
5.1.6	La méthode des Champs Virtuels	101
<b>5.2</b>	<b>Résultats</b>	<b>106</b>
5.2.1	Distribution des déformations	106
5.2.2	Validation de la méthode d'analyse inverse	108
5.2.3	Détermination des modules élastiques locaux	110
<b>5.3</b>	<b>Discussion et conclusions</b>	<b>113</b>

---



## Résumé

Les progrès technologiques ont permis de développer des techniques de mesure de champs surfacique et volumique et ces techniques ont elles-mêmes contribué à l'essor des méthodes d'analyse inverse pour l'identification des paramètres constitutifs d'un matériau. Cela paraît être un bon compromis entre l'essai de caractérisation traditionnel, i.e. à l'échelle de l'échantillon, qui donne accès à un ou deux paramètres mécaniques à la fois et l'essai microscopique comme la nanoindentation, i.e. à l'échelle de l'ostéon, qui donne des valeurs locales mais requiert plus de temps. Le but de cette étude est d'une part d'évaluer la répartition des déformations pour des échantillons d'os cortical d'enfants sains et pathologiques sous chargement de compression simple; et d'autre part d'adapter une méthode d'analyse inverse de type méthode des champs virtuels à la mesure de modules élastiques de l'os cortical d'enfant sain en distinguant notamment les zones interstitielle et ostéonale. Nos résultats ont montré des déformations locales importantes autour des cavités chez l'OI. De plus, la méthode d'analyse inverse a permis de mesurer un module d'élasticité apparent compris entre 4,68 GPa et 9,90 GPa selon la configuration, en accord avec les mesures macroscopiques. Ces résultats suggèrent donc la faisabilité du couplage corrélation d'images et méthode des champs virtuels pour la mesure des paramètres élastiques de l'os cortical d'enfant.



## Introduction

Tout au long de ce manuscrit nous avons expliqué en quoi la détermination des propriétés mécaniques était primordiale à la compréhension du comportement des os, particulièrement des os pathologiques. Le chapitre 2 utilisait la nanoindentation pour obtenir des valeurs de module d'Young et de dureté microscopiques mais nous n'avions alors pas d'information sur la répartition des déformations à chaque étape de chargement. Le chapitre 3 a montré une méthode de mesure macroscopique purement expérimentale utilisant un essai de compression et un extensomètre. La déformation mesurée était alors une valeur moyenne ne tenant pas compte de l'hétérogénéité du matériau. En effet, il est aujourd'hui connu que l'os possède des propriétés hétérogènes dues notamment à une hétérogénéité de minéralisation. Par exemple, nous avons constaté la différence significative de modules d'Young mesurés par nanoindentation entre les ostéons et les zones interstitielles sur deux échantillons contrôles (18,4 (2,2) GPa vs. 21,4 (2,6) GPa pour C1 et 19,4 (1,7) GPa vs. 20,8 (1,9) GPa pour C3). De même, Hoc *et al.* ont prouvé que le module d'Young et les déformations étaient hétérogènes à l'échelle de l'ostéon lors d'une étude sur l'effet de la microstructure sur les propriétés de l'os cortical haversien bovin[45]. Nicollela *et al.* ont également montré que les déformations étaient hétérogènes et ce particulièrement en fond de fissures et autour des lacunes ostéocytaires qui agissent comme des concentrateurs de contraintes[163]. Il est donc primordial de pouvoir mesurer ces déformations localement.

Cette étude traite également de mesures de propriétés mécaniques locales, l'idée étant d'utiliser l'hétérogénéité du matériau pour déterminer plusieurs paramètres inconnus simultanément. Cette approche exige une méthode d'identification adaptée. Les paramètres du matériau sont les inconnues, ce qui fait de ce problème un problème inverse par opposition au problème direct où l'on retrouve les champs de déformation et de contrainte à partir des paramètres du matériau, de la géométrie et de la force appliquée mesurée[164]. Les méthodes d'identification les plus fréquemment utilisées actuellement pour extraire des paramètres de comportement à partir de mesures de champs sont FEMU (*Finite Element Model Updating* = recalage de modèle éléments finis) et VFM (*Virtual Fields Method* = la méthode des champs virtuels). FEMU est une méthode qui consiste à créer un modèle éléments finis afin de simuler la réponse à un essai mécanique, de rentrer des valeurs initiales pour les paramètres inconnus et de construire une fonction coût à minimiser. Cette fonction coût est construite à partir de la différence entre la réponse à la simulation et la réponse à l'essai mécanique. Cette méthode ne nécessite pas la mesure du champ de déplacement sur l'ensemble de l'échantillon mais elle rencontre tout de même plusieurs inconvénients. Tout d'abord c'est une méthode itérative qui nécessite un temps de calcul important, la convergence dépend des conditions initiales, les conditions aux limites ne reproduisent pas toujours l'expérience, des hypothèses sur la distribution du chargement ou du déplacement peuvent être nécessaires et les calculs peuvent

devenir assez lourds en cas de non linéarité[164, 165]. Dans cette étude, c'est une méthode type méthode des champs virtuels qui lui a été préférée. Cette méthode permet d'identifier plusieurs paramètres simultanément à partir de la connaissance du champ de déplacement obtenu lors d'un seul test et ne nécessite pas la construction d'un modèle éléments finis[166]. Elle a été imaginée pour des problèmes élastiques[167, 168] puis elle a été adaptée à des cas non linéaires[169] voir élasto-visco-plastiques[170]. Néanmoins elle n'a été que très rarement utilisée dans un contexte biomécanique, elle a été utilisée pour identifier les paramètres anisotropiques et hyperélastiques des artères chez l'homme[171] mais à notre connaissance elle n'a jamais été utilisée pour étudier le comportement du tissu osseux.

Le but de cette partie est, dans un premier temps, d'utiliser un essai mécanique macroscopique couplé à des acquisitions d'images par caméra CCD pour déterminer les champs de déplacement et de déformation. Ces champs ont été déterminés par corrélation d'images 2D sur des échantillons sains et pathologiques afin de comparer leur distribution sur ces deux types de tissus osseux. Dans un second temps, les informations ainsi obtenues ont été couplées à la méthode d'analyse inverse choisie afin d'obtenir des valeurs de modules d'élasticité pour la zone interstitielle et la zone ostéonale d'un échantillon sain où la différence entre ces deux zones a été établie précédemment.

## 5.1 Matériels et méthodes

### 5.1.1 Les échantillons

Pour la détermination des champs de déplacement et de déformation quatre échantillons d'os cortical ont été utilisés. Ils proviennent tous des études présentées aux chapitres 2 et 3. Les deux os contrôles ont été prélevés sur deux donneurs sains (un garçon et une fille) appelés C1 et C2 aux chapitres 2 et 3. Les deux os pathologiques, prélevés sur deux donneurs OI (deux garçons de 13 et 14 ans) sont nommés OI1 et OI6 dans les chapitres 2 et 3.

Pour l'application de la méthode des champs virtuels à la détermination de modules d'élasticité de l'os, un seul échantillon d'os cortical, C1, a été utilisé afin de tester la faisabilité de la méthode.

### 5.1.2 Essais de compression

La micromachine de compression, le système d'acquisition et les capteurs sont les mêmes que ceux utilisés au chapitre 3. Pour les besoins de cette méthode, la micromachine d'essais mécaniques était disposée sur la platine d'un microscope optique Nikon LV (Nikon Corporation) surmontée d'une caméra QImaging Rétiga 4000 (QImaging, Surrey, British Columbia, Canada). Des images en niveaux de gris étaient prises à un grossissement 5x et avaient une taille de 2096 x 2096 pixels. La fréquence d'acquisition des images était de 0,1 soit une image

prise toutes les 10 secondes. Les fréquences d'acquisition des données issues du capteur de force et de l'extensomètre étant différentes, une routine Matlab<sup>®</sup> d'interpolation a été utilisée. Les images étaient ensuite traitées par corrélation d'images afin d'obtenir des valeurs de déplacement à différents états de charge. Les valeurs moyennes de la contrainte et de la déformation ingénieure dans la direction du chargement ont été calculées respectivement en divisant la charge par la surface initiale et le déplacement par la longueur initiale. Le module élastique tangent à l'échelle macroscopique a ensuite été calculé en charge comme la pente de la courbe contrainte déformation.

### 5.1.3 Détermination des zones de modules différents

Les images prises à l'aide du microscope optique Nikon LV (Nikon Corporation) et de la caméra QImaging Rétiga 4000 (QImaging, Surrey, British Columbia, Canada) à l'état initial ont également servi à définir des zones homogènes en termes de niveaux de gris et donc supposées comme homogènes en termes de module élastique. Trois types de calculs ont été réalisés dans la suite, le premier en considérant un échantillon totalement uniforme, le second en distinguant cette fois la porosité et le tissu et le troisième en considérant les échantillons composés de trous, de tissu ostéonal et de tissu interstitiel (fig. 5.1). Les lacunes ostéocytaires ont été négligées dans cette partie en raison de leur petite taille.

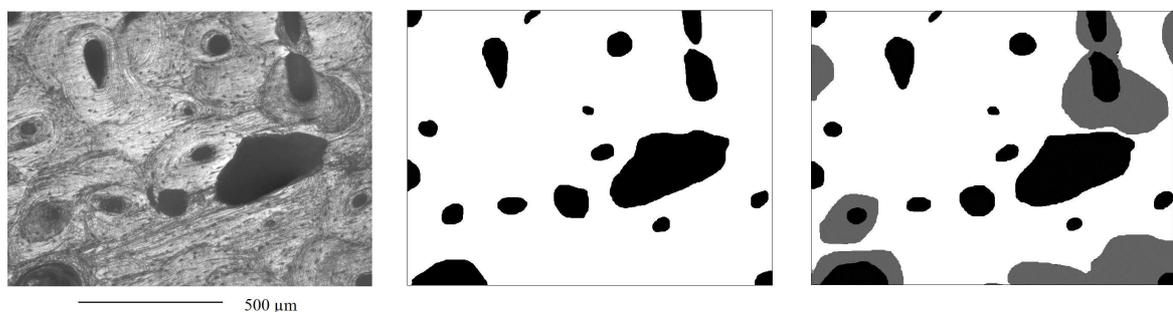


FIGURE 5.1 – a) Image optique d'un contrôle (C1) b) image binarisée de ce même échantillon avec les cavités en noir et le reste du tissu homogène en blanc c) image du même échantillon présentant trois matériaux, les cavités en noir, l'os interstitiel en blanc et l'os ostéonal en gris.

### 5.1.4 La corrélation d'images

#### 5.1.4.1 Le principe

Il existe plusieurs méthodes de mesures de champs (photoélasticimétrie, méthodes d'interférométrie. . .) dont les méthodes d'analyse d'images et parmi ces méthodes d'analyse d'images on trouve les méthodes de corrélation d'images numériques (*DIC= digital image correlation*), très utilisées en 2D mais étendues également depuis une dizaine d'années à la corrélation volumique sur la base d'images tomographiques 3D[172, 173]. Ces techniques de corrélation ont

été largement utilisées pour des applications variées telles que l'étude du durcissement des aciers[174] mais aussi dans le domaine de la biomécanique pour suivre la déformation des os par exemple[45, 163, 175]. Le principe général de la corrélation d'images (rappelé dans [176]) est de suivre la déformation d'un marquage, naturel ou non, solidaire de l'échantillon. Les images sont acquises à l'aide d'une ou plusieurs caméras CCD. Les déformations sont mesurées à partir d'un couple composé d'une image déformée et d'une image non déformée, dite de référence. La comparaison des états déformé et non déformé s'effectue ensuite via l'utilisation de fenêtres de corrélation. Ces fenêtres sont des petits domaines carrés (sur lesquels on va interpoler la déformation) définis dans l'image de référence et que l'on va apparier à un autre domaine dans l'image déformée. On obtient alors une transformation mécanique décrivant la déformation entre les deux états (fig. 5.2).

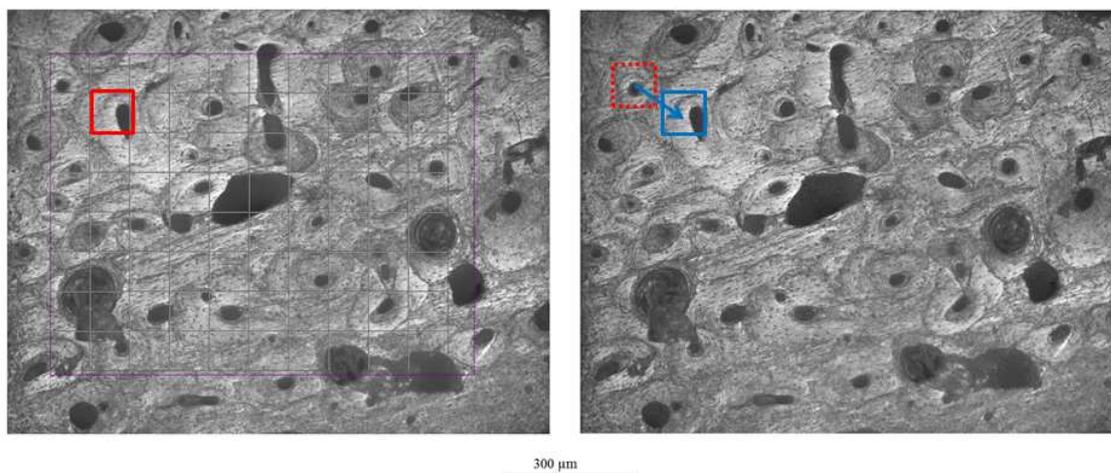


FIGURE 5.2 – Zone de corrélation en rose avec des fenêtres de corrélation de 128 x 128 pixels. Le centre de chaque fenêtre est pris comme point de référence de la fenêtre. La corrélation consiste à apparier une fenêtre de l'image de référence avec une fenêtre de l'image déformée, le gradient de la transformation vaut  $F = I + grad(u)$ .

Deux types de méthodes existent pour corréler ces domaines, les méthodes de corrélation directe et les méthodes itératives. Pour le premier type il s'agit de maximiser la corrélation pour différentes solutions de transformations (translation de solide rigide  $u,v$ ), i.e. dans un voisinage autour du point initial. Pour le second type, qui admet des transformations plus complexes, il s'agit de minimiser, par moindres carrés ou premier gradient, le coefficient de corrélation, défini par :

$$C = 1 - \frac{\sum_{\underline{X} \in D} (f(\underline{X}) - \bar{f}_D) \cdot (g(\Phi(\underline{X})) - \bar{g}_D)}{\sqrt{\sum_{\underline{X} \in D} (f(\underline{X}) - \bar{f}_D)^2} \cdot \sqrt{\sum_{\underline{X} \in D} (g(\Phi(\underline{X})) - \bar{g}_D)^2}} \quad (5.1)$$

où  $f$  et  $g$  sont les niveaux de gris pour les états de référence et déformé respectivement,

le trait représente la moyenne sur le domaine D de corrélation. Ce coefficient de corrélation permet d'évaluer la qualité de la corrélation, plus le critère est proche de zéro meilleur est l'appariement. Le choix de la méthode est alors un compromis entre rapidité et précision. Des méthodes d'interpolation du coefficient de corrélation ou des niveaux de gris sont utilisées pour obtenir une précision subpixel.

Comparer les niveaux de gris des fenêtres de corrélation nécessite donc que le gradient de niveau de gris puisse être considéré comme inchangé lors des étapes de chargement, il convient donc de ne pas fissurer le matériau et d'avoir une texture naturelle contrastée. L'analyse de la texture peut aider à choisir une taille de fenêtre adaptée pour avoir le meilleur compromis entre incertitude de mesure et résolution spatiale[177].

Dans cette étude la corrélation d'images a été réalisée à l'aide du logiciel Correla, développé par l'équipe PEM de l'Institut P' à Poitiers, qui possède de l'expertise dans ce domaine[172, 173, 176, 178]. Une semaine de formation dans cette équipe a permis de déterminer les paramètres adaptés au cas d'essais mécaniques sur du tissu osseux, lesquels ont ensuite été utilisés pour cette étude. Dans cette partie, la méthode de corrélation d'images se compose de deux étapes distinctes, la première consiste à déterminer des valeurs initiales correspondant à un mouvement d'ensemble dû au mouvement de la micromachine et non à la compression. Pour cette étape une seule fenêtre de corrélation la plus grande possible est utilisée, la méthode de corrélation était la méthode FFT (*Fast Fourier Transform*), à la fois rapide et suffisante pour un mouvement de solide rigide. La seconde étape est destinée à obtenir une carte des déplacements sur une zone de l'échantillon.

Pour calculer les déplacements locaux, nous avons utilisé des fenêtres de corrélation de 32 x 32 pixels, avec un espacement de 32 pixels. L'algorithme de minimisation utilisé était la méthode du premier gradient pour une transformation d'ordre 1. L'image de référence était prise pour une force appliquée nulle et le suivi des zones d'étude se faisait de manière temporelle. Il en résultait des mesures de déplacements tous les 32 pixels, soit un nombre total de points compris entre 624 et 2236 suivant la taille de la zone de corrélation. Pour la comparaison des quatre échantillons, nous nous sommes intéressés à un même état de contrainte moyen pour chacun d'entre eux, à savoir environ 45 MPa.

Pour déterminer les déplacements locaux requis dans la méthode d'analyse inverse, nous avons utilisé des fenêtres de 64 x 64 pixels espacées de 64 pixels, c'était la taille de fenêtre qui permettait d'obtenir les meilleurs résultats. Une taille de fenêtre plus petite n'était pas nécessaire puisque le plus important était ici la précision et non la résolution (peu d'inconnues à retrouver). La zone de corrélation faisait 1024 x 960 pixels. Pour calculer le module élastique nous avons pris un état de charge de 45 MPa.

Les déformations Lagrangiennes, telles qu'elles étaient implémentées dans le logiciel, étaient calculées à partir de 4 données de déplacement prises en « X » avec un pas donné (fig. 5.3).

Nous avons comparé les valeurs de déformations calculées par le logiciel avec les valeurs

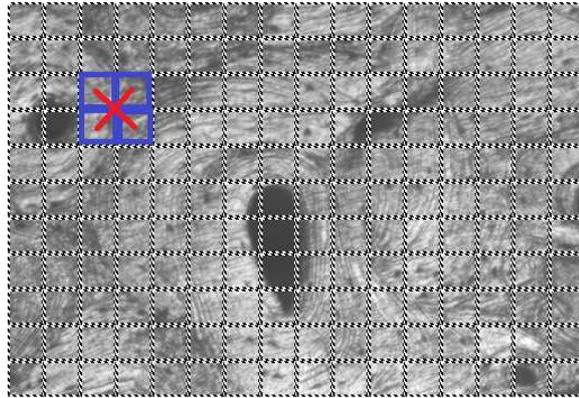


FIGURE 5.3 – Exemple de calcul de déformation en X à partir de 4 déplacements avec un pas de 1.

obtenues par un calcul des déformations infinitésimales (cf 5.1.5) implémenté dans Matlab qui utilise ce même champ de déplacements mesuré par Correla et nous n'avons pas constaté de différence.

#### 5.1.4.2 Validation et précision

La corrélation d'images a été validée en comparant, pour l'un des échantillons contrôles, la déformation globale obtenue à partir de 4 fenêtres de corrélation de 256 x 256 pixels (fig. 5.4) et la déformation macroscopique calculée à partir des mesures de l'extensomètre. Nous avons décidé de comparer plusieurs approches de mesures de déformations, pour cela nous avons comparé les déformations précédentes aux déformations mesurées directement sur les images avec imageJ à partir des deux mêmes images (de mors à mors et entre deux points contenus dans la zone de corrélation). Le calcul des déformations avec imageJ consistait à mesurer la distance entre deux points sur l'image de référence  $L^0$ , la même distance sur l'image déformée  $L$  et calculer la déformation  $(L^0 - L)/L^0$ . Les résultats sont présentés dans la table 5.1.

