



ÉCOLE
CENTRALE LYON

N°d'ordre NNT : xxx

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de l'École centrale de Lyon

ÉCOLE DOCTORALE N° 162
MÉCANIQUE – ÉNERGETIQUE - GÉNIE CIVIL - ACOUSTIQUE

SPÉCIALITÉ DE DOCTORAT : BIOMÉCANIQUE

Soutenue prévue le 21/11/2017, par :
Agathe OGIER, épouse ECHARD

Caractérisation multi-échelle du tissu osseux
Application à l'ostéogénèse imparfaite

Devant le jury composé de :

Dr Morad BENSIDHOUM	B2OA	Rapporteur
Dr Martine PITHIOUX	Université d'Aix Marseille	Rapporteur
Pr Catherine CHAUSSAIN	Université Paris Descartes – AP/HP	Examineur
Dr Jean-Charles AURÉGAN	AP/HP	Examineur
Pr Thierry HOC	École Centrale de Lyon	Directeur de thèse
Dr Pierre JURDIC	ENS Lyon	Invité

Résumé de la thèse

L'ostéogénèse imparfaite(OI) est une maladie génétique rare qui se caractérise, entre autres, par une fragilité accrue des os. Des analyses du génome des patients atteints ont permis d'identifier les mutations qui déclenchaient ce principal symptôme. Pour le tissu osseux, la difficulté dans la compréhension de cette pathologie réside dans la structure multi-échelle du tissu osseux et dans son caractère de tissu vivant renouvelé par le remodelage osseux.

Dans cette thèse, nous avons donc dans un premier temps étudié l'impact des différentes mutations sur la structure nanoscopique du tissu osseux de patients OI. Pour ce faire, une technique d'exploration des propriétés physico-chimiques a été développée. Plus particulièrement, nous avons pu mesurer l'apport de la spectroscopie Raman à l'étude du tissu osseux. Cela a permis d'identifier différentes conséquences sur le tissu osseux créées par des mutations touchant des protéines impliquées dans le métabolisme osseux. Ainsi, du point de vue de la spectroscopie Raman, trois groupes de mutations sont dissociables :

- les mutations touchant directement le collagène et ses modifications (OI type génétique III, VII et VIII),
- les mutations causant l'OI de type VI qui se caractérise par une hyperminéralisation due à une sous production de collagène,
- les mutations causant l'OI de type XI qui se caractérise par un taux de substitution en carbonate plus important que la moyenne traduisant un taux de remodelage plus faible.

Dans un second temps, l'aspect vivant du tissu osseux a été étudié avec l'étude de la phase de résorption du remodelage osseux. Il a ainsi été montré que les cellules osseuses qui résorbaient la matrice osseuse n'agissaient pas de manière aléatoire, mais qu'elles ciblaient les zones aux propriétés mécaniques et minérales les plus faibles. Ce comportement étudié d'abord sur du tissu osseux adulte sain a été aussi observé sur les os des patients souffrant d'OI. La pathologie n'a pas modifié qualitativement ce comportement.

Mots clés

Ostéogénèse imparfaite, spectroscopie Raman, remodelage osseux, nano-indentation, interférométrie

Abstract

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare genetic disease, whose main feature is more brittle bone. Genetic analysis identified mutations making the bone more prone to fracture. As the bone is a multistructural material, while also being a living tissue, the symptoms and consequences of the disease are numerous.

During this thesis, the focus was made on a first approach on the differences of nanostructures between the various mutations causing OI. More specifically, a new use of Raman spectroscopy was made in order to study the collagenic matrix as well as the mineral component. It was found that mutations could be gathered in three groups:

- Mutations implied directly in the collagen synthesis and in its early modification (OI genetical type III, VII et VIII),
- Mutations implied directly in the mineralization of the collagenic matrix, with an hypermineralization of this matrix (OI genetical type VII),
- Mutations causing OI genetical type XI, characterized by a high rate of carbonate substitution, implying a low remodeling rate.

On the other hand, the living aspect of bone tissue was studied, with a focus made on the resorption phase of the remodeling cycle. It was found on healthy adults bone that the cells were not behaving randomly, but target osteons with lower mechanical and mineral properties.

Moreover, the behavior of those cells is not altered by OI: it was found that the cells had the same not-random behavior on bone of OI patients

Keywords

Osteogenesis imperfecta, Raman spectroscopy, bone remodeling, nano-indentation, interferometry

Tables des matières

Résumé de la thèse	3
Mots clés.....	3
Abstract	4
Keywords	4
Tables des matières	5
Introduction.....	9
1 Bibliographie.....	13
Résumé.....	13
1.1 L'os, un tissu vivant	14
1.1.1 Les fonctions de l'os	14
1.1.2 Structure multi échelle	15
1.1.3 Propriétés mécaniques de l'os	19
1.1.4 Modelage et remodelage de la construction osseuse	23
1.1.5 Conclusion	27
1.2 Une pathologie du métabolisme osseux, l'ostéogénèse imparfaite	28
1.2.1 Historique.....	29
1.2.2 Typologies de l'ostéogénèse imparfaite	29
1.2.3 Une pathologie à plusieurs échelles	32
1.2.4 Traitements	37
1.2.5 Conclusion	40
Conclusion	41
Partie A : Étude du tissu osseux de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite, intérêt de la spectroscopie Raman	43
2 Apport de la spectroscopie Raman à l'étude des tissus osseux.....	45
Résumé.....	45
2.1 Caractérisation de la micro-structure	46

2.2	Caractérisation de la microstructure de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)	48
2.2.1	Principe du MEB	48
2.2.2	Protocole expérimental	48
2.3	Caractérisation mécanique locale par nano-indentation.....	50
2.4	Caractérisation des propriétés physico-chimiques par micro-spectroscopie Raman	53
2.4.1	Introduction	54
2.4.2	Bone structure.....	56
2.4.3	Raman principle and technological solutions	58
2.4.4	Bone spectra.....	61
2.4.5	Biomarkers.....	66
2.4.6	Biomarkers for investigating bone metabolism.....	69
2.4.7	Potential applications to Prognosis, other diseases or conditions.....	73
2.4.8	Key facts of bone metabolism	74
2.4.9	Summary points	75
2.5	Conclusion.....	76
3	Relations entre la mutation génétique et les propriétés biomécaniques des tissus	77
	Résumé.....	77
3.1	Matériel et méthode	78
3.1.1	Préparation des échantillons.....	78
3.1.2	Caractérisation des échantillons osseux.....	78
3.1.3	Les donneurs osseux.....	80
3.1.4	Les mutations.....	81
3.2	Résultats	87
3.2.1	OI versus contrôles	87
3.2.2	Différence au sein du groupe des patients OI	90

3.2.3	Corrélation entre nano-indentation et spectroscopie Raman	100
3.3	Discussion et conclusion	101
3.3.1	Le type génétique III	101
3.3.2	Type VII et VIII	102
3.3.3	Type VI	102
3.3.4	Type XI	103
3.3.5	Corrélation MMR et ratio module de Young sur dureté	104
3.4	Conclusion.....	105
	Transition.....	106
	Partie B : Comportement des ostéoclastes sur le tissu osseux sain et pathologique, application à l'ostéogénèse imparfaite.....	109
4	Comportement des ostéoclastes sur le tissu osseux sain	111
	Résumé.....	111
	Introduction	112
4.1	Étude quantitative de la résorption du tissu osseux humain par des ostéoclastes humains.....	113
4.1.1	Microscale mechanical and mineral heterogeneity of human cortical bone governs osteoclast activity (Pernelle et al., 2017).....	113
4.1.2	Conclusion	131
4.2	Comportement de résorption en fonction du temps.....	132
4.2.1	Description de l'expérience	132
4.2.2	Résultats de l'étude	134
4.2.3	Discussion.....	140
4.2.4	Conclusion	143
	Conclusion	143
5	La résorption du tissu osseux pathologique par les ostéoclastes	145
	Résumé.....	145
	Introduction	146

Déroulé des manipulations	147
5.1 Human osteoclast activity in a patient with osteogenesis imperfecta (OI) type III is governed by the same mechanical properties and mineral heterogeneities as in healthy patients.	148
5.1.1 Abstract.....	148
5.1.2 Introduction	148
5.1.3 Materials and methods.....	150
5.1.4 Results	152
5.1.5 Discussion.....	154
5.1.6 Conclusion	156
5.2 Discussion et conclusion	157
Conclusion	159
Apport de la spectroscopie Raman à l'étude de l'ostéogénèse imparfaite	159
Relation entre génétique et structure osseuse OI	159
Phénomène de résorption sur les tissus osseux	160
Résorption sur du tissu osseux OI	161
Perspectives	161
Références	163
Table des illustrations	187
Table des tableaux.....	191

Introduction

Assez dramatiquement et ironiquement, en médecine, c'est souvent l'étude des maladies qui a permis de mieux comprendre le fonctionnement du corps humain. Par l'étude des anomalies du métabolisme, les médecins ont pu découvrir des mécanismes subtils et complexes qui permettent aux organismes d'être fonctionnels. Mais dans les cas des maladies génétiques une fois ces mécanismes découverts les patients ne peuvent être guéris. La plupart du temps, le seul traitement disponible est un traitement symptomatique et non curatif, comme par exemple pour les patients souffrant d'hémophilie, voire un traitement palliatif comme pour la mucoviscidose.

C'est le cas également de l'ostéogénèse imparfaite, plus communément appelée *maladie des os de verre*, maladie rare puisque seuls 75 nouveaux cas sont répertoriés chaque année en France. Bien que rare, elle a une large place dans l'imaginaire collectif. On peut citer entre autres : *Amélie Poulain* (Jean-Pierre Jeunet), *Incassable* (Mr Night Shyamalan), ou plus récemment en France, l'humoriste Guillaume Bats, qui parle de sa pathologie sur scène. Le grand public a donc connaissance de cette maladie grave, mais du point de vue de la recherche, tous les mécanismes déclenchant cette fragilité accrue des os ne sont pas encore élucidés.

En effet, l'os est un organe complexe qui possède une structure très marquée, de l'échelle nanoscopique à l'échelle macroscopique (Rho et al., 1998). Cette structure est ce qui permet d'avoir un squelette léger et résistant. Qui plus est, loin d'être un tissu inerte, il est constamment renouvelé. Bien que ce mécanisme soit lent, il est loin d'être exempt de cellules actives et coordonnées (Dominguez et al., 2011).

Les patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite peuvent avoir des mutations qui touchent la base même de la structure osseuse. Le gène du collagène est par exemple touché dans 90% des cas (Patel et al., 2015). Ces mutations entraînent l'altération du métabolisme osseux à de nombreuses échelles. Cependant, le collagène n'est pas la seule protéine causant cette maladie. Les progrès récents en séquençage génétique ont permis d'en découvrir de nouvelles impliquées dans l'ostéogénèse. Modifiées ces protéines, entraînent la maladie des os de verre (Kang et al., 2016).

Durant cette thèse, nous nous sommes interrogés sur le rôle de la nanostructure osseuse et l'influence de la maladie sur les propriétés mécaniques et chimiques mais aussi sur le comportement des cellules. Cette thèse se compose donc de deux parties distinctes.

La première grande partie porte sur l'étude du tissu osseux des patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite, et sur l'apport des techniques de spectroscopie. Plus précisément, est-il possible de détecter des modifications de structure causées par l'ostéogénèse imparfaite et leurs impacts sur la physiologie de l'os en analysant les résultats de spectrographie Raman ?

Pour ce faire, une première étape a été de mettre au point une technique d'analyse du tissu osseux à l'échelle nanoscopique grâce à la spectroscopie Raman. Cette technique apporte des informations sur les composants à l'échelle du nanomètre et sur leur organisation. De plus, sa mise en application est facilitée par le fait qu'elle ne nécessite aucune préparation particulière du tissu.

Dans une seconde étape, nous nous sommes focalisés sur les conséquences des différentes mutations possibles causant la maladie des os de verre, en corrélant les types génétiques et les propriétés biomécaniques des tissus. En effet, on sait que les différentes mutations touchant les patients peuvent avoir des conséquences sur :

- la synthèse du collagène et de sa structure,
- la minéralisation de l'os,
- la modification du collagène,
- le traitement du collagène et de ses liaisons,
- la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes.

L'objectif est de voir si une mutation différente se traduit par des propriétés biomécaniques différentes.

Dans une seconde grande partie, nous avons pris en compte l'aspect vivant du tissu osseux et nous nous sommes plus précisément focalisés sur la seconde partie du cycle de remodelage.

Dans ce but, nous avons choisi d'étudier à la surface d'os sains le comportement de cellules osseuses résorbantes : les ostéoclastes. L'analyse des schémas de résorption et les propriétés des zones résorbées ont été mises en relation.

Par la suite, le comportement de ces cellules a également été observé à la surface d'os de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite afin de comprendre l'influence de la structure pathologique sur les mécanismes cellulaires. Ayant une nanostructure différente de celles des patients sains, il était intéressant de voir si les cellules étaient sensibles à ces modifications et si leur comportement cellulaire s'en trouvait altéré.

Pour finir, les conclusions de ce travail de thèse sont énoncées. Cette dernière partie est aussi l'occasion de décrire les perspectives qu'ouvrent ces études.

1 Bibliographie

Résumé

L'os, tissu vivant, est un matériau composite anisotrope doté d'une structure complexe à de multiples échelles (nanoscopique, microscopique, macroscopique). Cette organisation lui confère des rôles multiples dans l'organisme de par ses propriétés mécaniques et chimiques.

L'une de ses principales fonctions est la résistance mécanique. L'os peut résister à des chocs répétés qui sont produits durant la marche ou des chocs violents, tels que les sauts, sans se fracturer. Par ailleurs, l'os bénéficie d'un processus cellulaire complexe et efficace, appelé remodelage osseux, qui lui permet de se réparer et d'adapter sa structure aux sollicitations physiologiques et mécaniques de son environnement tout en restant léger.

Lorsque le métabolisme osseux est perturbé, une altération des propriétés mécaniques de l'os apparaît. A l'instar de l'ostéogénèse imparfaite, les propriétés mécaniques sont altérées, ce qui est dû dans la plupart des cas à une mutation sur le gène codant la protéine de collagène, un des constituants de base de l'os. Ces mutations entraînent une production anormale du collagène, soit quantitativement, soit qualitativement. D'autres mutations, touchant des protéines impliquées dans la minéralisation, ont pour conséquences de perturber le métabolisme osseux. Ainsi, les patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite ont une fragilité accrue des os qui les rend plus susceptibles à la fracture.

1.1 L'os, un tissu vivant

L'image d'Épinal de l'os le décrit comme un tissu inerte, simple avec comme unique fonction celle de supporter les muscles autorisant ainsi les mouvements. Pourtant, l'os remplit de nombreuses autres fonctions essentielles dont un rôle mécanique complexe. Ce rôle paraît évident, mais comme pour la plupart des tissus du corps humain, c'est le fruit d'un processus continu, complexe et perfectionné qui permet d'aboutir à des propriétés mécaniques exceptionnelles.

1.1.1 Les fonctions de l'os

1.1.1.1 *Support du corps humain*

La première fonction de l'os qui vient à l'esprit est un rôle de support pour l'organisme et le système musculaire. Le squelette protège les organes internes, le système nerveux (crâne, colonne vertébrale), viscéral, et pulmonaire (cage thoracique) grâce aux cavités formées par l'organisation des os entre eux. De par cette carapace interne, le squelette présente une grande mobilité grâce aux articulations facilitant le mouvement entre les segments corporels différents.

1.1.1.2 *Rôles physiologiques*

Les os assurent d'une part l'homéostasie des minéraux en régulant le calcium, ou le phosphore, et influencent aussi l'équilibre acido-basique de la circulation sanguine. Cette régulation permet un apport ou une baisse des minéraux dans le reste du sang humain.

D'autre part, c'est au sein de l'os, et plus particulièrement dans la moelle osseuse, que les cellules hématopoïétiques (les cellules sanguines) sont stockées et se développent (Clarke, 2008).

1.1.1.3 *Résistance aux chocs*

Les os allient des propriétés structurales très intéressantes qui peuvent paraître contradictoires : une légèreté limitant les dépenses trop importante d'énergie lors de la pratique d'activités, mais également une très grande résistance (Gibson, 2005) lui permettant de subir des chocs répétés provoqués par la marche ou la course sans se fissurer. Sa structure s'adapte aux sollicitations (Loi de Wolff), c'est ce que l'on appelle le remodelage osseux.

Ces fonctionnalités sont possibles grâce à sa structure multi-échelle et aux processus cellulaires complexes se déroulant au sein de celui-ci (Bala and Seeman, 2015; Rho et al., 1998).

1.1.2 Structure multi échelle

Au sein du squelette, les 200 os sont classés selon quatre catégories : les os plats (l'omoplate), les os longs (le fémur), les os courts (les carpes) et les os sésamoïdes (la rotule). Par la suite, seule la structure des os longs sera étudiée.

1.1.2.1 Échelle macroscopique

Les os longs sont composés d'une diaphyse, un long tube creux, encadré à ses extrémités par deux métaphyses, structure en forme de cône évasé, qui s'arrondissent pour devenir des épiphyses au bout de l'os. À l'interface entre épiphyse et métaphyse se trouvent les plaques de croissance osseuse ou cartilages de croissance, présents jusqu'à la fin de la puberté, qui sont les zones où ont lieu la croissance par ossification endochondrale (Figure 1-1).

Cette diaphyse, ou cortex osseux, est essentiellement constituée d'os très dense, l'os cortical. La métaphyse et l'épiphyse sont composées en leur cœur d'os trabéculaire ou spongieux, un réseau alvéolaire osseux, entouré d'une couche d'os cortical puis recouvert de cartilage (Clarke, 2008).

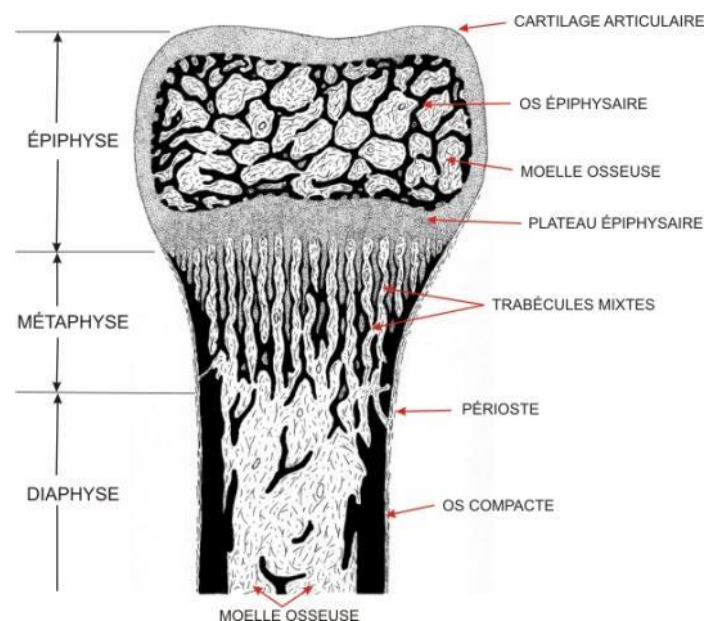


Figure 1-1 Organisation d'un os long au niveau macroscopique (Histology Atlas, by Yves Clermont, Michael Lalli & Zsuzsanna Bencsath-Makkai)

L'os cortical, représentant 80% du tissu osseux, est plus résistant aux chocs. L'os trabéculaire, de par sa structure alvéolaire, constituant les 20% restants de l'os, permet de répartir les charges appliquées sur l'os cortical. Les deux sortes de tissus osseux, n'ont pas la même organisation, ce qui se traduit en terme de porosité. Pour un adulte sain, l'os cortical a une porosité comprise entre 8 et 12 % tandis que l'os trabéculaire a une porosité qui peut monter jusqu'à 80%. La porosité de l'os cortical est principalement due à une sous structure osseuse nommée ostéon. Dans la suite de cette étude bibliographique, seules les structures et les propriétés propres à l'os cortical seront décrites.

1.1.2.2 Échelle ostéonale et microscopique

Les os corticaux sont organisés en ostéons entourés d'un tissu interstitiel. L'ostéon est une longue structure concentrique et tubulaire, de 10 à 500 μm de diamètre, et de 2,5 mm de long (Cowin, 2001) orientée dans l'axe longitudinale de l'os. Ces tubes sont composés de lamelles organisées concentriquement autour des canaux de Havers, à travers lesquels circulent les vaisseaux sanguins. Transversalement, des canaux dits de Volkmann, relient les canaux de Havers entre eux (Figure 1-2). Ces deux structures (Canaux de Havers et de Volkmann) constituent la majorité de la porosité intra corticale dont il sera question dans les chapitres suivants.

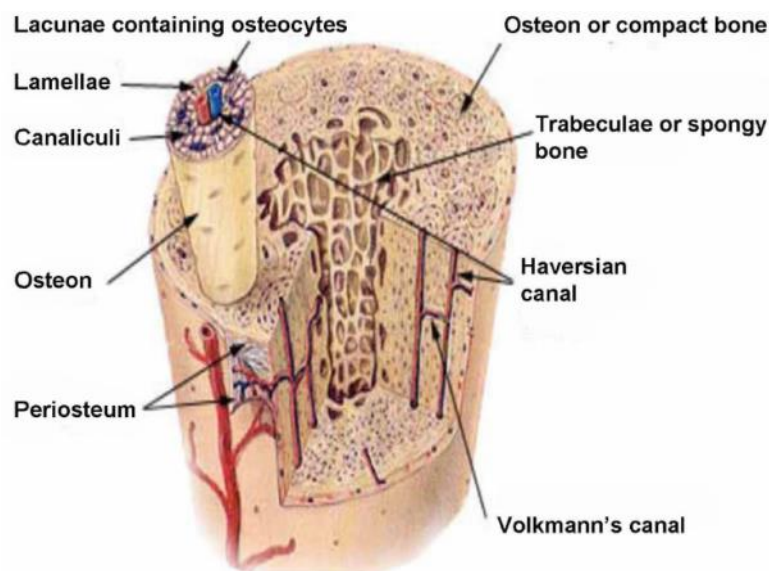


Figure 1-2 Organisation de l'épiphyse d'un os long autour des canaux de Havers et de Volkmann (Cowin and Cardoso, 2015)

Ces lamelles, constituant les ostéons, de 3 à 7 μm d'épaisseur, sont constituées de fibres de collagène minéralisées (Vaughan et al., 2012) toutes orientées dans la même direction au sein d'une même lamelle. Les lamelles ont des directions différentes au sein de l'ostéon (Kazanci et al., 2006), créant quant à elles une structure stratifiée (Hengsberger et al., 2002) qui augmente la résistance de l'os aux fractures (Figure 1-3).

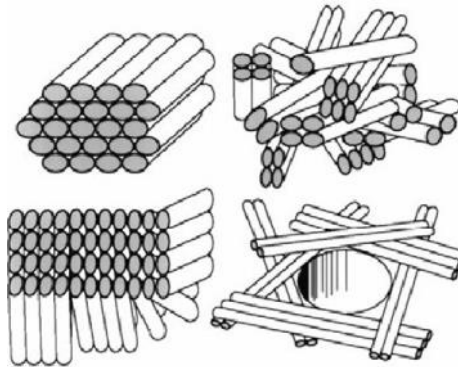


Figure 1-3 Organisation en lamelles de directions différentes des fibrilles de collagène minéralisé (extrait de Weiner (Weiner et al., 1999))

1.1.2.3 Échelle nanoscopique

Les fibrilles sont elles-mêmes un assemblage de fibres de collagènes minéralisées. Cet assemblage très régulier est constitué de molécules de collagène (300 nm de long et de 1,23 nm de diamètre), avec une périodicité de 67 nm : 40 nm de vide et 27 nm de superposition (Figure 1-4). Ces molécules de collagène de type I sont constituées de 3 protéines en hélice, les tropocollagènes : deux hélices $\alpha 1$ et une hélice $\alpha 2$.

Ces molécules de collagène constituent 90% des protéines présentes dans l'os, les 10% restant sont des molécules non collagéniques : l'ostéopontine, l'ostéocalcine, ostéonectine ou les protéoglycanes.

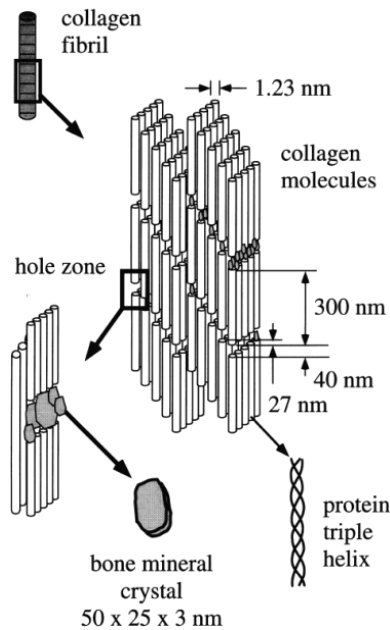


Figure 1-4 Organisation d'une fibre de collagène au sein de l'ostéon au niveau nanoscopique (Rho et al., 1998)

Dans les espaces vides laissés par les protéines de collagène sont insérées des plaquettes d'hydroxyapatite d'environ $50 \times 25 \times 3 \text{ nm}^3$, occupant près de 95 % de l'espace disponible, dont la direction principale est celle des molécules de collagène (Bala et al., 2013). Le dernier constituant de base de l'os est l'eau, dont la proportion en masse dans l'os, variant entre 10 et 20 % (Ong et al., 2012).

L'os est un constituant multi échelles composé de différentes molécules organisées entre elles comme le résume la Figure 1-5. Ces structures sont à l'origine de la résistance osseuse et de ses propriétés anisotropes.

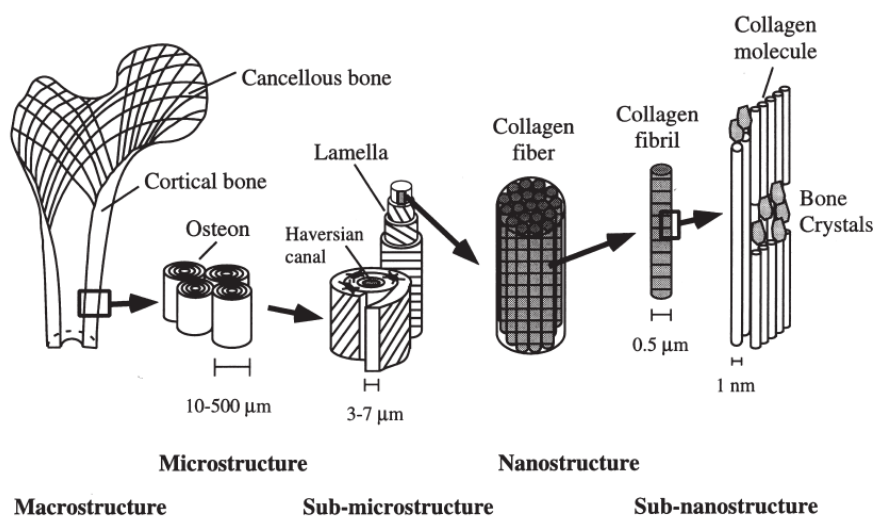


Figure 1-5 Représentation des six niveaux d'organisation de l'os lui permettant de remplir chacun de ses rôles : de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. (Rho et al., 1998)

1.1.3 Propriétés mécaniques de l'os

L'os étant un matériau composite, ses propriétés sont fonction de celles de ses constituants de base, le collagène et l'hydroxyapatite, et de leurs arrangements. Cependant, il faut d'abord préciser de quelles propriétés il sera question et dans quel contexte celles-ci seront évaluées.

1.1.3.1 Terminologie des propriétés mécaniques

Pour parler des propriétés mécaniques, il existe plusieurs notions présentant chacune un aspect de la mécanique de l'os :

- le module de Young : mesure de la rigidité ou de l'élasticité de l'os,
- la ténacité : mesure de l'énergie que l'os peut absorber avant de casser,
- La contrainte ultime : mesure de la résistance de l'os à la rupture,
- La dureté : mesure de la résistance relative qu'oppose la surface à la pénétration d'un corps plus dur (Zysset et al., 1999),
- le coefficient de Poisson : mesure la contraction de la matière dans la direction orthogonale à l'effort appliqué.

Par ailleurs, comme de nombreux matériaux, l'os n'a pas les mêmes propriétés mécaniques en traction, compression ou en torsion. Enfin, du fait de sa structure très organisée, l'os ne réagit pas de la même manière selon qu'il soit sollicité longitudinalement, radialement ou transversalement. Ce comportement est appelé anisotropie du matériau.

Du fait de sa structure multi-échelle, donner dans l'absolu une valeur aux différentes propriétés mécaniques est réducteur. Les valeurs qui seront présentées par la suite seront donc des valeurs mesurées à l'échelle du micromètre. Par ailleurs, la composition exacte de l'os varie selon les espèces et les types d'os étudiés (Currey, 2013) : seules les valeurs pour l'os cortical humain seront étudiées. Enfin, comme toutes les mesures dans ce travail de thèse ont été effectuées par nanoindentation, nous ne présenterons que les résultats obtenus par cette technique. Ceci implique que les paramètres mécaniques présentés seront le module de Young et la dureté.

En effet, la ténacité et la résistance à la rupture, se mesurent sur des tests menant à la rupture complète du matériau, tandis que le coefficient de Poisson a été supposé égal à 0,3 (Zysset et al., 1999).

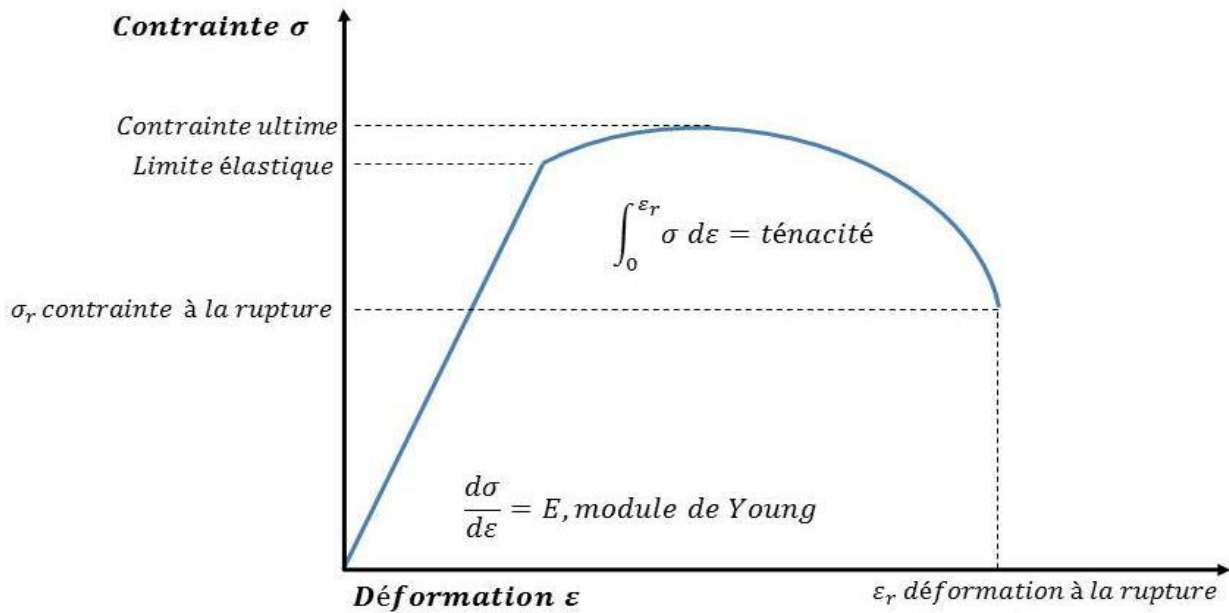


Figure 1-6 Courbe typique de l'os avec les différentes caractéristiques mécaniques : module de Young, limite d'élasticité, ténacité, contrainte ultime, contrainte et déformation à la rupture

1.1.3.2 Module de Young du tissu osseux cortical humain

Les différentes valeurs de module de Young pour des os adultes ont été regroupées dans le Tableau 1-1. La valeur moyenne du module oscille entre 15 et 30 GPa, avec une valeur plus élevée dans le tissu interstitiel. Ce comportement semble logique puisque le tissu interstitiel est constitué d'ostéons plus vieux et donc plus minéralisés, ce qui a été corrélé à une augmentation du module de Young (Bala et al., 2011; Hoc et al., 2006). Il faut noter que les résultats de module de Young sont influencés par l'état dans lequel les échantillons sont testés : en condition physiologique, le module est plus faible que lorsque les os sont secs (Hengsberger et al., 2002). À titre de comparaison, le module de Young du chêne est de 12 GPa, de l'acier 210 GPa. Cette thèse abordant l'ostéogénèse imparfaite, maladie affectant particulièrement les patients jeunes, il est important de disposer de valeurs de références pour les os d'enfants. Ces valeurs sont regroupées dans les deux dernières lignes du tableau ci-après:

Tissu	Module de Young	SD	Référence
Fémur ostéon diaphyse	19,1	5,4	(Zysset et al., 1999)
Fémur TI diaphyse	21,2	5,3	(Zysset et al., 1999)
Fémur ostéon épiphyse	15,8	5,3	(Zysset et al., 1999)
Fémur TI épiphyse	17,5	5,3	(Zysset et al., 1999)
Tibia ostéon	22,5	1,3	(Rho et al., 1997)
Tibia TI	25,8	1,3	(Rho et al., 1997)
Tibia ostéon	16,6	1,5	(Fan et al., 2002)
Tibia TI	19,7	1,5	(Fan et al., 2002)
Fémur lamelles	24-27		(Gupta et al., 2006a)
Fémur TI	30		(Gupta et al., 2006a)
Crête iliaque ostéon et TI	19,41	2,70	(Bala et al., 2011)
Fémur/tibia ENFANT	23,65	1,4	(Fan et al., 2006)
Fémur/tibia ENFANT	20,5	0,5	(Imbert et al., 2014)

Tableau 1-1 Module de Young d'os corticaux humains adultes obtenus par nanoindentation. (SD) standard déviation ; (TI) tissu interstitiel.

L'os est un matériau composite (Dong et al., 2009; Fantner et al., 2006; Wagermaier et al., 2015; Wang et al., 2012), dont les propriétés mécaniques sont fonction de celles du collagène, et de l'hydroxyapatite.

1.1.3.3 Contribution du collagène aux propriétés mécaniques osseuses

Le collagène, malgré son module de Young très faible de 6 MPa, contribue aux propriétés de l'os en augmentant sa capacité à résister à la fracture. C'est-à-dire, en augmentant la ténacité de l'os (Burr, 2002b). En effet, avec l'âge, le collagène produit par les ostéoblastes n'est plus de la même qualité, avec des liaisons enzymatiques et non enzymatiques entre les molécules de collagènes qui ne sont plus présentes dans les mêmes proportions (Karim and Vashishth, 2012; Tang and Vashishth, 2010; Wang et al., 2002).

1.1.3.4 Contribution du minéral aux propriétés mécaniques osseuses

De nombreuses études ont montré la contribution du minéral aux propriétés mécaniques de l'os (Donnelly et al., 2010; Yerramshetty and Akkus, 2008; Zebaze et al., 2011). Une hausse de la minéralisation augmente la force en compression ainsi que la rigidité, mais diminue par ailleurs la ténacité de l'os, le rendant plus fragile (Boivin et al., 2008; Currey et al., 1996; Follet et al., 2004; Roschger et al., 2008a; Yerramshetty and Akkus, 2008).

1.1.3.5 Hétérogénéité du tissu

Les interfaces et les hétérogénéités de ces composants au sein du tissu modifient les propriétés mécaniques (Granke et al., 2016; Poundarik et al., 2012; Tai et al., 2007), augmentant l'énergie nécessaire à la propagation d'une fracture (Bala and Seeman, 2015). De même, à une échelle microscopique, les ostéons ont des propriétés mécaniques hétérogènes (Currey, 1962; Granke et al., 2016; Yamada et al., 2013). En effet, les ostéons ont leur minéralisation qui augmente avec l'âge (Boyce, 2013; Ortner, 1975), minéralisation qui est corrélée aux propriétés mécaniques.

De par ses valeurs de module de Young élevées, l'os est donc un matériau qui résiste à la compression et peut emmagasiner une grande quantité d'énergie par la création de micro fissures avant de fissurer complètement. Malgré cela, il arrive que l'os se fracture, ou subisse des micro-fissures trop nombreuses. L'os doit alors être renouvelé. Ce phénomène est appelé remodelage osseux (Mohsin et al., 2006; Raeisi Najafi et al., 2007; Taylor et al., 2007). L'os est par ce mécanisme une structure vivante qui s'adapte et se répare grâce aux cellules osseuses.

1.1.4 Modelage et remodelage de la construction osseuse

Jusqu'à la fin de la puberté, l'os grandit, grossit longitudinalement et radialement, tout en renouvelant les parties fragilisées grâce au phénomène du modelage osseux. Ce procédé consiste à ajouter ou à supprimer de la matière en réponse à des stimuli mécaniques ou physiologiques afin d'adapter au fur et à mesure sa structure pour mieux répondre et/ou résister à son environnement. Le remodelage osseux, présent à tout âge, est le phénomène de renouvellement du tissu osseux afin de maintenir ses propriétés mécaniques et l'homéostasie en calcium et en phosphate.

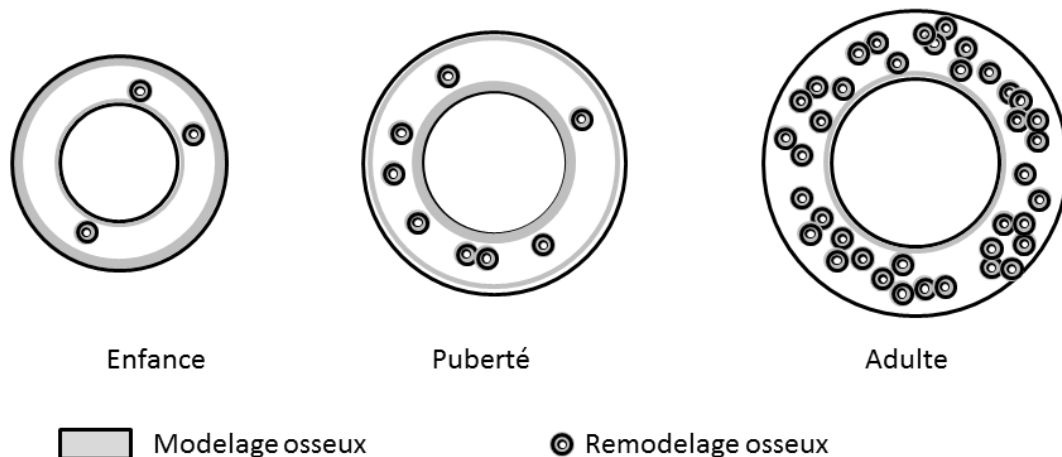


Figure 1-7 Localisation du modelage et du remodelage osseux, coupe transversale de la diaphyse d'un os long

1.1.4.1 La première construction osseuse, le modelage ou ossification endochondrale

L'os croît d'abord en s'allongeant au niveau des plaques de croissance osseuse (ou cartilage de croissance), à l'interface entre la métaphyse et l'épiphyse par la fabrication d'un tissu cartilagineux qui se minéralise dans un second temps. Le modelage n'est pas aléatoire, il existe un comportement de changement d'orientation des travées au sein de l'os trabéculaire dont le but est de mieux supporter les charges (loi de Wolff) (Clarke, 2008).

1.1.4.2 Le cycle du remodelage

Le phénomène de remodelage osseux est le plus courant des deux phénomènes d'ossification et a lieu chez l'adulte (plus fréquemment que le modelage) et à une fréquence moindre chez l'enfant (Figure 1-7).

Le cycle de remodelage est d'abord initié par les ostéocytes qui sont des cellules osseuses, ostéoblastes, emmurées puis différenciées dans l'os continuellement.

Dans un premier temps, ces cellules rentrent en apoptose lorsqu'elles ne sont plus stimulées par les mouvements de fluides le long de leurs dendrites (Bakker et al., 2004; Burger et al., 2003). Cette apoptose libère des marqueurs chimiques, notamment du monoxyde d'azote (NO), ce qui initie le recrutement d'une nouvelle lignée cellulaire : les ostéoclastes.

Cette phase d'activation est suivie par la résorption de l'os qui est effectuée par les ostéoclastes. Une fois la résorption réalisée, une période de pause sans activité apparente est mise en évidence, appelée phase d'inversion.

Dans un dernier temps, une nouvelle phase dite de dépôt advient: la matrice protéinique, l'ostéoïde, va se déposer sur le tissu osseux avant de se minéraliser.

En terme de temps, la phase de résorption est la plus courte et dure quelques jours, tandis que la phase de formation dure plusieurs semaines.

1.1.4.3 Le modelage et le remodelage au cours de la vie

La minéralisation de l'os augmente lentement mais constamment au cours de la vie. Les valeurs les plus basses de minéralisation, se situent chez l'enfant au moment de la croissance puisque le remodelage osseux y est plus fréquent et fait que l'os a moins le temps de se minéraliser (Boskey and Coleman, 2010; Fratzl-Zelman et al., 2009).

Le taux de remodelage osseux a une influence également au niveau de la structure osseuse, en particulier au niveau des ostéons qui ne sont pas les mêmes à l'enfance, l'adolescence ou à l'âge adulte (Schnitzler and Mesquita, 2013), avec par exemple l'existence d'ostéons dérivants (ostéons dont le canal de Havers central se décale au cours du temps).

Enfin, avec le vieillissement, de nombreuses modifications dans le tissu osseux au niveau de sa structure apparaissent : porosité augmentée, qualité du collagène moindre, diminution du nombre de travées dans les os trabéculaires (Akkus et al., 2004; Boskey and Coleman, 2010; Boyce, 2013; Kuhn et al., 2008).

1.1.4.4 Les cellules osseuses

Le processus de remodelage osseux est possible grâce à trois types de cellules : les ostéocytes, les ostéoclastes et les ostéoblastes qui agissent dans un ordre précis et en coordination les uns avec les autres.