	Extensomètre	Corrélation d'images	Mesurée de mors à mors (ImageJ)	Mesurée entre deux points de la zone de corrélation (ImageJ)
Déformation macroscopique	0,0118	0,0044	0,0116	0,0044

TABLE 5.1 – Valeurs de déformations macroscopiques calculées par plusieurs méthodes.

On constate que les déformations obtenues par l'extensomètre et par corrélation d'images coïncident avec les valeurs mesurées directement sur les images. La différence entre les valeurs obtenues par extensomètre et corrélations d'images provient notamment de l'hétérogénéité de l'os.

La précision de la corrélation a été évaluée en déplaçant un échantillon suivant les trois directions, x, y et z (z étant la direction hors plan) car, comme le rappelle Nicolella[163], un

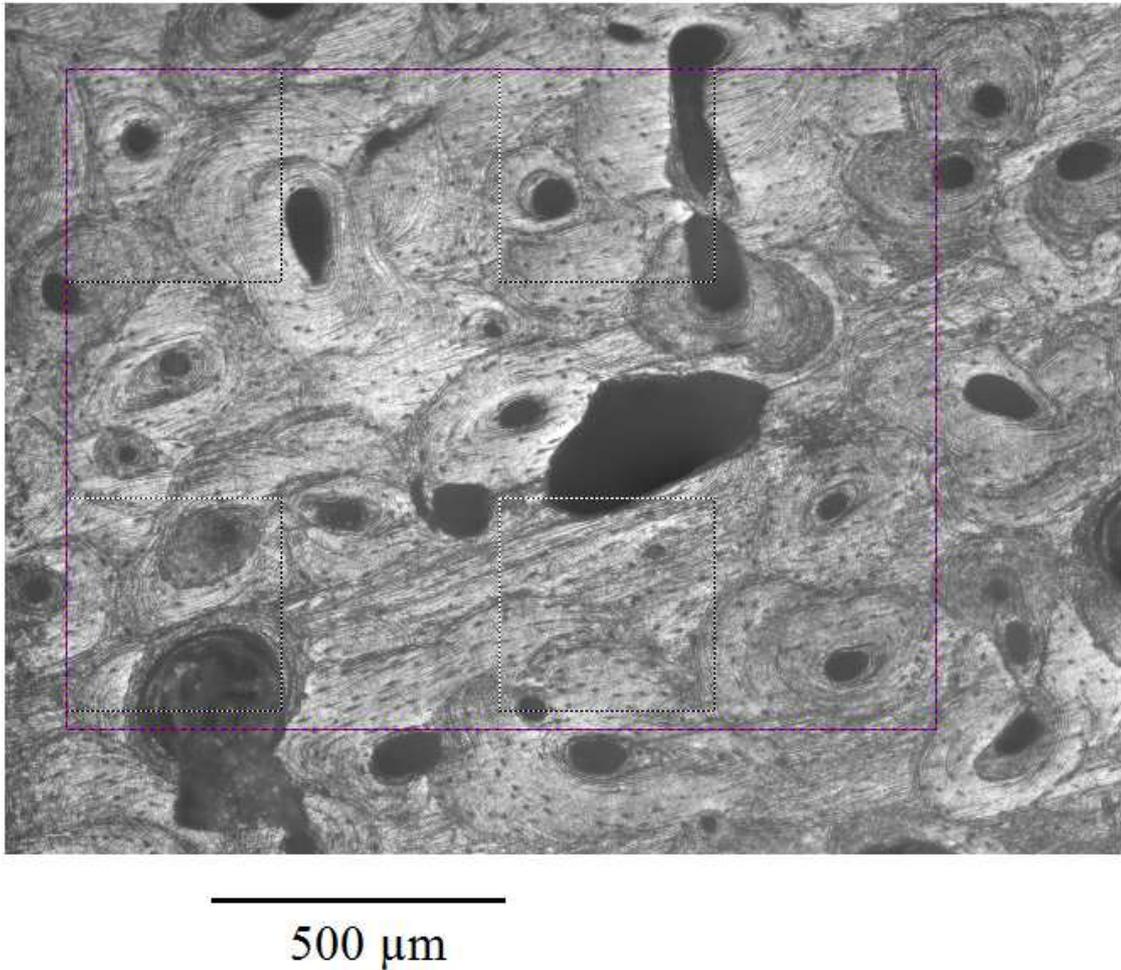


FIGURE 5.4 – Zone de corrélation (en rose) dans laquelle on distingue les 4 fenêtres de corrélations (en pointillés) utilisées pour calculer la déformation macroscopique de cette zone.

mouvement de solide rigide engendre des déformations locales nulles. Les déplacements mesurés par Correla étaient  $472\ \mu\text{m}$  et  $629\ \mu\text{m}$  selon  $x$  et  $y$  respectivement. Les déformations locales calculées étaient très faibles comme attendues. En effet, la moyenne des déformations suivant  $x$  et  $y$  étaient  $-4,75 \cdot 10^{-4}$  et  $2,52 \cdot 10^{-4}$  respectivement, soit une erreur inférieure à  $0,05\ \%$  dans ces deux directions. Les erreurs les plus importantes proviennent notamment de la présence de cavités.

Pour le mouvement hors plan imposé à l'échantillon contrôle, les déformations moyennes sont présentées en table 5.2.

Ainsi, les déformations dues à un mouvement hors plan restent très faibles, un déplacement hors plan inférieur à  $500\ \mu\text{m}$  résulte en une déformation parasite inférieure à  $0,07\ \%$ .

Déplacement hors plan ( $\mu\text{m}$ )	Déformation moyenne mesurée
20	$8,6 \cdot 10^{-6}$
50	$-1,1 \cdot 10^{-5}$
100	$2,2 \cdot 10^{-5}$
200	$1,2 \cdot 10^{-4}$
400	$4,7 \cdot 10^{-4}$
500	$6,8 \cdot 10^{-4}$

TABLE 5.2 – Déformations moyennes mesurées par corrélation d'images pour un échantillon contrôle dues à un mouvement hors plan imposé.

### 5.1.5 Calcul des déformations

Dans la loi de Hooke généralisée, la contrainte  $\sigma_{11}$  s'exprime en fonction des déformations  $\epsilon_{11}$  et  $\epsilon_{22}$  qu'il va donc falloir déterminer. Dans le cas général le tenseur des déformations de Green-Lagrange est de la forme :

$$\underline{\underline{E}} = \frac{1}{2}(\underline{\underline{F}}^T \cdot \underline{\underline{F}} - \underline{\underline{I}}) \quad (5.2)$$

Cependant, dans l'hypothèse des petites déformations on peut utiliser l'écriture des déformations infinitésimales :

$$\underline{\underline{\epsilon}} = \frac{1}{2}(\underline{\underline{F}}^T + \underline{\underline{F}}) - \underline{\underline{I}} \quad (5.3)$$

Où  $\underline{\underline{F}}$  désigne le tenseur gradient de la transformation et  $\underline{\underline{I}}$  la matrice identité.

Seules les composantes planes sont connues en toute rigueur et ce sont les seules auxquelles nous allons nous intéresser dans cette étude. Cette formule revient donc à :

$$\epsilon_{11} = F_{11} - 1 \quad (5.4)$$

$$\epsilon_{22} = F_{22} - 1 \quad (5.5)$$

$$\epsilon_{12} = \epsilon_{21} = \frac{1}{2}(F_{12} + F_{21}) \quad (5.6)$$

Les composantes planes du tenseur gradient de la transformation se déterminent de la manière suivante :

$$\underline{\underline{F}} = \frac{1}{2S} \sum_{i=1}^N (\underline{x}^i + \underline{x}^{i+1}) \cdot \underline{n}_i \quad (5.7)$$

Avec  $\underline{x}$  le vecteur position et  $\underline{n}$  la normale sortante.

## 5.1.6 La méthode des Champs Virtuels

### 5.1.6.1 Mise en œuvre de la méthode

La méthode des champs virtuels a été imaginée par Pr. Grédiac et ses collaborateurs à la fin des années 80. Le principe général de la méthode des champs virtuels est rappelé dans les articles traitant de ce sujet [164–167, 171, 179, 180] et un livre qui lui est consacré [181]. De manière simple, il s’agit de faire un choix de paramètres de comportement, de calculer les contraintes et de vérifier à l’aide du champ mesuré que ces contraintes respectent l’équilibre. Nous avons utilisé une méthode d’analyse inverse qui revient à un choix simple de déplacement virtuel et de loi de comportement, cette équivalence avec la méthode des champs virtuels est démontrée en annexe A. Le principe de la méthode des champs virtuels se trouve également en annexe, ici nous nous attacherons plutôt à expliquer pratiquement la mise en œuvre de la méthode.

Dans cette étude nous avons écrit l’équilibre sur des bandes définissant un ensemble de sous-domaines dans l’échantillon, subissant la contribution d’efforts intérieurs (contraintes) et extérieurs dont la résultante est mesurée (fig. 5.5).

Les efforts extérieurs sont dus à la force de compression dont seule la résultante  $F$  est connue. Pour chaque bande on a donc l’équation d’équilibre suivante :

$$\int \underline{\underline{\sigma}} \cdot \underline{n} \, dS = \int \underline{T} \, dS = Fd \quad (5.8)$$

avec  $\underline{\underline{\sigma}}$  le tenseur contrainte,  $\underline{n}$  la normale sortante,  $\underline{T}$  le vecteur contrainte,  $F$  la résultante de la force et  $d$  la largeur de la bande. L’intégrale se fait sur la surface  $S$  de chaque sous-domaine.

On ne garde que les composantes suivant la direction de chargement  $x$  :

$$e \int \sigma_{xx} \, dS = Fd \quad (5.9)$$

avec  $e$  l’épaisseur de la bande.

Reste à approximer cette intégrale par une somme discrète, pour cela il suffit de considérer des petits éléments où la déformation est homogène (dans notre cas il s’agit des fenêtres de corrélation) et de faire une somme discrète sur ces éléments. L’équation 5.9 devient finalement :

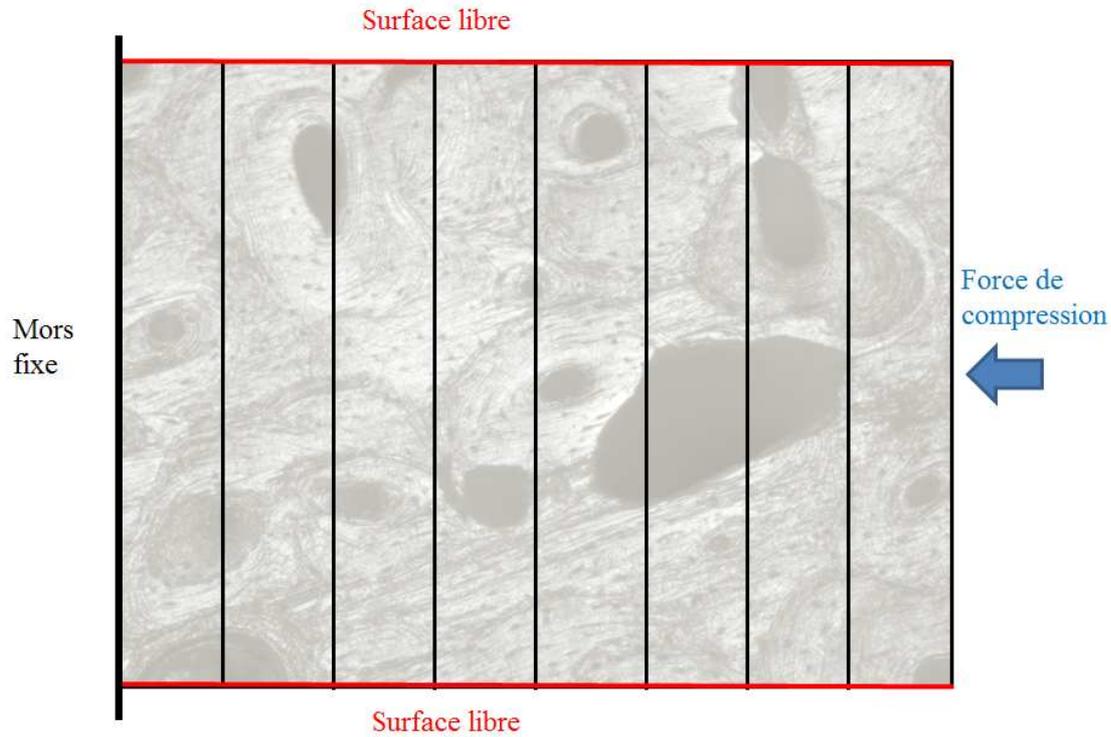


FIGURE 5.5 – Illustration de la partition de l'échantillon sous forme de bandes.

$$eS \sum_N \sigma_{xx} = Fl \quad (5.10)$$

La loi de comportement utilisée est la loi de Hooke généralisée, l'hypothèse de contraintes planes a été choisie dans l'étape de validation de la méthode des champs virtuels dans des cas simples simulés de matériaux hétérogènes. Elle permet d'écrire les formules suivantes :

$$\sigma_{xx} = \frac{E}{1 - \nu^2} (\epsilon_{xx} + \nu\epsilon_{yy}) \quad (5.11)$$

$$\sigma_{yy} = \frac{E}{1 - \nu^2} (\epsilon_{yy} + \nu\epsilon_{xx}) \quad (5.12)$$

$$\sigma_{zz} = 0 \quad (5.13)$$

On a donc finalement l'équation 5.14 suivante :

$$eS \left( \sum_{pixels} (\epsilon_{xx} + \nu\epsilon_{yy}) \frac{1}{1 - \nu^2} \right) E = Fd \quad (5.14)$$

C'est cette dernière équation 5.14 qui est codé sous Matlab<sup>®</sup>, afin de remonter aux modules

d'élasticité. En effet, en écrivant cette équation pour  $N$  bandes, on obtiendra un système de  $N$  équations de la forme  $\underline{A} \cdot \underline{E} = \underline{B}$  où  $\underline{A}$  est une matrice fonction des déformations mesurées par la DIC (et aussi du coefficient de Poisson choisi),  $\underline{B}$  est un vecteur fonction de la force  $F$  mesurée (et des dimensions de l'échantillon : largeur, longueur, épaisseur), pour finir  $\underline{E}$  est le vecteur composé des modules élastiques inconnus qui sont recherchés. En inversant ce système le vecteur des modules élastiques est déterminé. Le coefficient de Poisson est choisi égal à 0,3, cette valeur est fréquemment utilisée lorsque l'on travaille avec de l'os cortical, des études ont montré la pertinence de cette valeur[10].

De manière pratique, la routine Matlab est divisée en neuf étapes présentées en figure 5.6.

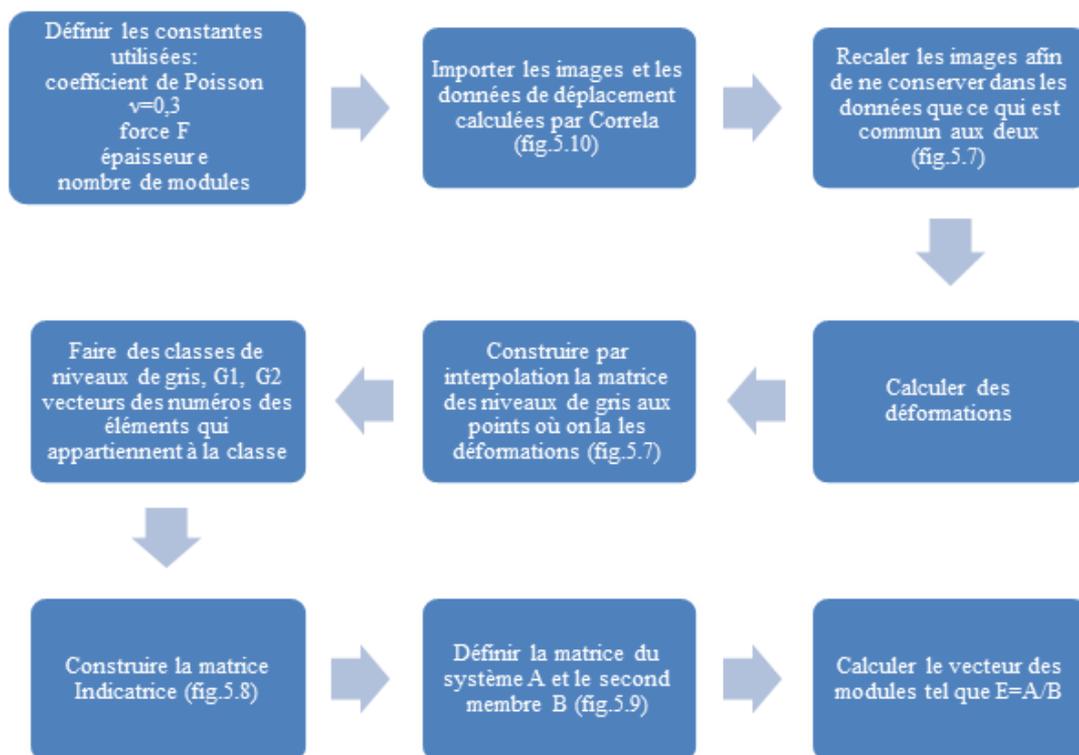


FIGURE 5.6 – Schéma des étapes du code de la méthode inverse (méthode des champs virtuels) sous Matlab<sup>®</sup>.

### 5.1.6.2 Validation de la méthode

La méthode présentée ci-dessus a, au préalable, été validée sur des cas simples simulés par éléments finis afin de vérifier que la méthode d'analyse inverse choisie pouvait retrouver des distributions hétérogènes de modules élastiques. Ainsi, trois modèles rectangulaires 3D hétérogènes ont été construits et maillés avec des éléments C3D8R puis soumis à un essai de compression uniaxiale à l'aide du logiciel Abaqus/CAE 6.9 (fig. 5.10). Pour cela on a bloqué suivant  $x$  tous les nœuds du côté droit et on a imposé  $U1=0,01$  aux nœuds du côté gauche.

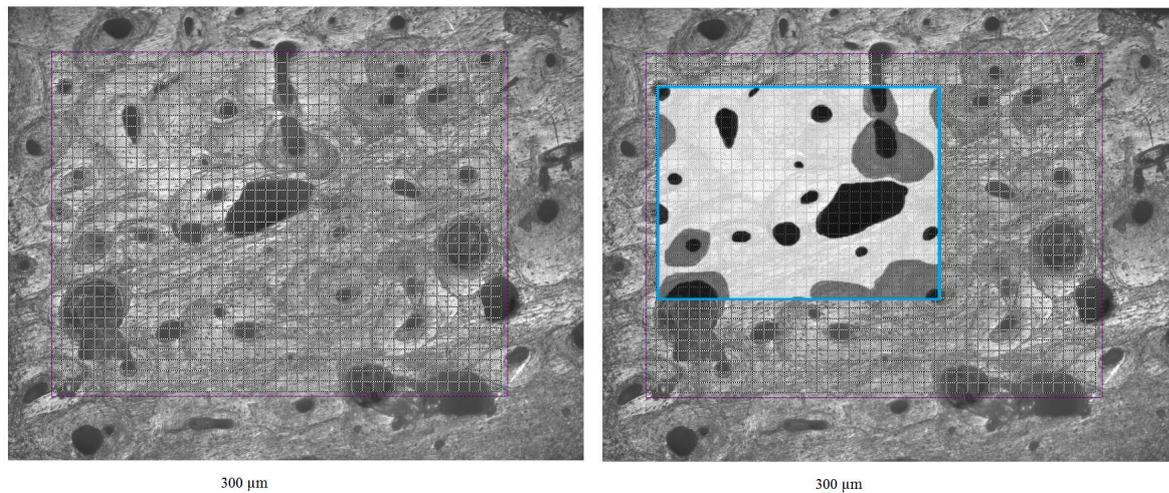


FIGURE 5.7 – A) Zone de corrélation en rose avec les fenêtres de corrélation de 32 x 32 pixels, le nombre de colonnes est NX et le nombre de lignes est NY. Le déplacement est donné au milieu de chaque fenêtre et les déformations sont calculées au milieu de quatre fenêtres. B) En bleu cadre commun aux données Correla et image en niveaux de gris. Il faudra interpoler les niveaux de gris pour avoir des valeurs sur chaque intersection du quadrillage où on a des données de déformation. Dans la zone commune, il y a en blanc la zone 1 avec un même module E1, en gris la zone 2 avec un module E2 et en noir la zone 3 avec un module E3.

	Zone 1	Zone 2
	↓	↓
Elément 1 →	0	1
Elément 2 →	0	1
Elément 3 →	0	1
	1	0
	1	0
	0	1
	0	1
	.	.
	.	.
	.	.
	.	.

FIGURE 5.8 – Exemple de matrice Indicatrice construite en mettant 1 quand l'élément est dans la zone de même module.

On a également bloqué deux nœuds de chaque côté suivant y et un nœud de la face arrière suivant z.

Le premier modèle était constitué de cinq matériaux de modules différents et 64 éléments, le second modèle comptait 10 modules et 64 éléments (fig. 5.11) et le dernier modèle présentait 14 modules et 4880 éléments.

Les résultats sont présentés dans la partie qui suit sous forme de cartes de déplacements et de cartes de déformations tracées avec le logiciel Matlab<sup>®</sup>. Sont présentés ensuite les résultats des calculs des modules élastiques via la méthode d'analyse inverse.

$$\begin{array}{c}
 \text{Zone 1} \quad \text{Zone 2} \\
 \downarrow \quad \quad \downarrow \\
 \begin{array}{l}
 \text{Colonne 1} \rightarrow \\
 \text{Colonne 2} \rightarrow \\
 \text{Colonne 3} \rightarrow
 \end{array}
 \begin{bmatrix}
 0 & \alpha \\
 0 & \alpha \\
 \alpha & \alpha \\
 \alpha & \alpha \\
 \alpha & 0 \\
 \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 E1 \\
 E2
 \end{bmatrix}
 =
 \begin{bmatrix}
 F d / e \\
 F d / e \\
 F d / e \\
 \cdot \\
 \cdot \\
 \cdot \\
 \cdot
 \end{bmatrix}
 \end{array}$$

$$\text{avec } \alpha = \frac{(\epsilon_{xx} + \nu \epsilon_{yy})}{1 - \nu^2} S$$

FIGURE 5.9 – Système  $AE=B$  où zone 1 et zone 2 sont les zones de même module et les colonnes sont les colonnes de la grille des fenêtres de corrélation. Le nombre de colonne est  $NX-1$  puisqu'il y a une donnée de moins en déformation qu'en déplacement.  $F$  est la force,  $d$  le côté de l'élément,  $e$  l'épaisseur prise égale à 0,01 mm,  $S$  la surface de chaque élément et  $\nu$  le coefficient de Poisson pris égal à 0,3.

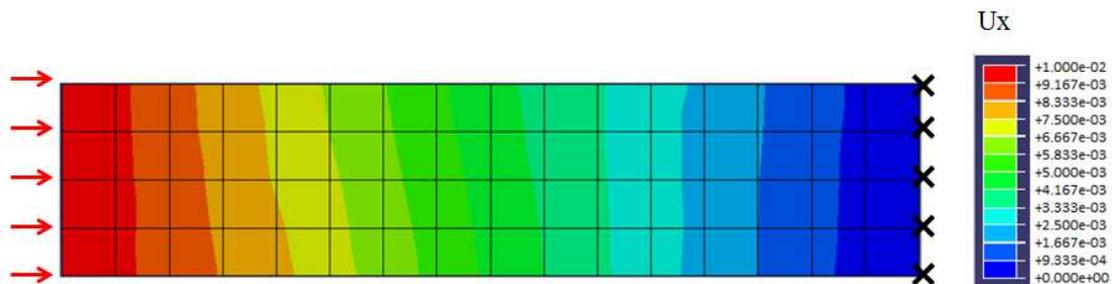


FIGURE 5.10 – Conditions limites et champ de déplacement pour la simulation de compression uniaxiale du modèle à 64 éléments.

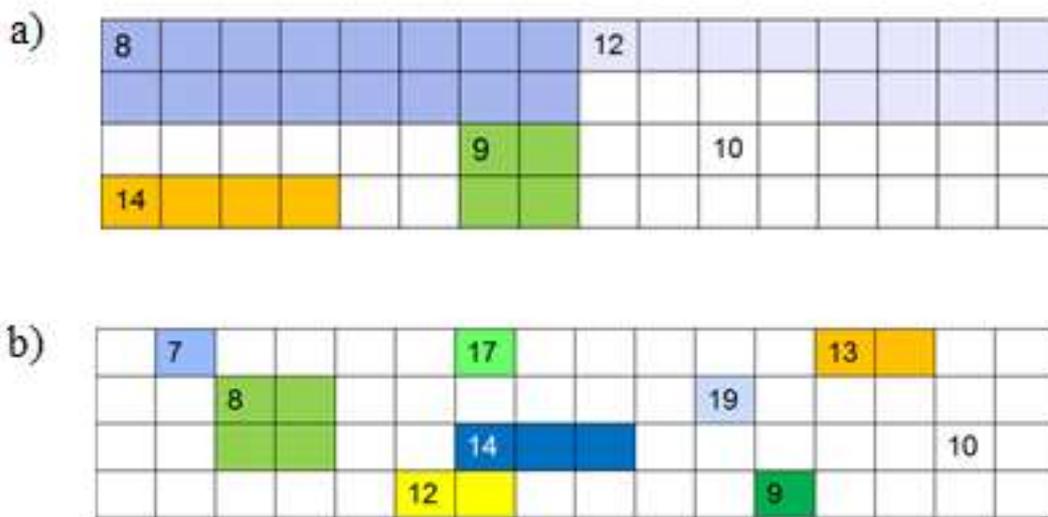


FIGURE 5.11 – a) Modèle de matériau hétérogène à 5 modules b) modèle de matériau hétérogène à 10 modules disposés de façon à imiter la microstructure haversienne des os. Les valeurs inscrites sont les valeurs de module imposées.

## 5.2 Résultats

### 5.2.1 Distribution des déformations

La corrélation d'images à partir d'une image de référence et d'une image prise durant la compression a permis de déterminer les déplacements et déformations locaux, lesquels sont tracés en figures 5.12 à 5.18 pour quatre échantillons, à savoir deux échantillons contrôles et deux échantillons OI, avec ou non application d'un masque pour cacher les résultats au niveau des cavités. Les déformations tracées correspondent aux déformations calculées par le logiciel Correla (nous avons au préalable vérifié, de manière qualitative, qu'elles correspondaient à celles calculées via Matlab®).

La figure 5.18 montre que les déplacements subis par l'échantillon au cours de l'essai mécanique sont cohérents avec une sollicitation de compression. Les échantillons n'étant pas fixés lors de l'essai, il était difficile d'appliquer de la compression strictement uniaxiale.

Les figures 5.12 à 5.17, qui présentent les cartes de déformations calculées par Correla, mettent en évidence la différence de comportement des deux types d'os face à une contrainte mécanique équivalente en intensité. En effet, pour un même niveau de contrainte (à savoir 45 MPa), les déformations locales sont plus élevées chez l'OI, particulièrement autour des cavités. De plus, l'application d'un masque confirme que les valeurs de déformations trouvées dans les cavités par corrélation d'images sont aberrantes.

Les valeurs de déformation sont majoritairement négatives ce qui est cohérent avec de la

## Déformation selon la direction X

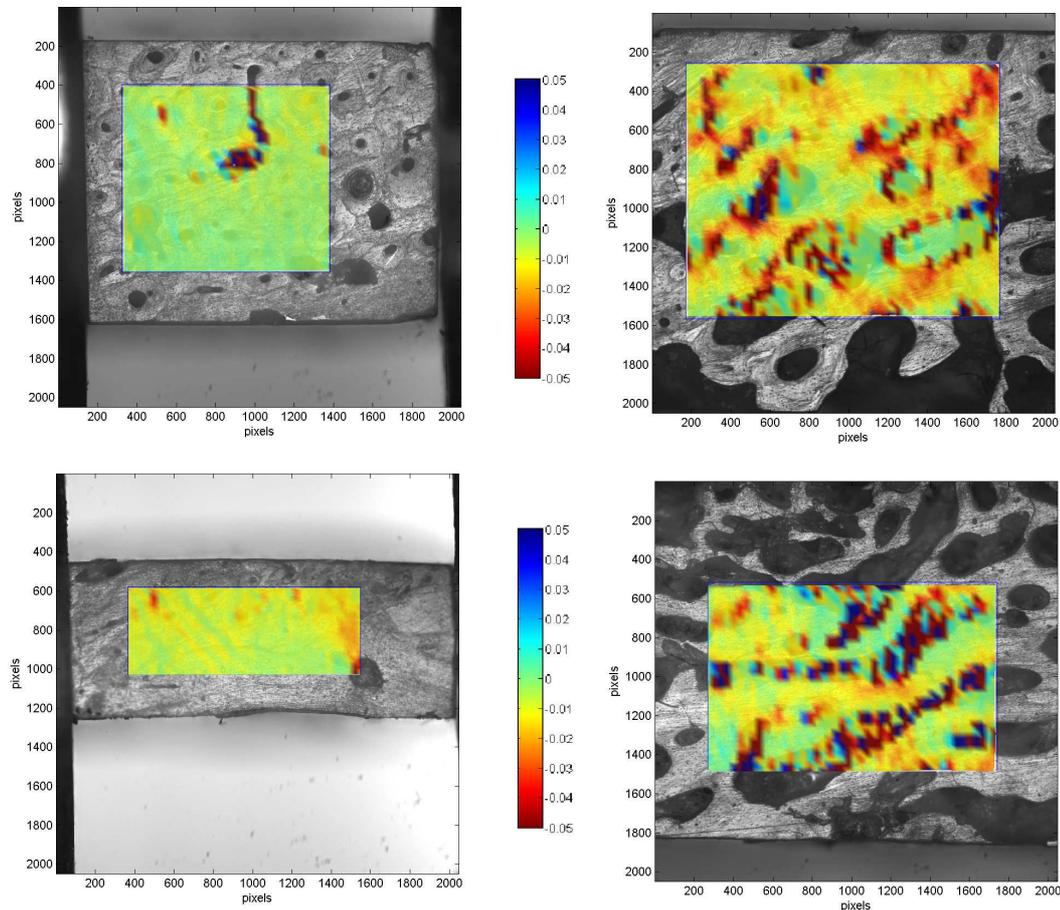


FIGURE 5.12 – Cartes des déformations  $\epsilon_{x,x}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d).

compression. Les valeurs pour les contrôles se situent majoritairement dans l'intervalle 0-1 % tandis que pour les OI les valeurs de déformation semblent se situer plutôt dans l'intervalle 1-2 %, ce qui indique que pour un même état de contrainte les OI se déforment plus que les contrôles.

Afin de savoir si la corrélation était satisfaisante, une analyse du critère de corrélation a été effectuée (fig. 5.19 et 5.20). Ce critère, compris entre 0 et 1, indique une bonne corrélation quand il est proche de 0. Nous avons choisi comme seuil 0,1, seuil en dessous duquel la corrélation est considérée comme satisfaisante.

On voit que le critère de corrélation est majoritairement inférieur à 0,1 pour ces deux échantillons ce qui indique une bonne corrélation générale, qu'il y ait beaucoup de grosses cavités ou que l'échantillon soit moins poreux. On a remarqué que les valeurs du critère étaient particulièrement élevées pour des points correspondant à des cavités, en effet la corrélation ne

### Déformation selon la direction X

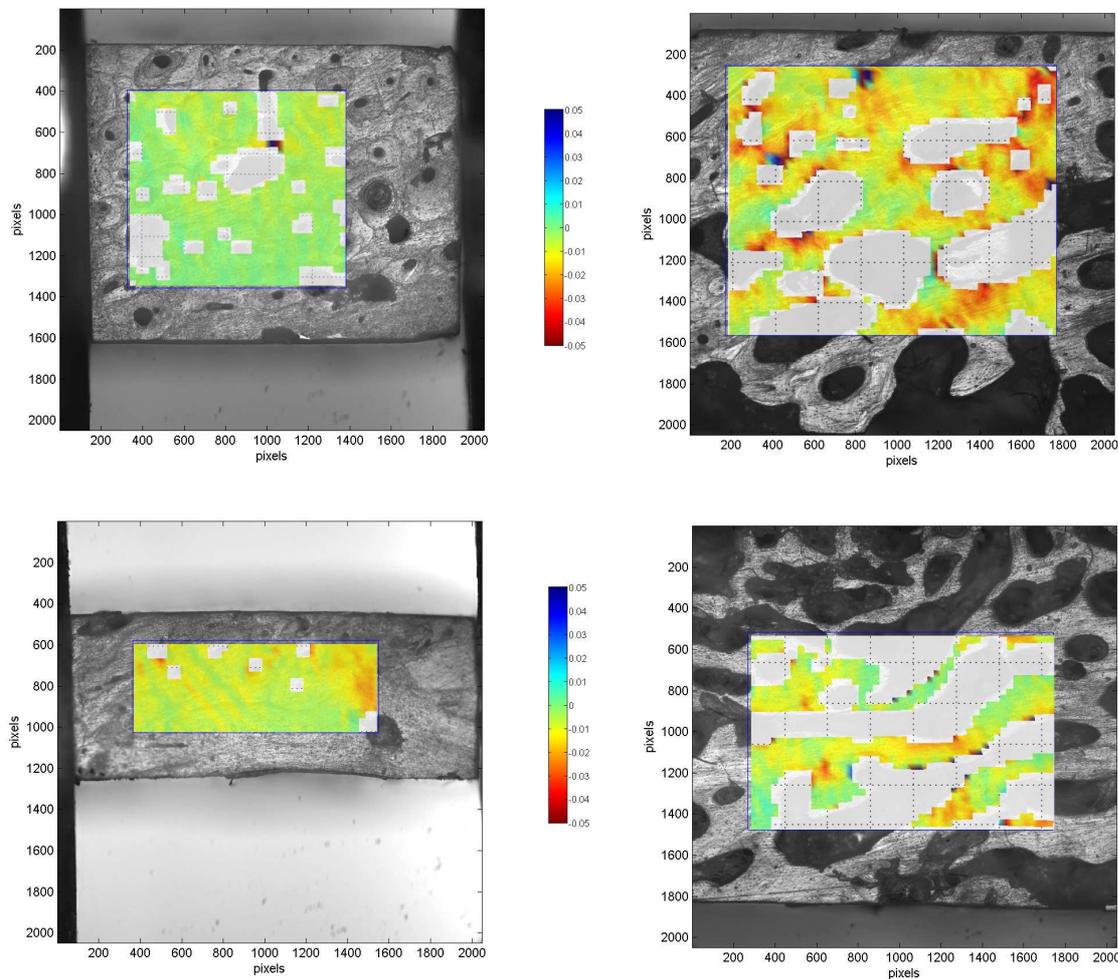


FIGURE 5.13 – Cartes des déformations  $\epsilon_{xx}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque.

peut se faire que quand il y a un gradient de niveaux de gris dans la fenêtre de corrélation, pour qu'il soit capable de situer le centre de la fenêtre. Ces zones peuvent également correspondre à des zones où les déformations étaient aberrantes (fig. 5.12, 5.14 et 5.16).

#### 5.2.2 Validation de la méthode d'analyse inverse

La méthode d'analyse inverse a été validée sur trois modèles simples hétérogènes simulés comportant 5, 10 et 14 modules. Les résultats des simulations sont présentés dans les tables 5.3 à 5.5 et la figure 5.21 suivantes.

Les modules trouvés par la méthode d'analyse inverse sont très proches des modules im-

## Déformation selon la direction Y

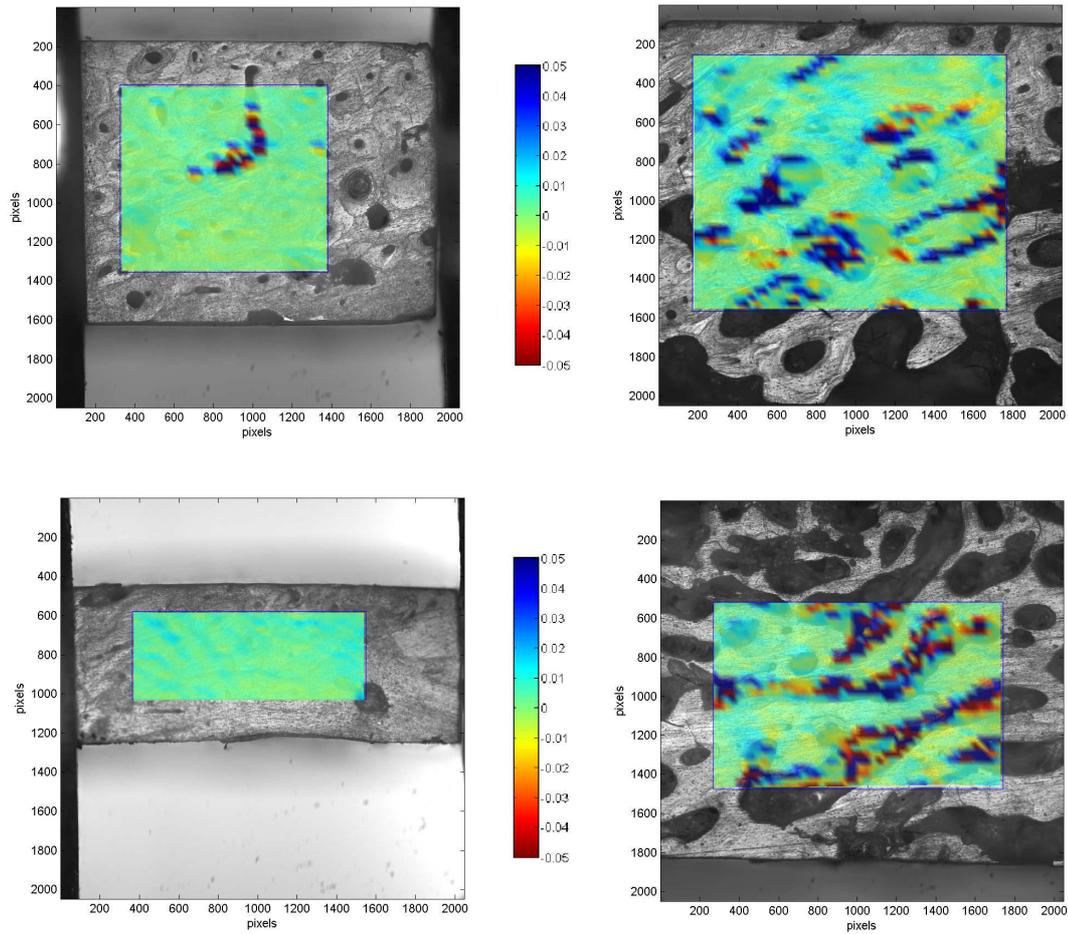


FIGURE 5.14 – Cartes des déformations  $\epsilon_{yy}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d).