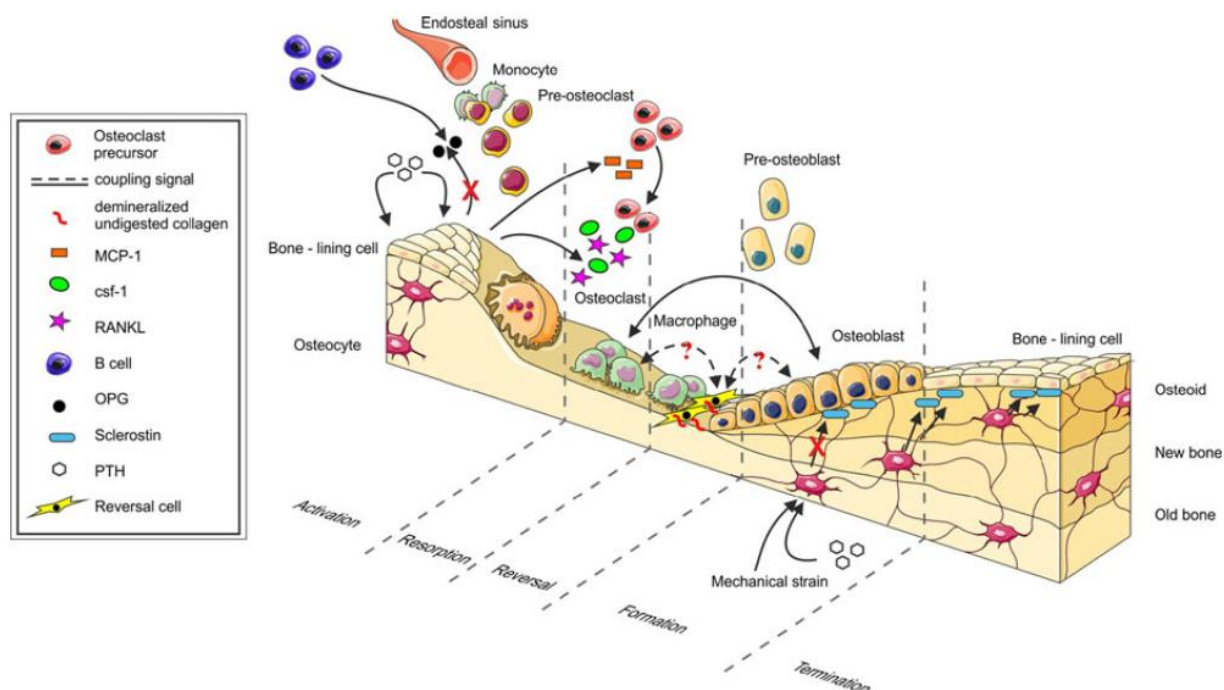


Figure 1-8 Schéma du cycle de remodelage osseux, représentant les différentes cellules et marqueurs sanguins l'influençant (Dominguez et al., 2011)

Les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses présentes dans l'os. Elles sont emmurées dans l'os et communiquent entre elles grâce à leurs dendrites emmurées dans les caniculae, formant un réseau dendritique qui leur permet de détecter les stimulations mécaniques. En dehors de toute stimulation mécanique, c'est l'activité d'hormones telles que les œstrogènes et la parathyroïde qui régulent le remodelage osseux. En revanche, lorsque l'os est chargé, les cellules détectent des écoulements dans les caniculae qui stimulent la mécanotransduction, ce qui inhibe le remodelage osseux (Klein-Nulend et al., 2003, 2015). En l'absence de ces stimulations, le remodelage est initié par l'apoptose des ostéocytes.

Le cycle de remodelage se poursuit alors par le recrutement de cellules hématopoïétiques et leur différenciation en ostéoclastes plurinucléés (Boyle et al., 2003) sous l'action de cytokines, telles que le MCS-F, macrophage colony stimulating factor et RANK-L, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (Bruzzaniti and Baron, 2006). Les ostéoclastes vont alors osciller entre deux états, un état non polarisé où les cellules se déplacent, appelé phase migratoire, et un état où les cellules vont se polariser pour résorber le tissu osseux. Lors de la résorption, les ostéoclastes vont alors former un anneau d'actine, nommée la sealing zone, à

l'intérieur de laquelle se déroule une acidification du milieu et la sécrétion d'acide phosphatase dans le but de dissoudre le minéral. Cette acidification est possible grâce à des pompes à protons spécifiques aux ostéoclastes. Les cristaux d'hydroxyapatite sont alors dissous et évacués par transcytose (passage à travers les membranes cellulaires), entraînant la mise à nu de la matrice organique. Les ostéoclastes peuvent alors libérer des enzymes protéiniques spécifiques, les collagénases, qui vont dégrader la matrice collagénique (Baron, 2001; Bruzzaniti and Baron, 2006; Drissi and Sanjay, 2016). Des lacunes de résorption sont alors visibles à la surface de l'os (Gentzsch et al., 2003; Goff et al., 2012; Vanderoost and van Lenthe, 2014) dont le volume peut parfois être évalué, par imagerie confocale (Goldberg et al., 2012), témoignant de l'activité des ostéoclastes.

Durant la phase de réversion, ces lacunes de résorption vont être recouvertes de tissus mésenchymateux contenant les progéniteurs des ostéoblastes (Delaisse, 2014), cellules responsables de la fabrication des protéines de la matrice collagénique : l'ostéoïde. Les ostéoblastes vont alors se différencier en présence de certains facteurs, comme la metalloprotéinase 9 (MMP9) (Brunner et al., 2013). Elles vont sécréter la matrice collagénique qui se minéralisera dans un second temps (Roschger et al., 2008a). Lors de ce processus : 10 à 20 % des ostéoblastes vont être emmurés et se différencient alors en ostéocytes.

Il est important de noter à quel point les cellules communiquent entre elles et régulent leur activité par des facteurs chimiques (Boyce, 2013; Boyce and Xing, 2007; Bruzzaniti and Baron, 2006). L'activité des cellules semble aussi être influencée par l'environnement extérieur (Valcourt et al., 2007) ; durant cette thèse, nous nous efforcerons de mettre en valeur des facteurs mécaniques et chimiques qui influencent le comportement de résorptions des ostéoclastes.

1.1.5 Conclusion

Ces processus de modelage et remodelage permettent à l'os de s'adapter à son environnement et de se réparer. L'homéostasie des minéraux, la production cellulaires, la fonction de support sont conservées et optimisées grâce à ces mécanismes.

Cependant, lorsque le processus n'est pas stimulé, par exemple lorsque les astronautes sont dans l'espace (Klein-Nulend et al., 2003), ou qu'il est soumis aux dérèglements hormonaux, par exemple lors de la ménopause, l'équilibre entre résorption et construction osseuse peut être rompu. Nous observons alors généralement une plus grande résorption ce qui accroît la porosité de l'os, phénomène d'ostéoporose et induit une fragilité osseuse.

Dans certaines pathologies, les cellules osseuses ne fonctionnent plus correctement, entraînant un dérèglement dans la synthèse de protéines. C'est le cas pour la maladie de l'ostéogénèse imparfaite (Helfrich et al., 2007), qui est due à une altération de la protéine de collagène de type I. Le métabolisme osseux est non seulement atteint dans son fonctionnement mais la qualité osseuse est aussi amoindrie.

1.2 Une pathologie du métabolisme osseux, l'ostéogénèse imparfaite

L'ostéogénèse imparfaite, maladie des os de verres, maladie de Lobstein, tous ces termes désignent la même famille de maladies génétiques rares qui se caractérisent par une fragilité accrue des os (Patel et al., 2015). D'autres symptômes accompagnent parfois cette fragilité caractéristique : sclérotique bleue, petite taille de l'individu, problèmes respiratoires, problème de tendons et de ligaments, surdité progressive, dentinogénèse imparfaite... À l'origine de la plupart de ces pathologies, une mutation du gène codant le collagène de type I présent sur le chromosome 7 entraîne la production d'une protéine imparfaite ou dans des quantités insuffisantes (90% des cas (Patel et al., 2015)). Cette anomalie au niveau du collagène entraîne des problèmes de minéralisation de la matrice osseuse (Boskey and Villarreal-Ramirez, 2016). À la différence de nombreuses maladies génétiques, ce n'est pas l'absence de production d'une protéine qui est responsable de la maladie, mais la production d'une protéine anormale qui continue d'assumer son rôle de support pour la minéralisation. Touchant environ 75 nouveaux cas en France chaque année, la prévalence de la maladie est estimée entre 10/100.000 et 20/100.000 cas, sans distinction ni de sexe ni de prédominance ethnique (Andersen and Hauge, 1989).



Figure 1-9 : Photos représentant le célèbre pianiste de jazz Michel Petrucciani, plus petite mère du monde Stacey Herald et jeune réalisatrice Leopoldine H Despointes, ces trois personnes ont en commun de souffrir d'ostéogénèse imparfaite

1.2.1 Historique

Le plus vieux malade connu est une momie âgée de 3000 ans découverte en Egypte (Lowenstein, 2009), et la première description de l'ostéogénèse imparfaite remonte à 1690, effectuée par un médecin français dont la patiente avait des os qui se « cassèrent de telle sorte qu'il était impossible de la toucher sans faire quelque fracture nouvelle » (Charlier et al., 2016). Une première typologie systémique des variantes d'ostéogénèse imparfaite utilisée comme référence, a été écrite par Sillence en 1979 (Sillence et al., 1979) et est basée sur des critères cliniques, radiologiques, physiologiques, et d'hérédité. À cette typologie phénotypique s'ajoute de plus en plus une typologie génétique, classant les patients selon les mutations dont ils souffrent. Les médecins, quant à eux, disposent de plus en plus d'outils comme des aides aux diagnostics différentiels, pour permettre d'identifier correctement la pathologie et pour la différencier d'autres pathologies osseuses (Arundel and Bishop, 2010).

1.2.2 Typologies de l'ostéogénèse imparfaite

Il est important de pouvoir classer les différents types d'ostéogénèse imparfaite pour plusieurs raisons allant d'un dépistage plus précoce de la maladie à un traitement plus adapté, en passant par une meilleure compréhension des mécanismes de l'ostéogénèse.

1.2.2.1 Typologie de Sillence

La première typologie de Sillence se basait essentiellement sur des facteurs phénotypiques, radiologiques, cliniques et d'hérédité. Quatre types étaient décrits :

- i. le type I, la forme la moins grave se caractérisait par une transmission autosomique dominante, une sclérotique bleue et pas de déformation,
- ii. le type II, la forme létale de la maladie se caractérisait par la mortalité périnatale,
- iii. le type III, se caractérisait par une sclérotique normale mais un squelette qui se déformait progressivement, ce qui faisait du type III la forme la plus sévère à laquelle les patients pouvaient survivre,
- iv. le type IV était un type intermédiaire entre le type III et le type I.

1.2.2.2 Typologie étendue

Avec les progrès de la génétique, il est apparu que les types décrits par Sillence n'étaient pas cohérents génétiquement, et qu'une même mutation n'avait pas les mêmes effets sur chaque patient (Bardai et al., 2016). Différentes classifications ont alors été proposées, certaines conservant la structure proposée par Sillence (Van Dijk et al., 2010), tandis que d'autres rajoutaient des types pour mieux rendre compte des mutations, du caractère héréditaire ou non et du phénotype (Shaker et al., 2015).

Type d'OI	Transmission	Gène défectueux	Protéine défectueuse
<i>Défauts dans la synthèse du collagène et de sa structure</i>			
I, II, III, IV	AD	COL1A1 ou COL1A2	Collagène $\alpha 1(I)$ ou $\alpha 2(I)$
<i>Défauts dans la minéralisation de l'os</i>			
V	AD	IFTM5	BRIL
VI	AR	SERPINF1	PEDF
<i>Défauts dans la modification du collagène</i>			
VII	AR	CRTAP	CRTAP
VIII	AR	LEPRE1	P3H1
IX	AR	PPIB	PPIB(CyPB)
<i>Défauts dans le traitement du collagène et de ses liaisons</i>			
X	AR	SERPINH1	HSP47
XI	AR	FKBP10	FKBP65
Non classé	AR	PLOD2	LH2
XII	AR	BMP1	BMP1
<i>Défauts dans la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes</i>			
XIII	AR	SP7	SP7(OSTERIX)
XIV	AR	TIMEM38B	TRIC-B
XV	AR/AD	WNT1	WNT1
XVI	AR	CREB3L1	OASIS
XVII	AR	SPARC	SPARC (Osteonectin)
XVIII	XR	MBTPS2	S2P

Tableau 1-2 : Types d'ostéogénèse imparfaite classés par mutations et types de défauts ; Abbréviations AD autosomale dominante, AR, autosomale récessive, XR récessive liée à X (Kang et al., 2016)

Comme résumé par le Tableau 1-2, les mutations causant des symptômes d'ostéogénèse imparfaite sont nombreuses et les conséquences variées. Il est remarquable de noter le nombre élevé de molécules qui interagissent dans l'ostéogénèse (Forlino and Marini, 2015).

Comme conséquence indirecte de la maladie, on note également que les patients, du fait de leurs nombreuses fractures et/ou des déformations sur leurs os ont une mobilité réduite, pratiquent peu d'activité physique, entraînant un surpoids par rapport à la population non-atteinte (Palomo et al., 2016).

De plus, le collagène de type I malformé étant également présent dans les tissus tels que les vaisseaux sanguins, il a été observé que les patients souffraient aussi de problèmes cardiaques ou d'anévrismes cérébraux (Bastos et al., 2010; Gaberel et al., 2016).

1.2.2.3 Relation type clinique et type génétique et échantillons

Actuellement, les types cliniques décrivent majoritairement la gravité de la maladie et comme 90% des patients souffrent d'une mutation sur le gène COL1A1 ou COL1A2 (Patel et al., 2015), ils sont souvent classés dans les types I, II, III, ou IV. Il y a néanmoins une distorsion entre les proportions réelles des mutations dans la population et les proportions des autres mutations dans les échantillons disponibles. Qui plus est, il y a des incohérences entre les types cliniques et génétiques, avec de nombreux patients catégorisés cliniquement type III mais souffrant de mutations ne touchant pas le gène du collagène directement. En d'autres termes, la représentativité des autres mutations dans les études portant sur l'ostéogénèse imparfaite n'est pas identique à celle incidente.

En effet, les cas qui seront étudiés durant cette thèse sont les cas les plus graves sans être létaux. Les patients de type clinique II ne sont pas étudiés en raison de leur décès aux environs de la naissance. Les patients de type clinique I ou IV, la plupart du temps atteints d'une mutation du gène COL1A1 ou COL1A2 étant moins grave, sont moins souvent opérés et le nombre d'échantillons disponibles en est donc réduit. En revanche, les patients de type clinique III présentent une grande diversité de types génétiques et sont plus souvent opérés. Ainsi dans les échantillons disponibles pour cette thèse, nous avons une surreprésentation de patients souffrant d'une mutation autre que COL1A1 ou COL1A2.

1.2.3 Une pathologie à plusieurs échelles

L'ostéogénèse imparfaite (OI) est une maladie touchant un des constituants de base de l'os : le collagène. Les répercussions de ces malformations ne sont pas uniquement nanométriques, mais aussi microscopiques et macroscopiques. Toutes ces échelles s'influençant les unes les autres entretiennent la fragilité osseuse des patients OI (Ruppel et al., 2008).

1.2.3.1 À l'échelle de la protéine : modification de l'ostéogénèse

Des modélisations de la protéine de collagène ont montrées que la protéine de collagène des souris modèle OI était plus large, irrégulière et que les espaces dans lesquels cristallisent l'hydroxyapatite étaient plus grands (Coleman et al., 2012; Li et al., 2016) (Figure 1-10). Cette modélisation est cohérente avec l'hyper minéralisation trouvée chez les patients OI par diffraction de rayon X ou simple scanner (Andriotis et al., 2015; Boyde et al., 1999; Roschger et al., 2008b; Weber et al., 2006). Des modèles supposent que du fait de l'espace disponible, cela indépendamment de la mutation, l'eau présente dans l'os modifie la cinétique de formation du cristal d'hydroxyapatite (Bertinetti et al., 2015), entraînant une hyperminéralisation (Roschger et al., 2008b; Traub et al., 1994). Une étude a montré une taille de cristaux identique chez des patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite de type I (Fratzl-Zelman et al., 2014). Mais chez des patients atteints d'ostéogénèse de type III, les cristaux étaient plus petits (Imbert et al., 2014) que ceux issus des patients sains. (Figure 1-11). Il y a donc un problème au niveau de la qualité osseuse, mais également au niveau de la quantité osseuse lors de l'ostéogénèse qui est gouvernée par un processus cellulaire complexe (Masci et al., 2016).

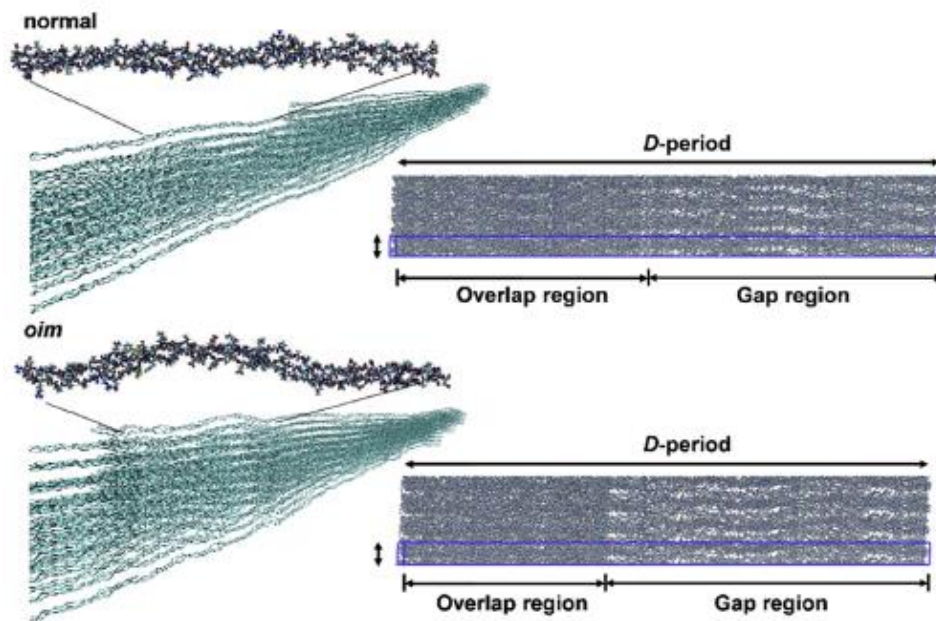


Figure 1-10 Modélisation des molécules de collagène normale (haut) et d'une souris modèle d'OI *oim* (bas) (Li et al., 2016) Sur chaque partie en haut, la molécule de collagène seule, puis l'assemblage des molécules les unes avec les autres pour former une fibrille, puis la même fibrille vue sur une période propre de l'agencement des molécules de collagène. Sur la modélisation *oim*, on peut remarquer la plus grande courbure de la protéine ce qui se traduit au niveau de l'arrangement fibrillaire par une région de gap plus importante dans laquelle peuvent se former plus de cristaux d'hydroxyapatite.

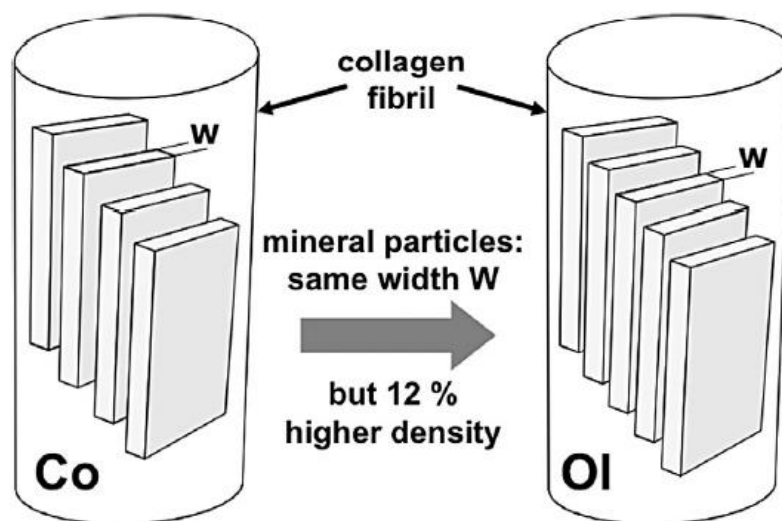


Figure 1-11 Différence entre l'hyperminéralisation des os OI et leur largeur (Fratzl-Zelman et al., 2014) Co : Contrôle, OI : ostéogénèse imparfaite

1.2.3.2 À l'échelle cellulaire

Au niveau cellulaire, le métabolisme osseux est perturbé. Dans un premier temps, les ostéoblastes ont une maturation ralentie (Li et al., 2010), entraînant une plus faible production de la matrice osseuse (Baron et al., 1983). Dans un second temps, ces ostéoblastes immatures stimulent plus efficacement l'ostéoclastogénèse, favorisant ainsi la résorption (Li et al., 2010). Le processus de remodelage osseux est alors déséquilibré et pathologique, avec une résorption osseuse effectuée par un plus grand nombre d'ostéoclastes qui est plus importante que l'apposition osseuse (Brunetti et al., 2016; Uveges et al., 2008; Zhang et al., 2007). De plus, il a été montré que les ostéoclastes d'OI ont un pouvoir de résorption plus grand que les ostéoclastes sains (Murillo et al., 2010; Zhang et al., 2007).

En plus des fonctions cellulaires perturbées, le remodelage osseux est plus rapide, accentuant encore le déséquilibre entre résorption et apposition d'os (Baron et al., 1983; Brunetti et al., 2016; Kalajzic et al., 2002; Rauch et al., 2000). Cette augmentation du taux de remodelage osseux est la raison pour laquelle les traitements actuels ciblent la résorption et plus précisément l'inhibition des ostéoclastes des patients OI. Enfin, au niveau cellulaire, la hausse du remodelage osseux se traduit par une densité ostéocytaire plus importante chez les patients OI que chez les patients sains (Carriero et al., 2014; Jones et al., 1999).

En l'absence de nouvelle formation osseuse, ce phénomène se traduit par une porosité plus importante de l'os au niveau microscopique.

1.2.3.3 À l'échelle microscopique

À l'échelle microscopique, plus précisément au niveau des ostéons, l'ostéogénèse imparfaite se caractérise par des canaux de Havers plus nombreux entraînant une porosité intracorticale supérieure à la normale (Imbert et al., 2015). Ces canaux de Havers ont de plus des formes atypiques augmentant les facteurs d'intensité de contraintes (Currey, 1962) (voir Figure 1-12). Cela entraîne une résistance aux chocs et une élasticité diminuées (Albert et al., 2014; Carriero et al., 2014; Vardakastani et al., 2014), influençant les propriétés mécaniques microscopiques à un titre plus important (Granke et al., 2016) que l'hétérogénéité de minéralisation au sein de l'os (Rauch et al., 2005; Traub et al., 1994). Il a par ailleurs été montré que les propriétés mécaniques microscopiques de l'os OI étaient plus faibles en terme de module de Young et de dureté par rapport à un os de personne saine (Albert et al., 2013; Fan et al., 2006, 2007, Imbert et al., 2014, 2015; Katti et al., 2015).

Au niveau du collagène, les mutations de la protéine provoquent une répartition des charges hétérogène qui concentre les micro-dommages sur des zones spécifiques. Ces micro-dommages sont plus nombreux chez les OI (Davis et al., 2012), augmentant la fragilisation de l'os (Dong et al., 2010).

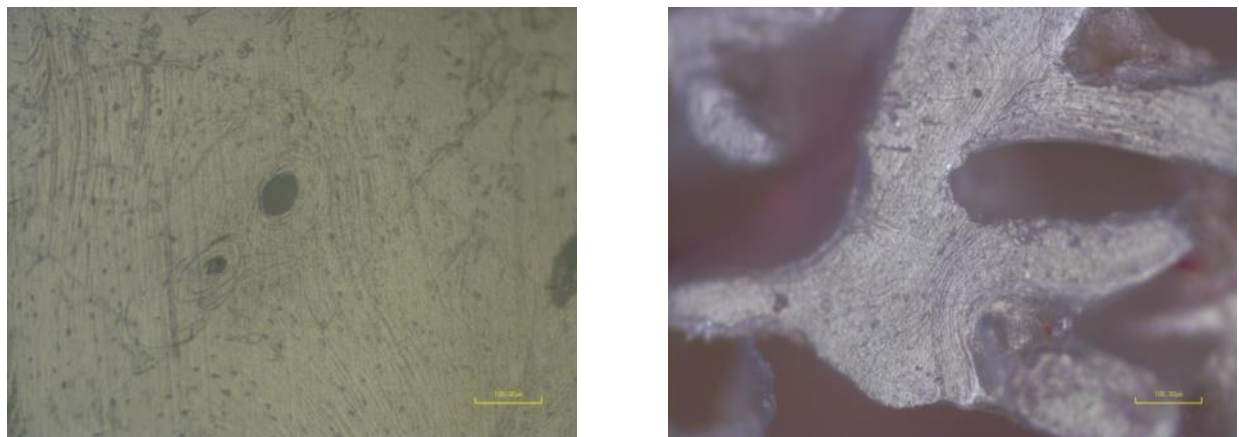


Figure 1-12 Coupe transversale d'os corticaux de patient sain (gauche) et OI (droite): les ostéons d'OI ont des formes peu circulaires qui concentrent les contraintes. Echelle 200µm

1.2.3.4 Échelles mésoscopique et macroscopique

En 1983, Baron a montré que les patients OI avaient un renouvellement du tissu osseux plus rapide et déséquilibré. La conséquence de ce remodelage, qui correspond à une diminution de la formation osseuse par les ostéoblastes, est l'incapacité et/ou l'inefficacité à accumuler l'os lors de la croissance et non pas une perte osseuse (Baron et al., 1983). Les cortex osseux vont donc devenir plus fins et fragiles (Rauch et al., 2000). En outre, ce métabolisme accéléré a des conséquences sur d'autres tissus du corps humain et plus précisément sur la mauvaise maturation des dents (Ilkka et al., 2016)

À l'échelle macroscopique, dans les cas les plus graves, les os sont déformés et des phénomènes de flambement se produisent fragilisant de nouveau le squelette (voir Figure 1-13) (Bishop, 2016).



Figure 1-13 Radiographie d'un patient atteint d'une forme sévère d'OI, on observe la déformation des os longs

1.2.4 Traitements

L'ostéogénèse imparfaite est une maladie pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif, uniquement des traitements symptomatiques visant à éviter les fractures, diminuer les douleurs et réduire l'immobilisation. L'approche multi-disciplinaire dans le suivi des patients conjugue traitements orthopédiques et chirurgicaux afin de stabiliser les fractures et d'arrêter les déformations, la rééducation pour renforcer les muscles et garder la mobilité articulaire et les traitement médicamenteux agissant sur l'augmentation de la masse osseuse et la diminution des douleurs (Bregou Bourgeois et al., 2016). Ces traitements sont à adapter à chaque patient et à chaque type d'OI. (Trejo and Rauch, 2016)

1.2.4.1 Chirurgical

Dans le cas de patients souffrant d'OI légère, s'ils présentent des fractures, ils sont alors équipés d'attelles légères, qui sont conçues pour être aussi peu contraignantes que possible. L'opération chirurgicale est ainsi évitée au maximum et la rééducation se fait aussi tôt que possible pour prévenir la perte osseuse due à l'absence de stimuli mécaniques.



Figure 1-14 Clou d'allongement au niveau des fémurs

Dans le cas de patients souffrant d'OI plus grave, il peut s'avérer nécessaire d'opérer afin de réduire les fractures trop importantes, ou rectifier les alignements et les grandes déformations sur les os longs. Des clous d'allongement sont dans ce cas posés. Ils ont été développés dans le but de diminuer les fractures autour des plaques et des broches assurant la stabilité des os et minimiser le nombre d'opération chirurgicale : en diminuant les contraintes sur les os on diminue le risque

de fracture. Ces clous s'allongent au fur et à mesure de la croissance de l'enfant. Ainsi, un seul acte chirurgical est nécessaire : au moment de la pose de ces clous.

1.2.4.2 Traitement médical par bisphosphonates

Mode de fonctionnement des bisphosphonates

Dans un cas où les symptômes de la maladie sont plus graves, les patients suivent alors une cure de bisphosphonates (BP). Cela va augmenter la masse osseuse et compenser la mauvaise qualité de l'os. Le bisphosphonate est une molécule agissant sur l'inhibition de la résorption par les ostéoclastes. Il est surprenant d'utiliser une médication agissant sur les ostéoclastes alors que la maladie se caractériserait plutôt par un défaut provoqué par une production des protéines modifiées de collagène par les ostéoblastes (Rowe and Shapiro, 1998). Cependant, l'hypothèse sous-jacente est que l'inhibition de l'activité des ostéoclastes, compense la faiblesse due aux défauts de production des ostéoblastes (Rauch and Glorieux, 2005). Il a été montré que ce traitement est particulièrement efficace s'il est commencé tôt, permettant un réel épaissement de l'os cortical et ainsi permettre à l'os une meilleure résistance aux chocs (Lindahl et al., 2016; Rauch et al., 2003).

Il existe plusieurs sortes de bisphosphonates, classés en trois grandes familles selon leur affinité avec l'hydroxyapatite : les BP non azotés (*BP/affinité* : étidronate/1x, clodronate/10x et tiludronate/10x, c'est-à-dire une affinité avec l'hydroxyapatite 10x plus grande pour les clodronate et le tiludronate que pour l'étidronate), les BP azotés (Pamidronate/100x, alendronate/100-1000x, et Ibandronate/1000x-10000x), et les BP hétéro-cycliques (zoledronate/10000x et risedronate/1000x-10000x)(Dominguez et al., 2011).

L'action des BP sur le métabolisme osseux est multiple.

Premièrement, en se fixant sur l'hydroxyapatite, les BP empêchent la précipitation spontanée du phosphate de calcium en solution, entraînant un retard dans la transformation de l'hydroxyapatite amorphe en cristal, et inhibant la dissolution des cristaux (Russell et al., 2008). Les ostéoclastes devront fournir plus d'acide pour dissoudre la partie minérale de l'os.

D'une autre manière, les BP agissent sur le comportement des ostéoclastes. Lorsque les ostéoclastes résorbent l'os, ils forment une lacune de résorption dans laquelle a lieu une acidification du milieu. Cette acidification entraîne une dissociation du BP et

de l'hydroxyapatite. Par un mécanisme d'endocytose, les BP sont intégrés dans le cytosol des cellules où ils bloquent la fonction des ostéoclastes et entraînent l'apoptose de ceux-ci (Frith et al., 2001; Hurtel-Lemaire et al., 2009).

De plus, Il a été montré que les BP inhibaient le développement des progéniteurs des ostéoclastes (Gossiel et al., 2016), diminuant d'autant plus le recrutement de ces cellules.



Figure 1-15 Stries typiques dues aux traitements aux BP visibles au niveau des genoux du patient

Réserves émises à la prescription des bisphosphonates

Après 40 ans d'utilisation des bisphosphonates, dont vingt-trois ans de prescription à des patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite (Glorieux, 2007), les bisphosphonates divisent toujours. Non pas d'un point de vue de leur prescription et/ou de leur efficacité (Letocha et al., 2005), mais de leurs modalités d'administration (Brizola and Shapiro, 2015; Cundy, 2012).

Pendant longtemps, les craintes au sujet de l'administration des bisphosphonates étaient qu'ils fragiliseraient les os en supprimant tout remodelage osseux. Cependant, il a été montré que ce n'était pas le cas (Weber et al., 2006).

Par crainte d'avoir un retard dû au ralentissement du remodelage osseux, la croissance des enfants était aussi surveillée. Cela s'est par la suite avéré faux, avec plutôt des gains en taille pour les patients traités suffisamment tôt (Zeitlin et al., 2006).

Enfin, une des dernières interrogations soulevées par l'utilisation des BP était leur durée de vie très longue, telle qu'une fois résorbés par les ostéoclastes, ils étaient recyclés et réintégrés à la surface des os (Russell, 2011).

Aujourd'hui, le consensus est de ne prescrire les BP qu'aux patients souffrant des formes d'OI les plus sévères (Rauch and Glorieux, 2005), et cela le plus tôt possible, avec une durée de prise limitée dans le temps. Des études sont actuellement menées pour conjuguer l'utilisation des BP avec d'autres médicaments inhibant la résorption (Perosky et al., 2016).

Autres pistes de traitement

Une autre piste pour traiter les symptômes de l'OI est l'utilisation d'anticorps monoclonal dirigé vers la cytokine RANK-L, plus connu sous l'appellation Denosumab (Baron et al., 2011). Ce traitement a pour but de stopper la formation, le fonctionnement et la survie des ostéoclastes. Pour l'instant, les essais ont produit des résultats encourageants et sûrs (Hoyer-Kuhn et al., 2014, 2016).

1.2.5 Conclusion

Tous ces traitements ne sont pas curatifs, mais seulement symptomatiques : la résorption osseuse est diminuée, mais l'os ne présente toujours pas une minéralisation normale et de qualité, ni une structure et un remodelage normaux. Avec la multiplication des moyens de manipulations génétiques sur les cellules souches, la recherche s'est tournée vers des traitements de l'OI par des thérapies géniques. Pour ce faire, comme l'OI est un ensemble de maladies génétiques qui se caractérisent non pas par une absence de production d'une protéine (le collagène) dans les cas les plus graves, mais par une mauvaise production de cette protéine, les chercheurs veulent produire des cellules qui pourront remplacer les ostéoblastes défectueux afin de produire du collagène de qualité (Horwitz et al., 1999; Ranzoni et al., 2016).

Conclusion

L'os de par les fortes relations entre sa composition chimique (minéral), biochimique (collagène) et ses propriétés mécaniques résultant de sa microstructure, est un tissu vivant ayant un rôle essentiel dans l'organisme. L'anomalie du métabolisme osseux chez les patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite a une répercussion sur la microstructure et le comportement mécanique de l'os, se traduisant par une plus grande fragilité de ce dernier. Les traitements actuels consistent à soigner les symptômes et non à guérir la maladie.

Peu d'études ont été réalisées sur le comportement cellulaire face à ses modifications structurelles (porosité) et chimiques (minéralité). Ces questions seront donc traitées dans ce travail de thèse.

Partie A :

Étude du tissu osseux de patients
souffrant d'ostéogénèse imparfaite,
intérêt de la spectroscopie Raman

2 Apport de la spectroscopie Raman à l'étude des tissus osseux

Résumé

Pour caractériser un tissu osseux, différentes approches sont possibles qui apportent toutes un éclairage spécifique. Durant cette thèse, nous nous sommes appuyés sur la nanoindentation, la tomодensitométrie et la spectroscopie Raman. L'étude des caractéristiques du tissu osseux par spectroscopie Raman apporte des informations sur les composants de l'os que sont l'hydroxyapatite et le collagène. Tout d'abord, la qualité du minéral, incluant une évaluation de l'épaisseur de cristaux le composant, peut être testée par cette méthode. La maturité du collagène est également caractérisée par étude du spectre Raman, ainsi que les proportions relatives de minéral et de matrice dans l'os. L'analyse de ces différents bio-marqueurs permet d'apporter des informations sur des pathologies du métabolisme osseux, à l'instar de l'arthrose ou de l'ostéogénèse imparfaite.

Après un bref rapport sur la méthodologie d'étude du tissu osseux, je présenterai l'apport de la spectroscopie Raman qui avait fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage dans *Biomarkers in Bone Disease* (Bossier et Ogier, 2016).

La caractérisation du tissu osseux peut prendre différente forme et surtout être centrée sur les structures distinctes de l'os. Dans ce chapitre, sera décrite la méthodologie générale appliquée lors de cette thèse, ainsi que les apports des différentes techniques. La démarche classique utilisée dans cette thèse de caractérisation des échantillons osseux, sains ou pathologiques, est constituée de quatre grandes étapes :

1. Analyse de la micro-structure par micro-tomographie
2. Analyse de la microstructure de surface par microscopie électronique à balayage
3. Analyse des propriétés mécaniques microscopiques par nano-indentation
4. Analyse des propriétés physico-chimiques par micro-spectroscopie Raman

2.1 Caractérisation de la micro-structure

Pour caractériser la micro-structure de l'os, c'est-à-dire, généralement sa porosité intra-corticale, les échantillons osseux sont analysés grâce à de la tomodensitométrie, ou Computed-Tomography. Un scanner utilise le principe de la radiographie à rayon-X auquel s'ajoute celui de la reconstruction 3D d'images à partir de projection 2D. La zone à étudier est traversée par les rayon-X. Ces rayons sont plus ou moins atténués selon les capacités d'absorption respectives des tissus : les rayon-X ne sont pas projetés sur la plaque du détecteur avec la même intensité. L'image obtenue est donc une vue projetée de l'ensemble des organes traversés par les rayons. Cependant, à l'instar de l'ombre de deux personnes qui marchent côte à côte, il n'est pas toujours possible de distinguer clairement la contribution de deux organes traversés par le même rayon-X, et surtout de les positionner les uns par rapport aux autres. Pour combler ce manque d'information, une succession de radiographies sont faites à différents angles. Au final, des projections de l'échantillon sont disponibles sous tous les angles, ce qui permet, à l'aide d'algorithmes, la reconstitution de coupes restituant la structure en trois dimensions des échantillons.

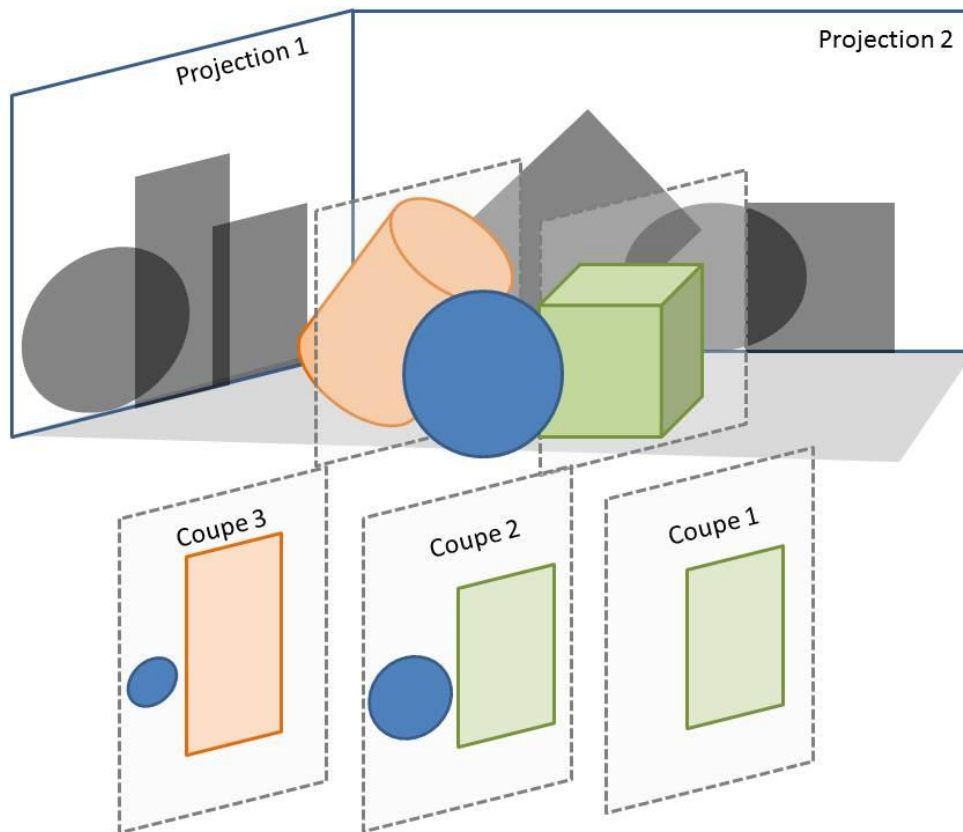


Figure 2-1 Principe de la Tomographie par rayon-X

La tomodensitométrie permet de mesurer la porosité des échantillons osseux et plus précisément la porosité intra-corticale due aux canaux de Havers et de Volkmann. L'étude de cette porosité permet ainsi de détecter des pathologies du remodelage osseux. Pour illustrer la méthode, trois coupes, résultats d'une tomographie par rayon X d'un os de patient souffrant d'ostéogénèse imparfaite sont données dans la Figure 2-2.

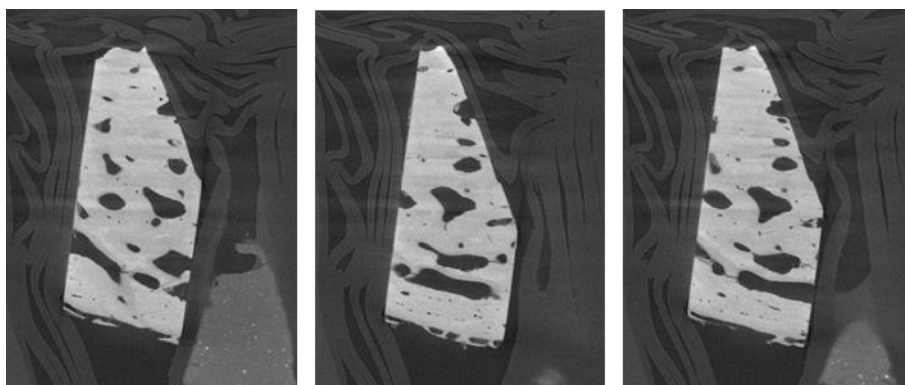


Figure 2-2 Images en coupe obtenues par tomographie à rayon X

2.2 Caractérisation de la microstructure de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)

2.2.1 Principe du MEB

En balayant la surface d'un échantillon avec un faisceau d'électrons et en analysant les particules réémises du fait des interactions entre électrons et matières, il est possible de récupérer des informations sur la surface des échantillons. Certains électrons interagissent avec le noyau des atomes de l'échantillon et sont diffusés de manière quasi-élastique (avec une perte d'énergie très faible). Ce sont les électrons rétrodiffusés.