E trouvé par analyse inverse	E imposé	Erreur relative (%)
14,0	14	-0,022
9,0	9	-0,001
10,0	10	-0,003
8,0	8	0,018
12,0	12	-0,003

TABLE 5.3 – Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 5 modules.

### Déformation selon la direction Y

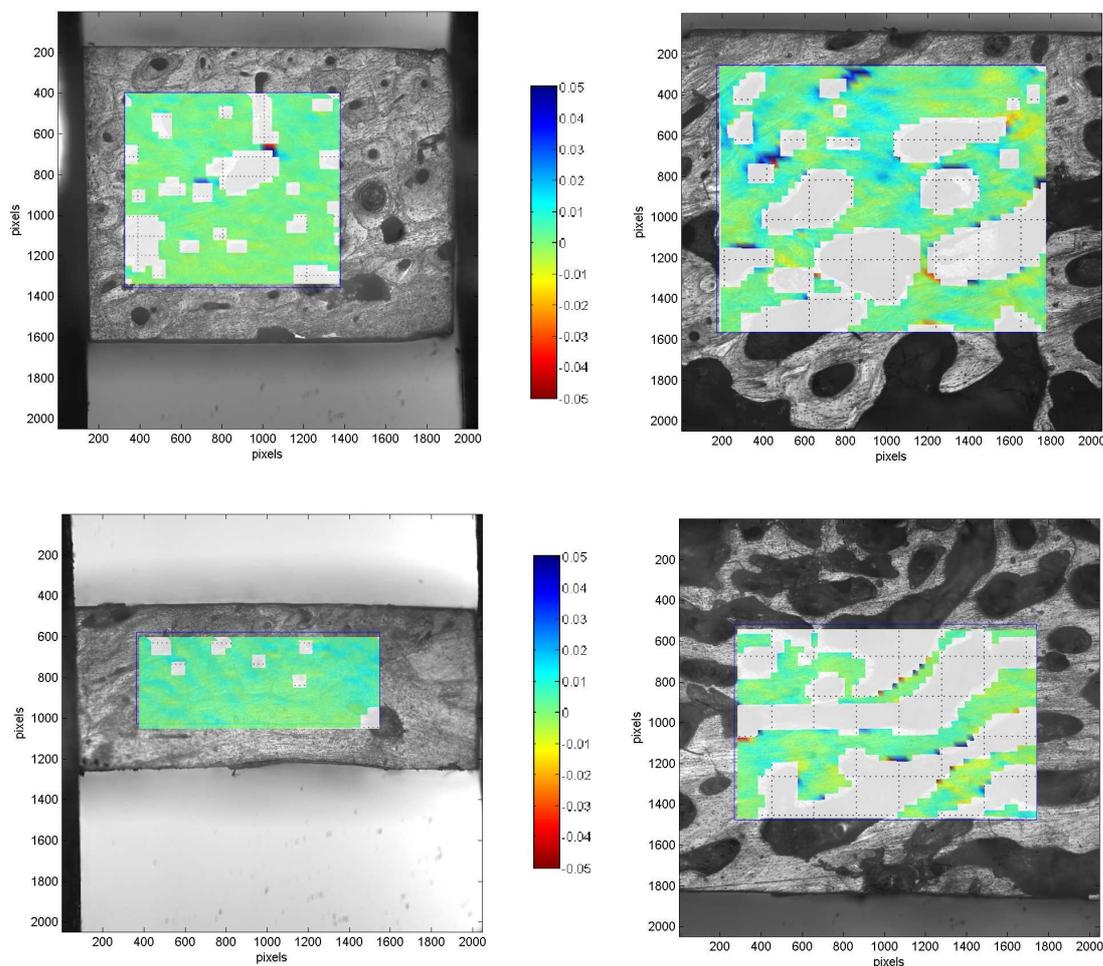


FIGURE 5.15 – Cartes des déformations  $\epsilon_{yy}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque.

posés, on a même pu vérifier qu'on était capable de retrouver un module quasi nul, puisqu'on a refait les calculs avec le dernier modèle en remplaçant 15 GPa par 0,000001GPa et la valeur identifiée était de 0,78 MPa, i.e. un module très faible devant les autres. On peut donc en conclure que la méthode permet de retrouver l'hétérogénéité de matériaux hétérogènes simulant l'os.

### 5.2.3 Détermination des modules élastiques locaux

La méthode des champs virtuels a été validée une première fois sur des matériaux simulés hétérogènes, nous avons voulu la valider sur nos images réelles en considérant, dans un pre-

## Déformation de cisaillement

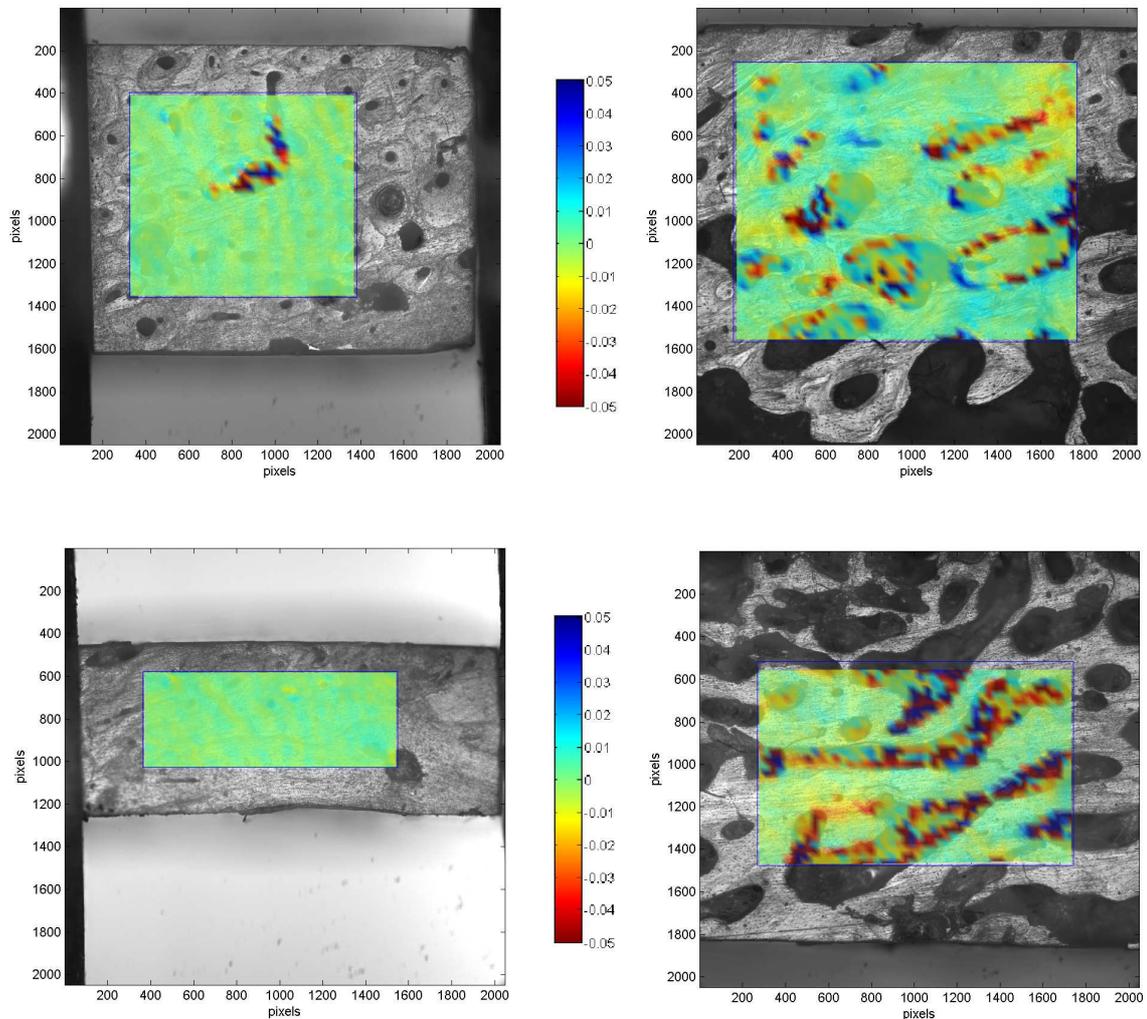


FIGURE 5.16 – Cartes des déformations  $\epsilon_{xy}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d).

mier temps, le matériau comme entièrement homogène sans exclure les cavités. Nous avons ensuite considéré les cavités comme un second matériau. Puis finalement, nous avons distingué également os interstitiel et os ostéonal.

Pour le matériau complètement homogène sans porosité, l'utilisation de la méthode des champs virtuels a donné un module élastique de 4,68 GPa. Ce module est à comparer avec le module calculé comme la pente de la partie linéaire de la charge, à savoir 3,02 GPa (fig. 5.22). Le module mesuré sur la courbe contrainte déformation est plus faible ce qui est cohérent avec le fait que la déformation mesurée soit plus grande.

### Déformation de cisaillement

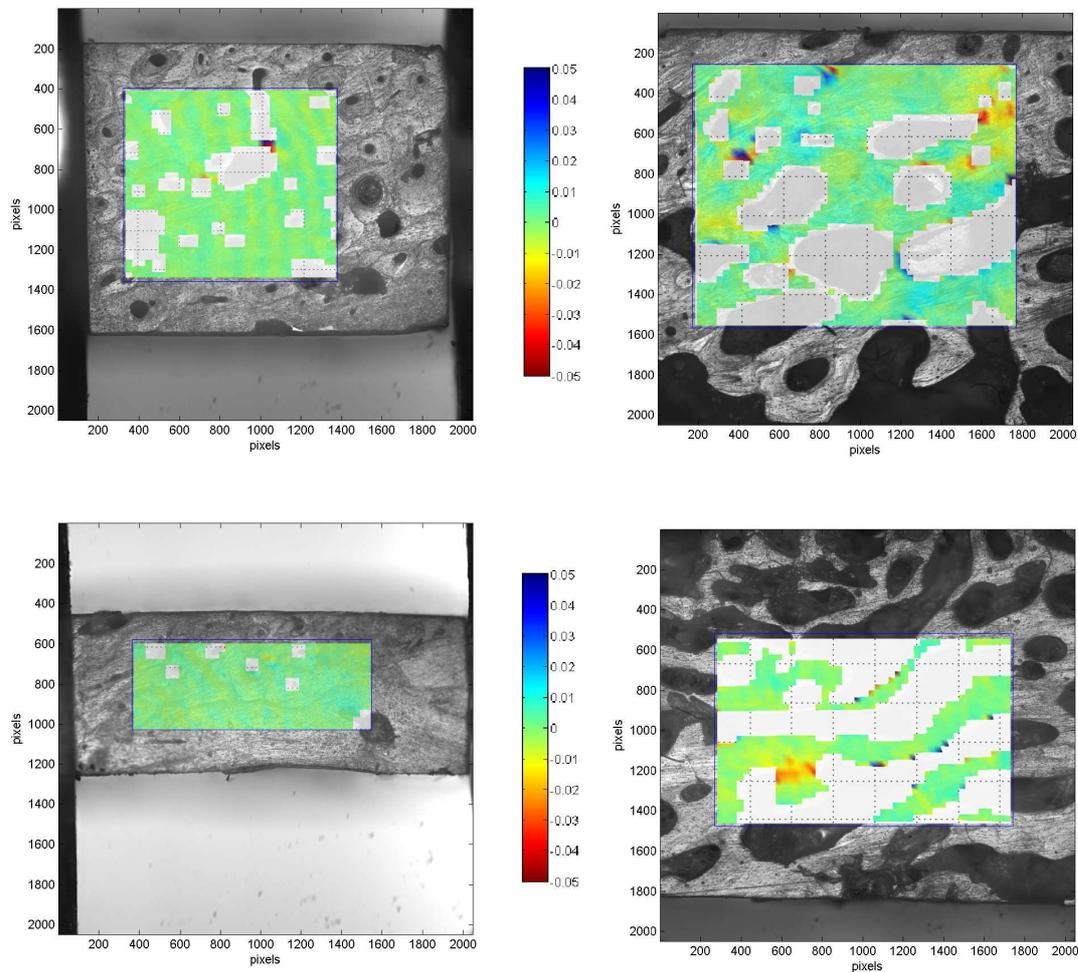


FIGURE 5.17 – Cartes des déformations  $\epsilon_{xy}$  pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d) avec application d'un masque.

Pour un matériau homogène mais avec porosité, les deux modules obtenus étaient respectivement de 9,47 GPa et 0,43 GPa pour l'os et la porosité. Même s'il était faible, le module élastique pour la porosité n'étant pas nul, le calcul a été refait en imposant ce module nul, le module du tissu osseux était alors 9,70 GPa.

Pour le matériau à 3 modules, la méthode d'analyse inverse a donné les valeurs de 9,64 GPa, 6,66 GPa et 0,74 GPa pour l'os interstitiel, l'os ostéonal et la porosité, respectivement. Ici encore, le module représentant la porosité était faible devant les deux autres et pouvait être considéré comme nul. En réitérant le calcul en le considérant nul, les valeurs de modules obtenues étaient alors 9,90 GPa et 7,65 GPa pour l'os interstitiel et l'os ostéonal respectivement.

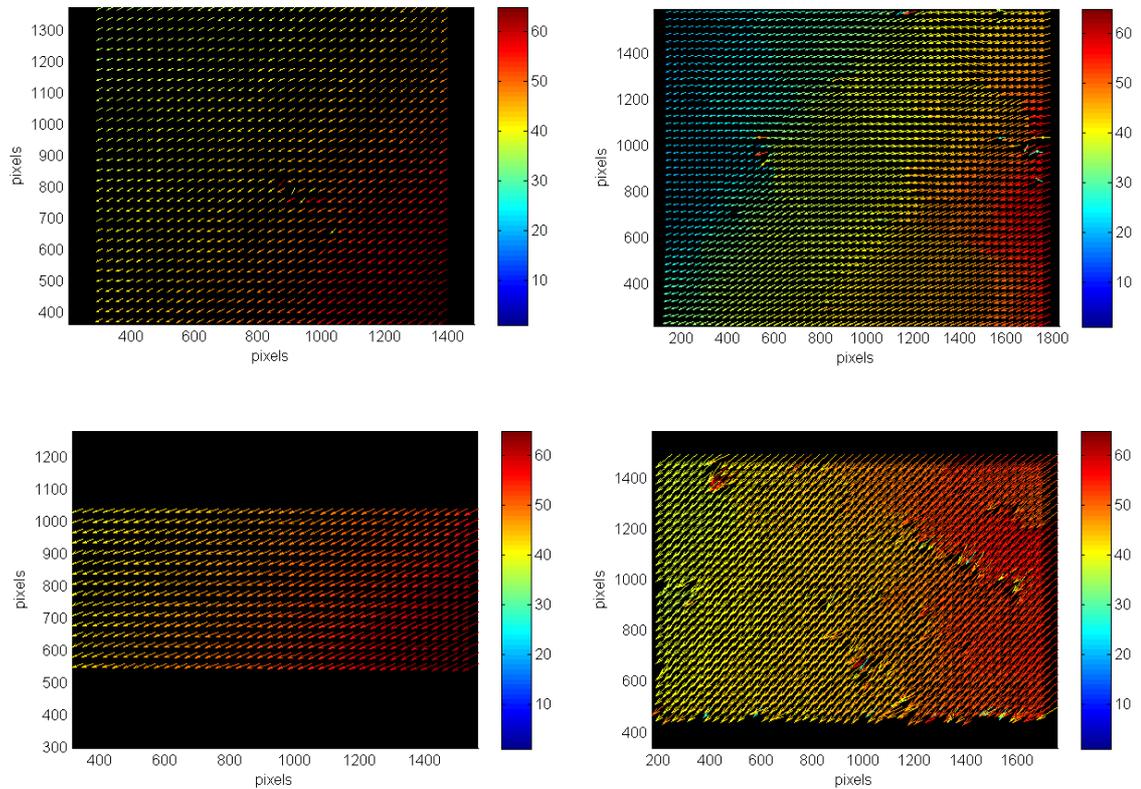


FIGURE 5.18 – Cartes des trajectoires (déplacement entre l'état initial et l'état de charge choisi) pour deux échantillons sains (a et c) et deux échantillons OI (b et d). La flèche donne la direction du déplacement et la couleur son intensité (norme du déplacement).

<b>E trouvé par analyse inverse</b>	<b>E imposé</b>	<b>Erreur relative (%)</b>
7,0	7	0,232
8,0	8	0,028
16,8	17	-1,352
14,0	14	0,011
12,1	12	0,640
14,9	15	-0,615
9,1	9	0,618
12,9	13	-0,427
11,1	11	0,731
10,0	10	0,000

TABLE 5.4 – Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 10 modules.

### 5.3 Discussion et conclusions

Dans cette étude, la corrélation d'images a été utilisée dans un premier temps pour déterminer les déplacements et déformations locaux puis tracer les cartes correspondantes pour des échantillons sains et des échantillons pathologiques. Dans un second temps, cette technique de

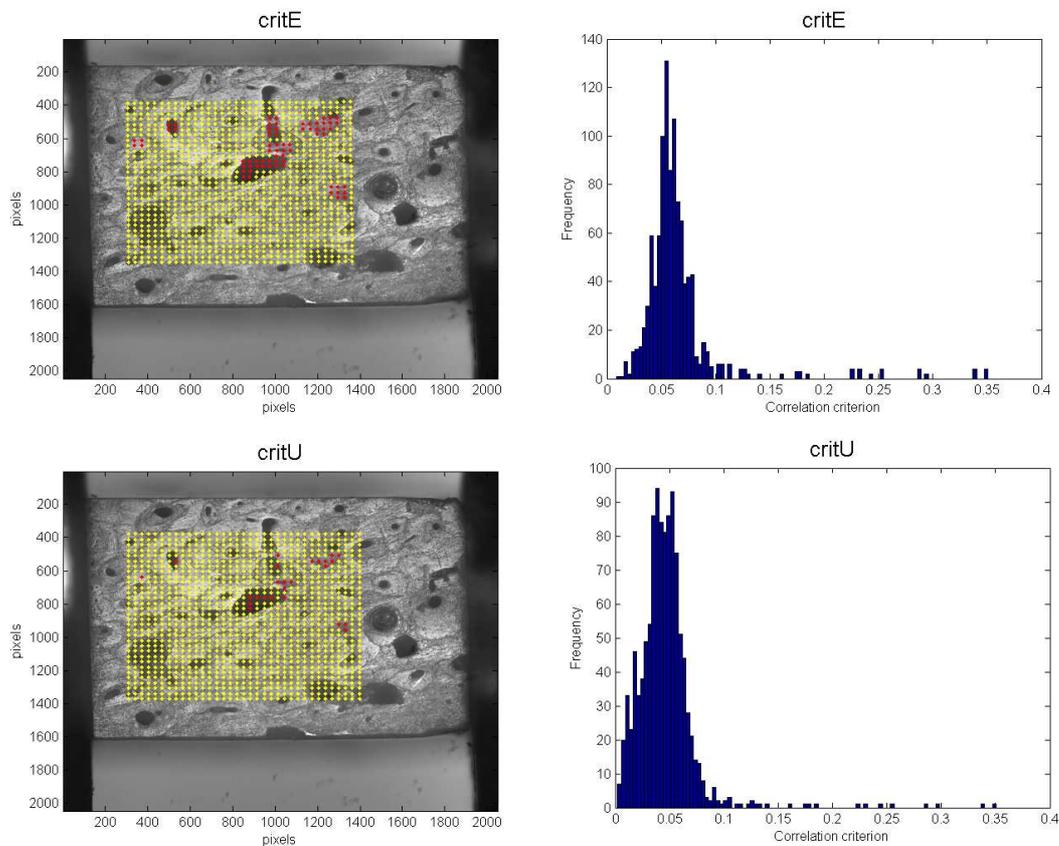


FIGURE 5.19 – Critère de corrélation pour l'échantillon contrôle C1 calculé lors de la mesure des déplacements (c et d) et des déformations (a et b). Il est tracé sous forme d'histogramme (b et d) ou en points de couleurs jaunes et rouges (a et c) sachant qu'un point jaune correspond à un critère inférieur à 0,1.