La surface des échantillons est passée au microscope électronique à balayage (MEB), utilisé en mode détection d'électron rétro diffusé (Back scattered electron, BSE) qui permet d'évaluer qualitativement la minéralité du tissu osseux. En effet, il a été montré que les variations en niveaux de gris sur les images obtenues par BSE MEB, sont corrélées aux variations de minéralité dans le tissu (Skedros et al., 1993b, 1993a) : plus la zone est claire, niveau de gris élevé, plus la zone est minéralisée. À l'inverse, plus la zone est foncée, moins la zone est minéralisée. L'image obtenue est une image en niveau de gris.

2.2.2 Protocole expérimental

Dans des conditions environnementales et sans préparation de l'échantillon, les faces sont imagées en mode rétrodiffusé à un grossissement 50x, une tension d'accélération de 30 kV, une pression hydrostatique de 0,9 Torr (120 Pa) et à une vitesse de balayage de 30 μ s/point à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type FEG (Quanta 250 FEG microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA).

Les images sont analysées en niveau de gris (8 bits) par le logiciel ImageJ.

Les histogrammes des images sont analysés pour vérifier que les images peuvent être comparées entre elles. Pour ce faire, le mode de la gaussienne ainsi que la dispersion sont mesurés et un test statistique est effectué pour vérifier qu'il n'y ait pas de mesure aberrante. Après calcul de la moyenne des modes principaux et de la

moyenne des dispersions de chaque gaussienne, les histogrammes sont calibrés, ce qui permet de calculer des niveaux de gris (NG) pour pouvoir comparer entre elles les images MEB. La calibration des niveaux de gris est faite selon la formule suivante.

$$NG_{Recalculé} = \frac{(NG_{Mesuré} - Mode_{Image})}{Dispersion_{image}} \cdot Dispersion_{moyenne} + Mode_{Moyen}$$

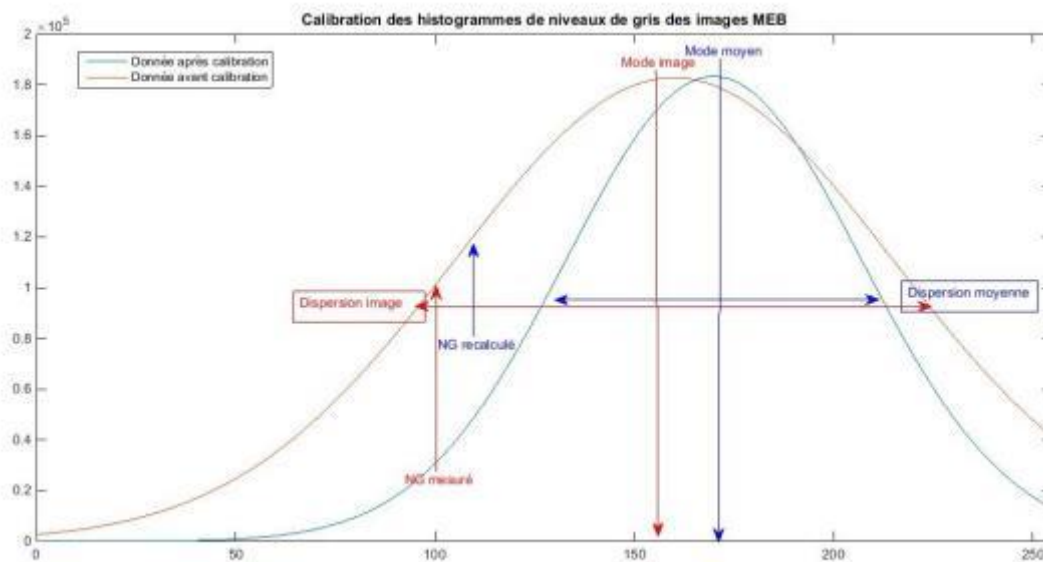


Figure 2-3 Histogramme de l'image MEB avant (en rouge) et après calibration (en bleu)

2.3 Caractérisation mécanique locale par nano-indentation

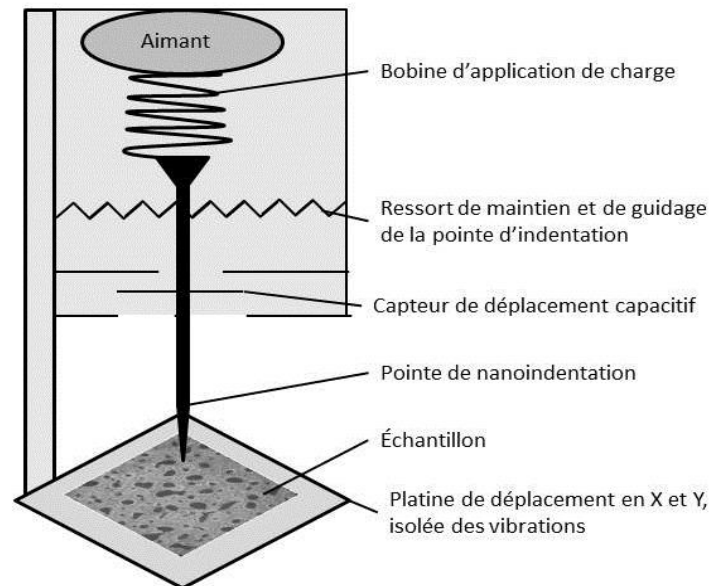


Figure 2-4 Différents éléments d'un nano-indenteur

Les os sont testés à l'échelle du micromètre par nano-indentation, ce qui permet de déterminer le module de Young et la dureté locale. Une pointe pénètre dans l'échantillon avec un déplacement imposé, et la force nécessaire est enregistrée.

La raideur de contact S est déterminée par la pente à la décharge de la charge en fonction du déplacement h (Figure 2-5)(Oliver and Pharr, 1992). Cette raideur est corrélée au module réduit E_r par la formule suivante :

$$S = \left[\frac{\partial P}{\partial h} \right]_{h_{max}} = 2 \cdot a \times \frac{E_r}{1 - \nu}$$

- E_r : le module réduit
- ν : le coefficient de Poisson du matériau testé
- $a = \sqrt{\frac{A_c}{\pi}}$: le rayon de la surface de contact, calculé à partir de l'aire de contact projetée A_c , qui dépend elle-même de l'indenteur utilisé (Pointe sphérique, pyramidale, etc).

On relie alors le module réduit E_r au module élastique de l'échantillon E par l'intermédiaire du module de Young et du coefficient de Poisson de l'indenteur E_i et

ν_i . Dans le cadre des études du tissu osseux, le coefficient de Poisson du matériau est fixé à 0,3 (Fan et al., 2006, 2007; Hoc et al., 2006; Imbert et al., 2014).

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

La dureté de l'échantillon est calculée à partir de la charge maximale $P_{\max}$: $H = \frac{P_{\max}}{A_c}$

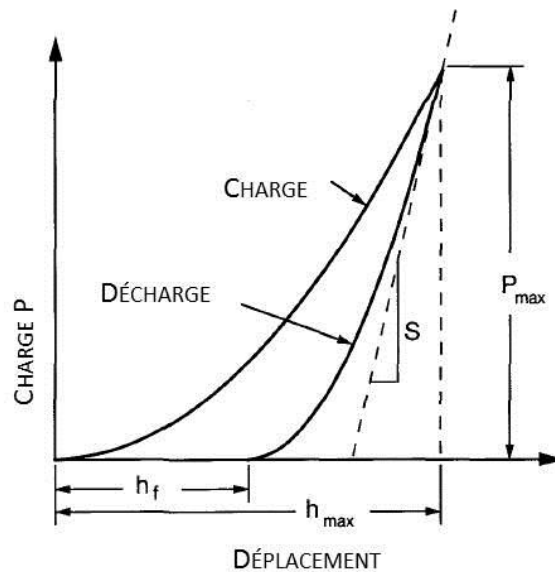


Figure 2-5 Cycle de charge et de décharge d'un nano-indenteur. $P_{\max}$ est la charge maximale d'indentation ; $h_{\max}$, la profondeur atteinte par l'indent à $P_{\max}$; h_f la profondeur de l'empreinte de l'indent après la décharge complète de l'échantillon ; S : rigidité de décharge.

Un raffinement de cette méthode, développée par Oliver et Pharr, est la mesure du module de Young tout au long du chargement de l'échantillon en effectuant des micro-cycles de charge et de décharge pour calculer à chaque instant le module de Young (CSM method) (voir Figure 2-6).

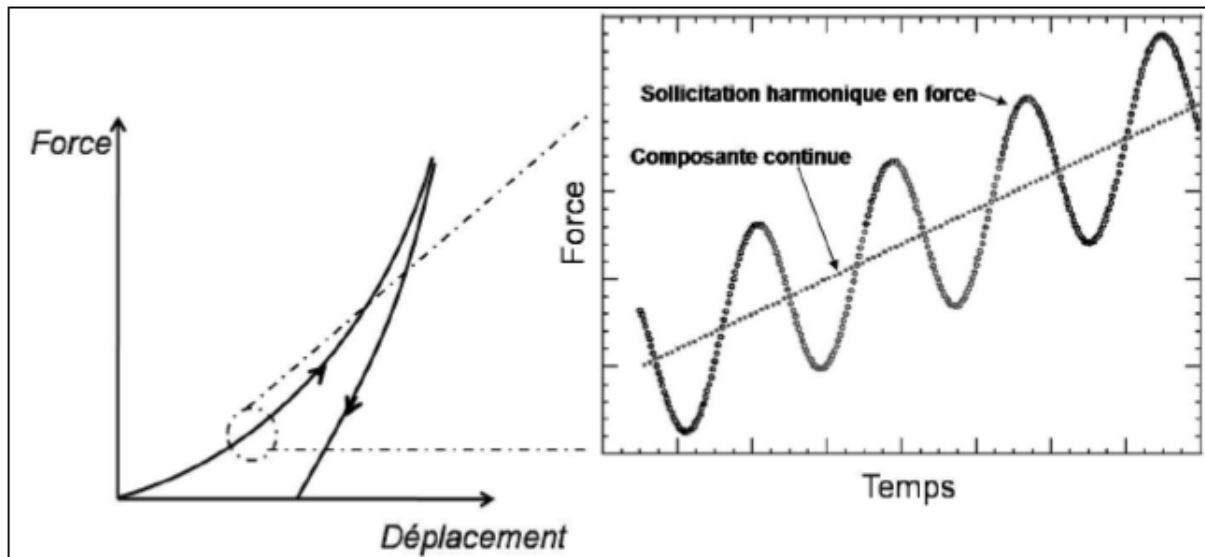


Figure 2-6 Principe de la mesure du module de Young de manière continue (CSM) La charge augmente régulièrement tout en étant sollicitée de manière harmonique.

La nanoindentation est une technique utilisée depuis de nombreuses années pour tester les propriétés mécaniques de l'os (Rho et al., 1997), ce qui permet d'avoir de nombreuses valeurs de références pour les tissus osseux sains (Fan et al., 2002; Hoc et al., 2006; Rho et al., 1997; Turner et al., 1999; Zysset et al., 1999) et pathologiques (Fan et al., 2006, 2007; Nalla et al., 2006; Weber et al., 2006).

À une autre échelle, les propriétés mécaniques de l'os peuvent être testées par des tests classiques de flexion trois points, de torsion, ou de compression. Cependant, ces différentes caractérisations mécaniques demandent des échantillons plus conséquents que ceux fournis durant cette thèse.

L'étude des propriétés mécaniques est une méthode permettant d'évaluer la qualité du tissu osseux ou de son arrangement. Cependant, les informations apportées par les mesures de nano indentation n'expliquent pas les différences qu'il peut y avoir dans les composants de l'os induisant des écarts d'élasticité ou de résistance à la rupture. La spectroscopie Raman est une technique d'analyse des matériaux qui apporte des informations sur la structure et l'arrangement des constituants à l'échelle du nanomètre. Ainsi, la spectroscopie Raman caractérise le collagène et l'hydroxyapatite de l'os.

2.4 Caractérisation des propriétés physico-chimiques par micro-spectroscopie Raman

La micro-spectroscopie Raman est une technique non destructive d'étude des matériaux qui consiste à envoyer une onde LASER à une fréquence donnée, et à observer les ondes qui sont renvoyées par le matériau. En effet, en interagissant avec le matériau, l'onde lumineuse change de fréquence et l'analyse de la lumière rétrodiffusée apporte des informations sur les composants du matériau et leurs liaisons.

Dans le cadre de l'étude des tissus osseux, il est intéressant de regarder la qualité du collagène et de l'hydroxyapatite pour déterminer l'impact de modifications des composants et de leur nano-organisation aux échelles supérieures.

Comme cela a une incidence sur les propriétés mécaniques de l'os, il est notamment important de quantifier les proportions respectives entre le minéral et le collagène. La dénomination de ratio mineral-to-matrix (MMR) désigne la proportion relative d'hydroxyapatite par rapport à celle de collagène. Il est important de remarquer que ce n'est qu'un ratio, une augmentation pouvant se traduire par une hyperminéralisation, mais aussi par une diminution de la part de collagène dans le tissu osseux.

De plus, l'hydroxyapatite, le minéral de base de l'os, présente des impuretés dans sa structure, ce qui abaisse l'énergie nécessaire à sa dissolution et le différencie de l'hydroxyapatite synthétique qui ne présente pas ces impuretés. Ces impuretés sont généralement des substitutions de la partie phosphate de la molécule par un groupement carbonate. Avec l'âge, ce taux augmente généralement.

Par ailleurs, l'épaisseur des cristaux d'hydroxyapatite est caractérisée par un paramètre appelé cristallinité. Lors de l'ostéogénèse, et plus particulièrement lors de la minéralisation, les cristaux d'hydroxyapatite s'épaississent jusqu'à avoir une taille d'à peu près 5 x 25 x 50 nm. La cristallinité permet de qualifier l'épaisseur de ces plaquettes.

Le collagène, quant à lui, est constitué de trois molécules de tropocollagène assemblées qui forment la fibre de collagène. Cette fibre s'organise précisément avec les autres fibres de collagène liées entre elles par des liaisons covalentes. La

qualité de ces liaisons, plus précisément la quantité de liaisons croisées/réticulées hydroxypyridinoline, quantifie la maturité du collagène (Bailey et al., 1998; Knott and Bailey, 1998).

Cette technique, et en particulier son application à l'os, sont assez récentes. Il nous a donc paru essentiel, au début de cette thèse, de faire le point sur les apports de cette technique à l'heure actuelle et de bien mettre en évidence les biomarqueurs potentiels. Ce travail a fait l'objet d'un chapitre intitulé « Raman Spectroscopy as a biomarker-investigative tool in bone metabolism » dans *Biomarkers in Bone Disease* (Bossier et Ogier, 2016). Ce chapitre est intégralement reproduit ci-dessous.

List of abbreviations :

- BMD Bone Mineral Density
- BP Bisphosphonate
- FWMH Full Width at Maximum Height
- GAG Glycosaminoglycan
- IR Infrared Spectroscopy
- NIR Near Infrared
- MicroCT Micro Computed Tomography
- PCA Principal Component Analysis
- PG Proteoglycan
- RS Raman Spectroscopy

2.4.1 Introduction

Bone is a living material with a composite structure. It combines the elasticity of an organic matrix with the strength of mineral components. This composition enables bone to be efficient and light. Furthermore, it allows the bone to easily restore itself in cases of an injury or to endure long and repetitive shocks caused by walking or jumping. Bone has remarkable mechanical properties because of its composite structure and its multiscale organization. Bone has different composition levels that range from the Angström to millimetre scale (Rho et al., 1998). The smaller levels influence the upper levels.

The correlation of mechanical properties between the tissue level (micrometre level) and the whole bone level has been found (Bi et al., 2011; Gallant et al., 2013). It is important to determine the right criterion to assess the bone quality from a lower

scale. Indeed, the bone mineral density has been proven to be insufficient to fully characterize bone (Gamsjaeger et al., 2010). The quantity and distribution of bone are not enough. Additionally, bone quality must be taken into account to quantify the mechanical properties of bone (Kohn et al., 2008). Over the last 20 years, two definitions of bone quality have been used. The first definition accounts for bone properties that influence its biomechanical properties. The second definition accounts for bone fracturing factors, which are independent from the bone mass or quantity (Hernandez and Keaveny, 2006). Therefore, bone quality takes into consideration the compositional properties of bone and its architecture. This enables bone to attain required mechanical properties and, thus, to fulfil its biological functions. The mineral and organic composition and arrangement determine the bone quality (Morris and Mandair, 2011). Additionally, some authors include the remodelling dynamic (McCreadie et al., 2006).

Bone is a material that remodels itself using the resorption and formation cycles. If the equilibrium between the two phases is disturbed, or if one phase is not correctly executed, the quality of bone can be affected. This can cause osteoporosis or other metabolic bone diseases. Biomarkers, which are used to quantify or to qualify the disease severity (Gamsjaeger et al., 2014a) and to help with aetiology, are the key elements.

Raman spectroscopy is a technique that provides an access to chemical and organizational bone properties on a micrometre scale (Bazin et al., 2009). The chemical and organizational bone properties are considered to be biomarkers of bone quality (Morris and Mandair, 2011).

The purpose of the defined biomarkers is to predict the mechanical properties at the whole bone level based on micrometre scale measurements (Kim et al., 2012) and to understand the influence of the smaller structure on the upper (Mandair and Morris, 2015; Ojanen et al., 2015; Yerramshetty and Akkus, 2008). The correlation between mechanical and chemical properties at a micrometre level corroborate the utility of biomarkers investigated using Raman spectroscopy (Hammond et al., 2014; Imbert et al., 2014).

2.4.2 Bone structure

The hierarchical structure of bone has been highlighted by many publications that accurately detailed a multiscale organization of bone (Rho et al., 1998). At a macroscopic scale, the two types of bone are observed: the trabecular bone (cancellous or spongy bone) and the cortical bone (compact bone) (Figure 2-7). The former is composed of trabeculae and is primarily found in epiphysis where the stress is multidirectional. However, the latter is very thick in the diaphysis because of its high mechanical (compressive) strength. The cortical bone microstructure consists of cylindrical units, osteons (100-500 μm), that are parallel to bone axis and are separated by interstitial tissue (partial osteons due to the secondary remodelling and primary bone). At the sub-microscopic level, the osteons are organized in concentric lamella ranging from the Havers canal in the centre to the cement line at the periphery. The Havers canals are lined with nerves and vessels that supply cells with nutrients. The Volkmann canals are oriented perpendicularly to the Havers canals and connect them together.

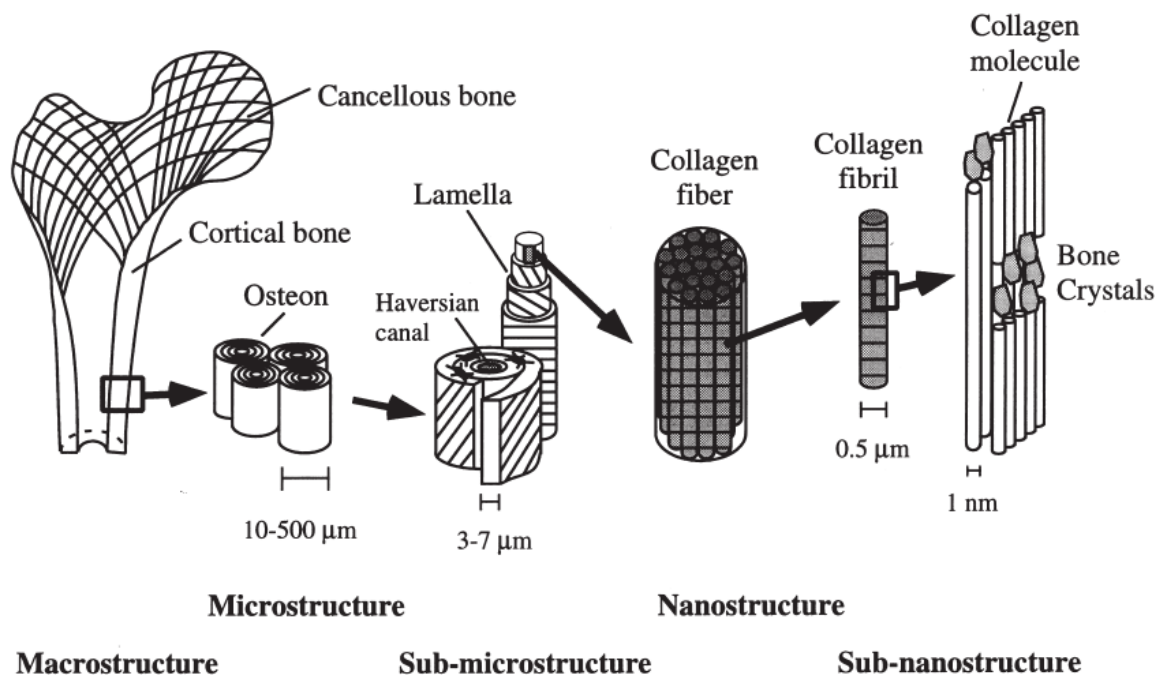


Figure 2-7 Hierarchical structural organization of bone (reprinted authorized by Rho et al., 1998). Hierarchical structural organization of bone, from bigger to smaller structures: cortical and cancellous bone; osteons with the Haversian systems; lamellae; collagen and mineral platelets.

To understand the unique mechanical properties of bone, it is important to visualize its heterogeneous composition at the nanometre scale. Bone is a composite material that is made of an organic matrix and inorganic mineral crystals. The organic matrix primarily consists of type I collagen fibres that are organized in fibrils. The mineral crystals are platelets of carbonated hydroxyapatite with a nanometre size (50 x 25 x 3 nm) and are oriented with their long axis parallel to collagen molecules (300 nm) (Figure 2-8). The crosslinks between collagen molecules stabilize the structure. The mineral part of bone represents 60 to 70% of the material weight. The rest are proteins, primarily type I collagen (90% of the proteins), cells and water.

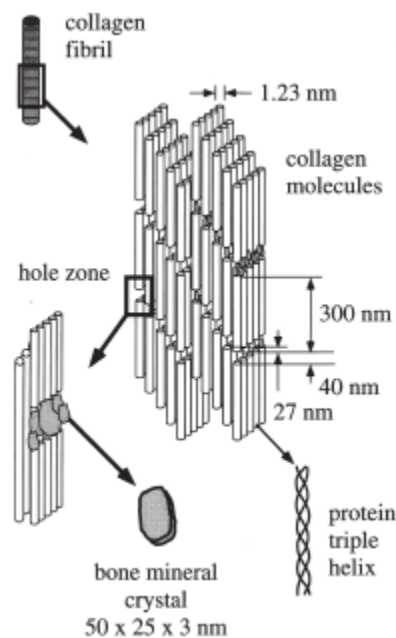


Figure 2-8 The structure at a nanometre scale (reprinted authorized by Rho et al., 1998). The structure of collagen fibrils and platelets of carbonated hydroxyapatite.

Because the apatite crystals are less elastic and more brittle than collagen fibres, the bone strength is induced by the mineral part, while the tissue elasticity is characterized by the organic part (Buchwald et al., 2012a; Kozielski et al., 2011).

2.4.3 Raman principle and technological solutions

Currently, the clinical imaging modalities for measuring bone mass and density, such as dual energy X-ray absorptiometry (DXA) or bone mineral content (BMD), do not completely characterize the bone quality (Hernandez and Keaveny, 2006). Additionally, they are inadequate for detecting the earliest disease stages, for determining aging or for verifying the treatment. Vibrational spectroscopies offer several advantages for biological investigation because these techniques provide quantitative information on both the organic matrix and mineral phases of bone. Raman and infrared spectroscopies as screening tools are appealing for developing medical diagnosis to compare normal and pathological tissue and to study disease progression.

Raman spectroscopy is a light scattering technique that measures and quantifies energetic changes in light. The incident photons, generated using a laser, interact with molecules present in a sample. The amount of energy either lost or gained by a photon is characteristic of the nature of each bond (only 1×10^{-7} of the scattered light is Raman). Thus, the change in wavelength (shift) of scattered photon provides chemical and structural information, referred to as fingerprint. These shifts, expressed in wavenumber units (cm^{-1}), correspond to the vibrational energy of molecules. Not all vibrations are observable using Raman spectroscopy (depends on the symmetry of molecules). However, the result is sufficient to precisely identify different molecules that are present in the sample, and the intensity of the peaks can be used to quantify their concentration (Bazin et al., 2009; Nyman et al., 2011). Figure 2-9 illustrates the information that Raman spectroscopy can provide.

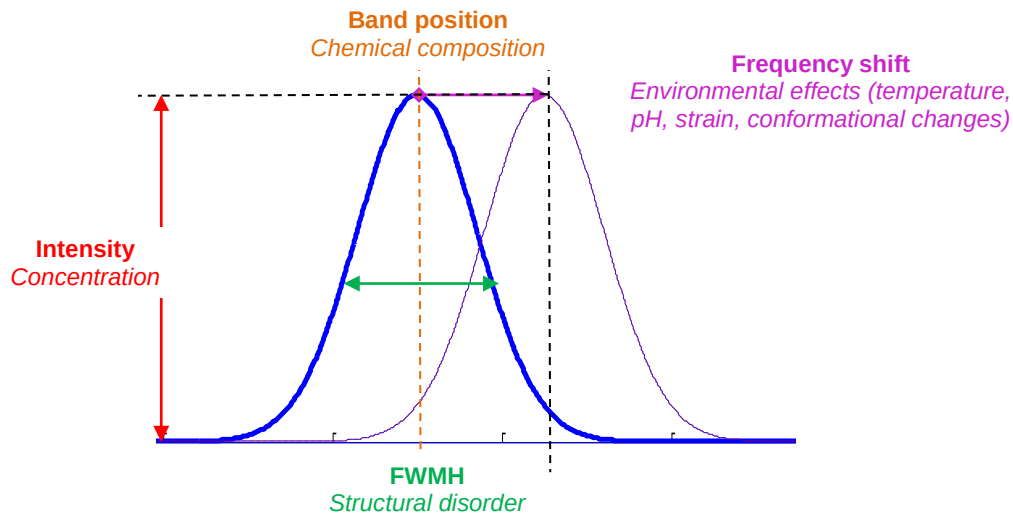


Figure 2-9 Information provided by Raman spectroscopy Raman spectrum provides a fingerprint of molecules and bonds that are present in the sample : Raman spectrum provides a fingerprint of molecules and bonds that are present in the sample:

- i) Band positions are characteristic of the chemical composition.
- ii) Frequency shifts are induced by the structure of the molecules and their local environment.
- iii) Intensity primarily corresponds to the concentration of molecule but can also be sensitive to laser polarization.
- iv) Linewidth (FWHM) reflects the crystal structure.

The infrared (IR) and Raman spectroscopic (RS) techniques provide complementary information on the quantity and quality of bone composition. Infrared transmission spectroscopy is based on a different physical principle, where the photons are absorbed by molecular bonds of the sample. Because the physical background is different, some vibrations that are not observable in IR spectra are visible in Raman spectra and vice versa. Because IR spectroscopy is a transmission technique, it requires more sample preparation (embedding and cutting of thin sample sections). Furthermore, IR spectroscopy is sensitive to water, which makes biological investigations difficult. However, Raman spectroscopy has clear advantages:

- RS is relatively insensitive to water and allows measurements on fully hydrated samples with minimal preparation.
- RS is a non-destructive method. Thus, the same sample can be analysed using several different techniques.
- RS offers micron scale spatial resolution (0.6–1 μm) compared to the IR technique (5–10 μm) and allows to differentiate between various important structures such as cement lines, lamellae and micro-crack surroundings (Buchwald et al., 2012a; Kazanci et al., 2007).

A recent study (Turunen et al., 2011) compared characterization of maturing rabbit cortical bone using the IR and near infrared RS techniques. The results demonstrated multiple correlations between compositional parameters calculated from IR and RS. In addition, there were correlations with bone mineral density (BMD) determined using micro-computed tomography.

Bone has a composite structure. Thus, a single point analysed using Raman microspectroscopy does not accurately represent the chemical composition and structure of the whole specimen. Nevertheless, a motorized stage coupled with a Raman microscope allows acquisition of Raman spectra maps of the sample. Therefore, Raman imaging is gaining popularity because it provides spatial information of samples (Kozielski et al., 2011; Timlin et al., 2000).

Raman signal depends on the composition of samples and is sensitive to the local orientation of fibres or crystals in relation to polarization of incident and scattered light (Goodyear et al., 2009).

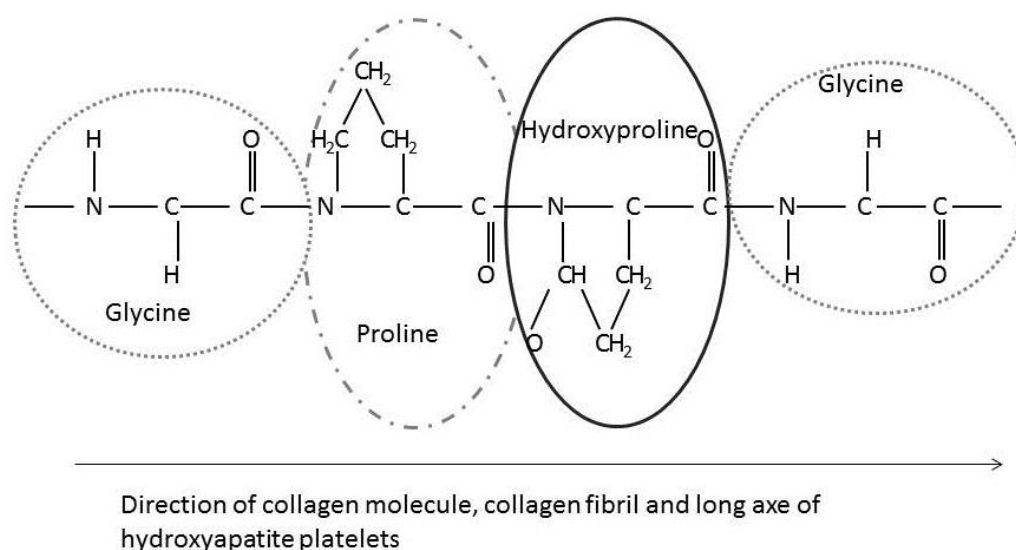


Figure 2-10 Sketch of the smallest collagen motif. Structure of the smallest collagen molecule motif. i) C=O bonds are perpendicular to the collagen molecular axis. ii) C-N bonds are either parallel to the collagen molecular axis and perpendicular to it in the proline and hydroxyproline groups.

Figure 2-10 describes the structure of collagen molecules. In collagen, the C=O bonds are perpendicular to the collagen molecular axis. However, the C-N bonds are either perpendicular or parallel to this axis. The Amide I band is attributed primarily to the C=O stretching vibration. The band is more intense when the polarization of incident light is perpendicular to the collagen fibres. The Amide III band is attributed to C-N vibrations and shows two different vibrational modes for perpendicular and

parallel orientations. In apatite crystals, the C-axis, parallel to the collagen fibres, is coupled with ν_1 phosphate vibrations. Therefore, the phosphate ν_1 band intensity is more intense when the polarization of incident light is parallel to the collagen fibres. However, the phosphate ν_2 and ν_4 bands are less sensitive to the orientation effects (Buchwald et al., 2012a; Kozielski et al., 2011). Therefore, Raman spectral imaging can provide much information about the composition and organization of bone tissue. The mineral and organic composition of bone tissue can be determined from bands that are not sensitive to the polarization direction. However, the orientation of collagen fibres can be estimated using bands that are orientation dependent (Kazanci et al., 2006, 2007).

The development of non-invasive diagnostics tools is a major goal today, and Raman spectroscopy has recently seen major advances in the area of *in situ* characterization for biological studies. An intravital Raman spectroscopy study allows the monitoring of the mineral and organic composition of bone tissue *in vivo* (Penel et al., 2005). Another study focused on a new technique in which a pulse laser probe recorded the Raman spectrum of bone underneath the skin (Draper et al., 2005). Currently, new probes are being developed to perform Raman arthrospectroscopy (Esmonde-White et al., 2011).

2.4.4 Bone spectra

2.4.4.1 Experimental preparation

Raman spectroscopy does not require complicated sample preparation. The analysis can be performed on fresh, frozen, fixed or embedded samples with thicknesses from submicron scale to that of intact bone (Timlin et al., 2000). Nevertheless, fixative solutions and embedding media have significant effects on the composition and physicochemical properties of bone, thus altering the Raman spectra (Yeni et al., 2006). These techniques may require the characterization with identical parameters of solutions and media separately to examine the overlaps between the spectra that can subsequently be subtracted from the bone spectra.

Because flat surfaces reflect more Raman scattering light, it is recommended to polish the analysed surface (Shen et al., 2010). Raman spectra of bone can be recorded under dry or physiological conditions (Bart et al., 2014; Hammond et al.,

2014; Ramasamy and Akkus, 2007; Yao et al., 2013; Yerramshetty et al., 2009, 2006).

The anatomical location of bone can also have a significant effect. The analysis of bands on cortical and trabecular bones showed that cortical bone has compositional characteristics of older bone, which is possibly due to the higher bone turnover that has been traditionally reported to be in the trabecular compartment (Goodyear et al., 2009). On long bones, it has been confirmed that the chemical composition of bone changes along the length of bones and across the cortex from the periosteum to the endosteum (Buckley et al., 2014). On a lower scale, osteonal tissue, interstitial tissue, cement lines, and lamellae can be analysed individually (Kazanci et al., 2006).

The interference of background fluorescence obscures prominent Raman bands of mineral and matrix components of bone tissue. Although fluorescence can be dealt with by using a variety of techniques, such as the utilization of a confocal configuration or photo bleaching (Golcuk et al., 2006), the choice of an appropriate wavelength is a compromise between longer wavelengths (NIR) that reduce the protein fluorescence and a shorter excitation that can improve the sensitivity (Raman scattering intensity is inversely proportional to the fourth order of the excitation wavelength). Utilization of near-infrared excitation at 785 nm remains the most commonly used wavelength because it minimizes the fluorescence.

2.4.4.2 Preprocessing

Currently, basic preprocessing consists of i) removing cosmic ray artefacts, ii) removing noisy spectra using a wavelet technique, if necessary, iii) filtering the data using a multipoint linear moving average, iv) subtracting the underlying background signal using an iteratively fitted polynomial (Lieber and Mahadevan-Jansen, 2003), and v) performing curve fitting or deconvolution to calculate the peak intensities and positions. Preprocessing is often performed using custom written procedures in Matlab (the Mathworks Inc., MA, USA). Then, spectra are analysed using different methods. Macroscopic information can be obtained from the direct comparison of spectra, and more accurate results can be derived by comparing the peak intensities and the position of the bands (the shift and width).

Without calibration of the intensity axis (Mandair and Morris, 2015; Morris and Mandair, 2011), peak intensities depend on the Raman scattering efficiency, laser

power, optical components in the Raman system, characteristics of the sample (irregularity, grain size, degree of polishing, refractive index of the surface) and variations in the distance from the objective to the sample. Accordingly, Raman peak ratios are usually used rather than peak intensities to detect differences in bone tissue composition (Nyman et al., 2011). Regarding the choice of comparing either the intensities or the areas of the peaks, some authors advocate that using peak intensities causes less error because of the smaller influence of the baseline (Gamulin et al., 2013), whereas some researchers have found no differences (Goodyear et al., 2009).

2.4.4.3 Assignments

Figure 2-11 shows a typical Raman spectrum of bone tissue with labels for the major bands that correspond to the mineral and organic constituents. Table 1 lists the positions of all of the relevant Raman vibrational bands in the bone spectra (Bansil et al., 1978; Gamulin et al., 2013; Kazanci et al., 2007; Mandair and Morris, 2015; Pinheiro et al., 2014).

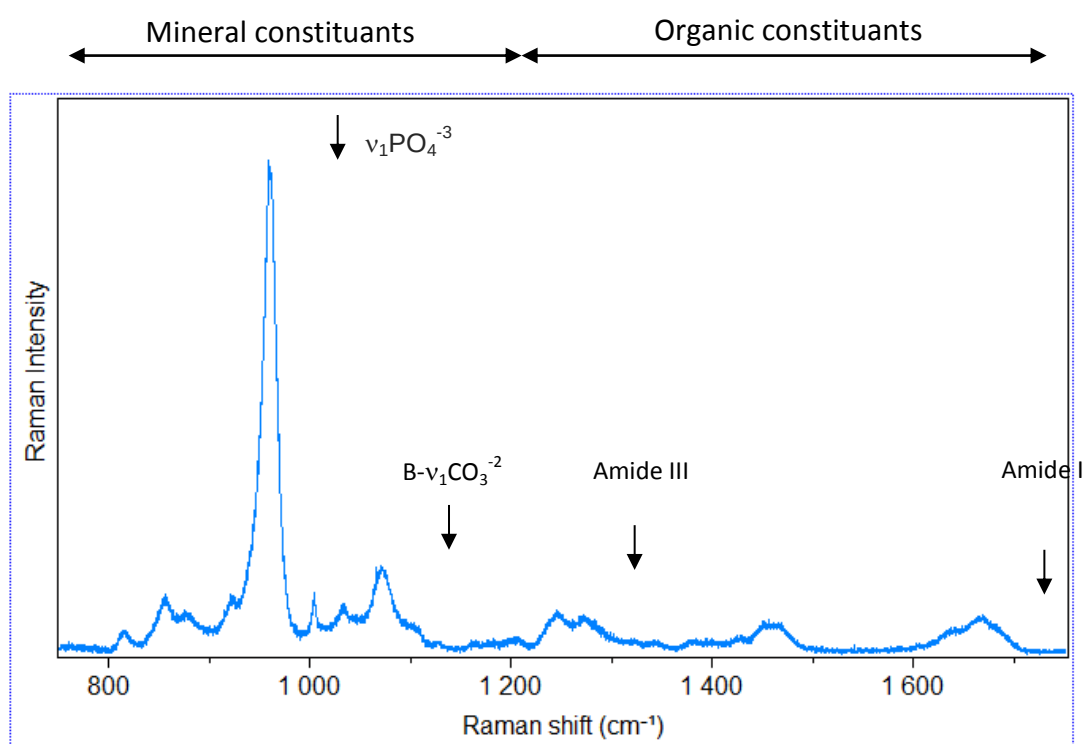


Figure 2-11 Typical Raman spectrum of bone tissue after baselining and filtering showing the main bands between 750 and 1800 cm^{-1} : the 960 cm^{-1} band corresponds to phosphate, the 1075 cm^{-1} band corresponds to the type B carbonate, the large 1250 cm^{-1} band corresponds to the Amide III band, and the large 1667 cm^{-1} band corresponds to the Amide I band.

The most prominent band that is associated with the mineral component of bone is the phosphate ν_1 symmetric stretch (P-O stretch) at $\approx 960\text{ cm}^{-1}$. Other phosphate bands, the ν_2 and ν_4 modes, appear at ≈ 430 and $\approx 590\text{ cm}^{-1}$, respectively. The ν_3 mode at $\approx 1045\text{ cm}^{-1}$ is broad and overlaps other bands; thus, it is not pertinent.

The mineral bone component is also represented by carbonate ν_1 symmetric stretching (C-O stretch) at $\approx 1070\text{ cm}^{-1}$.

Important matrix bands include the C-C stretches of proline and hydroxyproline at $\approx 855\text{ cm}^{-1}$ and $\approx 875\text{ cm}^{-1}$, respectively, which are specific to collagen, and the CH_2 wagging mode at $\approx 1450\text{ cm}^{-1}$, which is a general marker for protein content. The vibrations for the collagen backbone include the amide III (C-N stretches and N-H bends) and amide I (C=O stretch) bands, which reach maximum intensities at $\approx 1250\text{ cm}^{-1}$ and $\approx 1660\text{ cm}^{-1}$, respectively.

Raman shift (cm ⁻¹) (≈)		Assignments
430	s	P-O stretching of phosphate ($\nu_2\text{PO}_4^{-3}$)
590	s	P-O stretching of phosphate ($\nu_4\text{PO}_4^{-3}$)
815		C-C stretching of backbone
855	m	C-C stretching of proline (
875	m	C-C stretching of hydroxyproline
920	sh	C-C stretching of proline
960	vs	P-O symmetric stretching of phosphate ($\nu_1\text{PO}_4^{-3}$)
1003	m	C-C Phenylalanine ring breathing (aromatic ring)
1045		asymmetric stretching of phosphate ($\nu_3\text{PO}_4^{-3}$)
1060	br	Proteoglycan
1070	s, br	C-O symmetric in plane stretching of B-type carbonate ($\nu_1\text{CO}_3^{-2}$)
1075	w, br	asymmetric stretching of phosphate ($\nu_3\text{PO}_4^{-3}$)
1103	w	A-type carbonate ($\nu_1\text{CO}_3^{-2}$)
1077		O-P-O asymmetric stretching of phosphate ($\nu_3\text{PO}_4^{-3}$)
1246	br	C-N-H stretching of Amide III (β -helix conformation and random coil)
1272		Amide III (α -helix conformation)
1298		Lipids ($\delta=\text{CH}$)
1375		Proteoglycan (CH_3 glycosaminoglycans)
1458	br	δCH_2 bending mode in proteins and lipids
1460		$\delta\text{CH}_2/\text{CH}_3$ deformation
1667	s, br	C=O stretch of Amide I (α -helix conformation)
1690	sh, br	C=O stretch of Amide I (β -sheet conformation)

Table 2-1 Raman peak positions and bands assignment (s), strong; (m), medium; (w), weak; (sh), shoulder; (br) broad; (v), very (Bansil et al., 1978; Gamulin et al., 2013; Kazanci et al., 2007; Mandair and Morris, 2015; Pinheiro et al., 2014)

2.4.5 Biomarkers

It is important to define the criterion to quantify the quality of bone; thus, the utilization of a biomarker is a method to determine the influence of the mineral and organic portions of bone on its mechanical properties. Biomarkers for bone turnover and bone resorption are recommended to be included in observational and prospective clinical trials, according to the International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Gong et al., 2014). In this chapter, four biomarkers were chosen to qualify bone: three feature the impact of the mineral and one highlights the contribution of collagen crosslinking. The mechanical properties are impacted by three features of bone minerals: the crystallinity, the mineral to matrix ratio (Freeman et al., 2001) and the carbonate substitution (Carretta et al., 2015). These biomarkers are all ratios except for the crystallinity; thus, if both values increase, the ratios do not vary.