E trouvé par analyse inverse	E imposé	Erreur relative (%)
7,0	7	-0,111
7,9	8	-0,992
9,0	9	-0,171
11,0	11	0,081
11,5	11,5	-0,110
12,0	12	0,251
12,3	12,3	-0,113
13,0	13	-0,110
14,0	14	-0,099
15,0	15	0,020
16,0	16	-0,196
16,5	16,5	-0,149
16,9	17	-0,497
10,0	10	0,030

TABLE 5.5 – Valeurs de modules trouvées par analyse inverse et comparées aux valeurs imposées dans le modèle à 14 modules.

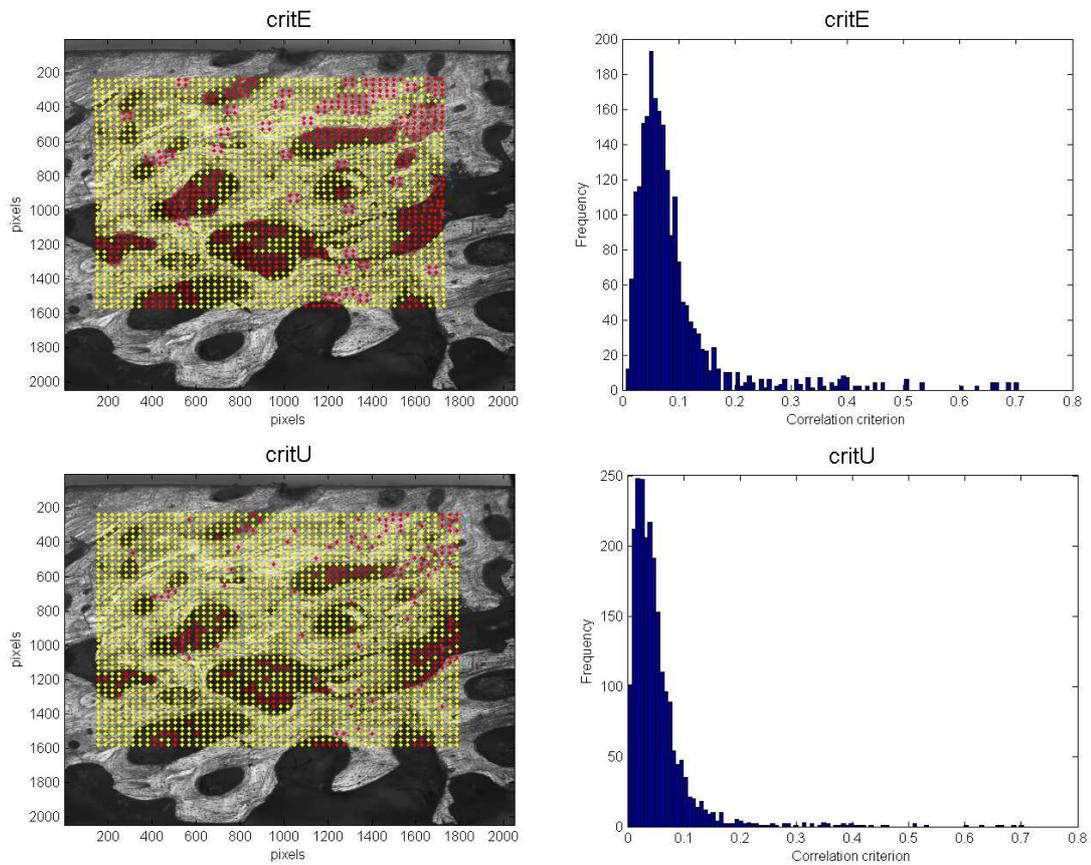


FIGURE 5.20 – Critère de corrélation pour l'échantillon OI 6 calculé lors de la mesure des déplacements (c et d) et des déformations (a et b). Il est tracé sous forme d'histogramme (b et d) ou en points de couleurs jaunes et rouges (a et c) sachant qu'un point jaune correspond à un critère inférieur à 0,1.

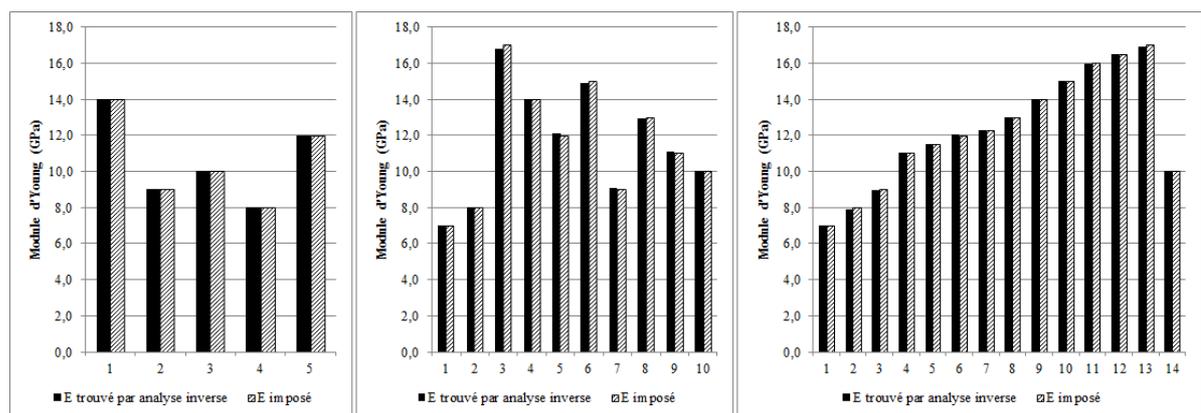


FIGURE 5.21 – Histogrammes présentant les valeurs de modules trouvés par analyse inverse et imposés pour a) le modèle à cinq modules b) le modèle à dix modules et c) le modèle à quatorze modules.

détermination du champ de déplacement a également été couplée avec une méthode d'analyse inverse équivalente à la méthode des champs virtuels sur un échantillon d'os cortical humain d'enfant sain afin de déterminer les modules moyens pour les zones interstitielle et ostéonale.

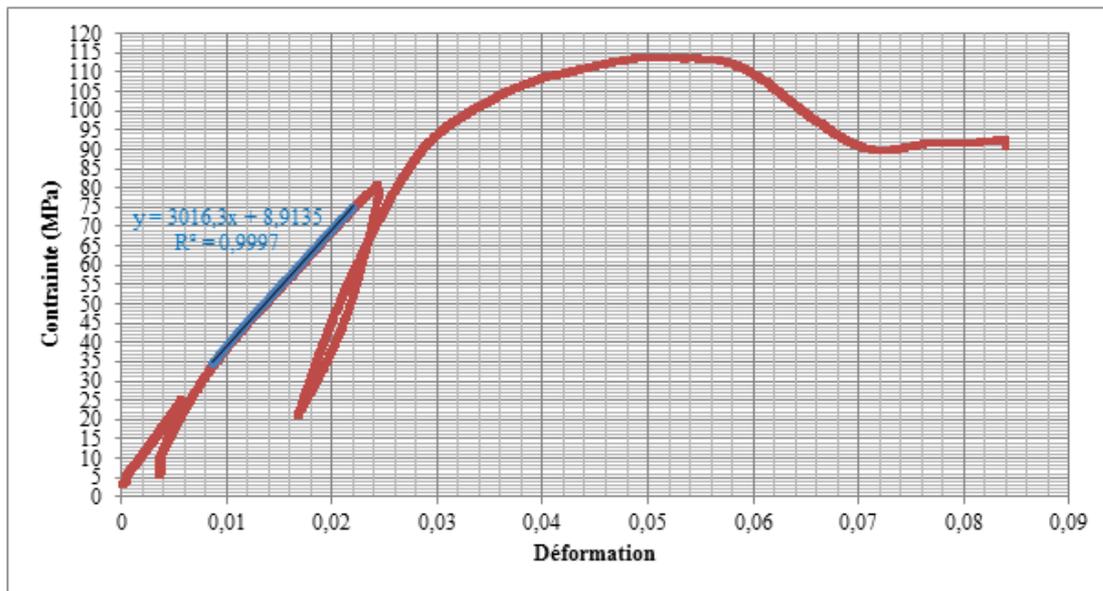


FIGURE 5.22 – Courbe contrainte déformation d'un échantillon contrôle soumis à un essai de compression.

Les déformations locales trouvées par corrélation d'images étaient hétérogènes et dépendaient clairement de la microstructure de l'os, en effet les déformations étaient distribuées différemment pour un os sain peu poreux ou un os pathologique très poreux. De plus, les valeurs de déformations locales se situaient respectivement autour de 1% et 2% pour les contrôles et les OI respectivement. Dans la littérature la corrélation d'images a déjà été utilisée sur de l'os, que ce soit de l'os animal[10, 45, 175] de l'os humain[182] ou même des composites imitant le fémur humain[183], et les champs de déformations observés étaient à chaque fois hétérogènes, tout comme dans cette étude. Hoc *et al.* ont également montré sur de l'os cortical bovin que les déformations locales dépendaient de la microstructure, il est donc cohérent de trouver ce phénomène sur des os humains, plus structurés que des os bovins. Les valeurs de déformations trouvées sur de l'os bovin quelque peu structuré avec des ostéons (entre 1 et 2% pour une contrainte de 80 MPa) étaient moins élevées que les valeurs trouvées dans cette étude mais l'os bovin est plus dense et plus rigide que de l'os humain. L'ordre de grandeur était toutefois similaire.

Il a été montré sur des tibias de souris par DIC que l'os s'adapte au chargement et réduit les déformations dans les zones où la charge est la plus élevée[175]. Ils n'ont pas pu conclure dans cette étude si les zones de déformation élevée correspondaient à des zones de formation osseuse plus élevée aussi. Pour vérifier que l'adaptation se fait de façon aussi locale que cela le suggère, il pourrait être intéressant de coupler ces analyses DIC pendant compression à des mesures d'activité ostéoblastique, voire ostéoclastique.

Dans cette étude, la méthode des champs virtuels a été utilisée pour déterminer le module

élastique moyen de deux zones distinctes de l'os, à savoir l'os interstitiel et l'os ostéonal. Nous avons trouvé pour l'os interstitiel un module de 9,64-9,90 GPa et pour l'os ostéonal un module de 6,66-7,65 GPa. L'os interstitiel est donc plus rigide que l'os ostéonal, ce qui est conforme avec les mesures faites par d'autres auteurs en nanoindentation notamment[75, 79, 184].

Dans cette étude, aucun pré-traitement des images n'a été fait, nous n'avons pas supprimé les cavités du calcul, nous avons simplement considéré les trous comme un matériau beaucoup moins rigide que l'os, i.e. avec un module nul et nous avons pu retrouver un module quasi nul par la méthode d'analyse inverse. Ce module n'étant toutefois pas rigoureusement nul, nous avons fait une seconde étape en considérant ce module nul et nous avons trouvé un module pour le tissu seul qui variait légèrement.

Lors de l'étude présentée au chapitre 2, nous avons également fait de la nanoindentation sur ce même échantillon d'os d'enfant sain et nous avons trouvé pour l'os interstitiel un module d'Young moyen de 21,4 (2,6) GPa et pour l'os ostéonal un module d'Young moyen de 18,4 (2,2) GPa. Ces résultats sont différents de ceux trouvés par la méthode d'identification utilisée dans cette étude, mais les échantillons n'ont pas été testés dans la même direction par les deux tests, or l'os est anisotrope et les modules élastiques dans la direction longitudinale et dans la direction transversale sont différents. Le rapport proche de deux entre les deux est cohérent avec la littérature.

A ce jour et à notre connaissance, c'est la première fois qu'une méthode type méthode des champs virtuels est utilisée sur de l'os humain d'enfants. Dans la littérature, peu de données existent pour le moment mais avec l'utilisation de techniques capables de mesurer le champ de déplacement dans beaucoup des tissus humains, de plus en plus d'études se sont intéressées à cette méthode d'analyse inverse pour des applications dans le domaine de la biomécanique. Par exemple, des études ont montré la faisabilité du couplage IRM et méthode des champs virtuels pour reconstruire l'hétérogénéité de rigidité d'un matériau hétérogène[181, 185]. Une autre étude a montré que la méthode des champs virtuels couplée à une méthode de mesure de champs à deux caméras permettait d'identifier les propriétés hyperélastiques des artères[171].

Dans cette étude, les valeurs de modules élastiques calculées pour les trois configurations étudiées étaient comprises entre 4,68 GPa et 9,90 GPa, pour rappel elles correspondent à des valeurs de module moyen pour le tissu osseux, en distinguant ou non la porosité et le tissu interstitiel/ostéonal. Au chapitre 3, nous avons mesuré le module macroscopique pour l'échantillon utilisé ici et nous avons trouvé 10,5 GPa. La différence s'explique notamment par le fait que ce module était calculé sur la décharge et non la charge comme ici, nous avons préféré faire cette analyse sur la charge pour être dans un comportement quasi élastique et non élasto-visco-plastique comme le suggère la courbe contrainte-déformation où l'endommagement pourrait également jouer un rôle.

Dans la littérature, nous avons trouvé des valeurs de modules d'Young macroscopiques calculés en compression comprises entre 5,65 (1,61) GPa et environ 17 GPa pour des adultes[20]

et des enfants[56]. Même si les résultats trouvés par corrélation d'images et méthode type méthode des champs virtuels sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature, les explications possibles de différences sont variées, elles peuvent être expérimentales ou numériques. Par exemple, la mesure en surface pouvait ne pas représenter exactement les mesures volumiques, notamment si les côtés en contact avec les mors n'étaient pas parfaitement parallèles, cela introduisait une erreur et la déformation de la surface n'était pas la déformation macroscopique mesurée. En plus d'avoir une compression non strictement uniaxiale, les mors et l'échantillon n'étaient pas solidaires, ce dernier a pu avoir un léger mouvement hors plan qui a faussé la mesure des déformations, mais pas de manière dramatique comme cela a été vérifié a posteriori. Une autre explication est l'utilisation d'un extensomètre pour mesurer la déformation macroscopique, comme cela a été montré dans ce chapitre, cette déformation macroscopique mesurée par extensomètre n'était pas rigoureusement équivalente à la déformation macroscopique de l'échantillon entier qui elle-même n'était pas rigoureusement la même que la déformation d'une partie de l'échantillon, ce dernier étant hétérogène. De plus, la déformation des mors, même si elle est négligeable par rapport à la déformation de l'os, pourrait introduire aussi une petite erreur. De manière numérique, l'identification de ces zones a été faite sur les images optiques et les images en électrons rétrodiffusées, le recalage des images peut être la cause d'erreur dans les résultats, en effet nous avons pu remarquer que la dispersion des résultats était grande quand le recalage se faisait manuellement. Si deux sources d'images sont utilisées une attention toute particulière doit être portée à ce recalage des images.

En conclusion, la corrélation d'images, réalisée sur des images prises pendant un test de compression, nous a permis, d'une part de confirmer l'hétérogénéité des déformations locales dans le cas de l'os, et d'autre part de mettre en évidence la différence de comportement entre un os sain et un os OI quand ils sont soumis à un même niveau de contrainte. De plus, en couplant cette technique de mesure de champs à une méthode de type méthode des champs virtuels, nous avons pu calculer le module élastique moyen de deux zones caractéristiques de l'os à savoir l'os interstitiel et l'os ostéonal. Nous avons ainsi montré la faisabilité de cette méthode appliquée au cas de l'os, des études complémentaires seraient nécessaires pour montrer la pertinence de son utilisation pour retrouver les modules élastiques locaux de l'os. Il faudrait en particulier adapter cette méthode à la détermination d'un plus grand nombre de modules, ceux-ci par exemple liés aux niveaux de gris des images faites en microscopie électronique à balayage.

# Conclusions et perspectives

Ce travail proposait de comparer un groupe d'échantillons provenant de patients souffrant d'OI à un groupe contrôle composé d'échantillons provenant d'enfants sains. Cette comparaison se faisait en termes de microstructure, de propriétés mécaniques et chimiques via l'utilisation de plusieurs techniques de référence pour l'étude de l'os, et notamment l'os OI, à savoir la tomographie RX haute résolution, la nanoindentation et la microscopie électronique à balayage. Ce travail a également été l'occasion d'appliquer des techniques pas ou peu utilisées pour l'étude de l'os OI comme la microspectroscopie Raman, les essais de compression ou la mise en culture d'ostéoclastes humains.

L'objectif principal de ce travail était d'avancer dans la connaissance de « la maladie des os de verre » chez l'humain, en particulier chez l'enfant, d'un point de vue macroscopique et tissulaire. Pour cela nous avons réalisé, à ce jour et à notre connaissance, pour la première fois, une étude comparative en termes de comportement mécanique mais également de microstructure, de composition et d'activité ostéoclastique. Un second objectif était d'adapter une méthode d'analyse inverse proche de la méthode des champs virtuels au cas de l'os en utilisant des champs de déplacement mesurés par corrélation d'images numériques (DIC).

Le premier chapitre bibliographique a permis de mettre en évidence la structure multi-échelles de l'os cortical humain, en particulier la structure haversienne, lui procurant, dans le cas non pathologique, des propriétés mécaniques étonnantes. Ce chapitre, qui fait le point sur les connaissances actuelles concernant l'OI, nous a permis d'insister sur le manque d'études comparatives chez l'humain et chez l'enfant en particulier.

La première étude abordée au chapitre 2 visait à étudier les propriétés mécaniques et minérales à l'échelle du tissu des échantillons d'os cortical d'enfants atteints d'OI et à les comparer à des échantillons contrôles. Ainsi les propriétés mécaniques, la densité minérale du tissu et les propriétés minérales ont été mesurées respectivement par nanoindentation, tomographie RX haute résolution et microspectroscopie Raman. Nous avons montré que le module d'Young était significativement plus faible chez l'OI comparé au groupe contrôle alors que la densité minérale du tissu était significativement plus élevée chez l'OI. De plus, les différences de cristallinité et de ratio minéral/matrice collagénique suggéraient que les cristaux étaient plus petits et devaient également être plus nombreux. Une différence évidente de qualité

du tissu entre les os OI et les os sains a donc été mise en évidence lors de cette étude.

Nous avons ensuite voulu savoir si, outre le tissu, la microstructure était également à mettre en cause dans la fragilité osseuse des patients souffrant d'OI. Pour cela nous avons mesuré les propriétés mécaniques, les densités minérales et des paramètres de structure, pour des échantillons OI et contrôles par essais de compression, tomographie RX haute résolution et microscopie électronique à balayage. Nous avons mesuré des porosités vasculaire et lacunaire significativement plus élevées chez les OI par rapport aux contrôles probablement dues à un défaut de remodelage osseux chez l'OI. Nous avons mesuré des propriétés mécaniques macroscopiques significativement plus faibles chez les OI comparativement aux contrôles. La corrélation entre propriétés mécaniques et paramètres de structure (porosité vasculaire et BMD) a prouvé l'influence de la microstructure sur le comportement mécanique des os des personnes souffrant d'OI.

Le quatrième chapitre de ce travail laissait quelque peu de côté le point de vue mécanicien pour revêtir un caractère biomatériaux et biologie. Il s'agissait dans cette partie de nous intéresser au remodelage osseux défectueux, évoqué précédemment, et en particulier à la résorption, intensifiée dans le cas de l'OI. Pour cela des ostéoclastes humains ont été mis en culture sur des substrats d'os OI et contrôle, et la résorption a été évaluée qualitativement et quantitativement par coloration au TRAP, au bleu de tolluidine et par analyse interférométrique. Nous n'avons pas observé de grandes différences de densité et de morphologie des ostéoclastes, par contre nous avons mesuré une résorption significativement plus importante chez l'OI due à une profondeur de résorption plus importante et non à une surface plus étendue. La résorption ne semblant pas aléatoire, nous nous sommes intéressés aux paramètres guidant la résorption chez un contrôle. Nous avons constaté que les ostéoclastes ciblaient les zones de faibles propriétés mécaniques, de faibles ratios minéral/matrice et des petites tailles de cristaux. Ces résultats mis en parallèle avec les propriétés des OI suggéraient que la qualité du cristal, plus que la quantité, jouaient un rôle dans la résorption osseuse.

En dernière partie nous avons voulu comparé la distribution des déformations sur des échantillons OI et des échantillons contrôles tous soumis au même niveau de chargement en compression. Par corrélation d'images nous avons pu montrer que les déformations étaient localement plus élevées chez les OI par comparaison avec les contrôles et ces déformations étaient particulièrement importantes autour des cavités. Ensuite, sur un échantillon sain, nous avons utilisé une méthode d'analyse inverse proche de la méthode des champs virtuels pour déterminer les modules élastiques de la zone interstitielle et de la zone ostéonale. Cette méthode d'analyse inverse utilisait l'équation d'équilibre globale écrite sur N bandes composant l'échantillon en mesurant le champs de déplacement par corrélation d'images sur les images prises pendant la compression. Nous avons trouvé des modules élastiques du même ordre de grandeur que la valeur mesurée sur la courbe contrainte-déformation ou les valeurs trouvées dans la littérature, ce qui a validé cette première approche de la méthode des champs virtuels

dans le cas de l'os.

En conclusion, nous avons pu montrer tout au long de ce travail de thèse que les os corticaux d'enfants atteints d'OI présentent de nombreuses différences avec des os d'enfants sains, tant du point de vue de la qualité du tissu que du point de vue de la microstructure. Tous ces aspects concourent à faire des os des patients souffrant d'OI des zones de fragilité dont le seul traitement efficace actuellement reste les bisphosphonates. Une investigation plus approfondie de l'interface minéral/collagène pourrait permettre d'améliorer les traitements en étudiant notamment le rôle des protéines non collagéniques.

Ce travail de thèse soulève donc de nombreuses perspectives intéressantes que nous développerons en plusieurs axes. Le premier axe est l'étude structurale du réseau de fibres de collagène, des cristaux d'hydroxyapatite et de l'interface collagène-minéral. Il s'agira en particulier de s'intéresser à l'organisation des fibres de collagène, d'une part afin de déterminer si le défaut d'organisation se fait effectivement de manière localisée, i.e dans certaines régions et pas dans d'autres. D'autre part, on pourra s'intéresser à leur diamètre et tenter d'établir un consensus sur l'effet de l'OI sur le diamètre des fibres de collagène. Par exemple, une étude au microscope confocal multiphotons pourrait permettre d'observer les fibres de collagène, leur organisation et de mettre en évidence les zones plus ou moins affectées. De plus, l'étude des cristaux, au SAXS ou au microscope électronique en transmission, pourra permettre de quantifier la diminution de leur taille et établir ainsi de possibles corrélations quantitatives avec les propriétés mécaniques. Finalement, on pourra aussi étudier l'agencement des cristaux au sein de la matrice collagénique à l'aide du microscope électronique en transmission, mais la question de l'adhésion demandera l'étude à une échelle moléculaire.

Le deuxième axe qu'il serait donc intéressant de poursuivre est l'étude des os OI d'un point de vue moléculaire et cellulaire. Tout d'abord, bien que le rôle des protéines non collagéniques ne soit pas encore totalement élucidé, on sait d'ores et déjà qu'elles ont un impact fort sur l'adhésion et la croissance des cristaux notamment. Il serait donc pertinent d'évaluer leur concentration et leur répartition chez le groupe pathologique et de comparer au groupe contrôle afin d'identifier de possibles causes de la fragilité osseuse chez l'OI à l'échelle moléculaire et ainsi perfectionner les traitements. De plus, au cours de ce travail de thèse, nous avons remarqué des différences entre les groupes OI et contrôle au niveau de la densité et de la morphologie des lacunes ostéocytaires, il serait donc intéressant de suivre de plus près l'activité des ostéocytes dont l'impact sur le remodelage osseux est aujourd'hui une évidence.

Le dernier axe à poursuivre concerne l'identification des propriétés élastiques de l'os cortical par corrélation d'images et méthode d'analyse inverse. La méthode de corrélation d'images a été validée lors de ce travail de thèse, il pourrait simplement être ajouté en amont une méthode de masque afin de ne pas calculer les déformations dans les cavités et éviter ainsi les valeurs aberrantes. Du point de vue de la méthode globale d'identification des propriétés mécaniques, il convient de poursuivre l'étude commencée dans ce travail de thèse et diviser le tissu osseux

en un plus grand nombre de zones de même module, en utilisant par exemple les images de microscopie électronique à balayage où le niveau de gris reflète le degré de minéralisation. Ce travail pourrait également être étendu à un plus grand nombre d'échantillons sains dans un premier temps, et pathologiques dans un second temps, afin de déterminer si cette méthode d'identification peut nous renseigner sur les propriétés mécaniques locales des os OI et nous permettre de discrétiser les os pathologiques et les os sains.

# Bibliographie

- [1] J-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering and Physics*, 20 :92–102, 1998. [xi](#), [9](#), [10](#), [13](#)
- [2] M. E. Ruppel, L. M. Miller, and D. B. Burr. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporosis International*, 19(9) :1251–1265, September 2008. [9](#), [10](#), [12](#)
- [3] S. C. Cowin. *Bone Mechanics Handbook. Second Edition*. CRC Press, 2001. [10](#), [11](#), [12](#), [14](#)
- [4] M-G. Ascenzi, A. Ascenzi, A. Benvenuti, M. Burghammer, S. Panzavolta, and A. Bigi. Structural differences between "dark" and "bright" isolated human osteonic lamellae. *Journal of structural biology*, 141(1) :22–33, 2003. [11](#), [12](#)
- [5] M-G. Ascenzi, J. Gill, and A. Lomovtsev. Orientation of collagen at the osteocyte lacunae in human secondary osteons. *Journal of Biomechanics*, 41(16) :3426–3435, December 2008.
- [6] E. M. Spiesz, W. Kaminsky, and P. K. Zysset. A quantitative collagen fibers orientation assessment using birefringence measurements : Calibration and application to human osteons. *Journal of Structural Biology*, 176(3) :302–306, December 2011. [11](#)
- [7] D. Rohrbach, S. Lakshmanan, F. Peyrin, M. Langer, A. Gerisch, Q. Grimal, P.l Laugier, and K. Raum. Spatial distribution of tissue level properties in a human femoral cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 45(13) :2264–2270, August 2012. [11](#), [13](#), [19](#), [21](#)
- [8] C. Chappard, A. Marchadier, and C. L. Benhamou. Side-to-side and within-side variability of 3d bone microarchitecture by conventional micro-computed tomography of paired iliac crest biopsies. *Bone*, 43(1) :203–208, July 2008. [11](#)
- [9] M. Granke, Q. Grimal, A. Saïed, P. Nauleau, F. Peyrin, and P. Laugier. Change in porosity is the major determinant of the variation of cortical bone elasticity at the millimeter scale in aged women. *Bone*, 49(5) :1020–1026, November 2011. [11](#)

- [10] L. Henry. *Approche micromécanique de l'os cortical : mesures de champs et simulation numérique. Thèse mécanique et matériaux*. PhD thesis, Ecole Centrale Paris, 2006. [xi](#), [12](#), [35](#), [103](#), [116](#)
- [11] H. Libouban, R. Filmon, A. Maureac, M.F. Basle, and Chappard D. Fetuin and osteocalcin interact with calcospherite formation during the calcification process of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) in vitro : a raman microspectroscopic monitoring. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40 :1234–1239, 2009. [12](#)
- [12] P. J. Thurner, C. G. Chen, S. Ionova-Martin, L. Sun, A. Harman, A. Porter, J. W. Ager, R. O. Ritchie, and T. Alliston. Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone*, 46(6) :1564–1573, June 2010. [12](#), [75](#)
- [13] D. B. Burr. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 31(1) :8–11, 2002. [12](#)
- [14] P. Fratzl. Cellulose and collagen : from fibres to tissues. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(1) :32–39, 2003. [12](#)
- [15] S. Viguet-Carrin, P. Garnero, and P. D. Delmas. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3) :319–336, March 2006. [12](#)
- [16] D. K. Dubey and V. Tomar. Role of molecular level interfacial forces in hard biomaterial mechanics : A review. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(6) :2040–2055, June 2010. [13](#)
- [17] H. S. Gupta, J. Seto, W. Wagermaier, P. Zaslansky, P. Boesecke, and P. Fratzl. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47) :17741–17746, 2006. [13](#)
- [18] Z. Qin, A. Gautieri, A. K. Nair, H. Inbar, and Buehler M. J. Thickness of hydroxyapatite nanocrystal controls mechanical properties of the collagen-hydroxyapatite interface. *Langmuir*, 28 :1982–1992, 2012. [13](#), [45](#)
- [19] D. K. Dubey and V. Tomar. Effect of osteogenesis imperfecta mutations in tropocollagen molecule on strength of biomimetic tropocollagen-hydroxyapatite nanocomposites. *J Mater Sci : Mater Med*, 21(2) :161–171, 2010. [13](#), [26](#)
- [20] X. N. Dong, R. L. Acuna, Q. Luo, and X. Wang. Orientation dependence of progressive post-yield behavior of human cortical bone in compression. *Journal of Biomechanics*, 45(16) :2829–2834, November 2012. [13](#), [20](#), [117](#)
- [21] C. M. Schnitzler and J. M. Mesquita. Cortical porosity in children is determined by age-dependent osteonal morphology. *Bone*, 55(2) :476–486, August 2013. [xi](#), [14](#), [15](#)

- [22] R. Baron. Les ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *médecine/sciences*, 17(12) :1260–1269, December 2001. [xi](#), [14](#), [17](#)
- [23] M. Nakamura, T. Hentunen, J. Salonen, A. Nagai, and K. Yamashita. Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101 :3141–3151, 2013. [16](#), [71](#), [85](#)
- [24] A. Cappariello, A. Maurizi, V. Veeriah, and A. Teti. The great beauty of the osteoclast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 558 :70–78, September 2014. [16](#), [18](#), [71](#)
- [25] F. Anderegg, D. Geblinger, P. Horvath, M. Charnley, M. Textor, L. Addadi, and B. Geiger. Substrate adhesion regulates sealing zone architecture and dynamics in cultured osteoclasts. *PLoS ONE*, 6(12) :1–10, December 2011. [16](#), [71](#), [85](#)
- [26] M. Rumpler, T. Würger, P. Roschger, E. Zwettler, I. Sturmlechner, P. Altmann, P. Fratzl, M. J. Rogers, and K. Klaushofer. Osteoclasts on bone and dentin in vitro : Mechanism of trail formation and comparison of resorption behavior. *Calcified Tissue International*, 93(6) :526–539, December 2013. [16](#), [71](#), [86](#), [87](#)
- [27] K. Henriksen, D. J. Leeming, I. Byrjalsen, R. H. Nielsen, M. G. Sorensen, M. H. Dziegiel, T. John Martin, C. Christiansen, P. Qvist, and M. A. Karsdal. Osteoclasts prefer aged bone. *Osteoporosis International*, 18(6) :751–759, April 2007. [17](#), [71](#), [85](#), [86](#)
- [28] M. Capulli, R. Paone, and N. Rucci. Osteoblast and osteocyte : Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561 :3–12, May 2014. [17](#), [18](#), [19](#), [71](#)
- [29] C. A. O’Brien, T. Nakashima, and H. Takayanagi. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*, 54(2) :258–263, June 2013. [19](#)
- [30] N. A. Sims and C. Vrahnas. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561 :22–28, May 2014. [18](#)
- [31] S. C. Cowin. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *Journal of Biomechanics*, 40 :S105–S109, January 2007. [xi](#), [18](#)
- [32] J. Klein-Nulend, R. G. Bacabac, and M. G. Mullender. Mechanobiology of bone tissue. *Pathologie Biologie*, 53(10) :576–580, December 2005. [19](#)
- [33] N.. Fratzl-Zelman, P. Roschger, B. M. Misof, S. Pfeffer, F. H. Glorieux, K. Klaushofer, and F. Rauch. Normative data on mineralization density distribution in iliac bone biopsies of children, adolescents and young adults. *Bone*, 44(6) :1043–1048, June 2009. [19](#), [53](#), [62](#)

- [34] P. Roschger, P. Fratzl, J. Eschberger, and K. Klaushofer. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone*, 23(4) :319–326, 1998.
- [35] P. Roschger, E.P. Paschalis, P. Fratzl, and K. Klaushofer. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone*, 42(3) :456–466, March 2008. [33](#)
- [36] N. Fratzl-Zelman, P. Roschger, A. Gourrier, M. Weber, B. M. Misof, N. Loveridge, K. Reeve, J. and. Klaushofer, and P. Fratzl. Combination of nanoindentation and quantitative backscattered electron imaging revealed altered bone material properties associated with femoral neck fragility. *Calcif Tissue Int*, 85 :335–343, 2009. [19](#), [53](#)
- [37] A. I. D. Prentice. Autofluorescence of bone tissues. *J. clin. Path.*, 20 :717–719, 1967. [19](#)
- [38] R. Ambekar, M. Chittenden, I. Jasiuk, and K. C. Toussaint. Quantitative second-harmonic generation microscopy for imaging porcine cortical bone : Comparison to SEM and its potential to investigate age-related changes. *Bone*, 50(3) :643–650, March 2012. [19](#)
- [39] K. Schenke-Layland, I. Riemann, O. Damour, U. A. Stock, and K. König. Two-photon microscopes and in vivo multiphoton tomographs - powerful diagnostic tools for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(7) :878–896, October 2006. [19](#)
- [40] R. LaComb, O. Nadiarnykh, and P. J. Campagnola. Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta : Experiment and simulation. *Biophysical Journal*, 94(11) :4504–4514, June 2008. [19](#)
- [41] Y. Bala, B. Depalle, T. Douillard, S. Meille, P. Clément, H. Follet, J. Chevalier, and G. Boivin. Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior : An instrumented indentation study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7) :1473–1482, October 2011. [19](#), [22](#)
- [42] E. Cory, A. Nazarian, V. Entezari, V. Vartanians, R. Müller, and B. D. Snyder. Compressive axial mechanical properties of rat bone as functions of bone volume fraction, apparent density and micro-ct based mineral density. *Journal of Biomechanics*, 43(5) :953–960, March 2010. [20](#)
- [43] E. Budyn, J. Jonvaux, C. Funfschilling, and T. Hoc. Bovine cortical bone stiffness and local strain are affected by mineralization and morphology. *Journal of applied mechanics*, 79 :011008–1–12, 2012.

- [44] N. M. Harrison, P. F. McDonnell, D. C. O'Mahoney, O. D. Kennedy, F. J O'Brien, and P. E. McHugh. Heterogeneous linear elastic trabecular bone modelling using micro-ct attenuation data and experimentally measured heterogeneous tissue properties. *Journal of biomechanics*, 41 :2589–2596, 2008.
- [45] T. Hoc, L. Henry, M. Verdier, D. Aubry, L. Sedel, and A. Meunier. Effect of microstructure on the mechanical properties of haversian cortical bone. *Bone*, 38(4) :466–474, April 2006. [35](#), [93](#), [96](#), [116](#)
- [46] C. Wynnyckyj, S. Omelon, K. Savage, M. Damani, D. Chachra, and M. D. Grynblas. A new tool to assess the mechanical properties of bone due to collagen degradation. *Bone*, 44(5) :840–848, May 2009. [20](#)
- [47] A.C. Vale, M.F.C. Pereira, A. Mauricio, P. Amaral, L.G. Rosa, A. Lopes, A. Rodrigues, J. Caetano-Lopes, B. Vidal, J. Monteiro, J.E. Fonseca, H. Canhao, and M. Fatima Vaz. Micro-computed tomography and compressive characterization of trabecular bone. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 438 :199–205, December 2013. [20](#)
- [48] O. Riekkinen, M. A. Hakulinen, M. J. Lammi, J. S. Jurvelin, A. Kallioniemi, and J. Töyräs. Acoustic properties of trabecular bone - relationships to tissue composition. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(9) :1438–1444, September 2007.
- [49] Y. Chevalier, D. Pahr, H. Allmer, M. Charlebois, and P. Zysset. Validation of a voxel-based FE method for prediction of the uniaxial apparent modulus of human trabecular bone using macroscopic mechanical tests and nanoindentation. *Journal of Biomechanics*, 40(15) :3333–3340, January 2007.
- [50] D. C Newitt, S Majumbar, B van Rietbergen, G von Ingersleben, S. T Harris, H. K Genant, C Chesnut, P Garnero, and B. MacDonald. In vivo assessment of architecture and micro-finite element analysis derived indices of mechanical properties of trabecular bone in the radius. *Osteoporosis International*, 13 :6–17, 2002.
- [51] C. Öhman, M. Baleani, E. Perilli, E. Dall'Ara, S. Tassani, F. Baruffaldi, and M. Viceconti. Mechanical testing of cancellous bone from the femoral head : Experimental errors due to off-axis measurements. *Journal of Biomechanics*, 40(11) :2426–2433, January 2007. [20](#)
- [52] H. H. Bayraktar, E. F. Morgan, G. L. Niebur, G. E. Morris, E. K. Wong, and T. M. Keaveny. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *Journal of Biomechanics*, 37(1) :27–35, January 2004. [20](#), [64](#)