2.4.5.1 Mineral to matrix ratio

The mineral to matrix ratio is a biomarker that quantifies the degree of mineralization of bone. As the ratio becomes larger, the mineral content in bone becomes higher. The net mineralization can be determined used ash weight measurements (McCreadie et al., 2006). The ratio can be linked to the calcium content that is measured by quantitative back-scattered electron microscopy with a correlation coefficient of 0.75 (Roschger et al., 2014). The mineral to matrix ratio is not a marker of the differences of substitution in the crystals.

Because the Raman confocal microscopy polarization can influence the signal, it is important to take this in account in the selection of the band for the calculation of this ratio. In prior studies, the phosphatase $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ ($\approx 960\text{ cm}^{-1}$) and collagen amide I ($\approx 1677\text{ cm}^{-1}$) bands were used to compute this ratio (Timlin et al., 1999), but they were strongly dependent on the orientation. (Gamsjaeger et al., 2010; Kazanci et al., 2006; Ramasamy and Akkus, 2007; Roschger et al., 2014). It is recommended thus either to add a depolarizer or to use another band that is not sensitive to an orientation effect, such as the phosphatase $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ band ($\approx 438\text{ cm}^{-1}$), the collagen amide III band ($\approx 1256\text{ cm}^{-1}$), the phosphatase $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ band ($\approx 589\text{ cm}^{-1}$), or the collagen amide III ($\approx 1256\text{ cm}^{-1}$) band (Kazanci et al., 2006). Some studies have shown that the mineral to matrix ratio is often calculated using the phosphatase $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (≈ 960

cm^{-1}) to the CH_2 wagging band ($\approx 1450 \text{ cm}^{-1}$) (Burket et al., 2011, 2013; Carden et al., 2003; Kim et al., 2012; Yao et al., 2013; Yeni et al., 2006).

The mineral to matrix ratio is dependent on the origin of the bone in the skeleton, for example either from the femoral head or femoral metaphysis. The ratio is higher in the metaphysis than in the epiphysis of a human femur (Buckley et al., 2014). Nevertheless, even though the site has an influence, on a mouse sample, there was no difference between the anterior and posterior quadrants of the femur (Ramasamy and Akkus, 2007).

2.4.5.2 Crystallinity

Crystallinity is an indication of the size of the hydroxyapatite crystals along their long axes direction (Pinheiro et al., 2014) with a very high correlation between the biomarker and the c length ($R = 99,2\%$) (Morris and Mandair, 2011). It is also considered to be a biomarker of mineral maturation (Yamamoto et al., 2012). It depends on the disorder and the strain that the mineral lattice experiences (Timlin et al., 2000). The usual method for determining the crystallinity is the inverse of the full width at maximum height ($1/\text{FWMH}$) of the ν_1 phosphate peak (Akkus et al., 2004; Awonusi et al., 2007; Bi et al., 2011; Burket et al., 2011; Carretta et al., 2015; Freeman et al., 2001; Goodyear et al., 2009; Imbert et al., 2014; Kavukcuoglu et al., 2009; Kim et al., 2012; Meganck et al., 2013; Newman et al., 2014; Nyman et al., 2011; Ojanen et al., 2015; Orkoula et al., 2012; Silva et al., 2006; Turunen et al., 2011; Yavorsky et al., 2008; Yerramshetty et al., 2009). However, some authors also measure this biomarker with the position of the ν_1 phosphate peak (Pinheiro et al., 2014; Timlin et al., 1999).

2.4.5.3 Carbonate substitution rate

The carbonate to phosphate ratio is a biomarker that measures the amount of carbonate substitution in the hydroxyapatite lattice. Indeed, human bone mineral differs from synthetic hydroxyapatite in that its lattice is not pure hydroxyapatite but has ions substituted primarily with carbonate. There are two types of carbonate substitutions: A-type, which is the substitution of a carbonate for a hydroxyl group, and B-type, which is a carbonate for phosphate substitution and is the most visible substitution in Raman analysis with a specific Raman shift at 1071 cm^{-1} . Calibration curves of the content of CO_3^{2-} substitution in synthetic hydroxyapatite have been

made to determine the substitution rates and their influence on the Raman spectrum of bone and enamel samples (Awonusi et al., 2007; Sønju Clasen and Ruyter, 1997). The carbonate substitution rate is usually calculated with the ratio of the intensities (respectively the area) of the Raman shift at 1070 cm^{-1} of the type B carbonate substitution on the intensities (respectively the area) of the Raman shift at 960 cm^{-1} of the $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (Akkus et al., 2004; Bi et al., 2011; Burket et al., 2011; Donnelly et al., 2009; Imbert et al., 2014; Kavukcuoglu et al., 2007; Kim et al., 2012; Kozielski et al., 2011; Orkouda et al., 2012; Penel et al., 2005; Ramasamy and Akkus, 2007; Roschger et al., 2014; Silva et al., 2006) (respectively Gentleman et al., 2009; Hammond et al., 2014; Kohn et al., 2008; McCreadie et al., 2006; Newman et al., 2014; Tarnowski et al., 2002; Turunen et al., 2011; Wallace et al., 2009; Yao et al., 2013).

2.4.5.4 Collagen maturity and cross linking

The above biomarkers mainly describe the state of the hydroxyapatite mineral in the bone. However, collagen also must be qualified. Because collagen organizes itself in highly structured fibrils with specific cross-links, quantifying its maturation is important. Collagen cross linking evolves with the age of the protein fibrils, which has an impact on the biomechanical properties of collagen and on bone (Bailey et al., 1998; Knott and Bailey, 1998). The relative pyridinoline compounds (major trivalent collagen cross link) qualify the quality of collagen. This is calculated as the ratio of the peak heights or areas of different parts of the amide I band, which is typically the ratio of the peak at 1660 cm^{-1} to the peak at 1690 cm^{-1} (Bart et al., 2014; Gamsjaeger et al., 2014a; Goodyear et al., 2009; Kohn et al., 2008; Orkouda et al., 2012; Pinheiro et al., 2014; Turunen et al., 2011; Wallace et al., 2009). Nalla et al. observed a good correlation with aging using the 1610 cm^{-1} to 1655 cm^{-1} ratio because the peak at 1655 cm^{-1} increases in intensity with age. This is consistent with an increase in the non-reducible cross-linking content (Nalla et al., 2006). Pinheiro et al. used the ratio of collagen type II to type I ($854\text{ cm}^{-1}/881\text{ cm}^{-1}$) to qualify this quality and the cross linking: the more non-reducible crosslinks there are, the older and less elastic the bone will be (Pinheiro et al., 2014). Thus, a smaller ratio is preferable.

2.4.5.5 *Other biomarkers*

The orientation of collagen fibres can be estimated using ratios that are orientation dependent ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}/\text{Amide I}$) by comparing with ratios that are not orientation dependent ($\nu_2\text{PO}_4^{3-}/\text{Amide III}$, $\nu_4\text{PO}_4^{3-}/\text{Amide III}$) in spongy bone tissue (Buchwald et al., 2012a; Kozielski et al., 2011).

Proteoglycans (PG) are non-collagenous proteins, and the ratio of the PG ($\approx 1375\text{ cm}^{-1}$) to the amide III band allows the characterization of the relative PG content in bone and cartilage (Gamsjaeger et al., 2014a).

2.4.6 **Biomarkers for investigating bone metabolism**

Table 2-2 provides the research articles in which Raman biomarkers have been used to characterize physiological changes, such as growth, exercise, aging and diseases for different bone types.

Bone type and specificity	Laser wavelength (nm)	Mineralization Ratios	Collagen maturity	Key words	References
Rat, wet	532	I & P	960 cm ⁻¹ /1663 cm ⁻¹	Physiochemical properties; Mineral crystals; Aging	Akkus et al, 2004
Hydroxyapatite artificial	785	P		Carbonated apatite	Awonusi et al, 2007
Mouse OI model, submerged in PBS	660	I		Physiochemical properties; Crystallinity; Osteogenesis imperfecta	Bart et al, 2014
Mouse, dehydrated and embedded	785	I	960 cm ⁻¹ /1665 - 1250 - 856 cm ⁻¹	Nanoindentation; Micro CT; Fracture risk	Bi et al, 2011
Human	785	A	v ₂ /Amide III, v ₄ /Amide III	Spongy bone; Fibers orientation; Mapping; Polarization	Buchwald et al, 2012a
			v ₁ /Amide I (fibers orientation)		
Human	785	A	960 cm ⁻¹ /1244 cm ⁻¹	Osteoarthritis; Subchondral bone; Spongy bone	Buchwald et al, 2012b
			960 cm ⁻¹ /1268 cm ⁻¹ (disorder)		
Human	830	I	960 cm ⁻¹ /Mean(830-900) cm ⁻¹	Long bone; Water; Mineral; Collagen and GAG content	Buckley et al, 2014
Baboon, dry	785	I	965 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹	Aging; Primate; Osteon; Nanoindentation; Tissue properties	Burket et al, 2011
Ovine, dry	785	I	965 cm ⁻¹ /1451 cm ⁻¹	Osteoporosis; Bisphosphonate; Cancellous bone; Mechanical properties	Burket et al, 2013
Bovine	785	I	959 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹	Biomechanic; Fracture; Nanoindentation	Carden et al, 2003
Bovine	532	I	960 cm ⁻¹ /1260 cm ⁻¹	Biomechanic; Finite element method	Carretta et al, 2013a
Human	532	I	960 cm ⁻¹ /1660 cm ⁻¹	Biomechanic; Finite element method; Osteoporosis	Carretta et al, 2013b
Human	532	I	v ₁ /Amide I	Trabecular bone; Strain; Toughness; microCT; Mechanical properties; PCA	Carretta et al, 2015
Rat	785	I	960 cm ⁻¹ /1675 cm ⁻¹	Aging; Nanoindentation; Biomechanic	Donnelly et al, 2009
Horse, hydrated in PBS	785	A		Imaging; Double notch; Bone mechanic	Dooley et al, 2009
Mouse, dry	514	P		Aging; Fluoride treatment; Apatite	Freeman et al, 2001
Mouse, dehydrated and embedded	785	A		Bone maturation; Composition; Orientation	Gamsjaeger et al, 2010
Human, dry	785	A	(410-460) cm ⁻¹ /(1215-1300) cm ⁻¹	Bone material properties; Normative data	Gamsjaeger et al, 2014a
			1660 cm ⁻¹ /(1620-1700) cm ⁻¹		
Human	785	A	(410-460) cm ⁻¹ /(1620-1700) cm ⁻¹	Proteoglycan; Cartilage; Collagen	Gasmjaeger et al, 2014b
Rat	1064	I	v ₁ /Amide I	Bone healing; Osteonecrosis; PCA	Gamulin et al, 2013
Bovine, w/o photobleaching	532	P & I		Photobleaching	Golcuk et al, 2006
Mouse, hydrated in PBS	785	I	589 cm ⁻¹ /1260 cm ⁻¹	Bone composition; Mechanical properties	Goodyear et al, 2009
Bovine	532	P & I		Deformation mechanisms; Micromechanics of bone	Gupta et al, 2006
Rat, hydrated in PBS	660	A	(930-980) cm ⁻¹ /(1550-1720) cm ⁻¹	Diabetes; Nanoindentation; Collagen	Hammond et al, 2014
Human, dry	785	I	961 cm ⁻¹ /1667 cm ⁻¹	Nanoindentation; Mechanical properties; Minerality	Imbert et al, 2014
Mouse, dehydrated and embedded	785	I	961 cm ⁻¹ /1667 cm ⁻¹	Nanoindentation; Mechanical properties; Composition	Kavukcuoglu et al, 2007
Mouse	785	I	961 cm ⁻¹ /1667 cm ⁻¹	Nanoindentation; Mechanical properties; Chemistry of bone	Kavukcuoglu et al, 2009
Human, dehydrated and embedded	532	I	438 or 589 cm ⁻¹ / 1256 cm ⁻¹	Orientation; Composition; Mapping; Osteon	Kazanci et al, 2006
Human, dehydrated and embedded	532	A	438 or 589 cm ⁻¹ / 1256 cm ⁻¹	Orientation; Composition; Imaging	Kazanci et al, 2007
Human	830		960 cm ⁻¹ /1660 cm ⁻¹	Osteoarthritis; Subchondral bone; pQCT; PCA	Kerns et al, 2014
			960 cm ⁻¹ /920 cm ⁻¹		
			960 cm ⁻¹ /(885+870) cm ⁻¹		

Bone type and specificity	Laser wavelength (nm)	Ratios	Mineralization	Collagen maturity	Key words	References
Rat	785	I	961 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹		Nanoindentation; Composite beam theory; Vitamin D	Kim et al, 2012
Human	785	I	961 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹		Nanoindentation; Osteoporosis; Trabecular bone	Kim et al, 2014
Mouse	785	A	958 cm ⁻¹ /(hydroxyproline+proline)	1660 cm ⁻¹ /1690 cm ⁻¹	Mechanical loading; Mechanical properties; Mineral; Collagen	Kohn et al, 2008
Human	785	I	v ₂ /Amide III, v ₄ /Amide III (fibers orientation)	v ₁ /Amide I	Spongy bone; Fibers orientation; Mapping; Polarization	Kozielecki et al, 2011
Human, dehydrated and embedded	785	A	(903-991) cm ⁻¹ /(1616-1720) cm ⁻¹		Osteoporosis; w/o Fracture; Women;	McCreadie et al, 2006
Mouse, kept moist in PBS	785	I & A	960 cm ⁻¹ /(851+873+917) cm ⁻¹ (A) 960 cm ⁻¹ /1445 cm ⁻¹ (I) 960 cm ⁻¹ /amide I (A)	1660 cm ⁻¹ /1690 cm ⁻¹ after five-peak fit	Osteogenesis imperfecta; Bisphosphonates; Fracture repair	Meganck et al, 2013
Human	244	A		1610 cm ⁻¹ /1655 cm ⁻¹	Aging; Fracture toughness; Mechanical properties	Nalla et al, 2006
Rat	660	A	960 cm ⁻¹ /1660 cm ⁻¹		Mechanical properties; Kidney disease	Newman et al, 2014
Human, dry	785	I			Review; Comparison of 15 peak ratios (Osteonal / interstitial tissue; transverse/longitudinal cuts; w/o embedded, dehydrated)	Nyman et al, 2011
Human	785	I	958 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹		Aging; Trabecular bone; Nanoindentation	Ojanen et al, 2015
Rat	1064	I	959 cm ⁻¹ /(855+877+922) cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹ /1685 cm ⁻¹	Osteoporosis; Collagen; Cross-links; Mineral	Orkula et al, 2012
Rabbit, intravital	633				Intravital; Apatic biomaterials; Assignments comparison	Penel et al, 2005
Rat	785	I	1077 cm ⁻¹ /854 cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹ /1670 cm ⁻¹	Bone repair; Biomaterial; Laser & LED Phototherapies	Pinheiro et al, 2014
Mouse, wet	633		960 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹		Bone adaptation; Collagen orientation; Microtesting; Mineral density	Ramasamy and Akkus, 2007
Human, dehydrated and embedded	785	A	(410-460) cm ⁻¹ /(1215-130) cm ⁻¹		Calcium content; Quantitative backscattered electron microscopy	Roschger et al, 2014
Rat	633	I	960 cm ⁻¹ /1451 cm ⁻¹		Osteoporosis; Spinal cord injury	Shen et al, 2010
Mouse, dry	532	A	2946 cm ⁻¹ /960 cm ⁻¹		Bone strength; Collagen organization; Aging	Silva et al, 2006
Mouse	785	A	957 cm ⁻¹ /1665 cm ⁻¹		Mineralization; Mouse calvaria; Multivariate analysis	Tarnowski et al, 2002
Bovine	785				Fatigue loading; Raman imaging; Spectral shifts of phosphate v ₁	Timlin et al, 2000
Rabbit	785	I & A	958 cm ⁻¹ /(917+873+851) cm ⁻¹ 958 cm ⁻¹ /1271 cm ⁻¹ 958 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹ /1690 cm ⁻¹	Maturing cortical bone; Comparison RS / FT-IR	Turunen et al, 2011
Mouse	785	A	960 cm ⁻¹ /1667 cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹ /1690 cm ⁻¹	MicroCT; Mechanical properties; PCR; Biglycan deficiency	Wallace et al, 2009
Rat	780		v ₁ /Amide I, v ₁ /Amide III, v ₁ /CH ₂		Bone allograft; Sterilization; Quality assessment	Yamamoto et al, 2012
Mouse, wet	633	A	960 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹		Osteogenesis imperfecta; Mechanical properties; Gender-dependence	Yao et al, 2013
Mouse, dehydrated and embedded	633	I	960 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹ 960 cm ⁻¹ /1667 cm ⁻¹		Fixation; Embedding medium	Yeni et al, 2006
Human, wet	633		960 cm ⁻¹ /1450 cm ⁻¹		Aging; Mineralization; Crystallinity; Carbonation	Yerramshetty et al, 2006
Human, wet					Osteoporosis; Strength; Crystallinity; Mechanical properties	Yerramshetty and Akkus, 2008

Table 2-2 Summary of acquisition parameters and calculation methods of biomarkers
Ratios can either be Intensity (I), Area (A), and/or Position (P).

Table 2-3 is a summary of the articles that are listed in Table 2 to show the evolution of biomarkers as a function of physiological changes and diseases according to the literature. In this systematic bibliography, all studies did not use all of the biomarkers. However, the table is a summary of all conclusions drawn with respect to the general trends followed by the biomarkers.

Particularity	Mineral to Matrix Ratio	Carbonate to phosphate substitution	Crystallinity	Collagen maturity, quantity of irreducible cross links	References
Physiological developpement					
Growth	↗	↗	↗		Burket et al., 2011; Donnelly et al., 2010; Gamsjaeger et al., 2014a ; Tarnowski et al., 2002; Turunen et al., 2011
Exercise	↗	↘			Kohn et al., 2008; Shen et al., 2010
Aging	↗	↗	↗	↗	Akkus et al., 2004; Burket et al., 2011; Carretta et al., 2013a ; Donnelly et al., 2010; Morris and Mandair, 2010; Nalla et al., 2006 ; Ojanen et al., 2015 ; Yerramshetty et al., 2006
Bone Diseases					
Osteoporosis	↘	↗	↗	↗	Burket et al., 2013; Carretta et al., 2013b ; Freeman et al., 2001; Gong et al., 2014; Kavukcuoglu et al., 2007; Kim et al., 2014 ; McCreadie et al., 2006 ; Morris and Mandair, 2010; Orkoulia et al., 2012; Shen et al., 2010; Silva et al., 2006
Osteogenesis imperfecta with BP	↗	=	↘	=	Imbert et al., 2014 ; Meganck et al., 2013
Osteogenesis imperfecta without BP	↘		↘	↘	Bart et al., 2014; Meganck et al., 2013; Silva et al., 2006; Yao et al., 2013
Congenital Contractural Arachnodactyly		↘			Kavukcuoglu et al., 2007
No osteocalcin		↘	↗		Kavukcuoglu et al., 2009
Other disease					
Diabetes melitus	↗			↗	Hammond et al., 2014
Kidney disease	≈	≈	≈	≈	Newman et al., 2014
Byglycan defficiency	↗		↗	↘	Wallace et al. 2009

Table 2-3 Biomarkers and particularity. Evolution of biomarkers with physiological changes and diseases; References in bold are studies with human subject

2.4.7 Potential applications to Prognosis, other diseases or conditions

2.4.7.1 *Other bone studies*

Biomarkers are also used to determine if the bone structure is altered during experiments. For example, we want to determine if the synchrotron modifies the mineral or the organic portion of a bone (Gupta et al., 2006b), if sterilization impairs bone properties (Yamamoto et al., 2012), if lasers have a positive impact on bone grafts (Pinheiro et al., 2014), or if healing has been completed (Gamulin et al., 2013). Using biomarkers can also be a method to determine if structures are altered by measurements, e.g., if laser energy damages the collagen and mineral organization (Gamsjaeger et al., 2014a; Kozielski et al., 2011).

Researchers have also used biomarkers to follow-up and quantify bone formation in experiments with osteoblasts (Gentleman et al., 2009; Wang et al., 2009).

2.4.7.2 *Joint analysis and other tissue*

Osteoarthritis is a bone disease and a joint disease. Thus, Raman spectroscopy can provide insight into the disease, and the technique can provide information on the synovial fluid, on the cartilage and on subchondral bone (Buchwald et al., 2012b; Esmonde-White et al., 2011; Gamsjaeger et al., 2014b; Kerns et al., 2014; Yavorsky et al., 2008).

Skin has also been studied using Raman spectroscopy with other biomarkers that are more focused on collagen properties; however, the principle remains the same (Zhao et al., 2007).

2.4.7.3 *Biomechanical properties and mechanical testing*

In a mouse model, the Raman composition parameters correlate with the mechanical properties at the tissue level: the mineral to matrix ratio correlated with the nanoindentation modulus and hardness (Bi et al., 2011; Kim et al., 2014). At the whole bone level, the mineral to matrix ratio was also correlated with the post-yield deflection (a measure of bone brittleness) (Bi et al., 2011).

The biomarkers are influenced by the mechanical load applied to the bone samples during the experiments, as Carden et al. showed in their experiments that included Raman imaging at different places next to an indent from the indentation spot (Carden et al., 2003). Indeed, Raman shifts vary in their frequencies and intensities

as the mineral lattice is distorted and as the ion spacing is changed with the load. Moreover, the organic bands are also changed as the crosslinking is degraded (Morris and Mandair, 2011). The same phenomenon has been observed in bone with microdamage that is related to fatigue stimulation (Timlin et al., 1999).

The crystallinity has been linked to mechanical properties, such as degradation rate, fatigue resistant time, tissue level strength and stiffness, in human cortical bone (Yerramshetty and Akkus, 2008). However, according to Morris and Mandair, the strongest predictors of the mechanical properties of bone are the mineral to matrix ratio and the carbonate substitution ratio (Akkus et al., 2004; Morris and Mandair, 2011).

It is also possible to correlate those biomarkers with the fracture parameters because the ultimate strain and the post-yield work as efficiently as the collagen quality and as the carbonate substitution biomarkers to distinguish osteoporotic donors (Carretta et al., 2013). Carretta et al. used the same biomarkers to predict the local ultimate strain and toughness of trabecular bone (Carretta et al., 2015).

Dooley et al. used the Raman shifts of the $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ band to determine a mapping distribution of the stress in strained and failed regions of bone (Dooley et al., 2009).

2.4.8 Key facts of bone metabolism

- The metabolism of bone, which is also known as bone remodelling, is a physiological and continuous process that enables the bone to achieve its remarkable mechanical properties. Each year, 10% of the skeleton of an adult is remodelled. Three types of cells are involved in this process.
- i) Osteocytes are the most abundant type of cells in bone, and their role is to maintain bone tissue, to feel the mechanical solicitation and to initiate remodelling if necessary.
- ii) When remodelling is initiated, osteoclasts migrate to the site to be resorbed to digest the organic portions of bone and dissolve the mineral portions. The resorption phase lasts between 2 or 3 weeks.
- iii) After a lapse in time (reversal phase), osteoblasts form an organic matrix that will then mineralize around the osteoblasts that then differentiate into osteocytes. This formation phase lasts approximately 3 months.

- Osteoporosis is a disease of aging that resulting from an imbalance between bone formation and resorption, promoting resorption that results in a decrease in bone mass. In the USA, 70% of women above 80 years old are suffering from the disease.
- Osteogenesis Imperfecta is a genetic bone disease associated with increased bone fragility due to a defective collagen matrix and impaired mineralization. In the USA, they are 20,000 to 50,000 patients suffering from the disease.
- Therapies with bisphosphonates are used for osteoporosis as well as for osteogenesis imperfecta to effectively prevent fractures and increases bone mineral density.

2.4.9 Summary points

- This chapter focused on the relevance of the Raman Spectroscopy technique to investigate the biomarkers for bone metabolism.
- Bone has a multilayer composite structure, which combines the elasticity of an organic matrix with the strength of mineral components.
- Raman spectroscopy provides fingerprint information on the chemical and structural organization of bone.
- Biomarkers are determined mainly as ratios of selected bands that represent mineral, matrix and carbonate contents.
- The biomarkers reviewed here were used to assess the bone quality and to follow the changes in bone due to the physiological environment (sport, weightlessness, ...) diseases (Osteogenesis imperfecta, osteoporosis, ...) or treatment effects (Bisphosphonate use).

2.5 Conclusion

La spectroscopie Raman est bien un outil adapté à l'étude des tissus osseux. Elle permet de caractériser des propriétés structurales et chimiques du minéral et du collagène, ainsi que leurs proportions relatives. Cette technique peut être jugée fiable et complémentaire à la tomographie et la nanoindentation dans l'étude de biomarqueurs osseux.

Des études ont déjà été menées sur des maladies du métabolisme osseux, telles que l'ostéoporose ou même des maladies qui n'ont que des conséquences indirectes sur les os, tel le diabète.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'influence des différents types de mutation causant l'ostéogénèse imparfaite et sur les différentes conséquences qu'elles peuvent avoir sur les biomarqueurs décrits dans ce chapitre.

En effet, l'ostéogénèse imparfaite est causée par des mutations qui ont des conséquences sur :

- la synthèse du collagène et de sa structure,
- la minéralisation de l'os,
- la modification du collagène,
- le traitement du collagène et de ses liaisons,
- la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes.

Nous allons voir dans le chapitre suivant l'influence de ces différents défauts du métabolisme sur les biomarqueurs osseux des patients OI.

3 Relations entre la mutation génétique et les propriétés biomécaniques des tissus

Résumé

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude du tissu osseux OI, et plus particulièrement aux mutations génétiques différentes, qui se manifestent toutes à l'échelle macroscopique par une fragilité accrue des os. L'objectif était de voir si ces mutations étaient différenciables par spectroscopie Raman. Pour ce faire, ont été mis en relation des données biomécaniques et les résultats des investigations génétiques. Ces résultats ont permis de mettre en avant 3 types de mutations :

- un groupe d'échantillons regroupant les mutations touchant directement le collagène et ses modifications (OI type génétique III, VII et VIII)
- un échantillon de type VI se caractérisant par une hyper minéralisation due à une sous production de collagène
- un échantillon de type XI se caractérisant par un taux de substitution en carbonate plus important que la moyenne, traduisant un taux de remodelage plus faible

La démocratisation du génotypage a permis de découvrir des nouveaux gènes liés l'ostéogénèse imparfaite et, par là même, de révéler des mécanismes impliqués dans l'ostéogénèse. Le lien entre génotype et phénotype n'est en revanche pas encore complètement établi, et c'est à ce lien que ce chapitre se propose d'apporter des éléments.

Une étude avait classer par gravité les types d'OI clinique par des méthodes de nanoindentation. Cependant, cette étude ne tenait pas compte de la diversité des mutations possibles causant l'ostéogénèse imparfaite (Fan et al., 2007). Une autre étude utilisait des données de densités osseuses et de gradation histomorphométriques pour différencier les mutations, mais cela n'avait pas abouti à des résultats très significatifs (Rauch et al., 2009). Le but de l'étude présentée dans ce chapitre est donc de voir ce que la spectroscopie Raman peut apporter à l'étiologie de l'ostéogénèse imparfaite et au lien entre génotype et phénotype.

3.1 Matériel et méthode

3.1.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés selon le protocole suivant (Imbert et al., 2014) : les tissus osseux sont prélevés à l'hôpital Necker à Paris (Paris, France) puis congelés à -20°C en attendant d'être préparés. Les os sont d'abord découpés avec une scie diamantée (Secotom, Struers) afin d'obtenir deux surfaces parallèles qui seront perpendiculaires à l'axe des ostéons. Les échantillons sont polis avec un tapis de silice de grain 1200 (LaboPol-1, Struers), puis avec une suspension diamantée de 1µm (Struers) pour une meilleure finition de la surface polie.

3.1.2 Caractérisation des échantillons osseux

Les échantillons osseux ont été ensuite étudiés à l'aide des techniques développées au chapitre précédent.

3.1.2.1 Spectroscopie Raman

Les propriétés chimiques des tissus osseux ont été analysées par spectroscopie Raman (LabRAM HR 800, Horiba Jobin Yvon). Un laser de 785 nm a été utilisé à la surface des échantillons polis et non hydratés, avec un objectif 50x (Olympus, Tokyo,

Japon) ($NA = 0,75$), créant un spot de $2\ \mu\text{m}$ de diamètre. 24 points ont été relevés : 12 en tissus interstitiels, 12 en tissus ostéonaux. Pour chaque point, une seule accumulation de 45 secondes par bande spectrale a été faite, mais suivant 3 spectres complets de $350\ \text{cm}^{-1}$ à $1750\ \text{cm}^{-1}$, moyennés après l'acquisition en chaque point. Avant chaque acquisition, une cartographie en altitude a été effectuée pour se placer au maximum du signal.

Le ratio MMR, pour Mineral to Matrix Ratio, représentant la proportion entre les quantités relatives de minéral et celles de matrice protéinique, était calculé en faisant le ratio de l'intensité du pic de $\nu_2\text{PO}_4^{-3}$ ($433\ \text{cm}^{-1}$) sur celle du pic d'Amide III ($1245\ \text{cm}^{-1}$) (Kazanci et al., 2006). Ce ratio est indépendant de l'orientation. Le taux de substitution en carbonate, représentant le taux de substitution de phosphate par des groupements carbonate, est calculé en faisant le ratio de l'intensité des pics de carbonate, $\nu_1\text{CO}_3^{-2}$ ($1070\ \text{cm}^{-1}$) sur celle du phosphate $\nu_1\text{PO}_4^{-3}$ ($960\ \text{cm}^{-1}$). La cristallinité est calculée comme la largeur à mi-hauteur du pic de phosphate $\nu_1\text{PO}_4^{-3}$ ($960\ \text{cm}^{-1}$). Elle est proportionnelle à l'épaisseur des cristaux d'hydroxyapatite. La maturité du collagène, calculée comme le ratio des pics d'amide I $1667\ \text{cm}^{-1}$ sur celui à $1690\ \text{cm}^{-1}$, permet de qualifier la réticulation des protéines de collagènes entre elles. L'intensité du pic d'amide I permet de quantifier la quantité de collagène dans la matrice.

3.1.2.2 Nanoindentation

La nano-indentation est effectuée sur le Nano Indenter G200 (Agilent Technologies), équipé avec une pointe de Berkovich en diamant de $v = 0,07$ et $E = 1131\ \text{GPa}$. À l'aide de l'équation d'Olivier et Pharr (Oliver and Pharr, 1992), il est possible de remonter au module d'Young et localement à la dureté en considérant l'os comme isotrope et doté d'un coefficient de Poisson de 0,3 (Hoc et al., 2006). Le module d'Young et la dureté ont été mesurés sur le plateau de la courbe entre 500 nm et 1500 nm. Sur les courbes analysées par NanoSuite (Agilent Technologies), celles qui ne présentent pas de plateau ne sont pas prises en compte pour les calculs de module et de dureté moyens. 48 points d'indentation ont été faits sur chaque échantillon : 24 en tissu ostéonal et 24 en tissu interstitiel, soit 2 pour chaque zone testée par spectroscopie Raman.

3.1.2.3 Tomographie à rayon X

Les os sont entourés de parafilm (Bemis North America) transparent aux rayons X, et maintenus dans une solution saline le temps de l'acquisition. Pour calibrer la densité minérale du tissu, TMD, des fantômes de densité minérale 0,25 and 0,75 gHA.cm⁻³ sont utilisés. Le scan est effectué avec un scanner haute résolution, le Pheonix Nanotom, research edition (General Electric). Les images sont reconstruites par les logiciels GE Phoenix datos|x ACQ et datos|x REC, tandis que la visualisation des résultats est effectuée par VGStudioMax (Volume Graphics). L'analyse des images est effectuée parallèlement sur les logiciels CTan (Bruker, Belgique) et ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). On obtient le BoneVolume/TissueVolume (BV/TV), dont on extrait la porosité en calculant la valeur de 1- BVTV.

Energie	Courant	Temps par image	Nombre d'image par angle	Nombre d'images par 360°	Résolution
80kV	130 µA	1000 ms	4 dont une supprimée, les 3 autres moyennées	2000	8µm

Tableau 3-1 Paramètres d'acquisition de la tomographie à rayon X

3.1.3 Les donneurs osseux

Les 8 donneurs prélevés ont été diagnostiqués avec une ostéogénèse imparfaite de type clinique III. Cependant, à la lumière des génotypes, il apparaît une grande variété dans les mutations ayant causé la fragilité osseuse. Le génotypage des patients a été effectué par l'équipe Imagine (Institut des maladies génétiques, INSERM UMR 1163, Paris, France). Trois échantillons contrôles de patients ne souffrant pas de pathologie du métabolisme osseux ont été prélevés dans les mêmes conditions.

Ces mutations ont été regroupées en quatre groupes (Aubry-Rozier et al., 2015; Ben Amor et al., 2011; Kang et al., 2016) :

- les mutations touchant directement la structure du collagène (touchant les gènes COL1A1 et COL1A2, type III),
- les mutations touchant le post traitement de la protéine (type VII et VIII),
- les mutations touchant la réticulation de la protéine (type XI),
- les mutations touchant la minéralisation de l'ostéoïde (type VI).

Donneur	Age	Sexe	Mutation	Type OI
OI16	14	M	COL1A2 p.Gly238Ser	III
OI22	14	M	FKBP10 homozygote c.950_951dupTC (p.Gly318Serfs*48)	XI
OI25	2	M	SERPINF1 homozygote c.847delA (p.Thr283Profs*4)	VI
OI27	1	M	COL1A2 c.2010_2013delACAGinsG (exon 33)	III
OI29	7	F	COL1A2 c.3034G>A/p.Gly1012Ser Ex46	III
OI30	9	M	CRTAP c.155T>C (p.Leu52Pro) homoz (exon 1)	VII
OI33	9	M	COL1A1 c.2155G>A (p.Gly719Ser) htz (exon 32)	III
OI35	4	M	NGS LEPRE1 c.1080+1G>T HMZ	VIII
C1	14	M	Contrôle	
C7	13	F	Contrôle	
C8	17	M	Contrôle	

Tableau 3-2 Données patients, mutation les touchant et type OI génétique auquel ils sont rattachés, ainsi que les caractéristiques des patients contrôles (Kang et al., 2016)

3.1.4 Les mutations

Dans ces paragraphes, nous précisons l'impact des différentes mutations sur l'ostéogénèse.

3.1.4.1 Mutations entraînant des collagènes malformés: COL1A1 et COL1A2

Les mutations touchant ces deux gènes sont responsables de 80% de tous les cas d'OI. Pour les cas d'OI de type clinique III, c'est la structure même du collagène qui est perturbée, avec la synthèse et la sécrétion de molécules anormales. En effet, ce sont principalement des substitutions dans la séquence de la protéine, au niveau des résidus en glycine. Ceux-ci sont remplacés majoritairement par des serine, modifiant ainsi la polarisation des résidus, ce faisant rendant la triple hélice moins compacte. Sur la Figure 3-1, le changement a lieu dès le niveau 1, et son impact majeur est sensible au niveau 3 où les acides aminés glycines sont tous placés au centre de la

triple hélice. Ce comportement n'est pas aussi flagrant dans les cas de substitutions de la glycine, entraînant une triple hélice moins compacte. Ce mécanisme a été modélisé et la gravité de la substitution a été mise en relation avec la distance intermoléculaire résultant de la substitution (Gautieri et al., 2009). Quatre échantillons sont touchés par ce type de mutation (50% des échantillons).

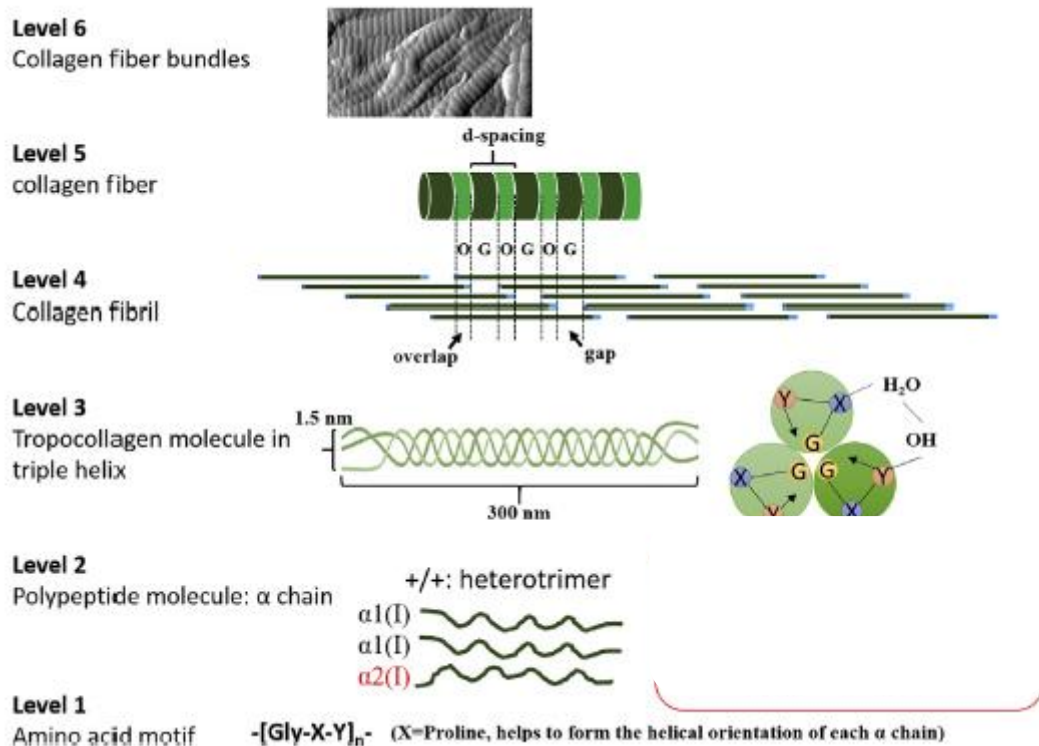


Figure 3-1 Schéma de l'organisation hiérarchique du collagène. (Li et al., 2016)

- Niveau 1 : motif d'acides aminés, avec un acide aminé glycine tous les trois acides aminés pour former la structure d'hélice dans chacune des chaînes α.
- Niveau 2 : molécule polypeptidique : chaînes α1 et α2.
- Niveau 3 : triple hélice de la molécule de tropocollagène, avec la glycine qui est au centre de la triple hélice.
- Niveau 4 : fibrille de collagène, organisée avec des zones de superposition de molécules de tropocollagène et des zones de fossé
- Niveau 5 : fibre de collagène.
- Niveau 6 : fuseaux de fibres de collagène

3.1.4.2 Mutations entraînant des défauts dans la modification du collagène : CRTAP et LEPRE1

Les gènes CRTAP et LEPRE1, qui codent respectivement les protéines CRTAP et P3H1 (Prolyl 3-hydroxylase 1) sont responsables des types d'OI VII et VIII. Ces deux protéines sont impliquées dans le complexe de prolyl 3-hydroxylation de la protéine de collagène. Ce complexe modifie dans le reticulum endoplasmique, un résidu proline spécifique, $\alpha 1(I)/\alpha 1(II)$ Pro986 et $\alpha 2(I)$ Pro707 sur les hélices α du collagène non plié (voir Figure 3-2). Les études récentes suggèrent que cette 3-hydroxylation soit impliquée dans la réticulation des protéines de collagène entre elles et permette de les maintenir à une distance optimum, satisfaisante à la déposition du minéral dans les fibres et à la résistance du réseau de ces fibres (Homan et al., 2014; Hudson et al., 2012; Marini et al., 2010). Deux échantillons sont touchés par ces mutations (25% des OI).

3.1.4.3 Mutations entraînant des défauts de réticulation du collagène : FKBP10

Le gène FKBP10 codant la protéine FKBP65 est typique de l'OI type XI. Cette protéine du réticulum endoplasmique est impliquée dans la réticulation du collagène et est une protéine chaperon qui interagit avec des lysyl hydroxylase 2 (LH2) (voir Figure 3-2). Si cette interaction n'a pas lieu, une baisse dans la lysyl hydroxylation des telopeptides collagènes est observée (Gjaltema et al., 2016). Son rôle précis n'a pas encore été parfaitement élucidé.

Un échantillon a été prélevé (12,5% des échantillons).