- [53] C. H. Turner, J. Rho, Y. Takano, T. Y. Tsui, and G. M. Pharr. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar : results from two microscopic measurement techniques. *Journal of Biomechanics*, 32(4) :437–441, 1999. [20](#), [21](#), [22](#)
- [54] T.S. Keller. Predicting the compressive mechanical behavior of bone. *Journal of Biomechanics*, 27 :1159–1168, 1994. [20](#)
- [55] D. W. Wagner, D. P. Lindsey, and G. S. Beaupre. Deriving tissue density and elastic modulus from microCT bone scans. *Bone*, 49(5) :931–938, November 2011. [20](#), [21](#)
- [56] C. Öhman, M. Baleani, C. Pani, F. Taddei, M. Alberghini, M. Viceconti, and M. Manfrini. Compressive behaviour of child and adult cortical bone. *Bone*, 49(4) :769–776, October 2011. [20](#), [64](#), [118](#)
- [57] J. D. Currey. Tensile yield in compact bone is determined by strain, post-yield behaviour by mineral content. *Journal of Biomechanics*, 37(4) :549–556, April 2004. [20](#), [43](#)
- [58] Kyung-Hoon Lee, Krzysztof Kuczera, and M. M. Holl. Effect of osteogenesis imperfecta mutations on free energy of collagen model peptides : A molecular dynamics simulation. *Biophysical Chemistry*, 156(2-3) :146–152, July 2011. [20](#), [21](#), [26](#)
- [59] J-P. Berteau, C. Baron, M. Pithioux, F. Launay, P. Chabrand, and P. Lasaygues. In vitro ultrasonic and mechanic characterization of the modulus of elasticity of children cortical bone. *Ultrasonics*, 54(5) :1270–1276, July 2014. [20](#), [21](#), [64](#)
- [60] A. Cohen, D. W. Dempster, R. Müller, X. E. Guo, T. L. Nickolas, X. S. Liu, X. H. Zhang, A. J. Wirth, G. H. van Lenthe, T. Kohler, D. J. McMahon, H. Zhou, M. R. Rubin, J. P. Bilezikian, J. M. Lappe, R. R. Recker, and E. Shane. Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography : comparison with transiliac bone biopsy. *Osteoporosis International*, 21(2) :263–273, February 2010. [21](#)
- [61] J. Töyräs, H. Kröger, and J. S. Jurvelin. Bone properties as estimated by mineral density, ultrasound attenuation, and velocity. *Bone*, 25(6) :725–731, 1999. [21](#)
- [62] D Hans, M. E Arlot, A. M Schott, J-P. Roux, P.O Kotzki, and Meunier P-J. Do ultrasound measurements on the os calcis reflect more the bone microarchitecture than the bone mass ? : a two-dimensional histomorphometric study. *Bone*, 16 :295–300, 1995. [21](#)
- [63] C .F Njeh, C. M Boivin, and C. M. Langton. The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis : a review. *Osteoporosis International*, 7 :7–22, 1997. [21](#)

- [64] G. I. Baroncelli. Quantitative ultrasound methods to assess bone mineral status in children : technical characteristics, performance, and clinical application. *Pediatric research*, 63(3) :220–228, 2008.
- [65] P. H. F. Nicholson and R. Alkalay. Quantitative ultrasound predicts bone mineral density and failure load in human lumbar vertebrae. *Clinical Biomechanics*, 22(6) :623–629, July 2007.
- [66] C.M. Langton and D.K. Langton. Comparison of bone mineral density and quantitative ultrasound of the calcaneus : site-matched correlation and discrimination of axial bmd status. *The British Journal of Radiology*, 73 :31–35, 2000.
- [67] J. P. Karjalainen, O. Riekkinen, J. Töyräs, M. Hakulinen, H. Kröger, T. Rikkonen, K. Salovaara, and J. S. Jurvelin. Multi-site bone ultrasound measurements in elderly women with and without previous hip fractures. *Osteoporosis International*, 23(4) :1287–1295, April 2012.
- [68] G. A. Hawker, S. A. Jamal, R. Ridout, and C. Chase. A clinical prediction rule to identify premenopausal women with low bone mass. *Osteoporosis international*, 13(5) :400–406, 2002.
- [69] C. Durosier, D. Hans, M. A. Krieg, C. Ruffieux, J. Cornuz, P. J. Meunier, and A. M. Schott. Combining clinical factors and quantitative ultrasound improves the detection of women both at low and high risk for hip fracture. *Osteoporosis International*, 18(12) :1651–1659, October 2007.
- [70] C. Cepollaro, S. Gonnelli, C. Pondrelli, A. Montagnani, S. Martini, D. Bruni, and C. Genari. Osteogenesis imperfecta : bone turnover, bone density, and ultrasound parameters. *Calcified tissue international*, 65(2) :129–132, 1999. [21](#), [24](#), [51](#), [62](#), [63](#), [71](#)
- [71] A. Saïed, K. Raum, I. Leguerney, and P. Laugier. Spatial distribution of anisotropic acoustic impedance assessed by time-resolved 50-MHz scanning acoustic microscopy and its relation to porosity in human cortical bone. *Bone*, 43(1) :187–194, July 2008. [21](#)
- [72] K. Hasegawa, C. H. Turner, R. R. Recker, E. Wu, and Burr D. B. Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy. *Bone*, 16 :85–90, 1995.
- [73] M. Regauer, P. Jürgens, U. Budenhofer, M. Hartstock, W. Böcker, D. Bürklein, W. Mutschler, R. Sader, and M. Schieker. Quantitative scanning acoustic microscopy compared to microradiography for assessment of new bone formation. *Bone*, 38(4) :564–570, April 2006.

- [74] T. Hofmann, F. Heyroth, H. Meinhard, W. Fränzel, and K. Raum. Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae. *Journal of Biomechanics*, 39(12) :2282–2294, January 2006. [21](#)
- [75] Z. Fan, J. G. Swadener, J. Y. Rho, M. E. Roy, and G. M. Pharr. Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation. *Journal of Orthopaedic Research*, 20 :806–810, 2002. [21](#), [22](#), [117](#)
- [76] T. N. Shepherd, J. Zhang, T. C. Ovaert, R. K. Roeder, and G. L. Niebur. Direct comparison of nanoindentation and macroscopic measurements of bone viscoelasticity. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8) :2055–2062, November 2011. [21](#)
- [77] Z. Wu, T. A. Baker, T. C. Ovaert, and G. L. Niebur. The effect of holding time on nanoindentation measurements of creep in bone. *Journal of Biomechanics*, 44(6) :1066–1072, April 2011. [21](#)
- [78] P. K. Zysset, X. Edward Guo, C. Edward Hoffer, K. E. Moore, and S. A. Goldstein. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *Journal of biomechanics*, 32(10) :1005–1012, 1999. [21](#), [22](#), [26](#), [35](#)
- [79] J. Y. Rho, T. Y. Tsui, and G. M. Pharr. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*, 18(20) :1325–1330, 1997. [21](#), [22](#), [26](#), [35](#), [117](#)
- [80] X. J. Wang, X. B. Chen, P. D. Hodgson, and C. E. Wen. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation. *Transactions of nonferrous metals society of china*, 16 :744–748, 2006. [21](#)
- [81] C. Tjhia, C.V. Odvina, D.S. Rao, S.M. Stover, X. Wang, and D. Fyhrie. Mechanical property and tissue mineral density differences among severely suppressed bone turnover (ssbt) patients, osteoporotic patients, and normal subjects. *Bone*, 49 :1279–1289, 2011. [21](#), [22](#), [53](#)
- [82] R. M.D. Zebaze, A. C. Jones, M. G. Pandey, M. A. Knackstedt, and E. Seeman. Differences in the degree of bone tissue mineralization account for little of the differences in tissue elastic properties. *Bone*, 48(6) :1246–1251, June 2011. [22](#)
- [83] L. Michou and J. P. Brown. Genetics of bone diseases : Paget’s disease, fibrous dysplasia, osteopetrosis, and osteogenesis imperfecta. *Joint Bone Spine*, 78(3) :252–258, May 2011. [22](#)

- [84] F. H. Glorieux. Osteogenesis imperfecta. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22(1) :85–100, March 2008. [23](#), [24](#), [43](#), [62](#)
- [85] T. Cundy. Recent advances in osteogenesis imperfecta. *Calcified Tissue International*, 90(6) :439–449, June 2012. [23](#), [24](#), [43](#), [62](#)
- [86] M. Labuda, J. Morissette, L. M. Ward, F. Rauch, L. Lalic, P. J. Roughley, and F. H. Glorieux. Osteogenesis imperfecta type VII maps to the short arm of chromosome 3. *Bone*, 31(1) :19–25, 2002. [23](#)
- [87] D. O. Sillence, A. Senn, and D. M. Danks. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, 16(2) :101–116, 1979. [23](#)
- [88] P. Arundel and N. Bishop. Diagnosing osteogenesis imperfecta. *Paediatrics and Child Health*, 20(5) :225–231, 2010. [23](#)
- [89] M. S. Cheung and F. H. Glorieux. Osteogenesis imperfecta : update on presentation and management. *Rev Endocr Metab Disord*, 9 :153–160, 2008. [23](#), [24](#), [87](#)
- [90] U. E. Pazzaglia, T. Congiu, P. C. Brunelli, L. Magnano, and A. Benetti. The long bone deformity of osteogenesis imperfecta III : Analysis of structural changes carried out with scanning electron microscopic morphometry. *Calcified Tissue International*, 93(5) :453–461, November 2013. [23](#), [26](#), [51](#), [62](#), [63](#), [71](#)
- [91] F. Rauch and F. H. Glorieux. Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 363(9418) :1377–1385, 2004. [24](#)
- [92] W. R. Reinus, W. H. McAlister, F. Schranck, A. Chines, and M. P. Whyte. Differing lumbar vertebral mineralization rates in ambulatory pediatric patients with osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*, 62(1) :17–20, 1998. [24](#), [26](#), [62](#), [64](#)
- [93] J. R. Shapiro, E. F. McCarthy, K. Rossiter, K. Ernest, R. Gelman, N. Fedarko, H. T. Santiago, and M. Bober. The effect of intravenous pamidronate on bone mineral density, bone histomorphometry, and parameters of bone turnover in adults with type IA osteogenesis imperfecta. *Calcified Tissue International*, 72(2) :103–112, February 2003. [25](#), [43](#), [62](#)
- [94] T. Edouard, F. H. Glorieux, and F. Rauch. Predictors and correlates of vitamin d status in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10) :3193–3198, October 2011. [24](#)
- [95] F. Rauch, C. Land, S. Cornibert, E. Schoenau, and F. H. Glorieux. High and low density in the same bone : a study on children and adolescents with mild osteogenesis imperfecta. *Bone*, 37(5) :634–641, November 2005. [24](#)

- [96] Y. Liu, J. Wu, Y. Zhu, and J. Han. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clinical and Experimental Medicine*, 14(1) :13–24, February 2014. [24](#)
- [97] A. Forlino and J. C. Marini. Osteogenesis imperfecta : Prospects for molecular therapeutics. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71(1-2) :225–232, September 2000. [24](#)
- [98] H. Wolf, K. Sarahrudi, and V. Vecsei. Intramedullary osteosynthesis for fracture associated with osteogenesis imperfecta. *Injury*, 40(3) :315–320, March 2009. [24](#)
- [99] B. Jobke, P. Milovanovic, M. Amling, and B. Busse. Bisphosphonate-osteoclasts : Changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone*, 59 :37–43, February 2014. [25](#), [87](#)
- [100] F. H. Ebetino, A-M. L. Hogan, S. Sun, M. K. Tsoumpra, X. Duan, J. T. Triffitt, A. A. Kwaasi, J. E. Dunford, B. L. Barnett, U. Oppermann, M. W. Lundy, A. Boyde, B. A. Kashemirov, C. E. McKenna, and R. G. G. Russell. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*, 49(1) :20–33, July 2011. [xii](#), [25](#), [87](#)
- [101] V. Vyskocil, R. Pikner, and S. Kutilek. Effect of alendronate therapy in children with osteogenesis imperfecta. *Joint Bone Spine*, 72(5) :416–423, October 2005. [25](#), [43](#), [62](#)
- [102] L. M. Ward, F. Rauch, M. P. Whyte, J. D’Astous, P. E. Gates, D. Grogan, E. L. Lester, R. E. McCall, T. A. Pressly, J. O. Sanders, P. A. Smith, R. D. Steiner, E. Sullivan, G. Tyerman, D. L. Smith-Wright, N. Verbruggen, N. Heyden, A. Lombardi, and F. H. Glorieux. Alendronate for the treatment of pediatric osteogenesis imperfecta : A randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(2) :355–364, November 2010. [25](#)
- [103] C. J. C. Williams, R. A. Smith, R. J. Ball, and H. Wilkinson. Hypercalcaemia in osteogenesis imperfecta treated with pamidronate. *Archives of disease in childhood*, 76(2) :169–170, 1997. [25](#)
- [104] B. Grabner, W. J. Landis, P. Roschger, S. Rinnerthaler, H. Peterlik, K. Klaushofer, and P. Fratzl. Age-and genotype-dependence of bone material properties in the osteogenesis imperfecta murine model (oim). *Bone*, 29(5) :453–457, 2001. [25](#), [43](#), [45](#), [53](#), [62](#), [64](#)
- [105] M. Vanleene, A. Porter, P. V. Guillot, A. Boyde, M. Oyen, and S. Shefelbine. Ultrastructural defects cause low bone matrix stiffness despite high mineralization in osteogenesis imperfecta mice. *Bone*, 50(6) :1317–1323, June 2012. [43](#), [44](#), [45](#), [64](#)

- [106] M. Vanleene, Z. Saldanha, K. L. Cloyd, G. Jell, G. Bou-Gharios, J. H. D. Bassett, G. R. Williams, N. M. Fisk, M. L. Oyen, M. M. Stevens, P. V. Guillot, and S. J. Shefelbine. Transplantation of human fetal blood stem cells in the osteogenesis imperfecta mouse leads to improvement in multiscale tissue properties. *Blood*, 117(3) :1053–1060, January 2011. [62](#), [64](#)
- [107] A. Carriero, M. Doube, M. Vogt, B. Busse, J. Zustin, A. Levchuk, P. Schneider, R. Müller, and S. J. Shefelbine. Altered lacunar and vascular porosity in osteogenesis imperfecta mouse bone as revealed by synchrotron tomography contributes to bone fragility. *Bone*, 61 :116–124, April 2014. [63](#), [65](#)
- [108] X. Yao, S. M. Carleton, A. D. Kettle, J. Melander, C. L. Phillips, and Y. Wang. Gender-dependence of bone structure and properties in adult osteogenesis imperfecta murine model. *Annals of Biomedical Engineering*, 41(6) :1139–1149, June 2013. [43](#), [44](#), [62](#), [64](#)
- [109] R. M. Coleman, L. Aguilera, L. Quinones, L. Lukashova, C. Poirier, and A. Boskey. Comparison of bone tissue properties in mouse models with collagenous and non-collagenous genetic mutations using FTIRI. *Bone*, 51(5) :920–928, November 2012. [37](#), [43](#), [44](#), [45](#), [62](#), [63](#)
- [110] M. S. Davis, B. L. Kovacic, J. C. Marini, A. J. Shih, and K. M. Kozloff. Increased susceptibility to microdamage in *brtl/+* mouse model for osteogenesis imperfecta. *Bone*, 50(3) :784–791, March 2012.
- [111] P. Fratzl, O. Paris, K. Klaushofer, and W. J. Landis. Bone mineralization in an osteogenesis imperfecta mouse model studied by small-angle x-ray scattering. *Journal of Clinical Investigation*, 97(2) :396, 1996. [26](#), [45](#), [62](#)
- [112] N. P. Camacho, P. Carroll, and C. L. Raggio. Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS) of mineralization in bisphosphonate-treated *oim/oim* mice. *Calcified Tissue International*, 72(5) :604–609, May 2003. [25](#), [44](#), [62](#)
- [113] F. Rauch, R. Travers, A. M. Parfitt, and F. H. Glorieux. Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 26(6) :581–589, 2000. [26](#), [51](#), [62](#), [63](#), [71](#)
- [114] S. J. Jones, F. H. Glorieux, R. Travers, and A. Boyde. The microscopic structure of bone in normal children and patients with osteogenesis imperfecta : a survey using backscattered electron imaging. *Calcified tissue international*, 64(1) :8–17, 1999. [26](#), [51](#), [63](#)
- [115] P. Roschger, N. Fratzl-Zelman, B. M. Misof, F. H. Glorieux, K. Klaushofer, and F. Rauch. Evidence that abnormal high bone mineralization in growing children with osteogenesis

- imperfecta is not associated with specific collagen mutations. *Calcified Tissue International*, 82(4) :263–270, March 2008. [26](#), [33](#), [43](#), [51](#), [62](#), [63](#), [64](#), [71](#)
- [116] C. Albert, J. Jameson, P. Smith, and G. Harris. Reduced diaphyseal strength associated with high intracortical vascular porosity within long bones of children with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 66 :121–130, September 2014. [26](#), [27](#), [51](#), [63](#), [65](#), [71](#)
- [117] V. Vardakastani, D. Saletti, W. Skalli, P. Marry, J.M. Allain, and C. Adam. Increased intra-cortical porosity reduces bone stiffness and strength in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 69 :61–67, September 2014. [26](#), [27](#), [65](#), [71](#)
- [118] V. Braga, D. Gatti, M. Rossini, F. Colapietro, E. Battaglia, O. Viapiana, and S. Adami. Bone turnover markers in patients with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 34(6) :1013–1016, June 2004. [26](#), [51](#)
- [119] P. Sarathchandra, F. M. Pope, M. V. Kayser, and S. Y. Ali. A light and electron microscopic study of osteogenesis imperfecta bone samples, with reference to collagen chemistry and clinical phenotype. *The Journal of pathology*, 192(3) :385–395, 2000. [26](#), [33](#), [62](#)
- [120] P. Sarathchandra, F. M. Pope, and S. Y. Ali. Morphometric analysis of type i collagen fibrils in the osteoid of osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*, 65(5) :390–395, 1999. [26](#), [33](#), [62](#)
- [121] J. P. Cassella, P. Barber, A. Catterall, and S. Y. Ali. A morphometric analysis of osteoid collagen fibril diameter in osteogenesis imperfecta. *Bone*, 15 :329–334, 1994.
- [122] H. Stöss and P. Freisinger. Collagen fibrils of osteoid in osteogenesis imperfect : morphometrical analysis of the fibril diameter. *American Journal of Medical Genetics*, 45 :257, 1993. [26](#)
- [123] A. Gautieri, S. Vesentini, A. Redaelli, and M. J. Buehler. Single molecule effects of osteogenesis imperfecta mutations in tropocollagen protein domains. *Protein Science*, 18 :161–168, 2008. [26](#)
- [124] A. Gautieri, S. Uzel, S. Vesentini, A. Redaelli, and M. J. Buehler. Molecular and mesoscale mechanisms of osteogenesis imperfecta disease in collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 97(3) :857–865, August 2009. [26](#), [43](#)
- [125] J. P. Cassella, P. J. Barrie, N. Garrington, and S. Y. Ali. A fourier transform infrared spectroscopic and solid-state NMR study of bone mineral in osteogenesis imperfecta. *Journal of bone and mineral metabolism*, 18(5) :291–296, 2000. [26](#), [33](#)