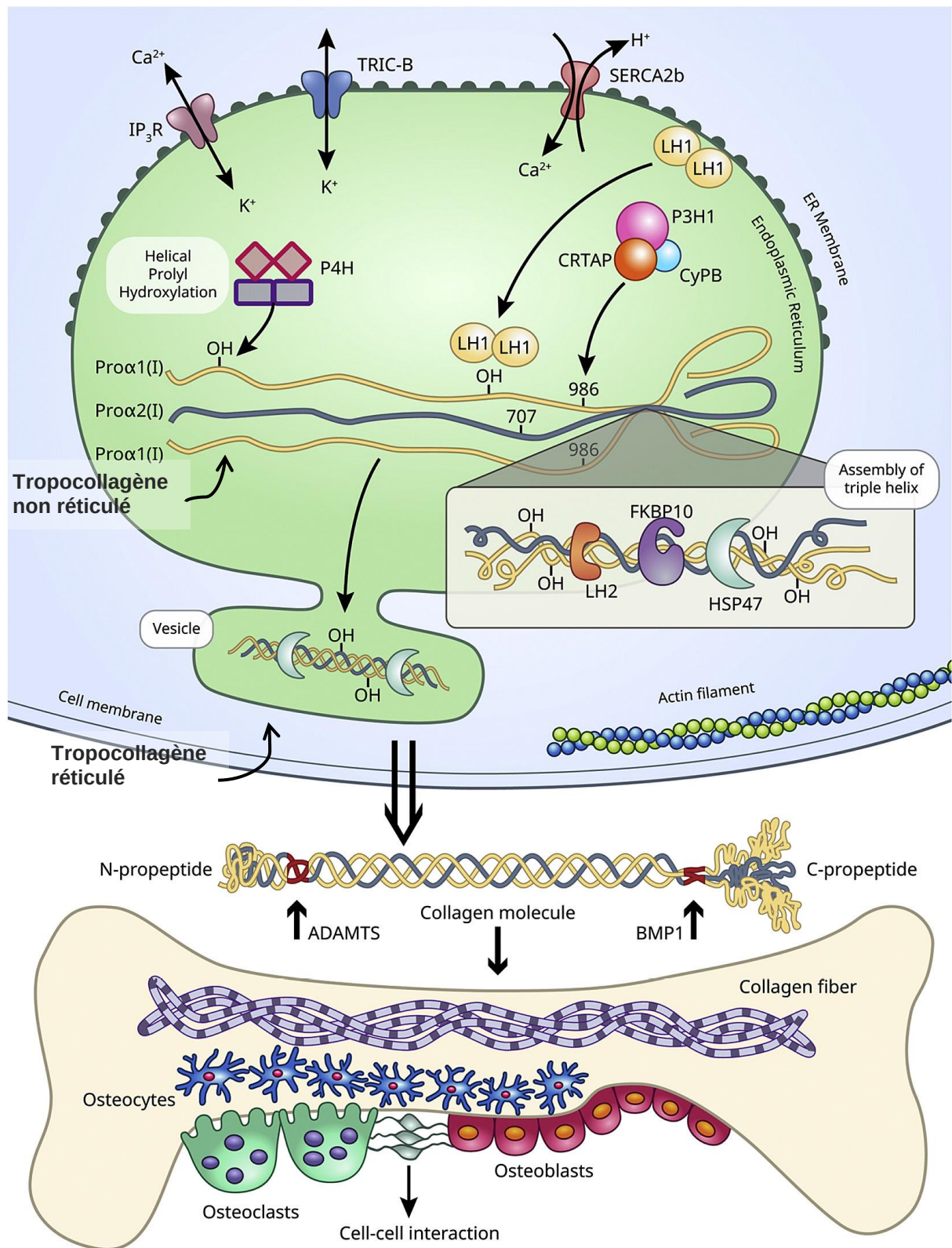


Figure 3-2 Transformations subies par les tropocollagènes, avec le rôle de chacune des protéines dans ces modifications (Kang et al., 2016), plus particulièrement CRTAP, P3H1 et FKBP10.

3.1.4.4 Mutations entraînant des défauts de minéralisation : SERPINF1

Le gène SERPINF1, codant la protéine Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF), est responsable des OI type VI. Les patients présentant une mutation sur ce gène n'ont pas de PEDF circulant dans le sang (Al-Jallad et al., 2015). Le tissu osseux est caractérisé par une lamellation en écaille de poisson, mais aussi, par une forte hétérogénéité de la minéralisation avec de larges travées en ostéoïdes non minéralisées et une minéralisation problématique. Certaines études supputent un rôle de PEDF dans la transition d'ostéoblastes à ostéocytes, entraînant un défaut de minéralisation primaire (Fratzl-Zelman et al., 2015). En effet, la minéralisation du tissu osseux se fait en deux phases : une première phase rapide durant laquelle le pourcentage en calcium de l'ostéoïde augmente jusqu'à 18% (en poids), puis une seconde phase plus longue durant laquelle le pourcentage de calcium dans l'ostéoïde va augmenter jusqu'à 23% (Ruffoni et al., 2007). Or, le tissu osseux OI type VI présente des taux en calcium très étalés et surtout très bas, de 5 à 15%, ce qui pourrait traduire un défaut dans la première phase de minéralisation primaire (Fratzl-Zelman et al., 2015). Sur la Figure 3-3, le rôle supputé du PEDF serait d'équilibrer la différenciation des ostéoblastes entre ostéocytes et cellules endothéliales. Un échantillon a été prélevé (12,5% des échantillons).

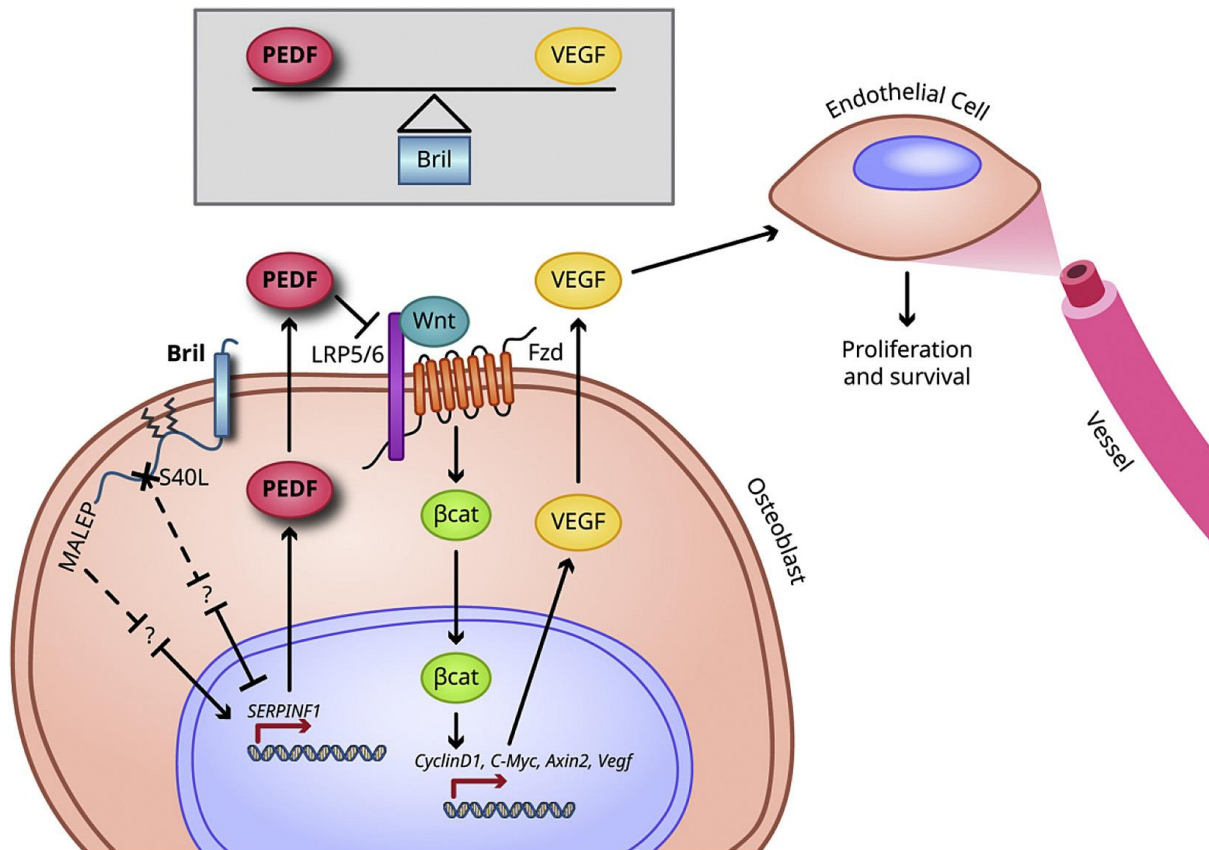
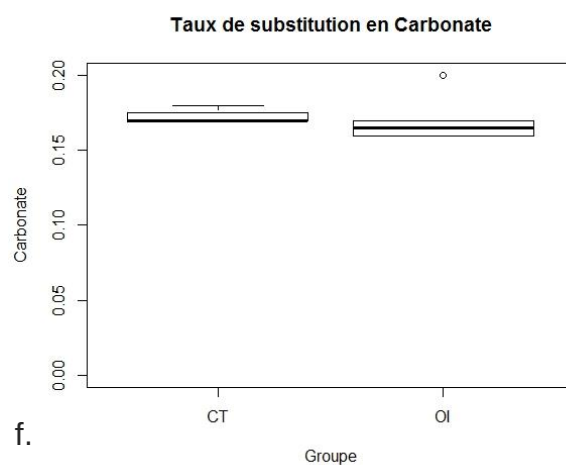
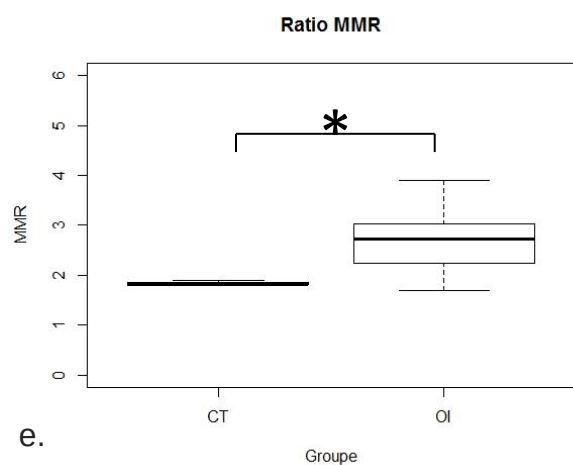
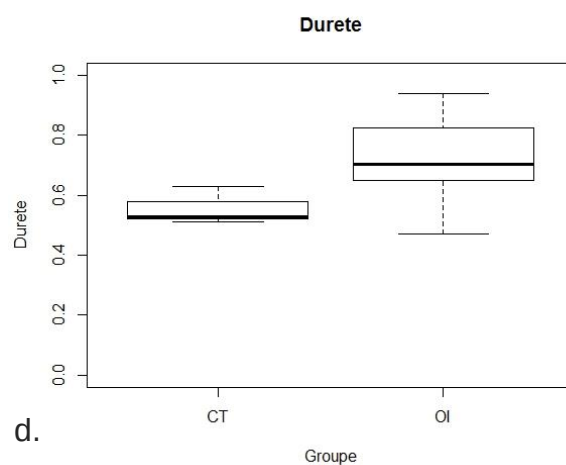
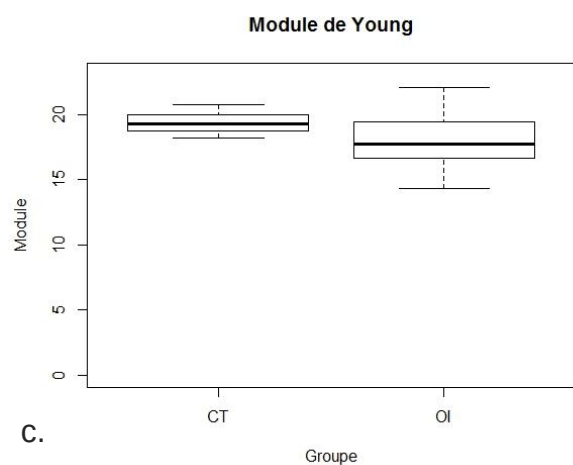
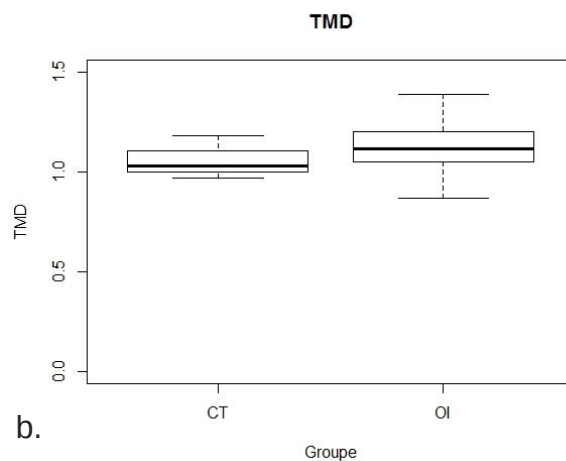
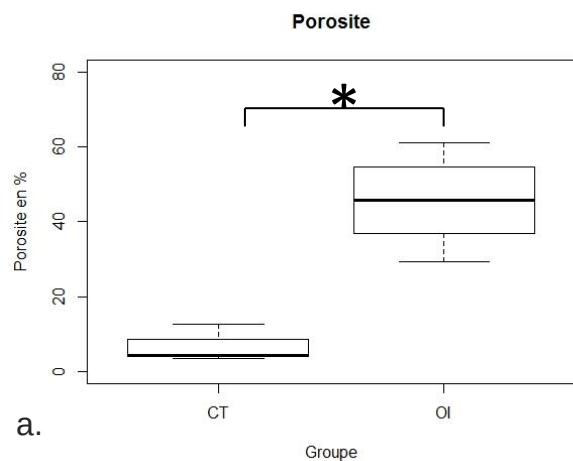


Figure 3-3 Schéma détaillant le rôle supposé de la protéine PEDF dans la minéralisation des os et dans leur vascularisation (Kang et al., 2016). Des signaux transmis par la protéine BRIL entraînent l'expression de PEDF, qui inhibe l'expression de VEGF chez les ostéoblastes en bloquant le signal Wnt. Ce faisant, BRIL régule l'activité entre PEDF et VEGF dans l'os.

3.2 Résultats

3.2.1 OI versus contrôles

La première étape de l'analyse des résultats a été de comparer le comportement de tous les échantillons OI avec les échantillons contrôles. Au niveau de la porosité, celle-ci est significativement supérieure chez les patients OI comparativement aux patients contrôles (respectivement 45 ± 18 % vs 6 ± 5 %, test de Mann-Whitney $p = 0,0167$, Figure 3-4 a). De même, la cristallinité est inférieure chez les patients OI à celle des patients contrôles (respectivement $0,054 \pm 0,018$ vs $0,59$, test de Mann-Whitney $p = 0,02$, Figure 3-4 g). Le ratio MMR est supérieur pour les patients OI comparés aux patients contrôles (respectivement $2,70 \pm 1,09$ % vs $1,83 \pm 0,04$ %, test de Mann-Whitney $p = 0,0167$, Figure 3-4 e). La maturité du collagène est aussi significativement supérieure pour les patients OI comparés aux patients contrôles (respectivement $11,6 \pm 4,5$ % vs $6,7 \pm 1,4$ %, test de Mann-Whitney $p = 0,0167$, Figure 3-4 h). Enfin, l'intensité du pic d'amide I est significativement plus basse pour les patients OI comparés aux patients contrôles (respectivement $79,2 \pm 30,0$ % vs $117,9 \pm 9,4$ %, test de Mann-Whitney $p = 0,0167$, Figure 3-4 i). En termes de module de Young, de dureté, de TMD, de taux de substitution en carbonate, les différences n'étaient pas significatives (Figure 3-4, c, d, b, f). Le module de Young et le taux de substitution en carbonate étaient plus faibles, tandis que la dureté et la TMD étaient supérieures.



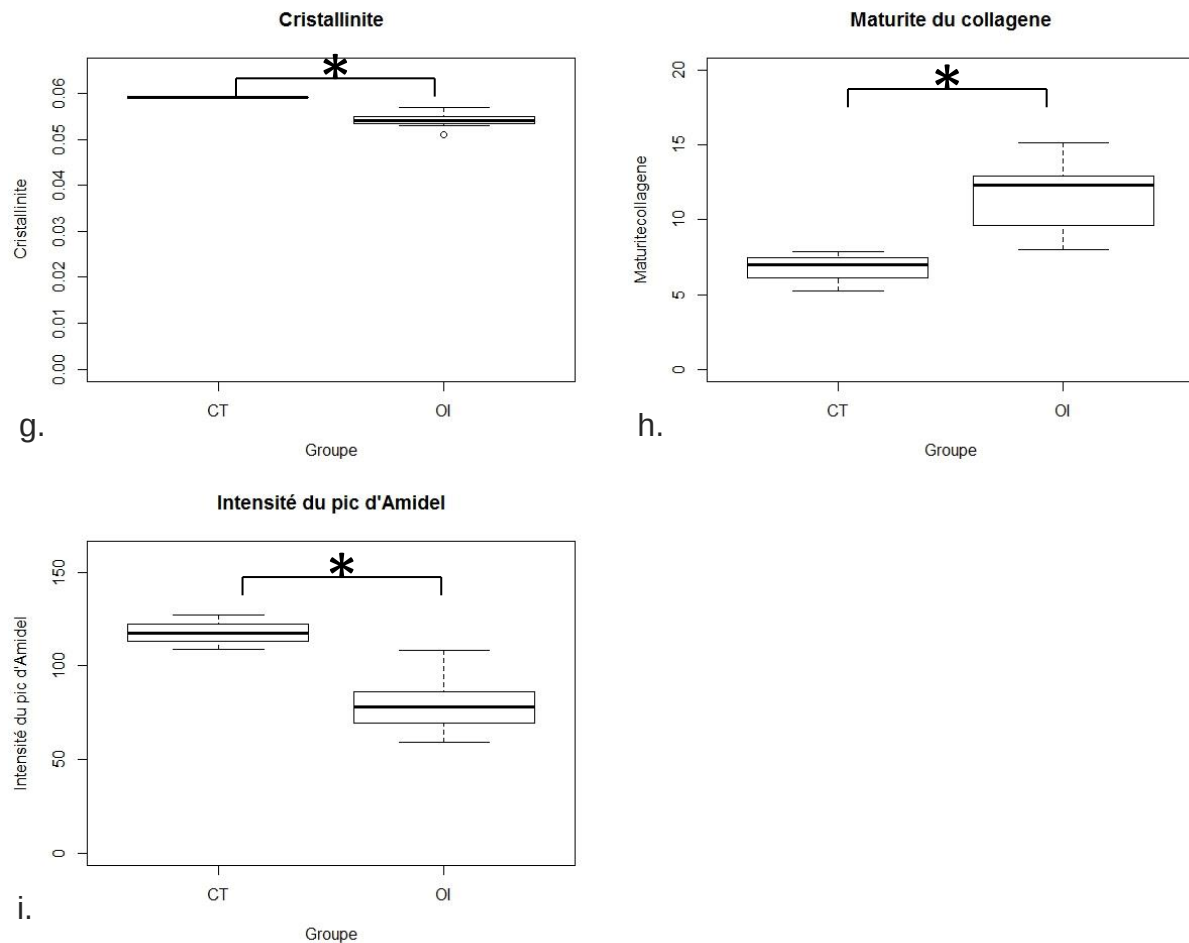


Figure 3-4 Récapitulatif graphique des résultats obtenus. La maturité du collagène, la porosité, la cristallinité, le ratio de minéral sur la matrice, le ratio du module de Young sur la dureté, le ratio du module de Young sur la dureté sur le ratio MMR et l'intensité du pic d'amide I sont significativement différentes (*, $p < 0.05$).

Lors d'une étude publiée en 2007 (Fan et al., 2007), la nanoindentation avait été utilisée comme moyen de distinguer des types d'OI clinique, en utilisant le ratio module de Young sur dureté. Plus ce ratio diminuait, plus le malade était sévèrement atteint. En calculant ce ratio, on retrouve ce résultat : il est aussi significativement différent entre les patients OI et les patients contrôles (respectivement $25,4 \pm 2,7$ vs $35,0 \pm 1,8$, Test de Mann-Whitney $p = 0,012$) (Figure 3-5).

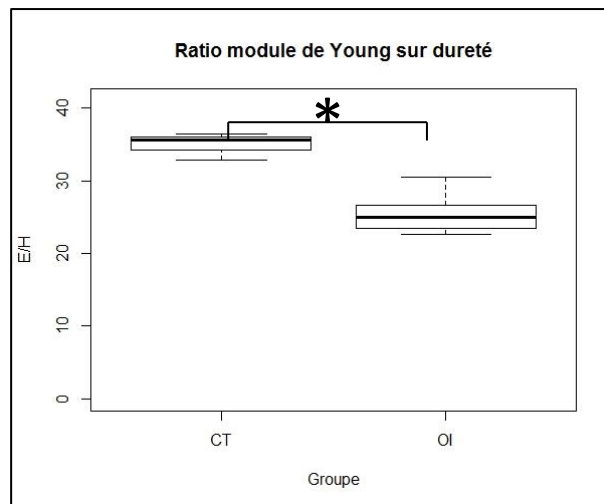


Figure 3-5 Ratio Module de Young sur dureté, significativement différents entre les groupes OI et CT

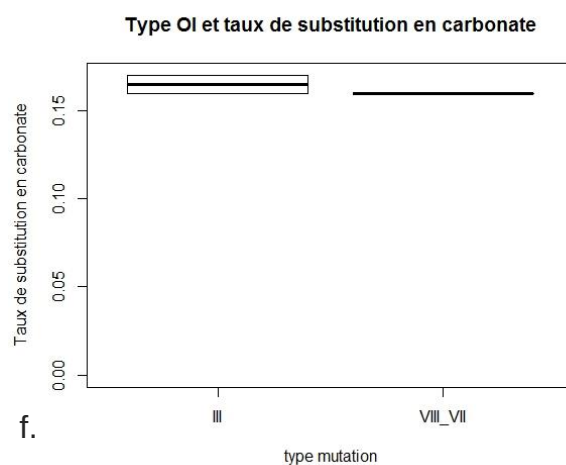
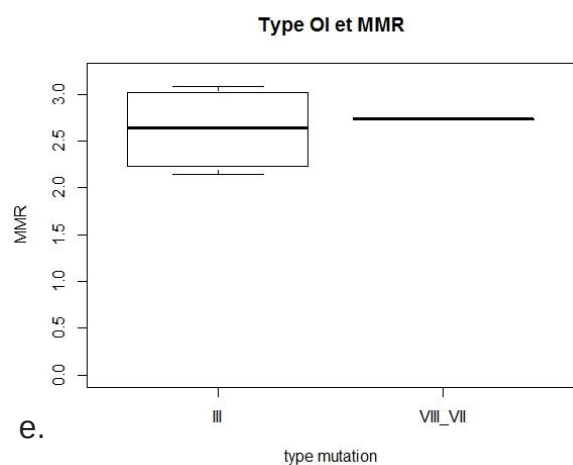
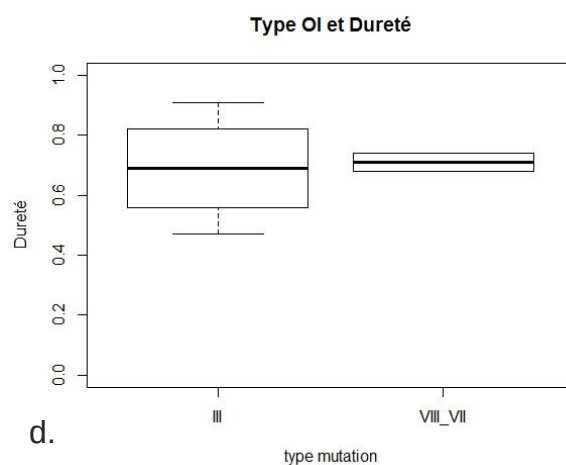
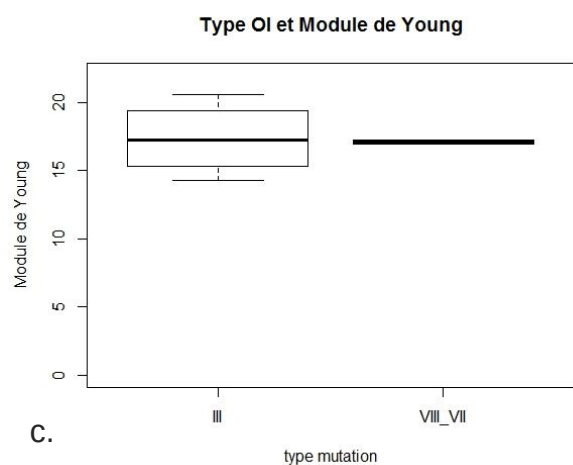
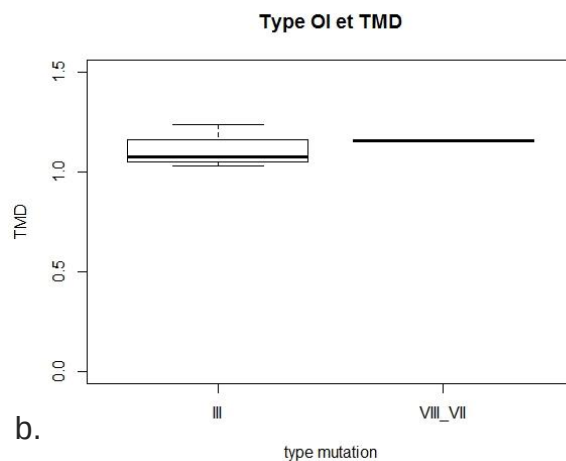
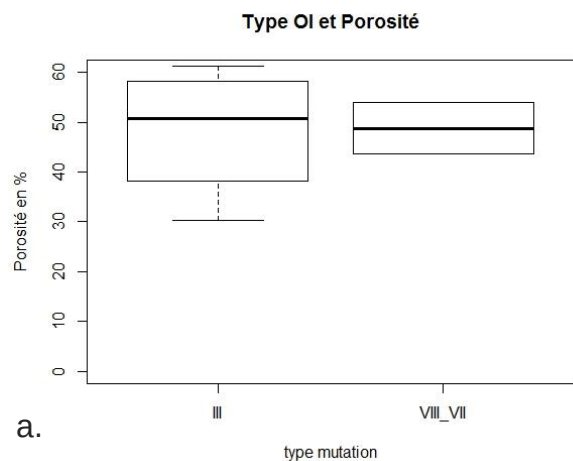
3.2.2 Différence au sein du groupe des patients OI

Les résultats qui sont présentés dans cette partie sont seulement des tendances. En effet, eu égard au nombre d'échantillons disponibles, les tests statistiques sont impossibles à effectuer. Nous avons classés les échantillons en quatre groupes :

- le type génétique III,
- les types génétiques VII et VIII,
- le type VI,
- le type XI.

3.2.2.1 Différence entre les mutations génétiques de type III et celle de type VII et VIII

Le groupe de type génétique III servira de référence étant celui qui représente les mutations les plus fréquentes, 80% des patients étant touchés par une mutation impactant les gènes COL1A1 ou COL1A2. Dans la Figure 3-6 suivante, les échantillons de type OI VII et VIII sont comparés aux échantillons de type OI III.



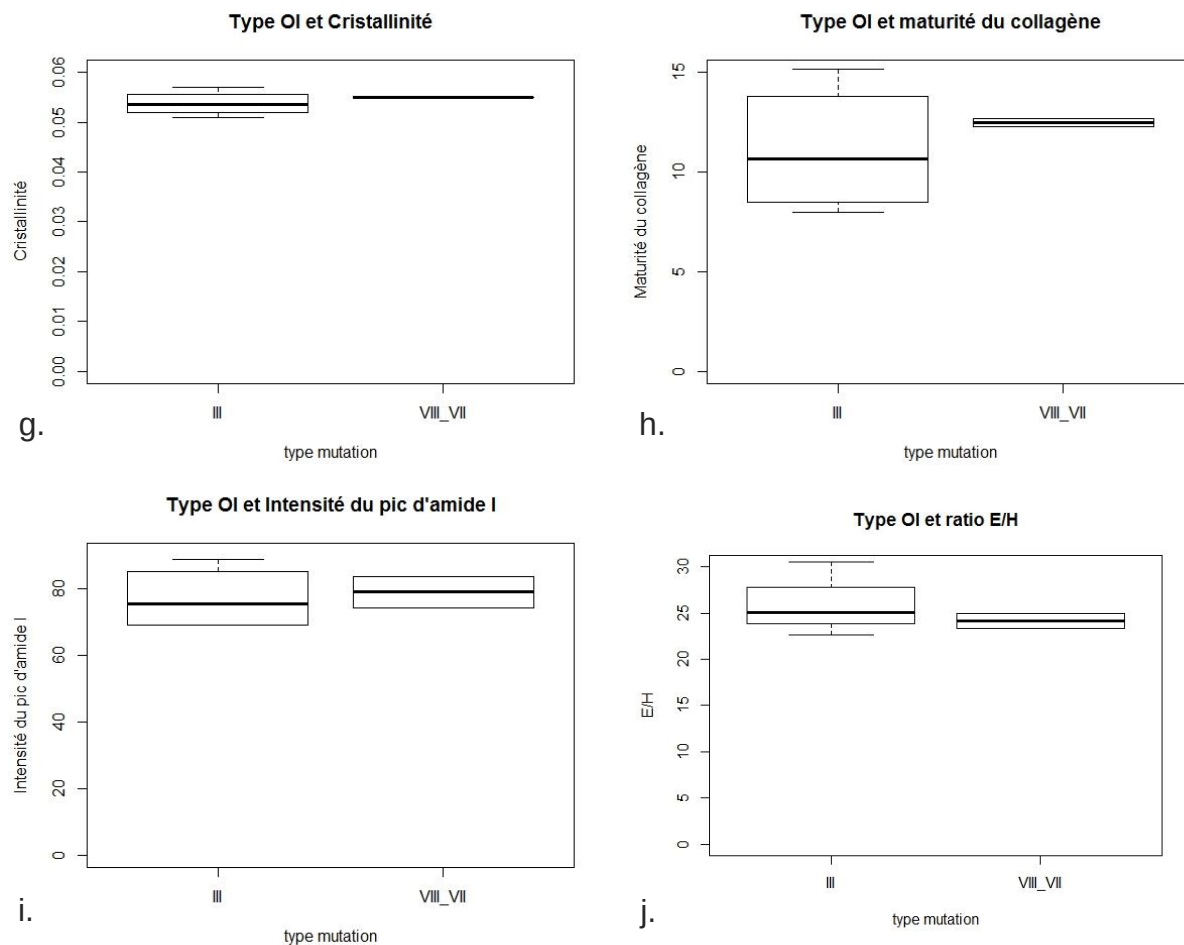


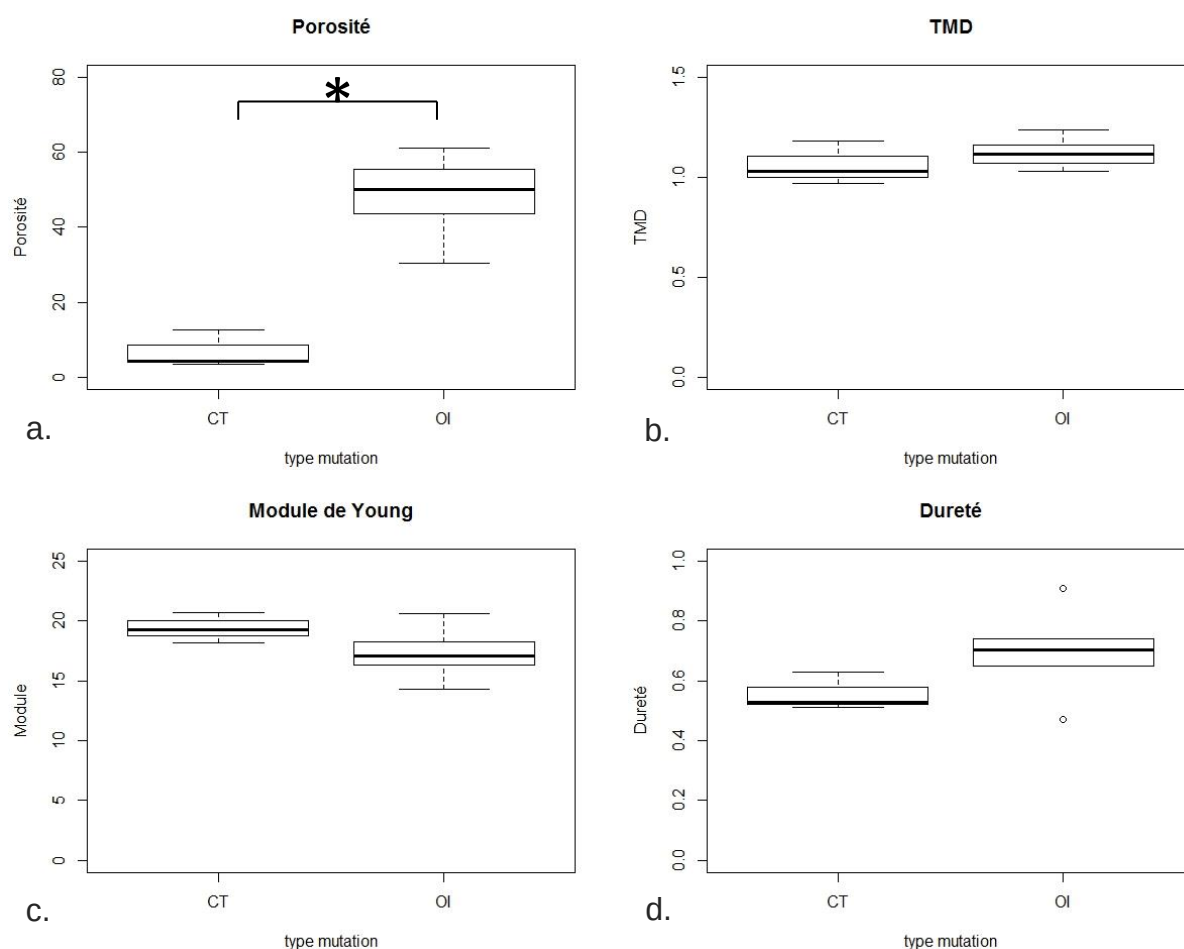
Figure 3-6 Récapitulatif graphique des résultats obtenus. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Les résultats des échantillons de type OI VII et VIII sont dans la fourchette des valeurs des échantillons de Type OI III.

Au niveau de la porosité, tous les échantillons sont dans le spectre des échantillons de type génétique III (Figure 3-6 a). Il en va de même pour la maturité en collagène des échantillons, la cristallinité, le ratio module de Young sur dureté (Figure 3-6 g, j, h) ou pour le ratio Module de Young sur dureté calculé précédemment (Figure 3-6 j). Pour les échantillons de type VII et VIII, il n'y a aucune différence flagrante avec les échantillons de type génétique III.

Nous avons donc comparé les échantillons contrôle avec un groupe composé des échantillons de type OI III, VII et VIII.

3.2.2.2 Les types OI génétiques III, VII et VIII comparés aux échantillons contrôle

Les différences entre le groupe contrôle et un groupe constitué des échantillons OI de type génétique III, VII et VIII ont été mesurées. Les résultats sont disponibles dans les figures ci-dessous (Figure 3-7). Les résultats significatifs sont les mêmes que dans les premières figures (Figure 3-4, Figure 3-5): une porosité un ratio MMR et un taux de substitution en carbonate plus élevé (Figure 3-7 a, e, f), tandis que la cristallinité, l'intensité du pic d'amide I et le ratio module de Young sur dureté, sont plus faibles que les échantillons contrôles (Figure 3-7 g, i, j).



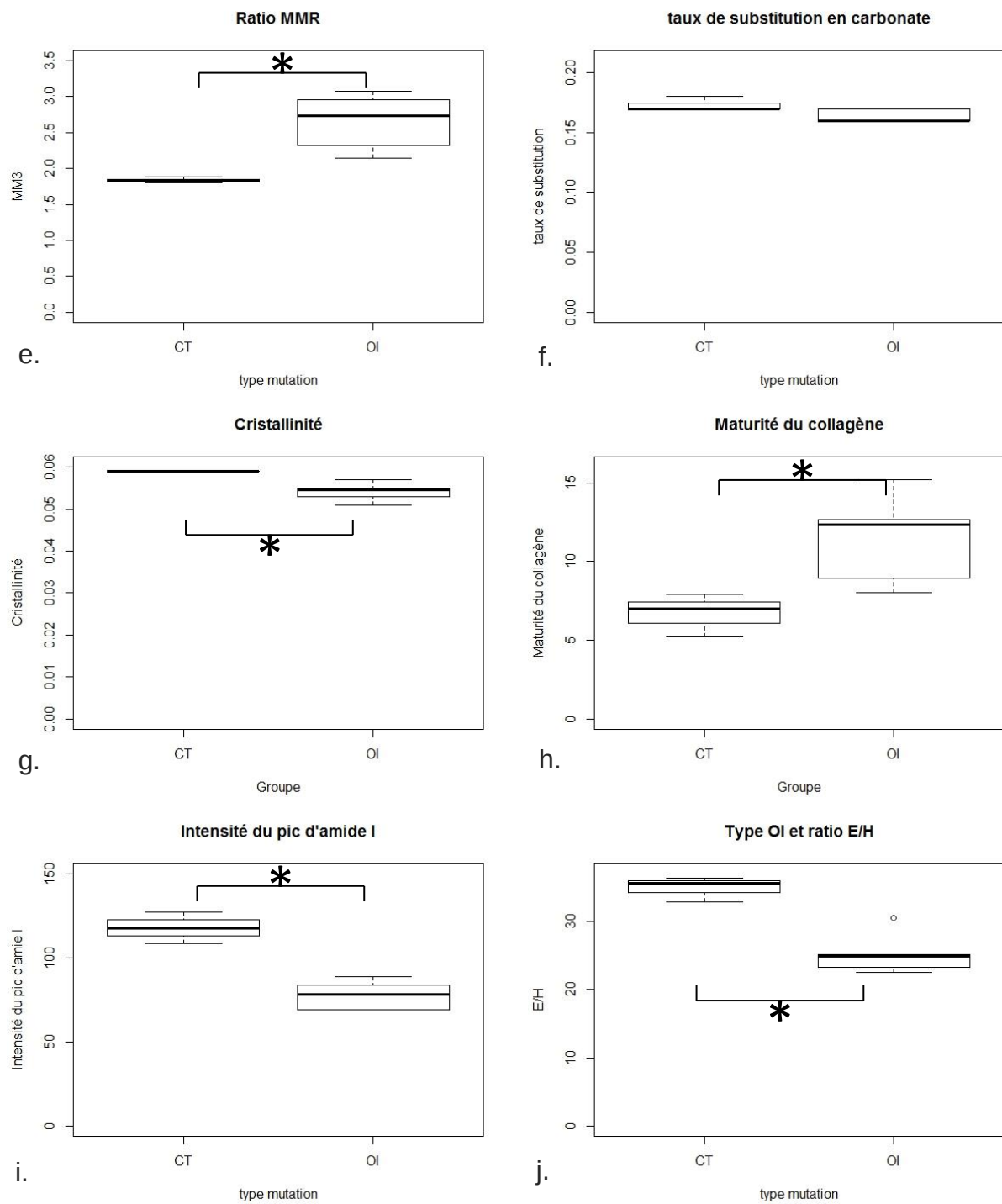
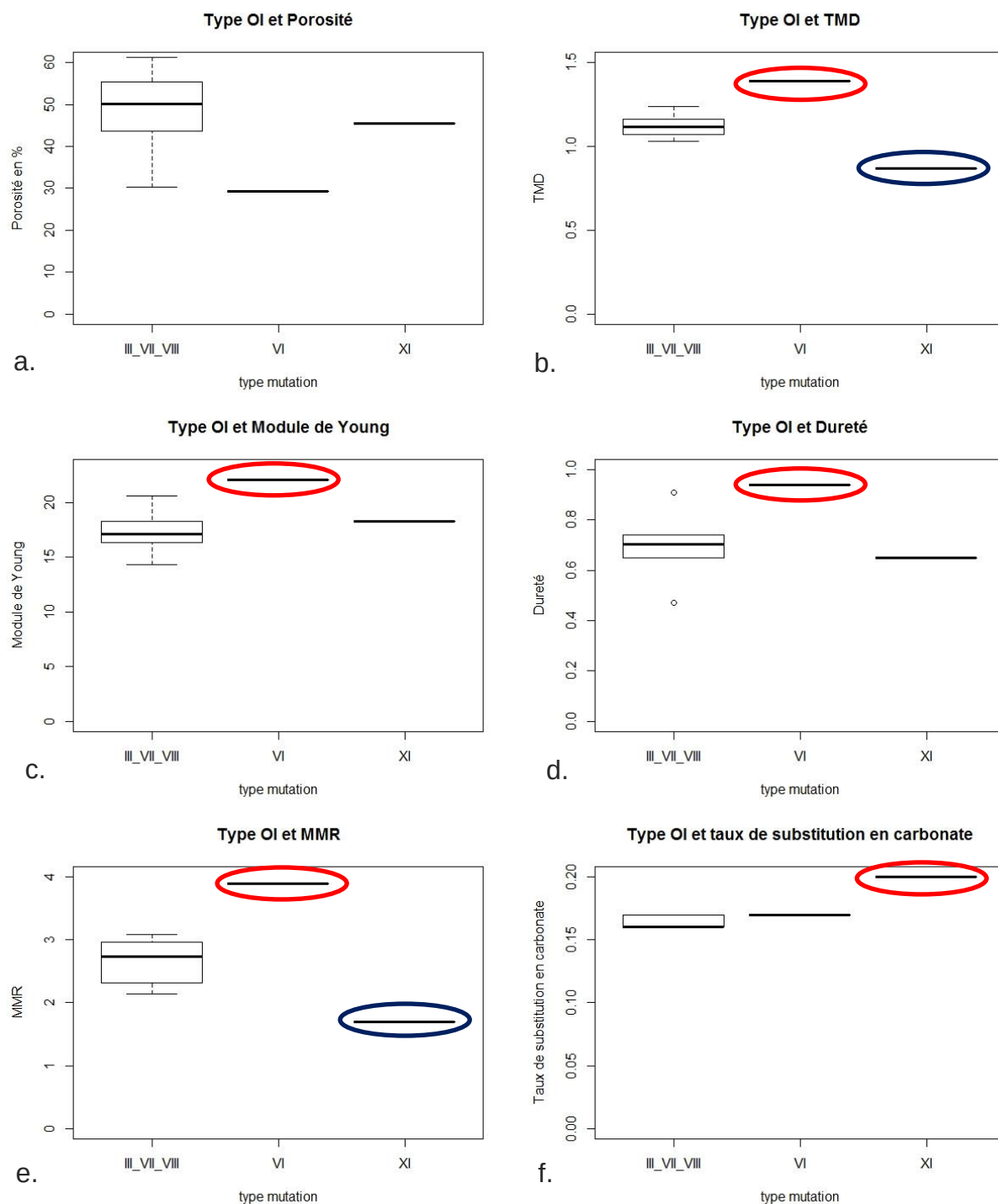


Figure 3-7 CT versus groupe OI type III, VII et VIII. (*, $p < 0.05$)

3.2.2.3 Les types OI VI et XI comparés aux échantillons de type OI III, VII et VIII

Les échantillons de type VI et XI sont comparés au groupe constitué des échantillons OI de type III, VII et VIII.



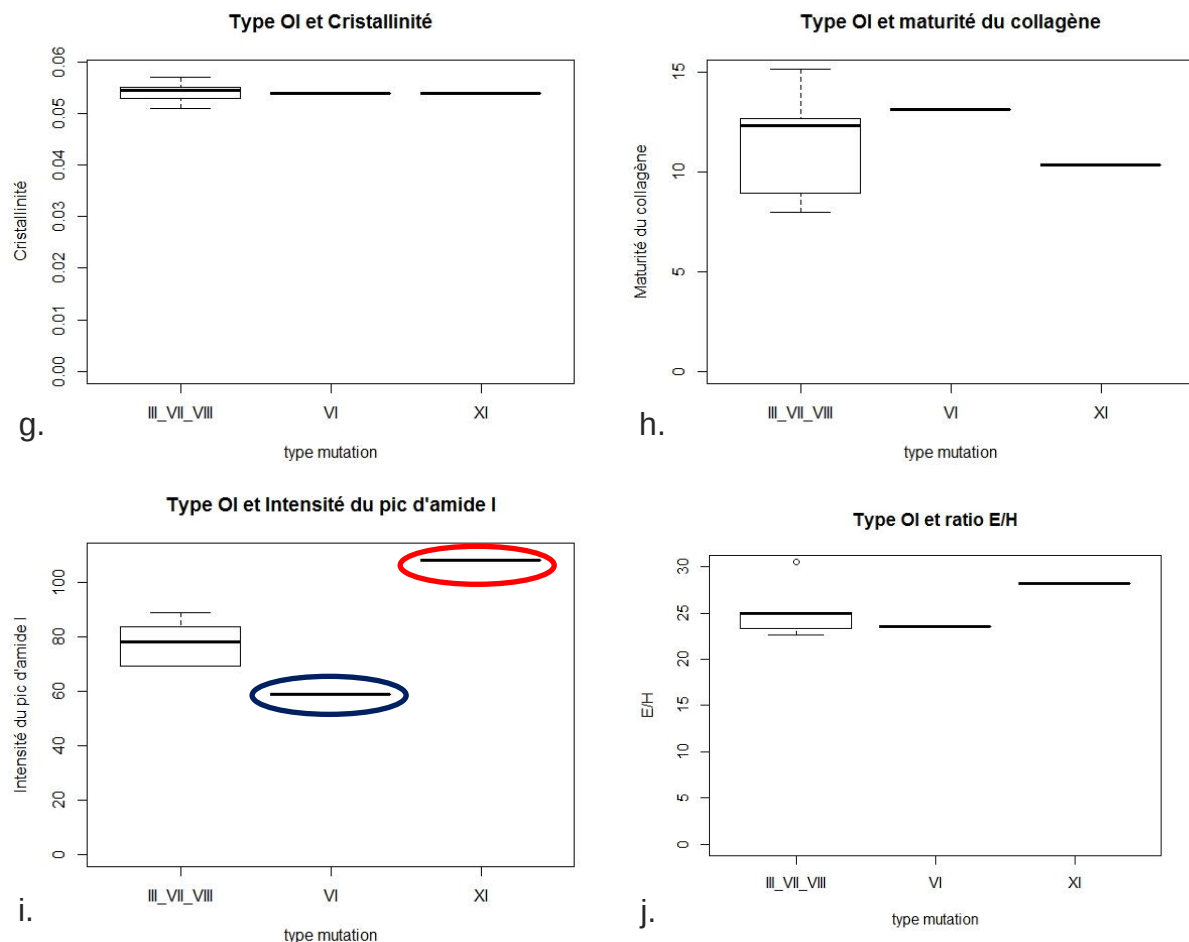


Figure 3-8 Récapitulatif graphique des résultats obtenus en comparant les échantillons de type OI VI et XI au groupe formé par les échantillons d'OI type III, VII et VIII. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Sont entourés en rouge les résultats qui semblent supérieurs à la moyenne plus la déviation standard des échantillons de type OI III, VII et VIII, en bleu ceux qui semblent inférieurs à la moyenne moins la déviation standard

Les échantillons de type VI et XI ont des différences avec le groupe des échantillons OI de type III, VII et VIII :

- une TMD plus grande pour le type VI et plus faible pour le type XI (Figure 3-8 b),
- un Module de Young et une dureté supérieurs pour le type VI (Figure 3-8 c et d),
- un ratio MMR plus grand pour le type VI et plus faible pour le type XI (Figure 3-8 e),
- un taux de substitution en carbonate très élevé pour le type OI XI (Figure 3-8 f)
- une intensité du pic d'amide plus faible pour le type VI et plus grande pour le type XI (Figure 3-8 i).

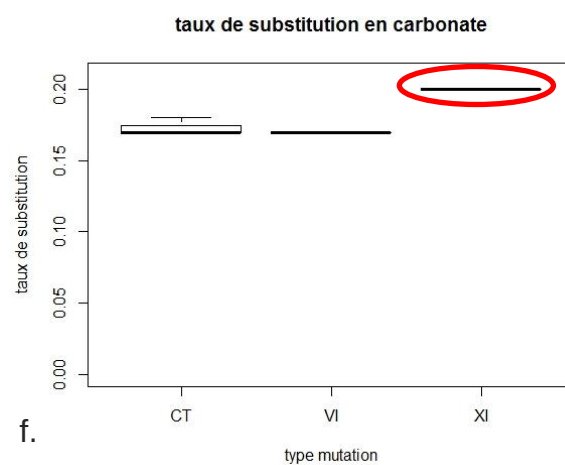
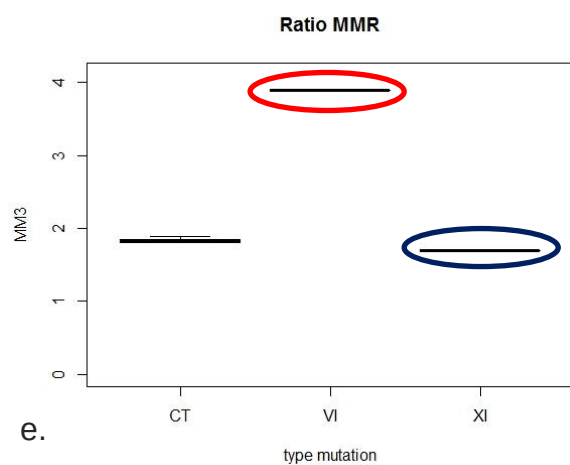
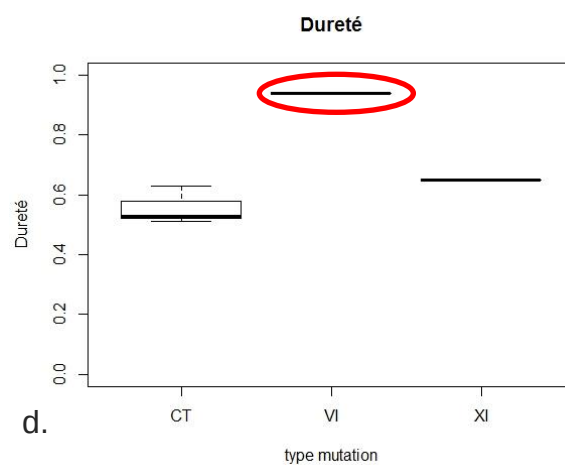
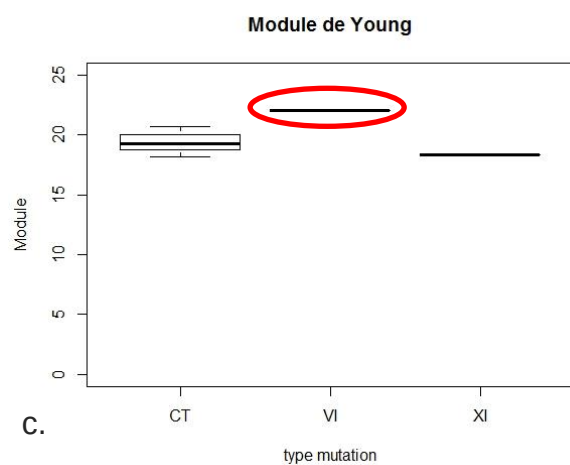
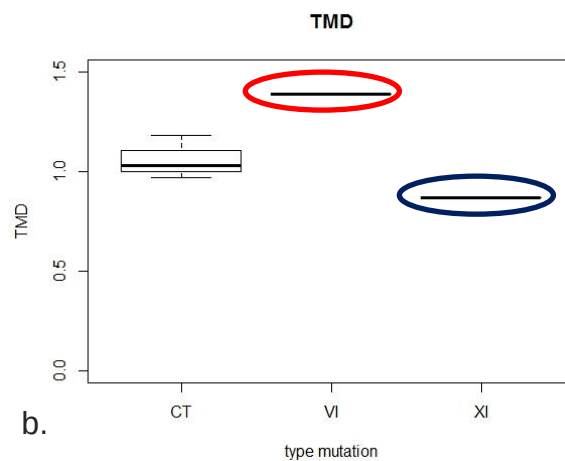
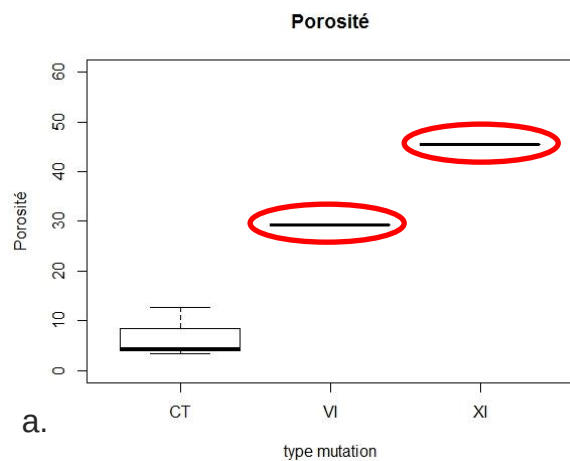
En revanche, l'échantillon OI de type VI ne se distingue pas des échantillons de type OI III, VII et VIII par la porosité, le taux de substitution en carbonate, la cristallinité, la maturité du collagène et le ratio E/H (Figure 3-8 a, f, g, h, j). De même, l'échantillon OI de type XI ne se distingue pas des échantillons de type OI III, VII et VIII par la porosité, le module de Young, la dureté, la cristallinité, la maturité du collagène et le ratio E/H (Figure 3-8 a, c, d, g, h, j).

3.2.2.4 Les types OI VI et XI comparés aux échantillons contrôle

Les échantillons VI et XI sont comparés aux échantillons contrôle.

Comparativement aux échantillons contrôles, le type VI a une porosité, une TMD, un module, une dureté, un ratio MMR et une maturité du collagène plus élevés (Figure 3-9 a, b, c, d, e, h), mais une cristallinité, une intensité du pic d'amide I et un ratio module de Young sur dureté plus faibles (Figure 3-9 g, i, j).

Comparé au groupe contrôle, l'OI type XI a une porosité, un taux de substitution en carbonate, et une maturité du collagène supérieurs (Figure 3-9 a, f, h). En revanche, sa TMD, sa cristallinité et son ratio module de Young sur dureté sont inférieurs (Figure 3-9 b, e, g, j).



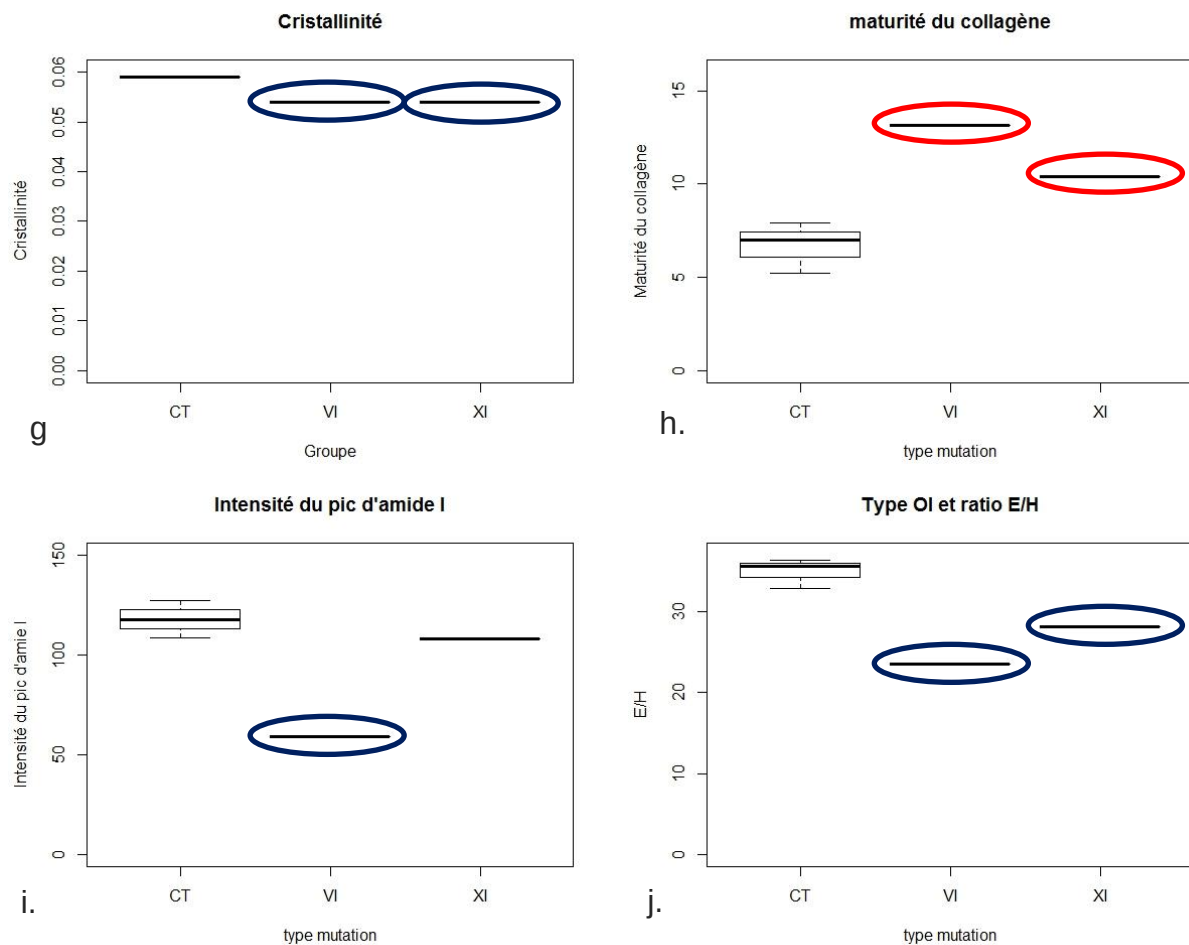


Figure 3-9 Récapitulatif graphique des résultats obtenus en comparant les échantillons de type OI VI et XI aux échantillons contrôle. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Sont entourés en rouge les résultats qui semblent supérieurs à la moyenne plus la déviation standard des échantillons contrôle, en bleu ceux qui semblent inférieurs à la moyenne moins la déviation standard

3.2.3 Corrélation entre nano-indentation et spectroscopie Raman

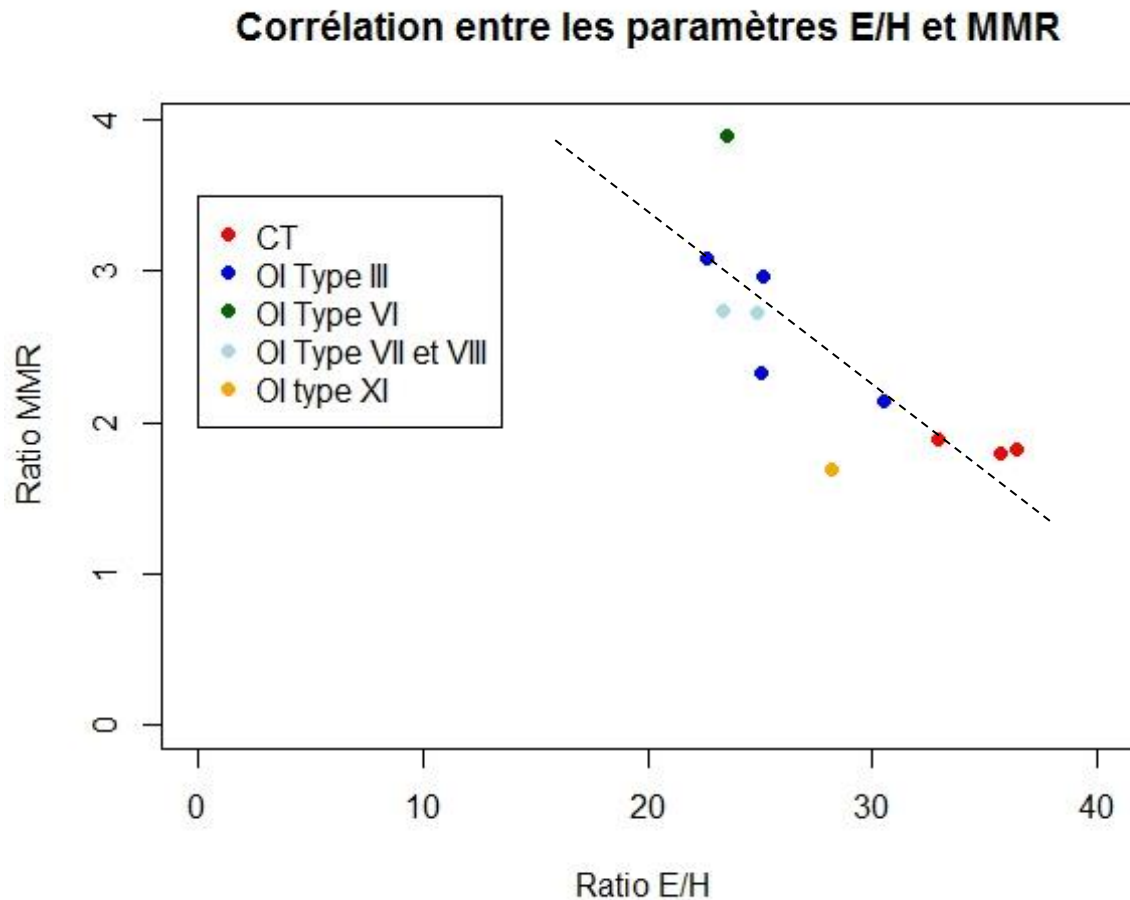


Figure 3-10 Corrélation E/H et MMR

Un dernier point à mettre en avant dans cette présentation des résultats, est la corrélation entre le ratio du module de Young sur la dureté avec le ratio MMR, comme cela est visible dans Figure 3-10. Ces deux paramètres sont inversement corrélés avec un R^2 de 0,603. Sur ce graphe, deux groupes se distinguent : le groupe contrôle en rouge, qui a un ratio MMR faible et un ratio module de Young sur dureté élevé, et un groupe constitué des échantillons de type génétique OI III, VII et VIII, qui ont un ratio MMR plus élevé mais un ratio E/H sur faible. Les échantillons de type VI et XI se distinguent de ces deux groupes par un ratio MMR respectivement supérieur et inférieur à ces courbes de tendance.

3.3 Discussion et conclusion

Avant toute considération d'analyse des résultats, il faut rappeler que seuls 75 nouveaux cas d'ostéogenèse imparfaite sont découverts chaque année. Parmi ceux-ci, seule une petite poignée se fait opérer à l'hôpital Necker, rendant ainsi l'obtention d'échantillon difficile. Sur ces 75 nouveaux cas, 80% sont atteints d'une mutation sur les gènes COL1A1 et COL1A2. Les échantillons provenant de patients souffrant d'autres mutations sont ainsi très rares. Les résultats seront donc analysés comme des présentations de différents patients sans chercher à généraliser à tous les patients catégorisés dans le même type génétique d'OI.

3.3.1 Le type génétique III

Nous avons trouvé chez les patients de type génétique III, un MMR et une maturité du collagène plus importante que les contrôles, une cristallinité plus faible, un ratio module de Young sur dureté plus faible.

Les patients souffrant d'OI de type génétique III, des mutations des gènes COL1A1 ou COL1A2 (Patel et al., 2015) sont les plus nombreux. C'est ce qui par ailleurs explique que le plus grand nombre d'échantillons analysés dans ce chapitre soient affectés par ces mutations.

Pour les cas les moins graves, les mutations des gènes COL1A1 ou COL1A2 entraînant une production moindre de collagène. La cristallinité n'est pas altérée, mais ces patients sont catégorisés généralement en OI type I (Fratzl-Zelman et al., 2014). En revanche, quand c'est la structure du collagène qui est directement modifiée, cette cristallinité est altérée. Le tropocollagène n'est par exemple alors plus formé que de 3 hélices $\alpha 1$ et non plus de 2 hélices $\alpha 1$ et de 1 hélice $\alpha 2$ (Andriotis et al., 2015), ce qui entraîne une baisse des propriétés mécaniques microscopiques du tissu en terme de module de Young (Andriotis et al., 2015; Li et al., 2016).

Les mutations sur ces gènes touchant directement le collagène sont majoritairement des mutations provoquant des substitutions de la glycine par d'autres acides aminés. Une étude a permis d'estimer la gravité du phénotype à partir de l'acide aminé se substituant à la glycine (Gautieri et al., 2009). Suivant l'acide aminé substitué, la distance entre les hélices des chaînes α est différente. Elle est de plus en plus grande avec une gravité de plus en plus sévère. Cette plus grande distance entraîne

des cristaux d'hydroxyapatite de plus en plus large qui amenuisent les propriétés mécaniques du composite formé par le collagène et l'hydroxyapatite (Qin et al., 2012). Ici, comme dans 75% des cas, (Kang et al., 2016), les échantillons étaient porteurs d'une mutation substituant de la serine à la glycine. Cette gradation du phénotype en fonction de l'acide aminé substitué n'a donc pas pu être observée. En revanche, les résultats sont cohérents avec une étude portant sur des échantillons de type clinique III : le module de Young était plus faible que les échantillons contrôles, la densité minérale du tissu plus importante, la cristallinité plus basse, et le MMR plus élevé (Imbert et al., 2014).

3.3.2 Type VII et VIII

Pour les échantillons de type VII et VIII, les résultats ont été les mêmes que pour les OI de type génétique III : un MMR et une maturité du collagène plus importants que les contrôles, une cristallinité et un ratio module de Young sur dureté plus faibles.

Les mutations des types VII et VIII (Marini et al., 2010) touchant le même complexe de 3-hydroxyproline, un complexe utile dans l'ordonnement des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ entre elles (Weis et al., 2010), les résultats des deux patients porteurs des mutations sur les gènes CRTAP et LEPRE sont analysés dans le même paragraphe. Il a été montré qu'une déficience en prolyl-3 hydroxylase 1, une modélisation murine des types VII et VIII entraînait une hyper minéralisation des os du fait d'une sécrétion de matrice collagénique moindre et d'une plus grande incorporation de minéral dans cette matrice (Fratzl-Zelman et al., 2016a) ; et que cette hyper minéralisation se retrouvait chez les patients OI type VIII (Fratzl-Zelman et al., 2016b). Nos résultats ont montrés une augmentation du ratio MMR, mais pas que ce ratio MMR était plus élevé que les patients souffrant d'OI type génétique III.

3.3.3 Type VI

L'échantillon OI de type VI présentait une porosité normale pour des échantillons OI. En revanche, il avait une TMD plus importante que les contrôles, même pour un échantillon OI. Le module de Young, la dureté et le ratio MMR étaient également plus élevés. Son ratio module de Young sur dureté était faible, même pour un échantillon de type OI.

La première description de l'OI type VI date de 2002 (Glorieux et al., 2002), et fait état d'un type d'OI dans lequel la production de collagène est normale, et pour lequel le remodelage n'était pas perturbé, mais pour lequel la production de PEDF est quasi inexistante (Al-Jallad et al., 2015), ce qui a un impact sur la minéralisation du tissu humain (Homan et al., 2011; Venturi et al., 2012). La mutation a été identifiée, mais on continue d'en découvrir des variantes (Wang et al., 2017), ayant toutes des effets sur la minéralisation. Les échantillons humains et murins présentent une part très importante d'ostéoïde dans le tissu et un retard à la minéralisation. Le tissu présentait des zones hyper minéralisées coexistant avec des zones hypo minéralisées (Bogan et al., 2013; Fratzl-Zelman et al., 2015). Cette hyper minéralisation du tissu a été retrouvée dans nos résultats, et est d'autant plus marquée qu'elle était plus importante que les échantillons de type OI III génétique. Nous avons aussi trouvé que l'échantillon n'avait pas des propriétés mécaniques plus faibles que celles des contrôles. La spectroscopie Raman, associée à de la nanoindentation permet donc de différencier le type VI du type III.

Il est intéressant de remarquer que les patients souffrant d'OI type VI ne répondent pas bien aux bisphosphonates, d'où l'importance de différencier ce type d'OI des types génétiques III. En effet, d'autres traitements ont montré une plus grande efficacité chez les OI de type VI, tels que le denosumab (Hoyer-Kuhn et al., 2014, 2016), qui, à la différence des BP, a un temps de latence plus court (Ward et al., 2016). La même efficacité a aussi été observée avec des essais de supplémentations en PEDF sur les modèles murins normalisant la masse osseuse (Belinsky et al., 2016).

3.3.4 Type XI

L'échantillon OI de type XI présentait une porosité et une cristallinité normales pour les échantillons OI. En revanche, il avait une TMD plus faible que les contrôles, contrairement aux autres échantillons OI. De même, le module de Young, la dureté et le ratio MMR présentaient des valeurs proches de celles des contrôles. Son ratio module de Young sur dureté était normal pour un échantillon de type OI et plus faible que celui des échantillons contrôles.

Deux études indiquaient chez les patients atteints d' OI type XI une réticulation du collagène réduite (Barnes et al., 2012; Lietman et al., 2014), entraînant une

résistance décreue des os (Oxlund et al., 1995). En effet, les protéines chaperon tels que FKBP65 empêchent les liaisons précoces entre les chaînes α et permettent la réticulation correcte des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ entre elles (Ishikawa et al., 2008). Le rôle du complexe FKBP65 est tel qu'en cas de mutation sur FKBP10, le collagène est surmodifié du fait de l'absence de molécule chaperon.. Cela n'a pas été observé sur l'échantillon étudié.

En revanche, une autre étude trouvait un ratio MMR et une cristallinité réduite (Lietman et al., 2017), ce qui a été observé puisque le MMR se situait dans les marges de valeurs des échantillons sains. En outre, le taux de substitution en carbonate était très supérieur aux autres échantillons OI et aux contrôles. Un patient présentant cette maladie a montré un taux de remodelage plus bas que la moyenne (0,32 fois/an contre $0,83 \pm 0,35$ fois/an), ainsi qu'un temps de minéralisation bien supérieur à celui des valeurs de références correspondant à son âge (122 jours contre $22 \pm 3,0$ jours), ce qui semble cohérent avec nos résultats (Venturi et al., 2012). En effet, plus le tissu osseux est âgé, plus ce taux de substitution est important. Par ailleurs, ce patient présentait un nombre d'ostéoclastes très supérieur à la valeur de référence ($2,4$ vs $0,94 \pm 0,38$ ostéoclaste/surface osseuse) (Venturi et al., 2012). Le défaut touche donc très certainement les ostéoblastes qui ne sont pas assez actifs.

La spectroscopie Raman a donc permis de mettre en avant une des caractéristiques des OI type XI, c'est-à-dire un remodelage trop lent.

3.3.5 Corrélation MMR et ratio module de Young sur dureté

Ces deux paramètres décrivent en fait le rapport entre les quantités de minéral, qui entraîne une dureté plus importante, et celles de collagène, qui procure à l'os une plus grande élasticité, influant ainsi sur le module de Young (Bala et al., 2011). La spectroscopie Raman apporte ainsi des informations cohérentes et complémentaires à celles pourvues par la nano-indentation puisqu'elle apporte, en sus des informations sur la cristallinité, une lecture du taux de substitution en carbonate et de la maturité du collagène.

3.4 Conclusion

Ce chapitre a permis d'étudier le rôle de certaines protéines impliquées dans l'ostéogénèse, et plus précisément de montrer que ces mutations avaient un impact dès la nanostructure osseuse. Ces résultats sont exposés tout en soulignant qu'au vu le faible nombre d'échantillons analysés, ils sont à considérer avec précaution. Même si nos résultats sont cohérents avec les différentes études de la littérature.

Il a été montré que les types génétiques OI VII et VIII n'étaient pas différenciables des types génétiques OI III par spectroscopie Raman, ni par nanoindentation.

Le type OI VI présente une minéralisation du tissu très supérieure à celle des autres types d'OI ainsi que celle des échantillons contrôles il a donc été distingué des autres types d'OI par spectroscopie Raman.

Enfin, le type génétique OI XI présente un taux de substitution en carbonate très élevé, bien supérieur à celui des échantillons OI et à celui des échantillons contrôles. Il constitue donc un type d'OI différenciable des autres types d'OI par spectroscopie Raman.

Chacune de ces caractéristiques contribue à la fragilité des tissus osseux et permet de mieux comprendre les mécanismes de l'ostéogénèse. Une étude plus poussée en génétique permet d'adapter les traitements (Hoyer-Kuhn et al., 2014, 2016), mais la solution miracle n'existe pas encore (Kanno et al., 2017). Il reste encore des progrès à faire pour qu'une fois les mécanismes pathologiques compris, les traitements enrayerent la maladie définitivement.

Transition

Nous avons pu voir dans cette première partie que le tissu osseux OI présentait à l'échelle nanoscopique des différences notables induites par la variété des mutations, provoquant un symptôme commun de grande fragilité osseuse chez les patients atteints de la maladie. Que ces différences aient lieu dans les premières étapes de l'ostéogénèse avec une production de collagène insuffisante (OI type I), un pro-collagène mal formé (OI type II, III, IV), mal modifié (OI type VII, VIII, IX), mal chaperonné ou mal exocyté (OI type X, XI, XII) ; ou dans les étapes plus tardives de l'ostéogénèse, comme les problèmes de minéralisation trop poussée (OI type V) ou hétérogène (OI type VI), ou de différenciation ou de fonctionnement des ostéoblastes perturbé (OI type XIII à XVIII) (Kang et al., 2016), l'os présente toujours une plus grande porosité intra corticale. C'est une trabécularisation des os et plus précisément des os corticaux qui a lieu (Albert et al., 2014; Jones et al., 1999; Vardakastani et al., 2014). De nombreux indices portent à croire que cette trabécularisation des os est due à un déséquilibre dans le cycle de remodelage avec une étape de résorption trop efficace et une phase d'apposition de la matrice pas suffisante pour compenser les quantités d'os résorbées par les ostéoclastes. Par ailleurs, ce cycle est décrit comme trop rapide et en présence de trop nombreuses lacunes ostéocytaires, ce qui fait que l'os n'a pas le temps de minéraliser plus et d'ainsi obtenir des propriétés mécaniques supérieures (Jones et al., 1999; Rauch et al., 2002).

Dans cette thèse, nous avons eu la possibilité d'étudier une étape du remodelage : la phase de résorption. En effet, les échantillons étant congelés immédiatement après le prélèvement, et les ostéocytes, initiateurs du cycle de remodelage, n'étant pas fixés ni traités pour supporter la congélation : ceux-ci ont explosés et disparus. Leur étude se fait donc de manière indirecte, en observant les traces qu'ils ont laissées : les lacunes ostéocytaires (Fratzl-Zelman et al., 2015).

Nous avons eu la possibilité d'étudier la deuxième phase du cycle de résorption en cultivant des ostéoclastes sains sur du tissu osseux. C'est cet aspect qui est développé dans les chapitres 4 et 5 suivants.

Enfin, la dernière phase du cycle de remodelage n'a pas été ici étudiée. Il s'agit de la phase d'apposition de la matrice protéinique et de sa minéralisation. En effet, pour ce

faire, il aurait fallu disposer de cellules malades pour en observer leur fonctionnement, ce qui a été fait dans d'autres études en utilisant des cellules sécrétant du collagène, comme par exemple des fibroblastes pour étudier l'OI de type génétique VI (Al-Jallad et al., 2015; Belinsky et al., 2016).

La deuxième partie de cette thèse va donc se centrer sur le comportement de résorption des ostéoclastes. Dans le prochain chapitre (chapitre 4) sera étudié ce comportement avec des tissus osseux sains. Nous analyserons ensuite (chapitre 5) la résorption de tissus osseux de patients souffrant d'OI.

Partie B :

Comportement des ostéoclastes sur le tissu osseux sain et pathologique, application à l'ostéogénèse imparfaite

4 Comportement des ostéoclastes sur le tissu osseux sain

Résumé

L'os étant un tissu vivant, il est constamment amené à se renouveler : en sept ans, le squelette humain aura entièrement été régénéré. La résorption est une des étapes clés de ce remodelage osseux. En dehors de stimuli purement chimiques, se pose la question de savoir ce qui régit la résorption, et de voir si des mécanismes la guident ou si c'est un phénomène purement aléatoire. En effet, il a été montré que les cellules étaient sensibles à la topographie des substrats sur lesquelles elles étaient ensemencées (Geblinger et al., 2010), mais aussi qu'elles étaient sensibles au minéral. En effet, lorsque le taux de minéralisation est faible, le taux de résorption est élevé (Jones et al., 1995). Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés au comportement de cellules osseuses humaines responsables de la résorption, les ostéoclastes, lorsqu'ils étaient ensemencés *in-vitro* sur de l'os humain. Nous avons montré que ce comportement n'avait rien d'aléatoire, et que les ostéoclastes résorbaient en premier lieu les zones osseuses aux propriétés mécaniques et minérales plus faibles en terme de module de Young ($19,7 \pm 0,7$ GPa en zone résorbée contre $22,9 \pm 1,3$ GPa en zone non résorbée), de dureté ($0,68 \pm 0,05$ GPa en zone résorbée contre $0,8 \pm 0,07$ GPa en zone non résorbée), de cristallinité (l'épaisseur des cristaux d'hydroxyapatite), de taux de substitution en carbonate (remplacement des groupements phosphates par des carbonates dans les cristaux d'hydroxyapatite) et de la quantité de minéral dans la matrice protéinique. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Bone (Pernelle et al., 2017). Par ailleurs, nous avons montré que la capacité de résorption des ostéoclastes dans le temps plafonnait, ce qui entraînait un plateau dans le nombre d'ostéons résorbés.

Introduction

Un protocole permettant d'étudier les propriétés mécaniques, chimiques et structurales du tissu osseux à différentes échelles a été décrit au chapitre 2. Cependant, étant un tissu vivant qui se régénère, l'étude du remodelage osseux d'un point de vue culture cellulaire permet d'éclairer des mécanismes qui confèrent à l'os ses bonnes propriétés mécaniques, mais aussi son rôle de régulateur de la calcémie. Mais en cas de dérèglement, ces mécanismes peuvent aussi expliquer des fragilités accrues de l'os. Le choix d'étude a été fait de se centrer sur les ostéoclastes, et plus précisément sur le mécanisme de résorption de l'os par les cellules en l'absence de stimuli physiologiques.

De précédentes études effectuées sur de l'os bovin ou de la dentine éléphantine (Rumpler et al., 2013; Søre et al., 2013) ont montré un comportement de résorption aléatoire par les ostéoclastes humains. Les cellules résorbaient soit en pits (résorption ultra localisée), soit en trail (trainée de résorption). Par ailleurs, Les cellules se sont avérées être insensibles à la présence de défauts osseux, mais très sensibles au substrat sur lequel elles étaient ensemencées (Rumpler et al., 2012). De nombreuses expériences testent la réaction des cellules ensemencées sur des substrats mimant l'os humain, à des fins de création de nouveaux substituts au tissu osseux, tant en termes de différenciation qu'en termes de résorption (Ciapetti et al., 2017; Detsch et al., 2010; Geblinger et al., 2009, 2010, 2012; Henriksen et al., 2007; Jones et al., 1995; Keller et al., 2012; Kleinhans et al., 2015; Luxenburg et al., 2007; Nakamura et al., 2013; Reid, 1986; Spence et al., 2010).

Cependant, aucune expérience, à notre connaissance, n'avait encore été faite en ensemencant des ostéoclastes humains sur des os humains. Il est donc intéressant de qualifier le comportement des cellules humaines en présence du tissu osseux humain.

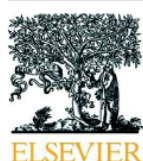
Dans un premier temps, une étude pour quantifier le phénomène de résorption a été effectuée et a fait l'objet d'une publication dans Bone en 2017 (Pernelle et al., 2017). Dans un second temps, une étude a été menée pour déterminer si le comportement était modifié en fonction du temps.

4.1 Étude quantitative de la résorption du tissu osseux humain par des ostéoclastes humains

La résorption du tissu osseux humain par des ostéoclastes humains n'avait jamais été étudiée, c'est donc l'objet de l'étude suivante. Des études sur les ostéoclastes avaient été menées à l'Ecole Nationale Supérieure de Lyon (Destaing et al., 2003, 2005; Jurdic et al., 2006; Pfaff and Jurdic, 2001; Saltel et al., 2008). Ces études portaient sur différents laps de temps d'observation, c'est pourquoi le temps moyen de 72h a été choisi. Cette étude a fait l'objet d'une publication retranscrite ci-dessous, essayant de déterminer s'il y avait un comportement particulier de résorption des tissus osseux humains par des ostéoclastes humains ?

4.1.1 Microscale mechanical and mineral heterogeneity of human cortical bone governs osteoclast activity (Pernelle et al., 2017)

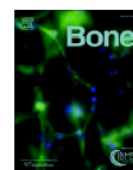
Bone 94 (2017) 42–49



Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone



Full Length Article

Microscale mechanical and mineral heterogeneity of human cortical bone governs osteoclast activity☆



K. Pernelle^{a,b}, L. Imbert^{a,c}, C. Bosser^a, J-C. Auregan^{a,d}, M. Cruel^a, A. Ogier^a, P. Jurdic^b, T. Hoc^{a,*}

^a LTDS UMR CNRS 5513, Ecole Centrale Lyon, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully, France

^b Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon UMR5242, Université de Lyon, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France

^c Mineralized Tissues Laboratory, Hospital for Special Surgery, New York, NY, United States

^d Département de l'Orthopédie pédiatrique, Necker—Hopital des enfants Malades, AP-HP, Paris Descartes, 145 rue de Sèvres, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2016

Revised 22 September 2016

Accepted 6 October 2016

Available online 08 October 2016

Keywords:

Osteoclasts

Biomechanics

Matrix mineralization

Nano indentation

Raman spectroscopy

ABSTRACT

Human cortical bone permanently remodels itself resulting in a haversian microstructure with heterogeneous mechanical and mineral properties. Remodeling is carried out by a subtle equilibrium between bone formation by osteoblasts and bone degradation by osteoclasts. The mechanisms regulating osteoclast activity were studied using easy access supports whose homogeneous microstructures differ from human bone microstructure. In the current study, we show that human osteoclasts resorb human cortical bone non-randomly with respect to this specific human bone microstructural heterogeneity. The characterization of this new resorption profile demonstrates that osteoclasts preferentially resorb particular osteons that have weak mechanical properties and mineral contents and that contain small hydroxyapatite crystals with a high carbonate content. Therefore, the influence of human bone microstructure heterogeneity on osteoclast activity could be a key parameter for osteoclast behaviour, for both *in vitro* and clinical studies.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

4.1.1.1 Abstract:

Human cortical bone permanently remodels itself resulting in a haversian microstructure with heterogeneous mechanical and mineral properties. Remodelling is carried out by a subtle equilibrium between bone formation by osteoblasts and bone degradation by osteoclasts. The mechanisms regulating osteoclast activity were studied using easy access supports whose homogeneous microstructures differ from human bone microstructure. In the current study, we show that human osteoclasts resorb human cortical bone non-randomly with respect to this specific human bone microstructural heterogeneity. The characterization of this new resorption profile demonstrates that osteoclasts preferentially resorb particular osteons that have weak mechanical properties and mineral contents and that contain small hydroxyapatite crystals with a high carbonate content. Therefore, the influence of human bone microstructure heterogeneity on osteoclast activity could be a key parameter for osteoclast behaviour, for both *in vitro* and clinical studies.

Keywords: Osteoclasts – Biomechanics – Matrix mineralization – Nano indentation - Raman spectroscopy.

4.1.1.2 Introduction:

Bone remodelling occurs throughout life and provides the bone turnover required to adapt both structure and architecture of bone tissue to its mechanical environment. Harmonious remodelling is vital to maintain the biological and mechanical characteristics of healthy bone (Bala et al., 2013; Eriksen et al., 2007; Zaidi, 2007). Osteoclasts - cells of a hematopoietic origin - are one of the three main bone cell types that play a crucial role in the bone remodelling cycle (Boyle et al., 2003). Mature bone-resorbing osteoclasts adhere tightly to the bone surface at the sealing zone and dissolve both the inorganic and organic components of the bone matrix by secreting protons and enzymes (Teitelbaum, 2000). This resorption phase initializes bone remodelling and thus determines the bone areas that will be substituted. Impaired osteoclast activity is involved in many bone diseases, such as osteoporosis (Drake et al., 2015) and osteogenesis imperfecta (Davis et al., 2012). Thus, osteoclasts are prime targets in the development of new therapeutic treatments

(Boyce, 2013). Moreover, resorption is an essential parameter in the formulation of better performing biomaterials whose bioresorbability has to be controlled (Detsch and Boccaccini, 2015). Recent studies on osteoclasts have allowed for a better understanding of the mechanisms involved in the differentiation of these cells and the intracellular mechanisms that are responsible for the resorption, the regulation of the resorption process remains unclear. Particularly, the behaviour of osteoclasts and their capacity to function in a cyclic manner - alternating between resorption and migration phases - has not been fully elucidated. In this study, we postulated that the *in vitro* observations of these alternating resorption and migration phases are regulated by the microstructure of the support used. The resorption profile was observed, for the first time, on human cortical bone in which the heterogeneous microstructure differs from the supports that are routinely used to investigate osteoclasts *in vitro*.

Previous *in vitro* studies on resorption were carried out using substrates that were either synthetic or natural - such as bovine bone or dentin. However, the osteoclast behaviour (adhesion, activity) varies according to the nature of the substrates (Nakamura et al., 2013; Rumpler et al., 2013). For synthetic substrates, the osteoclastic activity varies according to the composition, roughness, and size of the hydroxyapatite crystals (Nakamura et al., 2013). Regarding natural substrates, each has its own composition and microstructure; although their composition is similar, dentin has a tubular structure (Marshall, 1993), whereas bovine bone is plexiform. Under the same culture conditions, the surface area of dentin resorbed by osteoclasts is 11 times larger with 7 times more pits per square centimetre than bovine bone (Rumpler et al., 2013). Thus, the characteristics and organization of the material microstructures predispose them to be more or less resorbed. This observation suggests that the intracellular function of osteoclasts is modulated by the support (adhesion capacity – enzyme efficiency).