- [126] W. Traub, T. Arad, U. Vetter, and S. Weiner. Ultrastructural studies of bones from patients with osteogenesis imperfecta. *Matrix Biology*, 14 :337–345, 1994.
- [127] M. Weber, P. Roschger, N. Fratzl-Zelman, T. Schöberl, F. Rauch, F. H. Glorieux, P. Fratzl, and K. Klaushofer. Pamidronate does not adversely affect bone intrinsic material properties in children with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 39(3) :616–622, September 2006. [26](#), [43](#), [53](#)
- [128] U. Vetter, E. D. Eanes, J. B. Kopp, J. D. Termine, and P. Gehron Robey. Changes in apatite crystal size in bones of patients with osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*, 49(4) :248–250, 1991. [26](#), [33](#), [45](#), [62](#)
- [129] N. Fratzl-Zelman, I. Schmidt, P. Roschger, F. H. Glorieux, K. Klaushofer, P. Fratzl, F. Rauch, and W. Wagermaier. Mineral particle size in children with osteogenesis imperfecta type i is not increased independently of specific collagen mutations. *Bone*, 60 :122–128, March 2014. [26](#)
- [130] A. Boyde, R. Travers, F. H. Glorieux, and S. J. Jones. The mineralization density of iliac crest bone from children with osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*, 64(3) :185–190, 1999. [26](#), [33](#), [43](#), [62](#), [64](#)
- [131] C. Albert, J. Jameson, J. M. Toth, P. Smith, and G. Harris. Bone properties by nanoindentation in mild and severe osteogenesis imperfecta. *Clinical Biomechanics*, 28(1) :110–116, January 2013. [26](#), [33](#), [43](#), [44](#), [64](#)
- [132] Z.F. Fan, P. Smith, F. Rauch, and G.F. Harris. Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. *Composites Part B : Engineering*, 38(3) :411–415, April 2007. [26](#), [33](#), [44](#), [64](#)
- [133] W. C. Oliver and G. M. Pharr. An improved technique for determining hardness and elastic modulus. *Journal of Materials Research*, 7 :1564–1583, 1992. [35](#)
- [134] Michael D. Morris and Gurjit S. Mandair. Raman assessment of bone quality. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8) :2160–2169, November 2010. [36](#), [37](#), [43](#)
- [135] M. G. Orkoula, M. Z. Vardaki, and C. G. Kontoyannis. Study of bone matrix changes induced by osteoporosis in rat tibia using raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 63 :404–408, November 2012. [37](#)
- [136] J. S. Yerramshetty, C. Lind, and O. Akkus. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone*, 39(6) :1236–1243, December 2006. [37](#), [44](#)

- [137] E. P. Paschalis, F. Betts, E. DiCarlo, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey. FTIR microspectroscopic analysis of human iliac crest biopsies from untreated osteoporotic bone. *Calcified tissue international*, 61(6) :487–492, 1997. [37](#)
- [138] E. P. Paschalis, F. Betts, E. DiCarlo, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey. FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcified tissue international*, 61(6) :480–486, 1997. [37](#)
- [139] R. K. Nalla, J. J. Kruzic, J. H. Kinney, M. Balooch, J. W. Ager, and R. O. Ritchie. Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Materials Science and Engineering : C*, 26(8) :1251–1260, September 2006. [37](#)
- [140] P. Roschger, S. Rinnerthaler, J. Yates, G. A. Rodan, P. Fratzl, and K. Klaushofer. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone in osteoporotic women. *Bone*, 29 :185–191, 2001. [43](#), [53](#), [62](#)
- [141] G Boivin, P Chavassieux, A Santora, J Yates, and P Meunier. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*, 27 :687–694, 2000.
- [142] S. Gamsjaeger, B. Hofstetter, E. Zwettler, R. Recker, J. A. Gasser, E. F. Eriksen, K. Klaushofer, and E. P. Paschalis. Effects of 3 years treatment with once-yearly zoledronic acid on the kinetics of bone matrix maturation in osteoporotic patients. *Osteoporosis International*, 24 :339–347, 2013. [43](#)
- [143] P. Sarathchandra, M. V. Kayser, and S. Y. Ali. Abnormal mineral composition of osteogenesis imperfecta bone as determined by electron probe x-ray microanalysis on conventional and cryosections. *Calcified tissue international*, 65(1) :11–15, 1999. [43](#), [62](#)
- [144] A. Carden, R. M. Rajachar, M. D. Morris, and D. H. Kohn. Ultrastructural changes accompanying the mechanical deformation of bone tissue : A raman imaging study. *Calcified Tissue International*, 72(2) :166–175, February 2003. [43](#)
- [145] J. Currey. Incompatible mechanical properties in compact bone. *Journal of Theoretical Biology*, 231(4) :569–580, December 2004. [43](#)
- [146] J. D Currey, K. Brear, and P. Zioupos. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *Journal of Biomechanics*, 29 :257–260, 1996. [43](#)
- [147] P. Sarathchandra, J. P. Cassella, and S. Y. Ali. Ultrastructural localization of proteoglycans in bone in osteogenesis imperfecta as demonstrated by cuproinic blue staining. *Journal of bone and mineral metabolism*, 20(5) :288–293, 2002. [45](#)

- [148] O. Akkus, F. Adar, and M. B. Schaffler. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, 34(3) :443–453, March 2004. [45](#)
- [149] J. S. Yerramshetty and O. Akkus. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone*, 42(3) :476–482, March 2008. [45](#)
- [150] X. Bi, C. A. Patil, C. C. Lynch, G. M. Pharr, A. Mahadevan-Jansen, and J. S. Nyman. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. *Journal of Biomechanics*, 44(2) :297–303, January 2011. [45](#)
- [151] J. G. Ramasamy and O. Akkus. Local variations in the micromechanical properties of mouse femur : The involvement of collagen fiber orientation and mineralization. *Journal of Biomechanics*, 40(4) :910–918, January 2007.
- [152] N. B. Kavukcuoglu, E. Arteaga-Solis, S. Lee-Arteaga, F. Ramirez, and A. B. Mann. Nanomechanics and raman spectroscopy of fibrillin 2 knock-out mouse bones. *Journal of Materials Science*, 42(21) :8788–8794, July 2007. [45](#)
- [153] D. P. Nicoletta, D. E. Moravits, A. M. Gale, L. F. Bonewald, and J. Lankford. Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 39(9) :1735–1743, January 2006. [63](#)
- [154] Y. L. Ma, R. C. Dai, Z. F. Sheng, Y. Jin, Y. H. Zhang, H. J. Fang, L. N. and Fan, and E. Y. Liao. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *Journal of Biomechanics*, 41(6) :1324–1332, January 2008. [63](#), [64](#)
- [155] S. Qiu, D. Sudhaker Rao, D. P. Fyhrie, S. Palnitkar, and A. M. Parfitt. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. *Bone*, 37(1) :10–15, July 2005. [63](#)
- [156] D. Vashishth, O. Verborgt, G. Divine, M. B. Schaffler, and D. P. Fyhrie. Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. *Bone*, 26(4) :375–380, 2000. [64](#)
- [157] X. N. Dong, M. Zoghi, Q. Ran, and X. Wang. Collagen mutation causes changes of the microdamage morphology in bone of an OI mouse model. *Bone*, 47(6) :1071–1075, December 2010.
- [158] Y. Carter, C. D. L. Thomas, J. G. Clement, A. G. Peele, K. Hannah, and D. M. L. Cooper. Variation in osteocyte lacunar morphology and density in the human femur - a synchrotron radiation micro-CT study. *Bone*, 52(1) :126–132, January 2013. [63](#)

- [159] M. Rumpler, T. Würger, P. Roschger, E. Zwettler, H. Peterlik, P. Fratzl, and K. Klaushofer. Microcracks and osteoclast resorption activity in vitro. *Calcified Tissue International*, 90(3) :230–238, March 2012. [71](#), [86](#)
- [160] D. O. Costa, P. D.H. Prowse, T. Chrones, S. M. Sims, D. W. Hamilton, A. S. Rizkalla, and S. J. Dixon. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*, 34(30) :7215–7226, October 2013. [71](#), [85](#)
- [161] M. Krukowski and A. J. Kahn. Inductive specificity of mineralized bone matrix in ectopic osteoclast differentiation. *Calcified tissue international*, 34(1) :474–479, 1982. [85](#)
- [162] S. A. Reid. Effect of mineral content of human bone on in vitro resorption. *Anatomy and embryology*, 174 :225–234, 1986. [86](#)
- [163] D. P. Nicolella, A. E. Nicholls, J. Lankford, and D. T. Davy. Machine vision photogrammetry : a technique for measurement of microstructural strain in cortical bone. *Journal of biomechanics*, 34(1) :135–139, 2001. [93](#), [96](#), [98](#)
- [164] M. Grédiac, F. Pierron, S. Avril, and E. Toussaint. The virtual fields method for extracting constitutive parameters from full-field measurements : a review. *Strain*, 42(4) :233–253, 2006. [93](#), [94](#), [101](#)
- [165] M. Grédiac, E. Toussaint, and F. Pierron. Special virtual fields for the direct determination of material parameters with the virtual fields method. principle and definition. *International Journal of Solids and Structures*, 39(10) :2691–2705, 2002. [94](#)
- [166] S. Avril, M. Grédiac, and F. Pierron. Sensitivity of the virtual fields method to noisy data. *Computational Mechanics*, 34(6) :439–452, November 2004. [94](#)
- [167] F. Pierron and M. Grédiac. Identification of the through-thickness moduli of thick composites from whole-field measurements using the iosipescu fixture : theory and simulations. *Composites Part A : Applied Science and Manufacturing*, 31(4) :309–318, 2000. [94](#), [101](#)
- [168] R. Moulart, S. Avril, and F. Pierron. Identification of the through-thickness rigidities of a thick laminated composite tube. *Composites Part A : Applied Science and Manufacturing*, 37(2) :326–336, February 2006. [94](#)
- [169] H. Chalal, S. Avril, F. Pierron, and F. Meraghni. Experimental identification of a nonlinear model for composites using the grid technique coupled to the virtual fields method. *Composites Part A : Applied Science and Manufacturing*, 37(2) :315–325, February 2006. [94](#)

- [170] S. Avril, F. Pierron, M. A. Sutton, and J. Yan. Identification of elasto-visco-plastic parameters and characterization of lüders behavior using digital image correlation and the virtual fields method. *Mechanics of Materials*, 40(9) :729–742, September 2008. [94](#)
- [171] S. Avril, P. Badel, and A. Duprey. Anisotropic and hyperelastic identification of in vitro human arteries from full-field optical measurements. *Journal of Biomechanics*, 43(15) :2978–2985, November 2010. [94](#), [101](#), [117](#)
- [172] A. Germaneau, P. Doumalin, and J-C. Dupré. Comparison between x-ray micro-computed tomography and optical scanning tomography for full 3d strain measurement by digital volume correlation. *NDT & E International*, 41(6) :407–415, September 2008. [95](#), [97](#)
- [173] A. Germaneau, P. Doumalin, and J. C. Dupré. Full 3d measurement of strain field by scattered light for analysis of structures. *Experimental Mechanics*, 47(4) :523–532, July 2007. [95](#), [97](#)
- [174] S. Cooreman, D. Lecompte, H. Sol, J. Vantomme, and D. Debruyne. Identification of mechanical material behavior through inverse modeling and DIC. *Experimental Mechanics*, 48(4) :421–433, August 2008. [96](#)
- [175] P. Sztetek, M. Vanleene, R. Olsson, R. Collinson, A. A. Pitsillides, and S. Shefelbine. Using digital image correlation to determine bone surface strains during loading and after adaptation of the mouse tibia. *Journal of Biomechanics*, 43(4) :599–605, March 2010. [96](#), [116](#)
- [176] Y. Barranger, P. Doumalin, J. C. Dupre, and A. Germaneau. Strain measurement by digital image correlation : influence of two types of speckle patterns made from rigid or deformable marks. *Strain*, 48 :357–365, 2011. [96](#), [97](#)
- [177] K. Triconnet, K. Derrien, F. Hild, and D. Baptiste. Parameter choice for digital image correlation. *Optics and Lasers in Engineering*, 47 :728–737, 2009. [97](#)
- [178] N. Bretagne, V. Valle, and Dupré J. C. Development of the marks tracking technique for strain field and volume variation measurements. *NDT&E International*, 38 :290–298, 2005. [97](#)
- [179] M. A. Sutton, J. H. Yan, S. Avril, F. Pierron, and S. M. Adeb. Identification of heterogeneous constitutive parameters in a welded specimen : Uniform stress and virtual fields methods for material property estimation. *Experimental Mechanics*, 48(4) :451–464, August 2008. [101](#)

- 
- [180] E. Toussaint, M. Grédiac, and F. Pierron. The virtual fields method with piecewise virtual fields. *International Journal of Mechanical Sciences*, 48(3) :256–264, March 2006. [101](#)
- [181] F. Pierron and M. Grédiac. *The Virtual Fields Method Extracting constitutive mechanical parameters from full-field deformation measurements*. NY Springer, 2012. [101](#), [117](#)
- [182] L. Cyganik, M. Binkowski, G. Kokot, T. Rusin, P. Popik, F. Bolechala, R. Nowak, Z. Wrobel, and A. John. Prediction of young’s modulus of trabeculae in microscale using macro-scale’s relationships between bone density and mechanical properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 36 :120–134, August 2014. [116](#)
- [183] S. P. Väänänen, S. Amin Yavari, H. Weinans, A. A. Zadpoor, J. S. Jurvelin, and H. Isaksson. Repeatability of digital image correlation for measurement of surface strains in composite long bones. *Journal of Biomechanics*, 46(11) :1928–1932, July 2013. [116](#)
- [184] J. Y. Rho, P. Zioupos, J. D. Currey, and G. M. Pharr. Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *Journal of Biomechanics*, 35(2) :189–198, 2002. [117](#)
- [185] S. Avril, J. M. Huntley, F. Pierron, and D. D. Steele. 3d heterogeneous stiffness reconstruction using mri and the virtual fields method. *Experimental Mechanics*, 48(4) :479–494, August 2008. [117](#)

## Annexe A

# Principe de la méthode des champs virtuels et démonstration de l'équivalence de la méthode d'analyse inverse utilisée et de la méthode des champs virtuels

De manière générale, si on considère un solide quelconque  $S$  (fig. A.1) sur lequel s'applique des forces extérieures sur une partie de sa surface  $S_f$ , et dont on connaît le déplacement d'une autre partie de sa surface  $S_u$ , la formulation faible du principe des champs virtuels s'écrit :

$$-\int_V \underline{\underline{\sigma}} : \underline{\underline{\epsilon}}^* dV + \int_{S_f} \underline{T} \cdot \underline{u}^* dS + \int_V \underline{b} \cdot \underline{u}^* dV = \int_V \rho \underline{a} \cdot \underline{u}^* dV \quad (\text{A.1})$$

Où  $\underline{\underline{\sigma}}$  est le tenseur contrainte,  $\underline{T}$  le tenseur des forces qui s'appliquent sur  $S_f$ ,  $\rho$  la densité,  $\underline{a}$  l'accélération,  $\underline{b}$  les forces volumiques appliquées,  $\underline{u}^*$  le déplacement virtuel et  $\underline{\underline{\epsilon}}^*$  la déformation virtuelle.

Le déplacement virtuel  $\underline{u}^*$  est dit cinématiquement admissible (CA) s'il est nul sur  $S_u$ , il est également requis qu'il soit  $C_0$ . Ce déplacement virtuel  $\underline{u}^*$  est mesuré une fois la force appliquée et est souvent perçu comme une variation du déplacement réel. Attention, ces quantités virtuelles sont purement mathématiques et ne doivent pas être confondues avec les quantités réelles.

L'équation générale est très souvent réduite, par exemple quand on se restreint à un problème statique sans force volumique extérieure.

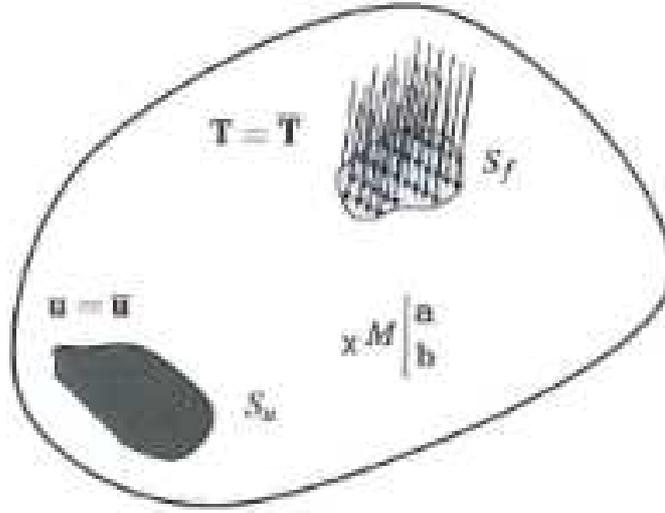


FIGURE A.1 – Solide quelconque avec une zone  $S_f$  où le chargement est imposé et une zone  $S_u$  où le déplacement est imposé (reprise du 1 du livre Pierron F, Grédiac M. The Virtual Fields Method, Extracting constitutive mechanical parameters from full-field deformation measurements).

$$-\int_V \underline{\underline{\sigma}} : \underline{\underline{\epsilon}}^* dV + \int_{S_f} \underline{T} \cdot \underline{u}^* dS = 0 \quad (\text{A.2})$$

Où le premier terme décrit les efforts intérieurs et le second terme les efforts extérieurs. Une loi de comportement est ensuite introduite. Elle est choisie a priori en fonction de la nature du problème. Cette loi sera par exemple la loi de Hooke généralisée dans un problème élastique linéaire comme le nôtre. L'équation qui en résulte est vérifiée pour tout champ virtuel cinématiquement admissible, cette infinité de solutions permet d'en choisir une en particulier qui simplifie la résolution du problème, le choix des champs virtuels utilisés est assez libre, il faut juste qu'ils soient cinématiquement admissibles, qu'ils prennent en compte la géométrie du problème et qu'ils donnent lieu à des équations indépendantes. Il faut prendre au minimum autant de champs virtuels que de paramètres inconnus. Il en résulte un système de la forme  $AQ=B$  où  $Q$  contient les inconnues du problème et il suffit d'inverser le système pour les retrouver. Mais un choix astucieux de champs virtuels, appelés champs virtuels spéciaux, permet une détermination directe de  $Q$ . En effet, même s'ils peuvent aussi être trouvés intuitivement, ils ne sont souvent pas optimaux, alors qu'ils peuvent être choisis de manière à diminuer le temps de calcul et minimiser le bruit du aux mesures, c'est notamment le cas des champs virtuels définis par morceaux. Ce choix des champs virtuels est donc un point critique de cette méthode.

Pour retrouver l'équation utilisée dans ce manuscrit il suffit de diviser notre échantillon en 3 parties et de considérer  $u_1^* = 0$  sur le bord non mobile,  $u_1^* = x_1$  dans la partie centrale et  $u_1^* = L$ , la longueur de l'échantillon, sur le bord mobile (fig. A.2).

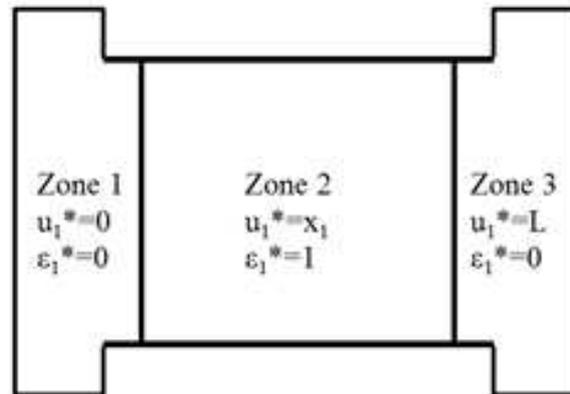


FIGURE A.2 – Echantillon et mors séparés en trois zones.

L'équation A.1 revient donc à :

$$\int_{\text{zone 2}} \sigma_{11} dV = L \int_{\text{frontiere 3}} \underline{T} dS = 0 \quad (\text{A.3})$$

Soit :

$$e \int_{\text{zone 2}} \sigma_{11} dS = L F \quad (\text{A.4})$$

Nous avons ainsi montré l'équivalence entre la méthode d'analyse inverse utilisée au chapitre 5 et la méthode des champs virtuels.