Human cortical bone has a specific heterogeneous haversian microstructure composed of osteons (Rho et al., 1998) that are formed from adjacent concentric lamellae of type 1 collagen sprinkled with hydroxyapatite crystals and are delimited at their periphery by cement lines (Burr et al., 1988; Lakes and Saha, 1979). The microstructural heterogeneity is observed for mechanical (Hoc et al., 2006) and mineral properties between osteons and interstitial bone. Although the microstructure

of human cortical bone is different from other species (Hillier and Bell, 2007) or other substrates that are usually used to study osteoclast behaviour, the only previous study investigating the resorption of human bone is from 1986. Using techniques available at the time and a mixture of chick osteoclasts, it was reported that resorption by such osteoclasts was confined at 60% to a single mineral density phase (Reid, 1986). In the present study, direct correlations between human cortical bone mechanical and mineral properties and resorption localization by human osteoclasts were analysed. Resorbable and non-resorbable areas were characterized in terms of their mechanical and mineral properties. The mechanical properties with the Young's modulus and hardness were determined on the microscale by nanoindentation. The quantity and quality of minerals on the microscale were measured by RAMAN spectroscopy.

4.1.1.3 Material and methods

Bone sample preparation

Human cortical bones were collected from fresh cadavers by JC Auregan at Ecole de chirurgie du fer à Moulin, Lariboisière hospital (three male donors with a mean age of 72 years old), and immediately frozen at -20°C. The age of the three bone male donors was respectively: donor 1: 69 years old; donor 2: 77 years old; donor 3: 71 years old. Every anatomical subject was free of systemic disease and did not take any medication before its inclusion in the study. However, given that no information about the BMD was available before the completion of the study, we collected the hip, distal radius and vertebrae of each subject to ensure that none of these bones displayed any sign of osteoporosis. Nine plane-parallel samples (4 mm-long, 4-mm wide and 3-mm high) were cut in the diaphysis with a diamond saw (Secotom-15, Struers A/S, Ballerup, Denmark) transversally from the osteon direction (see figure 4-1a). The upper surface perpendicular to the osteon's direction was polished using a 1- μ m diamond powder. Samples were then cleaned by ultrasonication in distilled water.

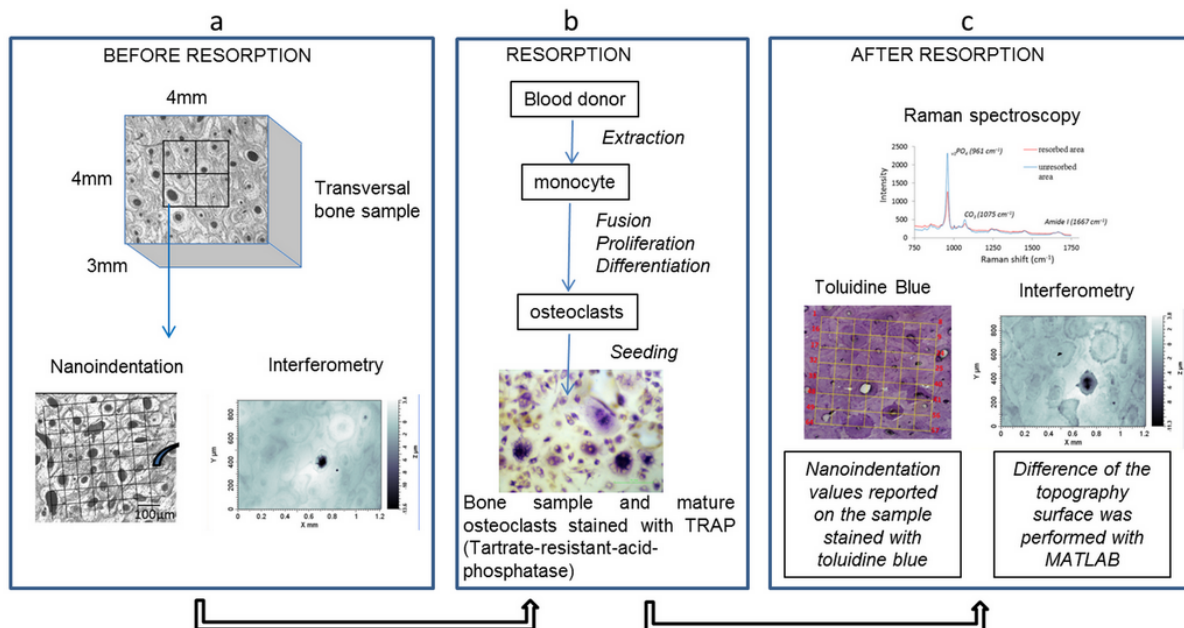


Figure 4-1 Experimental design. The surface of each bone sample was characterized before seeding mature osteoclasts. First, nanoindentation and interferometer, respectively, provided local mechanical properties values and surface topography before resorption, respectively (Figure 1a). In parallel, monocytes from human donors were extracted from peripheral blood and differentiated into osteoclasts. Then, osteoclasts were seeded on each sample in an optimal medium for osteoclast activity. After 72 h, osteoclasts were stained with TRAP, counted and removed from the bone surface (Figure 1b). Next, the resorbed bone sample was stained by toluidine blue to determine the resorbed areas (intense violet). Analysis of the surface topography after resorption was carried out by interferometry on the same areas that were characterized before osteoclasts seeding. The variation of z (μm) at each point was measured and the mineral properties were characterized by Raman spectroscopy (Figure 1c).

Human osteoclasts

Monocytes were purified from blood of healthy adult volunteer donors (Etablissement Français du Sang, Lyon Gerland, France) as previously described (Rivollier et al., 2004). Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll (Eurobio®), then centrifuged through a 50% Percoll gradient (GE Healthcare®). The light density fraction from the pellet was recovered and incubated for 10 minutes at room temperature in 3% human serum-PBS. Monocytes were purified from the light density fraction by immunomagnetic depletion (Dyna, Invitrogen®) using monoclonal antibodies (Immunotech, Beckman Coulter®) directed against CD19 (J3-119), CD3 (UCHT1), CD56 (C218) and CD235a (11E4B-7-6). Then, monocytes were cultured at 37°C in 5% CO₂ using α -minimum essential medium (α -MEM, Life technologies®) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco®), 100 U/mL penicillin (Gibco®), 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin (Gibco®), and 10% foetal bovine serum (FBS, Pan biotech Dutscher®). Monocytes were seeded in the presence of 50 ng/mL human M-CSF (PeproTech®) and 30 ng/mL human RANKL (PeproTech®). The medium and cytokines were changed after 3 days; M-CSF at 25 ng/mL and RANKL at 100 ng/mL.

Osteoclasts were then detached from the plastic plates using Accutase (Sigma-Aldrich®) as previously described (Harre et al., 2012) and were seeded onto bone samples (50 000 cells/sample) with 25 ng/mL M-CSF and 100 ng/mL RANKL for 72 h (Figure 4-1b). In the present study, osteoclasts from two blood donors were seeded on nine bone samples (see table 4-1).

Nanoindentation

Prior to osteoclast seeding, nanoindentation tests were performed on the nine bone samples surrounded by a physiological saline solution at ambient temperature using a commercial nanoindenter (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France) (Figure 4-1a). Fused silica was used to calibrate the Berkovich diamond tip contact surface. A grid of 81 measurement points per sample with a spacing of 150 μm was performed. Then, nanoindentation points were at random locations inside the bone microstructure. A constant strain rate of 0.05 s^{-1} and a maximum depth of 2000 nm were imposed. The Continuous Stiffness Measurement (CSM) method allowed for the determination of the Young's modulus and the hardness as functions of the displacement into the surface. In the present study, Oliver and Pharr's method (Oliver and Pharr, 1992) was used with the assumptions for linear elastic isotropic material. The elastic properties of the diamond indenter were $\nu_i = 0.07$ and $E_i = 1131 \text{ GPa}$. Moreover, bone was assumed to be isotropic, with a 0.3 Poisson ratio. The Young's modulus and hardness for each point were measured on the plateau between 600 and 1200 nm. The mean values of the Young's modulus and hardness for each sample are given in table 4-1.

Sample	Bone donor	Osteoclast donor	Young's modulus (GPa)	Hardness (GPa)	Mineral to matrix ratio $v_1\text{PO}_4/\text{Amide I}$	Mineral to matrix ratio $v_1\text{PO}_4/\text{CH}_2$	Crystallinity	Rate of carbonate substitution
1	1	1	21.7 ± 2.5	0.80 ± 0.13	15.60 ± 2.1	14.49 ± 0.9	0.0601 ± 0.0007	0.171 ± 0.006
2			22.1 ± 2.8	0.71 ± 0.14	14.68 ± 2.1	12.61 ± 1.9	0.0609 ± 0.0007	0.172 ± 0.006
3			21.7 ± 2.6	0.79 ± 0.14	17.18 ± 2.7	14.87 ± 1.2	0.0598 ± 0.001	0.172 ± 0.006
4	2	2	21.9 ± 2.3	0.79 ± 0.13	17.65 ± 1.5	15.37 ± 1.2	0.0604 ± 0.0009	0.162 ± 0.007
5			20.7 ± 2.6	0.73 ± 0.11	17.65 ± 1.1	15.87 ± 0.8	0.0611 ± 0.0009	0.162 ± 0.006
6			20.5 ± 2.4	0.62 ± 0.09	17.77 ± 2.4	15.92 ± 1.0	0.0605 ± 0.001	0.164 ± 0.008
7	3	2	20.3 ± 2.8	0.72 ± 0.11	17.43 ± 2.4	14.86 ± 1.5	0.0599 ± 0.001	0.190 ± 0.008
8			20.7 ± 2.1	0.73 ± 0.10	16.06 ± 2.2	14.31 ± 1.3	0.0593 ± .0007	0.172 ± 0.006
9			20.1 ± 2.0	0.69 ± 0.10	17.39 ± 1.6	14.96 ± 1.5	0.0599 ± 0.0009	0.169 ± 0.006
Mean			21.0	0.73	16.82	14.81	0.0602	0.1681
SD			± 0.7	± 0.06	± 1.1	± 0.9	± 0.0006	± 0.004

Tableau 4-1 Mechanical and mineral properties of each sample were analysed by nanoindentation and Raman spectroscopy. The Young's modulus and hardness values for each sample correspond to a mean value of 81 indents, and the mineral to matrix ratios, crystallinity and carbonate substitution rate correspond to a mean value of 30 points. Three human bone donors were used in this study

Raman spectroscopy

Raman spectroscopy (LabRAM HR 800, Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) was performed under wet conditions on the same sample surface as nanoindentation. This technique uses Raman scattering to obtain information on the composition of the material. A 785 nm laser was focused on the bone surface through a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with a 50× objective (NA= 0.75), resulting in a laser spot diameter of less than 2 μm . The system included a CCD camera (1024x 256 pixels cooled by Peltier effect at -70°C) to detect the Raman scattering and a grating of 1800 grooves/mm permitting to collect data with a spectral resolution less than 1 cm^{-1} . LabSpec 5 software (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) was used to de-spike the spectra and subtract the background. Before use, the instrument was calibrated to the 520.7 cm^{-1} Raman line of silicon. Thirty location points inside the bone microstructure were measured for each of the nine samples (15 points for resorbed areas, 15 points for unresorbed areas) corresponding to a total of 270 location points. For better reproducibility, one accumulation was used and five consecutive spectra were acquired in each location

corresponding to 1350 spectra (Hammond et al., 2016; Imbert et al., 2014). These five 45 s acquisitions were averaged at each location between 750 cm^{-1} and 1750 cm^{-1} . Accordingly, Raman peak ratios are usually used rather than peak intensities to detect differences in bone tissue composition. Then two intensity ratios were automatically calculated from the smoothed spectra (sliding average over three points corresponding to a range of 2 cm^{-1}). Three parameters were calculated from the smoothed spectrum: i) mineral-to-matrix ratio describing the mineral content compared to the collagen matrix was calculated in two ways: (1) $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) / Amide I (1667 cm^{-1}) maximum intensities ratio and $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}) / CH_2 wag (1453 cm^{-1}) maximum intensities ratio; ii) the carbonate-to-phosphate ratio, which is the ratio between the CO_3 (1075 cm^{-1}) and the $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1}), conveying the substitution rate; and iii) the crystallinity, which is the inverse of the full width at half-maximum of the $\nu_1\text{PO}_4$ peak (961 cm^{-1}). The crystallinity value increases when the size of the mineral crystals increases (Yerramshetty et al., 2006) (Figure 4-1c). As $\nu_1\text{PO}_4$ and Amide I bands are orientation dependent (Kazanci et al., 2006) a large number of points was analyzed to statistically compare resorbed and unresorbed osteons. The mean values of the mineral/matrix ratios, carbonate substitution rate and crystallinity for each sample are provided in Table 4-1.

Resorption analysis

After 72 h of osteoclast culture, osmotic lysis with water and sonication were used to remove cells. Then, the nine bone samples were stained in a toluidine blue solution. Toluidine blue intensely colours naked collagen fibres resulting from the resorption process. Resorbed areas were localized using an upright microscope under tangential light (Figure 4-1c). The quantification of resorption was analysed using white light interferometry (Wyko NT, Veeco). Topography acquisition was performed before and after resorption in vertical scanning interferometry mode using Visio 32 software parameters: FOV 1x, 5x magnification, VSI optical speed 1x, backscan $20\mu\text{m}$, length $50\mu\text{m}$ and 2.5 modulations. For each sample, four acquisitions were performed to cover 4 mm^2 in the centre of the sample surface (Figure 4-1c). For each point of the sample, the variation depth Δz , corresponding to the height before resorption minus the height after resorption, and the percentage of the resorbed surface were calculated using a homemade Matlab routine.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) acquisitions were taken in the backscattered electron mode to reflect the difference in mineralization with a Quanta 250 FEG microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) equipped with a GDA detector in environmental conditions. The microscope was operated at a voltage of 30 kV and hydrostatic pressure of 0.9 Torr (120 Pa) in the chamber. A magnification of 50x and a very slow scanning speed (30 μ s per point) were used to obtain a contrasted image of 2.54 mm by 2.54 mm. Each image was resized to keep only the area of interest already analyzed in the experiments of nanoindentation and Raman spectroscopy.

Statistical analysis

In the present study, a Kruskal-Wallis test was performed to analyse differences between the mechanical and mineral properties of values obtained on the three bone donors. Because no significant difference was observed between donors, resorption analysis was performed on the mean values of all samples. Differences between the resorbed and non-resorbed values were analysed using a Mann-Whitney test. A p-value of 0.05 was considered to be statistically significant.

4.1.1.4 Results

Resorption heterogeneity

In a first step, osteoclast resorption was studied in terms of localization within the cortical bone microstructure. For that purpose, classical identification of the resorption process was performed using toluidine blue staining, which colours collagen fibres, specifically the naked ones. To evaluate the impact of heterogeneity, we initially compared - under the same conditions - resorption by human osteoclasts of bovine plexiform cortical bone and human haversian cortical bone. 72h after seeding the osteoclasts - derived from human peripheral blood - onto bovine cortical bone, in the presence of MCSF and RANKL, we observed random homogeneous resorption lacunae - or “pits” - within the matrix (Figure 4-2a). By contrast, we found that resorption of human cortical bone by human osteoclasts was not homogeneous within the microstructure (Figure 4-2b).

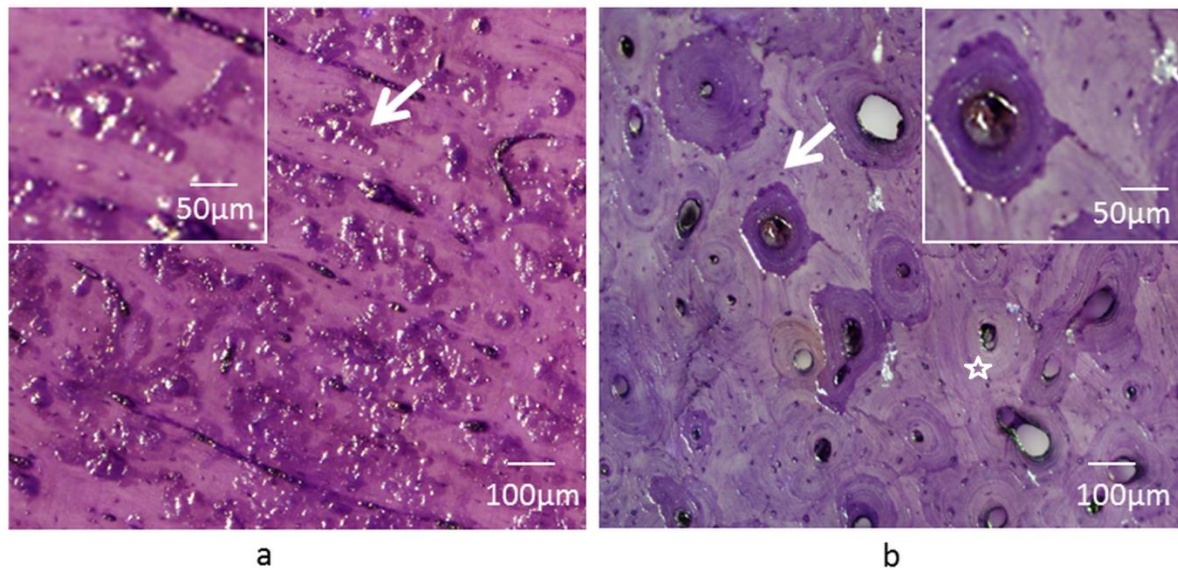


Figure 4-2 Comparison of the resorption profile between bovine plexiform cortical bone and human haversian bone. Human osteoclasts were cultivated for 72h on samples of bovine cortical bone (a) and human bone (b), in the presence of MCSF (macrophage colony-stimulated factor) and RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand). Cells removal and staining with toluidine blue (staining of naked collagen fibers) allows – using tangential light - to visualize resorption lacunae created by osteoclasts. (a) Observation of resorbed bovine plexiform bone reveals the random distribution of small lacunae called “pits” (arrow). (b) Resorption of human haversian cortical bone reveals the resorption of some osteons (white arrow) but not others (star). Enlarged area corresponds to a zoom of arrow zone.

To better characterize the resorption profile of human cortical bone we first compare bone samples before and after resorption. Figure 3a shows a typical cortical bone stained with toluidine blue before osteoclast seeding. Pale homogeneous coloration was observed. After 72h of mature osteoclast culture, typical cortical bone surfaces from donor 1 (sample 1), donor 2 (sample 4), and donor 3 (sample 7) are shown in figure 4-3b, figure 4-3c, figure 4-3d, respectively. For all samples, toluidine blue staining revealed a heterogeneous coloration within the microstructure. Osteoclasts resorbed some osteons (intense coloration and loss of matrix enhanced by tangential light; see the zoomed area in figure 4-3b, 4-3c and 4-3d, arrow) but not others (star), resulting in a very clear resorption contour corresponding to the cement line, while interstitial bone was not a preferential target of the osteoclasts (see the enlarged area in figure 4-3).

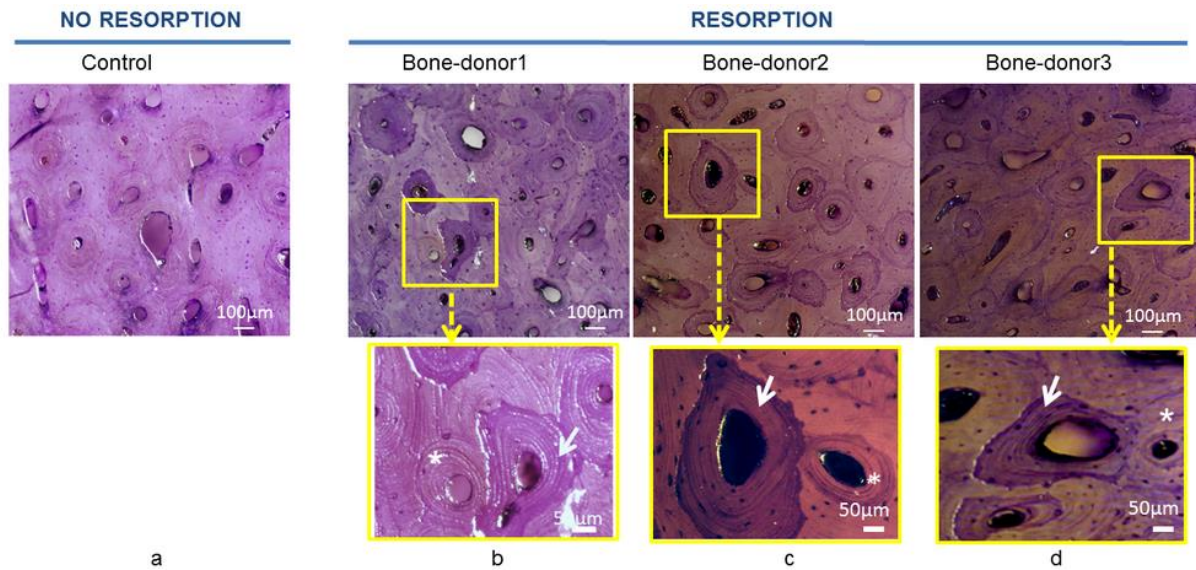


Figure 4-3 Human osteoclasts resorb specific human cortical bone osteons. (a) Control: human cortical bone stained with toluidine blue observed using tangential light in the absence of osteoclast culture. Staining is weak and homogeneous within the osteons. **(b) (c) (d) After culture of human osteoclasts for 72 h on human cortical bone samples, osteoclasts resorbed some osteons (arrow), but not neighbouring osteons (star). The same resorption profile was observed for all of the human bone donors: (b) donor 1 (c) donor 2- (d) donor 3 and for all of the samples studied.**

Resorption quantification

To assess the resorption depth, a comparison of the topographic surface of each cortical bone sample before and after resorption was performed. Comparison of the same zone before and after resorption permitted to assess the loss of material (Δz in μm) at the osteon level. Quantitatively, the resorption depth was expressed as Δz (z before - z after resorption) in μm for each point of the same sample. A typical image of the resorption depth is shown in figure 4-4a. This topographic analysis confirmed a heterogeneous resorption process within the microstructure.

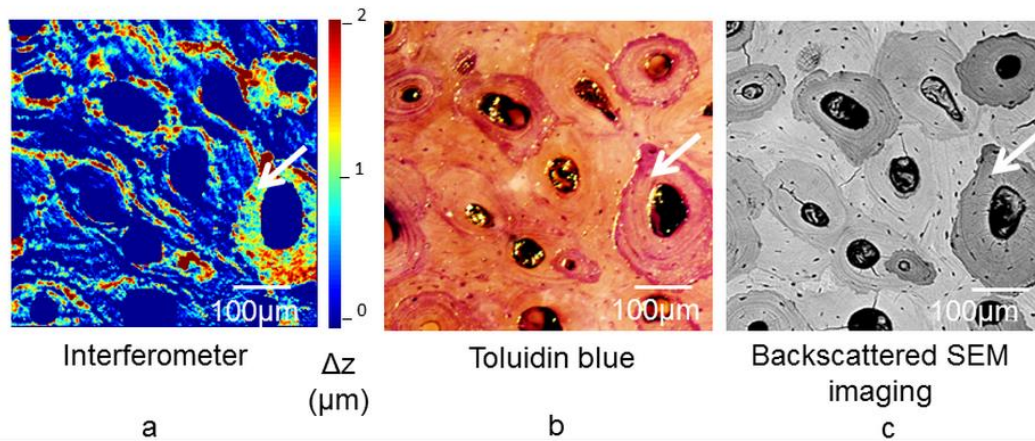


Figure 4-4 Human osteoclasts specifically resorb osteons that have a poor mineral content. Comparison of the same human cortical bone area with different approaches showed a correlation between mineral content and localization and depth of resorption. (a) Interferometry measurements before and after resorption of the same bone area allow a representation after treatment to be obtained with MATLAB software with a z variation (Δz) before and after resorption (μm). The red colour scale indicates the resorption areas, whereas the blue colour scale indicates no resorption. (b) Toluidine blue staining of a sample after resorption, which colours collagen fibres, specifically the naked ones resulting from osteoclast activity. The intense toluidine blue staining is localized to the resorbed areas, and loss of matter is underlined with tangential light. (c) Backscattered SEM imaging of each samples before resorption reflected the degree of mineralization of each osteon. Mineralization differed from one osteon to another and from interstitial bone. The darkest osteons (arrow) correspond to youngest osteons with the lowest mineralization level. Therefore, the least mineralized areas (arrow) correspond to the most resorbed osteon (arrow).

In a quantitative point of view, this comparison allowed to determine the values of the resorption depth as well as the fraction of the resorbed surface for each sample (Table 4-2). The mean values of the resorption depth and fraction of the resorbed surface obtained on all samples were $2.41 \mu\text{m}$ and 12.7% , respectively.

Sample	Mean value of resorbed osteons Δz (μm)	Resorbed surface percentage
1	2.63	13.4
2	1.77	12.4
3	3.38	11.1
4	2.90	13.6
5	2.47	13.0
6	2.06	12.3
7	2.19	11.7
8	1.78	14.3
9	2.59	12.2
Mean values	2.41 ± 0.52	12.7 ± 0.99

Tableau 4-2 Topographic analysis of the human cortical bone resorption profile. Each cortical bone sample was analysed by interferometry before and after resorption. Comparison of the topographic data allowed the quantification of resorbed areas Δz (μm) and resorbed surface percentage.

The resorption depth, obtained by interferometry, was compared with toluidine blue staining of the same area (figure 4-4b). The greater values of depth of resorption (Δz) correspond to more intense toluidine blue coloration after resorption. Then, toluidine blue staining image of all samples allows resorbed osteons and unresorbed osteons to be separated. In the same way, figure 4-4c shows the distribution of the mineral content obtained using SEM backscatter imaging. Because the darkest SEM grey level corresponds to the lowest mineral content, resorbed osteons were associated with a lower mineral content usually linked with the mechanical properties (Huang et al., 2010). As a result, the mechanical and mineral contents play a significant role in osteoclast resorption. However, a decrease in the mineral content does not necessarily involve a modification of the mineral quality.

Mechanical and mineral quality properties

We compared the mechanical and mineral properties of resorbed versus unresorbed osteons and aimed to define a specific signature of the areas targeted by osteoclasts. The mechanical values measured before resorption using the nanoindentation technique are given in Table 4-3 for both types of osteon. The mean values of Young's modulus (E) and hardness (H) for future resorbed osteons were significantly lower (E=19.7 GPa and H=0.68 GPa, respectively) compared to future unresorbed osteons (E=22.9 GPa and H=0.80 GPa, respectively).

Nanoindentation	Resorbed osteons	Unresorbed osteons	<i>P</i> value
Young's modulus (GPa)	19.7 $\pm$ 0.7	22.9 $\pm$ 1.3	9.49 10^{-6}
Hardness (GPa)	0.68 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.07	9.45 10^{-5}

Tableau 4-3 Human osteoclasts resorb target areas with the lowest mechanical properties. Values of nanoindentation measurements obtained before resorption were superimposed on the toluidine blue resorption image obtained after resorption. Thus, each measurement was determined as a future resorbed area or unresorbed area. Osteoclasts preferentially resorbed areas with the lowest Young's modulus and hardness values. Statistics: (Mann-Whitney U-test).

Then, the mineral characteristics of resorbed and unresorbed osteons were measured using Raman spectroscopy. The usual parameters analysed in bone Raman spectroscopy, such as the mineral-to-matrix ratios, carbonate-to-phosphate ratio and crystallinity for both types of osteons, were measured and are shown in Table 4-4. The mineral to matrix ratios and the crystallinity for resorbed osteons were significantly lower than for unresorbed osteons (resorbed osteons, respectively, 16.2 and 0.0596 vs unresorbed osteons 17.6 and 0.0614). The carbonate substitution rate

of resorbed osteons was significantly higher than that of unresorbed osteons (Resorbed osteons 0.172 vs unresorbed osteons 0.163). Therefore, osteoclasts preferentially target the lowest mineral content areas with specific mineral characteristics, such as small crystals with a lower crystal quality and a higher carbonate substitution rate.

Raman spectroscopy	Resorbed osteons	Unresorbed osteons	<i>pvalue</i>
Mineral to matrix ratios :			
$\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1})/Amide I (1667 cm^{-1})	16.2 ± 1.4	17.6 ± 0.8	0.010
$\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1})/CH ₂ (1450 cm^{-1})	13.9 ± 1.2	15.7 ± 0.8	0.004
Cristallinity :			
the inverse of the full width at half maximum of the $\nu_1\text{PO}_4$ peak (961 cm^{-1})	0.0596 ± 0.001	0.0614 ± 0.005	$1.94 \cdot 10^{-5}$
Carbonate substitution rate : CO ₃ (1075 cm^{-1}) / $\nu_1\text{PO}_4$ (961 cm^{-1})	0.172 ± 0.005	0.163 ± 0.004	0.004

Tableau 4-4 Osteoclasts preferentially resorbed areas that had the lowest mineral content, contained small crystals, and whose maturation was the most advanced. The bone mineral characteristics were obtained with RAMAN microspectroscopy. The mineral/matrix ratios reflect the rates of mineralization, crystallinity reflects the size of the crystal, and the rate of carbonate substitution reflects the mineral maturation. Each value corresponds to a mean value of 9 samples, with 15 measurements per sample. Osteoclasts preferentially resorbed areas with the lowest levels of mineralization, the smallest crystals and areas with the highest rates of carbonate substitution. Statistics: (Mann-Whitney U-test).

4.1.1.5 Discussion

The goal of our study was to better understand the links between the mechanical properties of the human cortical bone surface and human osteoclast mediated resorption. To date, the vast majority of *in vitro* studies on osteoclast mediated bone degradation have been performed using cortical bovine bone, dentin or biomaterials, which provide relatively homogeneous surfaces (Aerssens et al., 1998; Hefti et al., 2010; Varghese et al., 2006). In contrast, the human haversian cortical bone microstructure is composed of osteonal units (Brandi, 2009) derived from the remodelling process, implying osteoclast activity. The elastic modulus and mineral content were shown to be almost constant inside the same osteon, but variable across osteons (Akkus et al., 2004; Hoc et al., 2006; Roschger et al., 1995). The hardest tissues inside the microstructure are interstitial tissues that are mainly composed of the remains of aging osteons (Rho et al., 2002). We raised the question

of whether osteoclasts could sense their environment, such as the heterogeneous microstructure, and preferentially resorb bone surfaces with characteristic mechanical and mineral properties.

Several studies have shown that *in vitro* osteoclast-mediated bone degradation implies that there are very dynamic cell behaviours linked to the actin dynamic (Jurdic et al., 2006). Indeed, osteoclasts adhere to the extracellular matrix through integrins that are associated with a dense network of actin and proteins that form podosomes (Georgess et al., 2014). On mineralized surfaces, they form a sealing zone that is composed of an interlinked network of podosomes, which delimits the degradation lacuna into which osteoclasts secrete acid and proteolytic enzymes (Yovich et al., 1998). Labernardie et al. showed that podosomes from macrophages exert pushing forces on their substrates (Labernadie et al., 2014) and that they possess mechanosensing properties, *i.e.*, the capacity to sense substrate rigidity. Moreover, B. Geiger's group provided evidence that sealing zones can sense the heterogeneity of adhesion surfaces (Geblinger et al., 2010, 2012). Through these actin dynamic structures, osteoclasts are mechanosensitive cells that are able to sense substrate rigidity. In this study, we studied, in detail, human monocyte-derived osteoclast activity on human haversian cortical bone, as a function of its structural, mechanical and chemical heterogeneities. We provide evidence that human cortical bone resorption, in contrast to bovine cortical bone, dentin or synthetic biomaterials, is not a random process. Indeed, we observed that the osteoclasts that are seeded homogeneously on the surface of human cortical bone resorbed preferentially within osteons, whereas interstitial bone was untouched. Human cortical bone sample topographic analysis defined a mean value of the resorption depth of 2.4 μm in our culture conditions. To our knowledge, no other study has analysed the depth of human osteoclast resorption on human bone *in vitro*. However, the order of values measured is consistent with the data found in the literature (Mabilleau et al., 2012; Rumpler et al., 2013), even if the *in vitro* culture conditions were variable. For instance, in 2006, Varghese et al. reported a pit depth of 1.42 μm for mouse osteoclasts that were cultured for 48 h on dentin (Varghese et al., 2006).

Moreover, heterogeneity also exists within osteons because osteons targeted by human osteoclasts had the weakest mechanical properties in terms of the Young's modulus/hardness. The average Young's modulus and hardness values before

resorption for the resorbed areas were 19.7 GPa and 0.68 GPa, respectively, compared to the unresorbed areas, with 22.9 GPa and 0.80 GPa. These results indicate that osteoclasts can sense bone surface mechanical heterogeneity to degrade it. In a previous study, we showed that on homogeneous surfaces, such as glass; synthetic mineralized surfaces; dentin; or cortical bone, murine osteoclasts alternate between migration phases with a loose actin network and resorption phases with the formation of an actin containing sealing zone (Georgess et al., 2014; Hu et al., 2011; Jurdic et al., 2006). We can now determine that on heterogeneous human cortical bone surfaces, osteoclasts resorb specific areas, mostly within osteons. Then, osteons are completely resorbed along the main axis of the haversian structure. This indicates that once located within osteons, osteoclasts are constrained within a physical barrier. This is in agreement with the results published by Anderegg et al., showing that the sealing zone organization and dynamics of murine osteoclasts seeded on micro-patterned glass substrates strictly depend on the continuity of substrate adhesiveness (Anderegg et al., 2011).

Furthermore, our study provides evidence that osteons targeted by osteoclasts had a lower mineralization content compared to unresorbed osteons and interstitial bone. This result is in agreement with the weak mechanical properties of these areas because a positive correlation exists between the mineral content and mechanical properties (Huang et al., 2010). Different studies have described the effect of mineral density on osteoclast activity (Jones et al., 1995; Nakamura et al., 2013). The only study that used a human cortical bone substrate concluded that chick osteoclasts resorbed homogeneous density mineral areas in 60% of the cases. In addition Jones et al. showed that for elephant teeth, the rate of resorption was inversely proportional to the mineral density (Jones et al., 1995), whereas Taylor et al. showed the same relationship for the rate of rabbit osteoclast activity on biomaterials (Taylor et al., 2007).

In this study, we highlighted that osteons targeted by osteoclasts are characterized by smaller hydroxyapatite crystals and a higher carbonate substitution rate compared to non-resorbed areas in human cortical bone. In bone tissue engineering, the interaction of osteoclasts with biomaterials with different compositions, crystallinities, grain sizes and surface bioactivities in regard to the degradation activity has been investigated (Detsch and Boccaccini, 2015). The resorbability of different bone

substitutes by human osteoclasts is not equivalent (Schilling et al., 2004). Indeed, the composition of synthetic material is a major parameter that inhibits or enhances osteoclast-mediated resorption. In particular, the crystallinity, grain size (Despang et al., 2015; Detsch et al., 2010) and roughness affect osteoclast activity (Geblinger et al., 2010). Concerning the rate of carbonate substitution, it is known that substitutions within the hydroxyapatite crystals, such as carbonate, provokes a stoichiometric variation, resulting in a loss of mineral quality (Aruwajoye et al., 2015). Another study on ceramics reported that the resorption increased with the carbonate substitution content (Spence et al., 2010). Therefore, our results emphasize the impact of the heterogeneity of the human bone microstructure in terms of the mechanical and mineral properties on osteoclast activity. In the same way, Dong et al. (Dong et al., 2011) observed that the bone resorption activities of osteoclasts were positively correlated with the in situ concentration of advanced glycation endproducts (AGEs). Then, it will be interesting to analyze AGEs accumulation in future work.

Our results showed clearly a strong impact of microstructure, osteoclasts resorbing preferentially osteons with mechanically softer properties. This result raises the question; how older tissues are resorbed in vivo? Actually, in vivo bone remodeling process aims to maintain bone mechanical properties and mineral homeostasis. It seems that two kinds of bone remodeling exist: one that is “stochastic” and a second that is targeted to areas that require repair such as microcracks created by repetitive cycles of mechanical loading (Burr, 2002a; Clarke, 2008; Martin, 2002; Parfitt et al., 1996). Microcracks accumulation is more important in older tissue as it increased with the number of cycles. Targeted remodeling process is based on a strong association between microdamage and osteocyte apoptosis, which is an important factor in initiating new remodeling sites (Verborgt et al., 2000). Because, no mechanical stimulation was applied on bone sample during osteoclast culture and osteocytes were dead, fatigue microcrack accumulation removal cannot be observed in our experiments. In this context, osteoclast resorption measured in the present study corresponds to “stochastic” remodeling which serves functions other than microdamage removal such as metabolic function. Moreover, results obtained in this study suggest that “stochastic” remodeling does not operate truly in a random manner.

The results obtained in the present *in vitro* study present similarities with recent results obtained on bone pathologies, such as osteogenesis imperfecta. In fact, this bone pathology is characterized by large resorption cavities, leading to a weak fracture resistance (Van Dijk et al., 2010). These large cavities were also associated with local altered mechanical properties and the crystal quality compared to the bones of healthy children (Imbert et al., 2014). In particular, osteogenesis imperfecta bones are composed of small crystals, which in regard to our study, were associated with an increase in bone resorption. Furthermore, Gourion-Arsiquaud et al (Gourion-Arsiquaud et al., 2013) have shown a reduction of the heterogeneity of mineral-to-matrix and carbonate-to-phosphate ratios and more variable crystallinity in fracture cases compared with fracture-free controls. It will be interesting to compare osteoclast activity between these two groups. The crystal quality and mechanical properties at the local scale are then key parameters for osteoclast behaviour, for both *in vitro* and clinical studies.

This study demonstrates that the substrate microstructure influences osteoclast activity. The resorption profile on the human haversian cortical bone microstructure revealed a correlation between the resorbed areas and the mechanical and mineral properties. The resorbed areas matched clearly with the osteon geometry. Osteons targeted by osteoclasts are weaker in terms of their mechanical properties (Young's modulus and Hardness) and mineral quantity and quality (a small crystallinity value and high carbonate substitution rate) than non-resorbable areas. Future *in vitro* resorption studies must take into account the influence of substrate properties on the osteoclast activity. It would also be interesting to study the direct impact of variations in the bone properties in bone diseases or tissue engineering (Place et al., 2009) on osteoclast activity.

Acknowledgements: This work has been supported through grants from ANR-10-EQPX-06-01 IVTV, and ANR-11-BS09-036-01 OMBIOS. We thank the French Establishment of blood (EFS) for the blood sample as well as "Ecole de chirurgie du fer à Moulin Lariboisière" for the access to the human bone samples.

4.1.2 Conclusion

En conclusion de cet article, nous avons pu montrer que le comportement de résorption des ostéoclastes n'était pas aléatoire, mais ciblait les ostéons, aux propriétés mécaniques et structurelles les plus faibles. Ce comportement peut sembler contradictoire si l'homéostasie du calcium est omise. En effet, le remodelage osseux sert deux fonctions : le maintien des propriétés mécaniques et la régulation de la calcémie. La première de ces fonctions, implique qu'un cycle de remodelage est déclenché lorsque les os présentent des micro-fissures, ce qui entraîne l'apoptose des ostéocytes (Cardoso et al., 2009; Herman et al., 2010; Jilka et al., 2013; Klein-Nulend et al., 2005). Généralement, ce sont les tissus les plus âgés qui sont renouvelés. Cette étude a montré qu'en l'absence de stimuli mécaniques, les ostéoclastes ne rentrent pas seuls dans un cycle de renouvellement du tissu âgé.

En revanche, la deuxième fonction, la régulation de la calcémie, le taux de calcium circulant dans le sang, phénomène continu qui demande une réponse rapide, semble cohérente avec les résultats obtenus dans cette étude. En effet, il semble plus logique de résorber des zones plus faibles, donc plus facilement résorbables pour réguler la calcémie en continu. Cette régulation du calcium circulant dans le sang représente une majorité des cycles de remodelage observés sur les os trabéculaires (Clarke, 2008).

4.2 Comportement de résorption en fonction du temps

Le phénomène observé dans la première partie de ce chapitre est-il valable dans les temps précoces de culture cellulaire ? Les ostéoclastes montrent-ils toujours ce même comportement ciblant les zones aux propriétés mécaniques et structurelles plus faibles ? C'est ce à quoi cette partie va s'efforcer de répondre.

4.2.1 Description de l'expérience

Cette étude est le résultat de deux manipulations qui portaient chacune sur des échelles de temps différentes :

- Une première manipulation a été réalisée avec des cellules qui avaient été cultivées sur l'os pendant : 3, 8, 11 et 18 jours, et qui visait à étudier les comportements à long terme des ostéoclastes.
- Une deuxième manipulation a ensuite été effectuée sur des temps plus courts d'ensemencement des cellules sur l'os : 3h, 6h, 9h, 24h, et 72h (3 jours), qui permettait d'observer le comportement précoce des ostéoclastes.

Lors de ces deux manipulations, pour chaque temps, trois échantillons étaient utilisés. Ces échantillons provenaient du même donneur, un homme ne présentant pas de pathologie du métabolisme osseux. Aucun échantillon n'a été analysé par interférométrie. Deux donneurs sanguins différents ont permis de mener ces expériences. Leurs caractéristiques sont données dans les tableaux suivants (Tableau 4-5 et Tableau 4-6).

Donneurs	Age (ans)	Sexe	Groupe	Hématologie
Comportement long terme	64	M	O	48
Comportement précoce	34	F	O	41

Tableau 4-5 Caractéristiques des donneurs sanguins

Temps	Comportement Précoce					Comportement long terme			
	3 h	6h	9h	24h	72h	3j	8j	11j	18j
Comptage des cellules sur l'os	X	X	X	X	X				
MEB	X	X	X	X	X				
Nano-indentation	X	X	X	X					
Comptage des lacunes ostéocytaires	X	X	X	X	X				
Coloration au bleu de Tolluidine	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tableau 4-6 Résumé des techniques utilisées pour les deux études.

Évaluation de l'activité des cellules supplémentaires

Les cellules sont colorées avec un kit Acid Phosphatase Leukocyte kit (Sigma Aldrich, USA). Cette coloration qualifie l'activité et la maturité des ostéoclastes par la coloration d'une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules : la Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP). Cette enzyme est libérée lors de la résorption. Les cellules ayant plus de 3 noyaux (visibles dans le cytoplasme coloré) et étant colorées sont alors considérées comme des ostéoclastes.

La densité des cellules est également évaluée et calculée en cellules/mm² afin de vérifier la différenciation ostéoclastique.

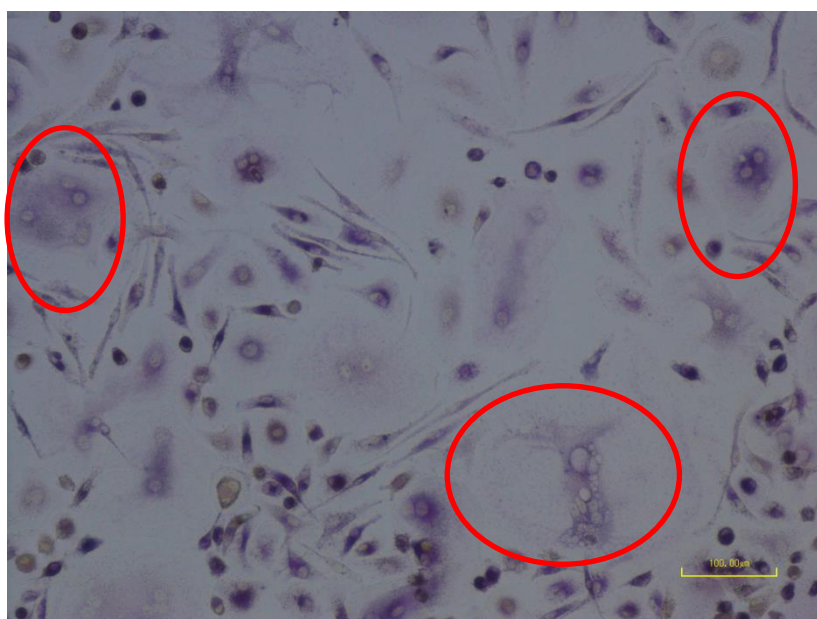


Figure 4-5 Ostéoclastes plurinucléés, après 3 jours d'ensemencement dont les cytoplasmes ayant exprimé l'enzyme TRAP sont colorés. Les précurseurs des ostéoclastes sont encore fusiformes (Echelle, 100µm)

4.2.2 Résultats de l'étude

4.2.2.1 Nombres d'ostéons résorbés en fonction du temps

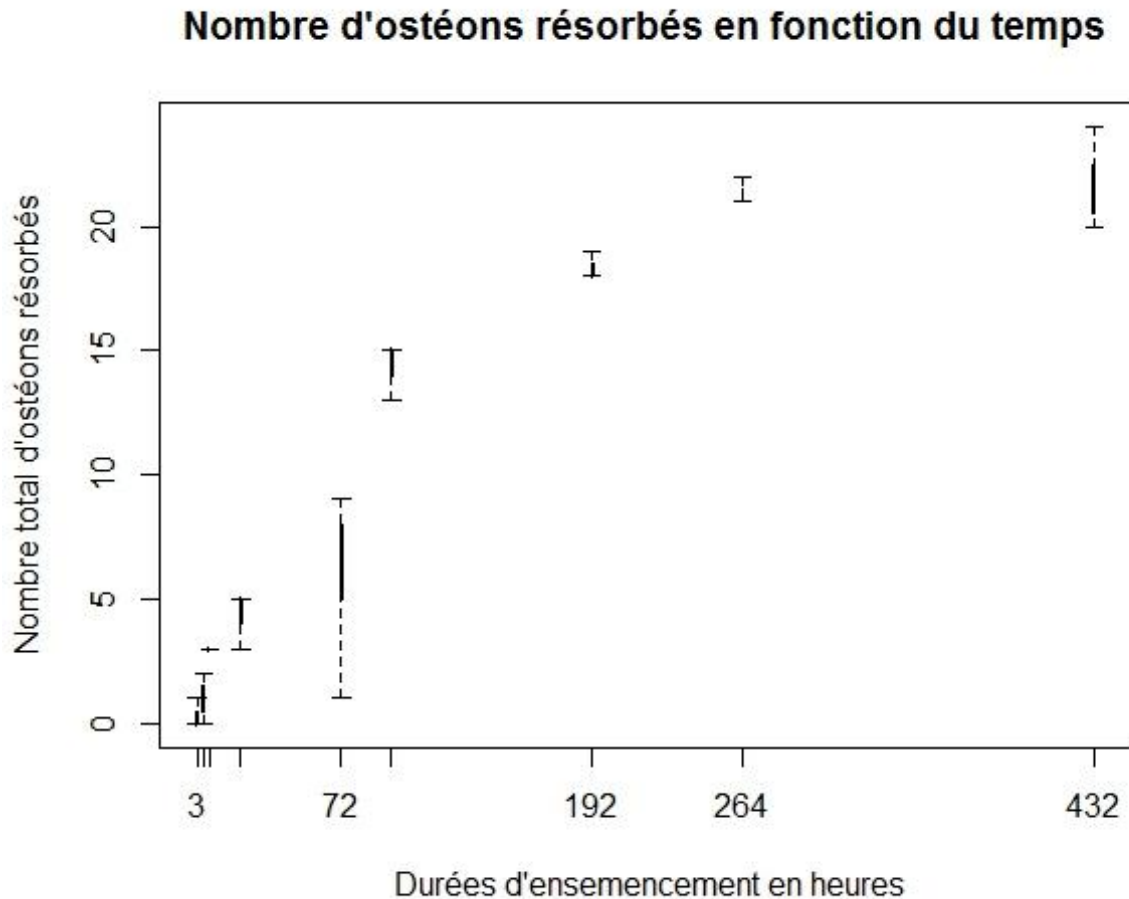


Figure 4-6 Nombre cumulé d'ostéons résorbés en fonction du temps d'ensemencement

Grâce aux images de coloration au bleu de Toluidine et en comptant le nombre d'ostéons résorbés, on remarque que plus le temps de l'expérience est important, plus le nombre d'ostéons résorbés augmente, comme montre la Figure 4-6. En combinant les résultats des deux expériences (*id est* jusqu'à 18 jours), on observe que le nombre d'ostéons résorbés atteint un plateau au bout de 264 heures (11 jours) et que dès 72 heures, des ostéons résorbés apparaissent en nombre suffisant. C'est pourquoi, dans la seconde manipulation le choix a été fait de ne laisser les cellules ensemencées que 72h, et de porter une plus grande attention au comportement précoce des ostéoclastes, afin de ne pas observer une saturation qui aurait pu perturber les résultats.

4.2.2.2 Comportement de résorption des ostéoclastes entre 0 et 24 heures

Maturité des ostéoclastes

Sur l'image ci-dessous (Figure4-7), les cellules ont été fixées puis colorées afin de mettre en évidence l'enzyme TRAP permettant de distinguer les noyaux dans le cytoplasme et de compter les cellules plurinucléées sur l'os humain.



Figure 4-7 Cellules différenciées et cultivées pendant 3 jours, colorées au TRAP. En rouge sont entourées les cellules ayant plus de trois noyaux, considérées comme des ostéoclastes matures sur l'os humain. Echelle= 100µm

Cette coloration des cellules, permet de qualifier la maturation des cellules ostéoclastiques. Comme représenté ci-dessous dans la Figure 4-8, la densité ostéoclastique augmente au cours du temps, permettant de mettre en évidence la plurinucléation progressive des ostéoclastes. Il semble que les cellules, une fois ensemencées, aient besoin de 6 heures pour fusionner à nouveau. On remarque également, après 72 heures (3 jours), que la densité en ostéoclastes augmente toujours sans sembler atteindre un plateau.

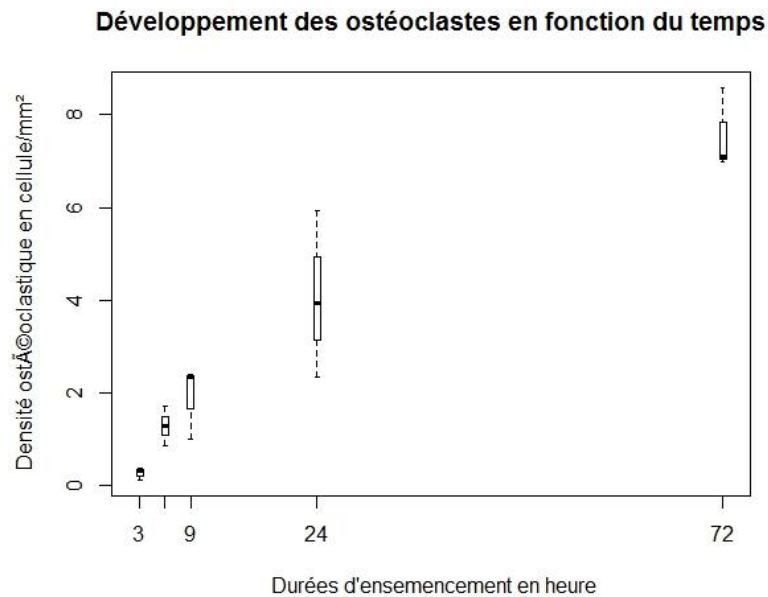


Figure 4-8 Développement des ostéoclastes en fonction du temps

Évolution de la capacité de résorption des ostéoclastes

Pour quantifier l'action des ostéoclastes en fonction du temps, le potentiel d'ostéon résorbé par cellule a été calculé. Afin d'estimer ce potentiel, le nombre d'ostéons résorbés a été divisé par la densité ostéoclastique à chacune des durées étudiées. Les résultats sont illustrés par la figure 4-9 ci-dessous.

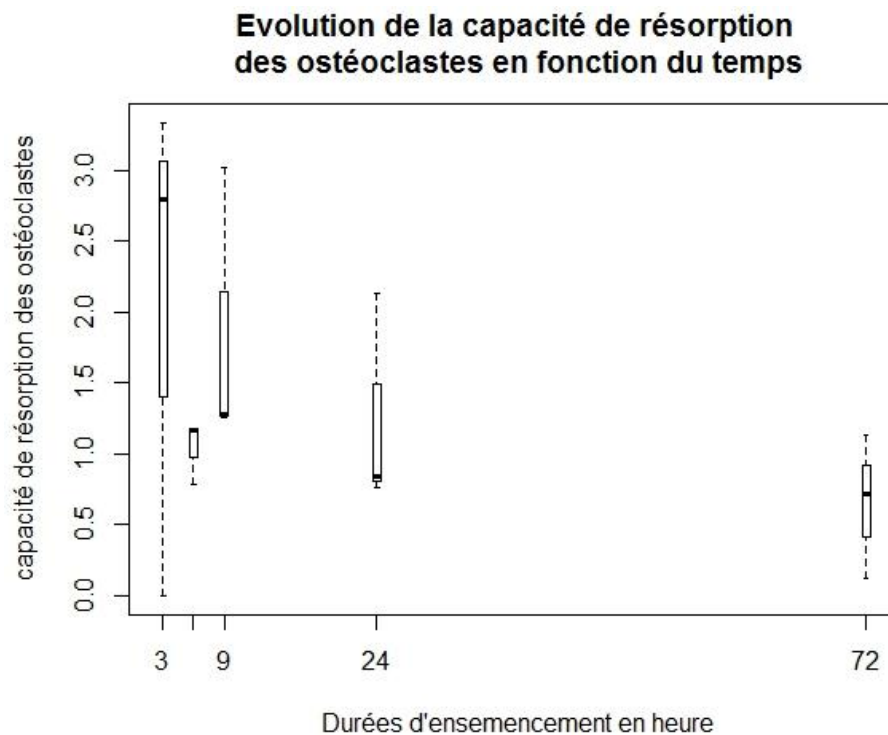


Figure 4-9 Capacité d'ostéons résorbés par ostéoclastes en fonction du temps

La capacité d'ostéons résorbés par ostéoclaste, augmente après une courte phase d'adaptation entre 0 et 3 heures, puis semble se stabiliser avec le temps. À partir de 24h, la capacité de résorption d'ostéons par ostéoclaste mature diminue. Soit cette capacité diminue dans l'absolu, soit les ostéoclastes résorbent les mêmes ostéons, mais plus profondément, et cessent de migrer, ce qui n'est pas observable avec les techniques utilisées dans ces manipulations.

4.2.2.3 Propriétés mécaniques des zones résorbées par des ostéoclastes entre 0 et 24 heures

Propriétés mécaniques des zones résorbées et non résorbées

Grâce à la coloration au bleu de Toluidine, on a pu distinguer les zones résorbées ou non résorbées sur les osensemencés entre 0 et 24h. De plus, avec la nano-indentation sur les échantillons lors de la seconde manipulation, il a été possible d'observer les propriétés mécaniques des zones résorbées ou non. Une différence significative aussi bien pour le module de Young ou la dureté entre ces régions a été trouvée (Figure 4-10). Par un test statistique de Mann Whitney, le module de Young des zones résorbées ($19,1 \pm 2,7$ GPa) est significativement plus faible que celui des zones non résorbées ($23,53 \pm 2,7$ GPa) ($p = 3,4 \cdot 10^{-7}$), ainsi que la dureté (résorbées $0,63 \pm 0,11$ GPa, non résorbées $0,80 \pm 0,13$ GPa) ($p = 8,3 \cdot 10^{-6}$).

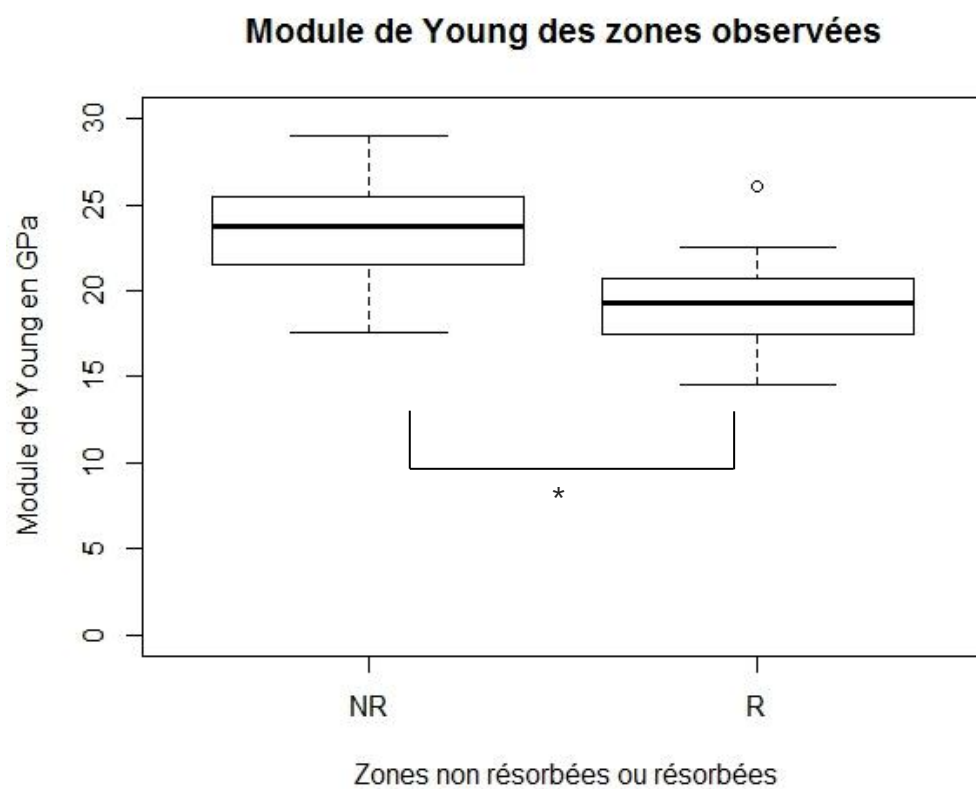


Figure 4-10 Modules de Young des zones résorbées et non résorbées (*, $p < 0,05$)

Évolution des propriétés mécaniques des zones résorbées

L'évolution du module de Young des zones résorbées en fonction du temps a aussi été analysée (voir Figure 4-11). Comme il n'était pas possible de distinguer sur chaque échantillon, à un temps donné, quelle zone avait été résorbée en dernier, tous les modules de Young des zones résorbées ont été notés à chaque temps de mesure afin d'observer la dispersion de ces modules au cours du temps.

Il n'a pas été trouvé de différence significative (Figure 4-11) en terme de module d'Young des ostéons résorbés entre les différents temps : 3h, pas de valeur de module de Young pour l'ostéon résorbé ; 6h, $19,9 \pm 0,8$ GPa ; 9h, $18,3 \pm 3,3$ GPa ; 24h, $22,2 \pm 1,5$ GPa (Test de Kruskal-Wallis, $p = 0,11$). Ceci permet de conclure que les ostéoclastes ne résorbent pas prioritairement les zones aux propriétés mécaniques les plus faibles, mais plutôt qu'ils résorbent les zones ayant des propriétés mécaniques inférieures à un certain seuil. Si les ostéoclastes résorbaient en priorité certaines zones, par exemple celles avec un module de Young plus bas, puis avec le temps des modules de plus en plus élevés, le graphe ferait état d'une dispersion de plus en plus élevée avec le temps.

Module de Young des zones observées en fonction du temps

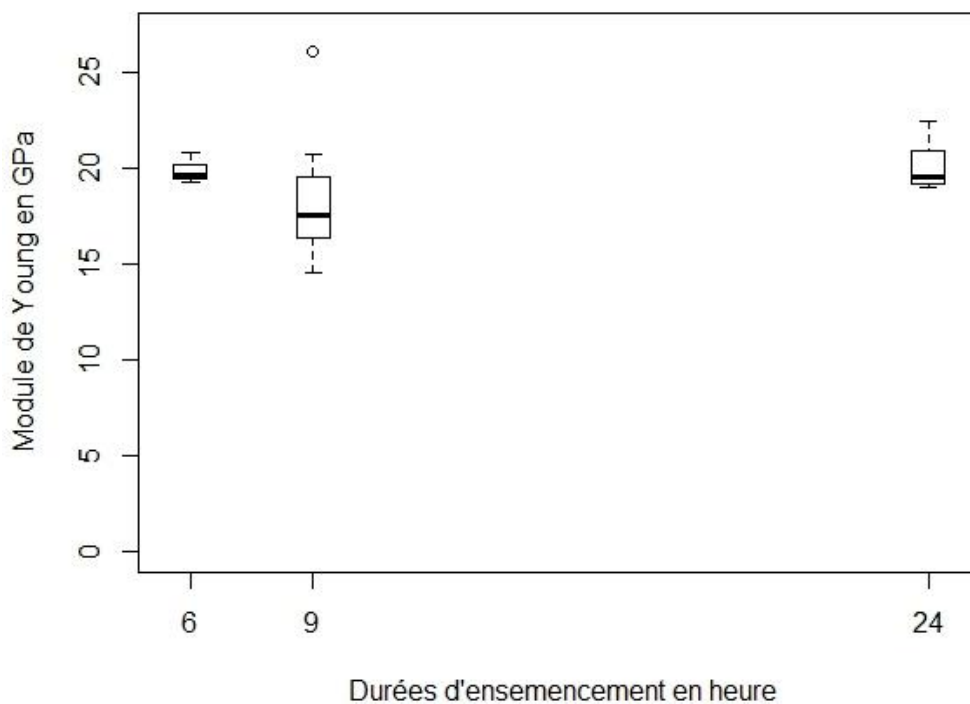


Figure 4-11 Évolution du module de Young des zones résorbées en fonction du temps d'ensemencement. Les zones résorbées à 3h et à 12h ne correspondaient pas à des zones testées auparavant, ce qui explique leur absence du graphique.

4.2.3 Discussion

4.2.3.1 Culture cellulaire

Maturité des ostéoclastes

La seule culture menée sur le long terme a été réalisée avec des ostéoclastes de la lignée RAW 264.7 (lignée cellulaire témoin de macrophage murin), ensemencées dans des boîtes de Petri (Akchurin et al., 2008). Cette étude a montré qu'après une phase de prolifération cellulaire d'une semaine, la densité ostéoclastique chutait pour à nouveau augmenter une semaine après. L'étude effectuée, pendant laquelle les cellules ont été comptées, se déroulait dans cette phase d'augmentation de la densité ostéoclastique (durée inférieure à 7 jours). Il a effectivement été observé, dans nos cultures des résultats similaires, c'est à dire une augmentation de la densité ostéoclastique. Les cellules semblaient donc avoir une activité normale. Si une différence d'activité a été observée, elle ne peut pas être imputée à la culture cellulaire.

Potentiel résorbant et maturité des ostéoclastes

En 1992, une étude utilisant des ostéoclastes de poulet a montré que plus les cellules étaient plurinuclées, plus leur action de résorption était efficace (Piper et al., 1992) avec cependant un potentiel résorbant par noyau diminué. En d'autres termes, plus un ostéoclaste serait mature et plus il y aurait de noyaux coordonnés au sein d'un même cytoplasme, entraînant un volume résorbé plus grand. Dans l'étude présente (de 0 à 72h), le nombre d'ostéons résorbés et de cellules plurinuclées augmente avec le temps, mais le ratio de ces deux quantités diminue avec le temps. Cela signifie que soit les ostéoclastes ne résorbent plus aussi efficacement au cours du temps, soit qu'ils creusent au même endroit et qu'ils ne peuvent plus migrer à la surface des os.

Le fait que seul le nombre d'ostéons résorbés soit mesuré et non la surface résorbée peut induire une erreur dans le calcul du potentiel de résorption des ostéoclastes. Cependant, le calcul exact de cette surface résorbée est impossible à faire sans images interférométriques précises avant et après l'ensemencement, ce qui n'a pas pu être réalisé pour cette étude. En ayant cette mesure, il serait possible de préciser le comportement des ostéoclastes.

4.2.3.2 Mécanisme proposé d'action des ostéoclastes lors de la résorption

Par mécanisme de résorption, il est entendu : facteurs régissant la résorption et son déroulement. Nous avons montré que les ostéoclastes ciblent majoritairement les zones aux propriétés mécaniques les plus faibles. Nous proposons le mécanisme de résorption suivant : les ostéoclastes sont paramétrés pour résorber tout l'os, mais il leur est plus facile de résorber en priorité les tissus les plus faibles.

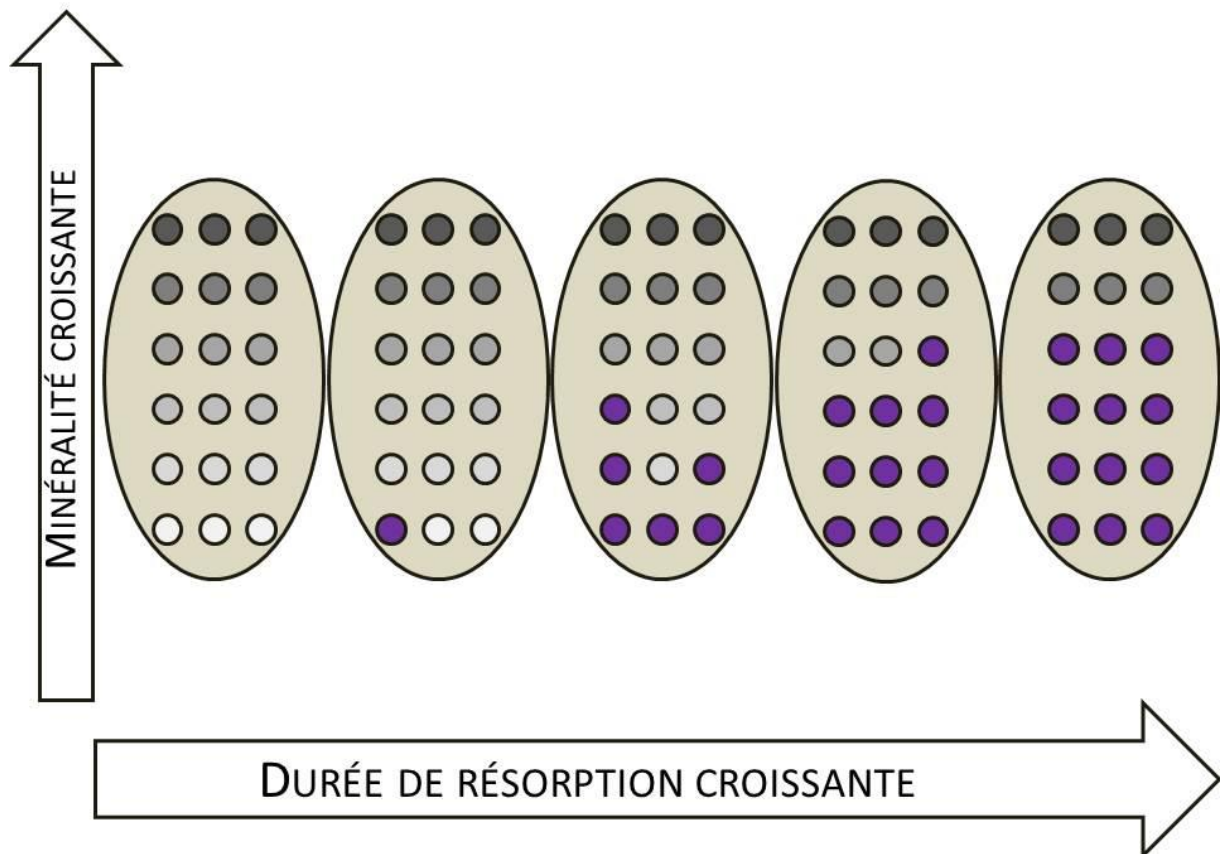


Figure 4-12 Sur le schéma ci-dessus, les petits ronds inclus dans le grand ovale sont des ostéons. Le grand oval représente le tissu cortical. Plus les ostéons sont foncés, plus ils sont minéralisés et plus leur module de Young est élevé. Les ostéons résorbés sont colorés en violet foncé. Les ostéoclastes résorbent en priorité les ostéons au module de Young le plus faible, le moins minéralisé, puis progressivement s'attaquent aux ostéons les plus minéralisés.

Ce mécanisme permet de tenir compte du temps : les ostéoclastes avec moins de noyaux résorbent plus facilement les zones aux propriétés mécaniques les plus faibles et le nombre de noyaux par cytoplasmes augmentant au cours du temps. Les cellules peuvent ainsi par la suite résorber des zones où l'os a des propriétés mécaniques meilleures. Cependant, cela nécessite plus d'énergie pour déminéraliser l'os et pour l'activité de l'enzyme responsable de la collagenolyse, ce qui entraîne une baisse de la capacité de résorption par ostéon des ostéoclastes.

Discussion du mécanisme

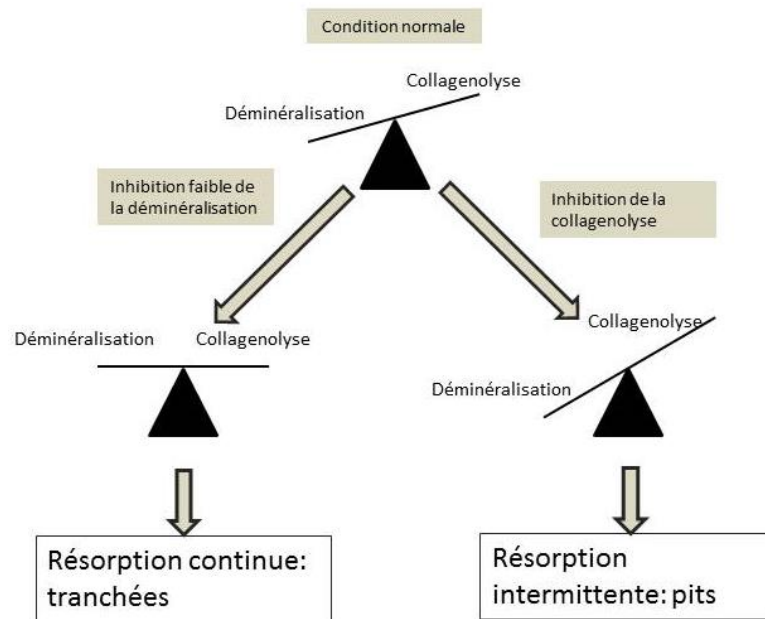


Figure 4-13 Différences de vitesse entre la collagenolyse et la déminéralisation et implication sur le comportement migratoire des ostéoclastes. Si déminéralisation et collagenolyse ont lieu à des vitesses équivalentes, l'ostéoclastes aura tendance à résorber en continu et en migrant. Si la vitesse de déminéralisation est très supérieure à celle de la collagenolyse alors l'ostéoclaste ne résorbera que par intermittence et aura tendance à plus migrer. (schéma d'après Søre (Søre, 2013))

D'un autre côté, il a été montré que les ostéoclastes sont sensibles à l'influence de la vitesse de déminéralisation par rapport à la vitesse de collagenolyse (Søre et al., 2013), ce qui entraîne une migration ou une polarisation influencées par ce rapport. Si la déminéralisation a une vitesse supérieure à celui de la collagenolyse, alors les ostéoclastes résorbent très localement, formant des petits puits appelé pits. Si les deux vitesses sont équivalentes, alors les ostéoclastes forment des tranchées (Figure 4-13).

Les propriétés mécaniques des ostéons sont dues à celles du matériau composite qu'est l'os, constitué majoritairement d'eau, d'hydroxyapatite et de collagène (Rho et al., 1998). Si les propriétés mécaniques changent, c'est qu'il y a eu une modification des matériaux constituant l'ostéon, ce qui doit entraîner une différence dans les taux de déminéralisation par rapport au taux de collagenolyse. Les zones qui ont été résorbées durant l'étude étaient celles qui avaient les propriétés mécaniques les plus faibles et celles qui étaient le moins minéralisées. Elles avaient donc un taux de déminéralisation plus rapide que la collagenolyse, ce qui, d'après Søre et al, se traduit par une motilité réduite et une résorption plus locale. En revanche, dans les zones

plus minéralisées, la vitesse de déminéralisation est plus faible, ce qui doit se traduire par une motilité plus grande des ostéoclastes. Ceux-ci migrent des zones d'os de meilleures qualités en résorbant moins, voire en ne résorbant pas l'ostéon. Le comportement observé est donc cohérent avec celui décrit par Sørge : une plus grande motilité dans les zones plus minéralisée et donc moins de résorption, tandis que les zones moins minéralisée sont plus résorbées.

4.2.4 Conclusion

Lors de cette étude *In-Vitro* de résorption de l'os humain par des ostéoclastes humains, il a été montré que les ostéoclastes fusionnent avec le temps, et qu'il y a une saturation du nombre d'ostéons résorbés au cours du temps même si ces ostéons sont très certainement résorbés de plus en plus profondément. Les zones résorbées ont des propriétés mécaniques plus faibles que les zones non résorbées et les ostéoclastes ont une capacité de résorption intrinsèque qui dépend du nombre de noyaux et une vitesse de résorption qui dépend du substrat.

Conclusion

Contrairement à ce qui a été montré précédemment, les ostéoclastes n'ont pas un comportement aléatoire *In-Vitro* lorsqu'ils sont ensemencés sur de l'os humain sain. Plus précisément, les cellules résorbent en priorité les zones aux propriétés mécaniques et chimiques les plus faibles. Ce comportement peut expliquer l'importance du remodelage osseux dans le rôle régulation de la calcémie par le tissu osseux.

Il est intéressant de remarquer que dans certaines pathologies, les propriétés du tissu sont altérées, comme pour l'ostéogénèse imparfaite qui présente des cristaux d'hydroxyapatite plus petits. L'étude de la résorption du tissu osseux pathologique serait intéressante afin de savoir si le comportement osteoclastique est similaire à celui des tissus osseux sains. Pour cela, une étude sur la résorption du tissu osseux d'enfants atteints d'ostéogénèse imparfaite fera l'objet du chapitre suivant.

5 La résorption du tissu osseux pathologique par les ostéoclastes

Résumé

L'ostéogénèse imparfaite se caractérise par des propriétés mécaniques amoindries (Imbert et al., 2015), une porosité élevée (Albert et al., 2014; Jones et al., 1999; Vardakastani et al., 2014) mais aussi par une minéralisation altérée (Blouin et al., 2017) ou des modifications du collagène entraînant une cristallinité réduite (Imbert et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que les os de patients OI étaient plus souvent soumis au remodelage osseux (Blouin et al., 2017; Jones et al., 1999; Rauch et al., 2000), ce qui était dû à un remodelage excessif, processus où les ostéoclastes jouent un rôle essentiel. Il a été montré au chapitre précédent, que les ostéoclastes humains ne résorbaient pas le tissu osseux humain aléatoirement, mais que lors des expériences de résorption, les zones osseuses aux propriétés mécaniques plus faibles étaient prioritairement résorbées. Ces zones présentent une cristallinité et un ratio de quantité de minéral sur la matrice collagénique plus faibles, ainsi qu'un taux de substitution en carbonate plus élevé. Ces caractéristiques correspondent aussi à celles des os des patients OI. Il a donc été intéressant d'étudier comment les ostéoclastes réagissaient lorsqu'ils étaient ensemencés sur du tissu osseux de patients souffrants d'ostéogénèse imparfaite.

Un échantillon de tissu osseux d'un patient non traité au bisphosphonate, ainsi que trois échantillons osseux de patients OI traités aux bisphosphonates ont pu être obtenus et testés. Sur les échantillons traités aux bisphosphonates, la résorption était inhibée. En revanche, sur l'échantillon OI non traité, la résorption n'étant plus inhibée, il a pu être observé que les ostéoclastes avaient le même comportement que précédemment, c'est-à-dire qu'ils ciblaient en priorité les zones aux propriétés mécaniques plus faibles. Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise mais non publiée.

Introduction

Nous avons montré dans un premier chapitre que l'ostéogenèse imparfaite, appellation regroupant des patients souffrant d'une fragilité accrue des os, faisait preuve d'une grande diversité génétique qui se traduit généralement par un ratio de minéral à la matrice collagénique plus faible que les contrôles sains, une cristallinité plus faible, mais un taux de substitution en carbonate plus élevé. En outre, les os des patients présentaient une porosité supérieure à la moyenne des os sains, phénomène appelé trabécularisation de l'os (Jones et al., 1999). Cette trabécularisation est due à un taux de remodelage trop élevé (Baron et al., 1983; Brunetti et al., 2016; Kalajic et al., 2002; Li et al., 2010; Zhang et al., 2007), ce qui implique que le comportement des cellules osseuses est affecté par la pathologie. Au chapitre précédent, nous avons développé un protocole d'étude du comportement des ostéoclastes. Il a été montré que les zones résorbées présentaient un module de Young plus faible ainsi qu'une cristallinité plus faible que les zones non résorbées. Le tissu osseux des patients OI se caractérise par un module de Young généralement plus faible que celui des échantillons d'os sains et une cristallinité plus faible (Imbert et al., 2014). La question se pose alors de savoir quel comportement les ostéoclastes adoptent lorsqu'ils sont ensemencés sur des échantillons osseux de patients atteints d'ostéogenèse imparfaite.

Par ailleurs, l'OI étant une maladie génétique, elle ne se traite que de manière symptomatique et non étiologique. Les traitements médicamenteux les plus prescrits, en dehors des traitements des fractures comme des antalgiques, sont des médicaments qui diminuent la résorption (Trejo and Rauch, 2016). Ces médicaments, majoritairement des bisphosphonates, agissent en inhibant la capacité de résorption des ostéoclastes (Russell et al., 2008), mais réduisent aussi le nombre de précurseurs d'ostéoclastes circulant dans le sang (Gossiel et al., 2016) et régulent le couplage ostéoclaste ostéoblaste (Fonseca, 2008; Henriksen et al., 2014). 70% des patients OI sont traités de manière préventive aux bisphosphonates (Patel et al., 2015). Chez les patients diagnostiqués avec un type clinique plus élevé, de type III par exemple, ce pourcentage peut même monter à 88 %. Les échantillons qui ont été prélevés pour cette thèse sont majoritairement des échantillons de type clinique III, ces patients étant plus sévèrement atteints que les autres types cliniques. La

majorité des échantillons a donc été traitée aux bisphosphonates. Seul un échantillon n'a pas été traité. C'est sur lui qu'a porté le case report soumis ci-après.

L'intérêt que l'on peut porter à une étude de la résorption du tissu osseux OI est donc double : observer la résorption du tissu osseux OI traité au bisphosphonates, et observer si les ostéoclastes ont le même comportement sur les os OI que sur les os contrôles sains. Ces deux aspects sont traités dans ce chapitre : le comportement d'ostéoclastes ensemençés sur des os de patients OI traités aux bisphosphonates et le comportement d'ostéoclastes ensemençés sur des os de patients OI non traités aux bisphosphonates.

Déroulé des manipulations

Ces essais de résorptions du tissu osseux pathologiques, sur les os de patients OI traités ou non aux BP (Respectivement OIBP, OI-NT), ont eu lieu en une manipulation. Afin de comparer ces résultats à ceux précédemment trouvés au chapitre 4, des échantillons d'os d'enfant non atteints de pathologie du métabolisme osseux (groupe CT) ont aussi été testés en résorption. Les essais de résorption ont été effectués sur une période de 72h. Pour chaque donneur, deux échantillons ont été préparés. Les tissus osseux sont prélevés à l'hôpital Necker à Paris (Paris, France) puis préparés selon le protocole décrit au chapitre précédent (Chapitre 4).

5.1 Human osteoclast activity in a patient with osteogenesis imperfecta (OI) type III is governed by the same mechanical properties and mineral heterogeneities as in healthy patients.

5.1.1 Abstract

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare disease caused by mutations in collagen coding genes; these mutations are observed in 90% of the cases. The primary feature of the disease is extreme fragility of the bone but also a trabecularization of the bone, which is thought to be caused by increased remodelling. At a microscopic scale, the density and quality of the mineral content is altered by the disease. In the present study, the bone resorption due to osteoclast activity of a severe OI type III patient, OI-NT, was analysed. Particular attention was paid to the resorption pattern in the OI pathology, which was recently observed not to be random in adult bone, but rather to depend on the location of mineralization and the mechanical properties inside the Haversian microstructure.

Strong modifications of microscopic properties due to OI disease do not change the resorption potency of the bone by osteoclasts, and the observed resorption pattern was similar to that observed in normal adults – that lower mechanical zones were resorbed.

5.1.2 Introduction

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare disease, with the primary feature being an increased fragility of the bone. In 90% of the case, a mutation of the collagen I coding gene (COL1 A1 and COL1 A2) is responsible for the disorder. OI mutations have consequences on the trimeric collagen protein structure and quantity that differs from that found in healthy patients. An associated modification of the quality and quantity of mineralization is observed (Vanleene et al., 2012) which leads to weaker mechanical properties at the microscopic scale (Imbert et al., 2014, 2015; Vanleene

et al., 2012). At the macroscopic scale, an increased intracortical porosity (Albert et al., 2014; Jones et al., 1999; Vardakastani et al., 2014), consisting of large pores within the cortical bone, was due to an excessive remodelling rate (Jones et al., 1999; Rauch et al., 2002). The subsequent microarchitecture modifications, involving high osteoclast activity, increased the fragility of bone. According to a classification established in 1979 by Sillence on the basis of clinical, radiological, and heredity characteristics, the phenotypes are classified into four types. This classification is still evolving to take into account all the genetic mutations found to cause OI (Arundel and Bishop, 2010; Rauch and Glorieux, 2004). The present study was focused on patients with OI type III, the most severe, non-lethal form, characterized by a progressively deforming short stature. The golden standard for the treatment of severe OI is both surgery and bisphosphonate (BP) administration (Trejo and Rauch, 2016) which aim to inhibit the resorption potency of osteoclasts (Russell et al., 2008).

In healthy patients, osteoclasts have a precise, targeting resorption process that is based on the mineralization and mechanical parameters found within adult bones (Pernelle et al., 2017). Osteons with a lower Young's modulus and hardness, as well as lower mineralization, were resorbed while others with higher mechanical properties remained intact. The question is then to determine if that pattern is disturbed in OI bone as osteoclasts are known to have a major role in the disease.

Nevertheless obtaining samples from a patient that has never been treated with anti-resorptive drugs is difficult as the golden standard for the treatment of severe OI is surgery and bisphosphonates (BP) administration (Patel et al., 2015; Trejo and Rauch, 2016) which aims to inhibit the resorption potency of osteoclasts (Dominguez et al., 2011; Gossiel et al., 2016; Russell et al., 2008).

Here is presented an OI type III patient, who never received BP, and the resorption pattern of osteoclasts seeded on its surface is compared to those of three healthy donors and three OI type III who received BP. To date and to the best of our knowledge, this report presents the first case description of a resorption test on OI bone by human osteoclasts. Previous studies on OI have already been published with some patients who did not received BP administration (Albert et al., 2013, 2014; Fratzl-Zelman et al., 2016a; Rauch et al., 2005; Weber et al., 2006), but the effect of the disease on resorption potency was never studied.

5.1.3 Materials and methods

5.1.3.1 Bone samples preparation and characterization

A nine-year-old patient suffering from severe osteogenesis imperfecta type III, never treated with any bisphosphonate treatment (designated in this paper as OI-NT), was admitted for a valgus osteotomy of the right femur, a routine surgery at Necker Hospitals for children, Paris, France. During the surgery the discarded bone sample was kept and stored at -20°C until testing was done. Three bone samples from healthy control (CT group) and three from OI Type III treated with BP (OI-BP group) were collected as control. The study was conducted according to the Institutional Review Board recommendations (IRB 00003835 2010/28NI).

Samples preparation and imaging and mechanical tests were performed using a protocol described in previous published paper (Imbert et al., 2014, 2015; Pernelle et al., 2017). Bones were sliced (1.5 mm of thickness) under constant water irrigation using a diamond saw (Secotom, Struers), with their surface perpendicular to the main direction of the osteons. They were then polished with a silice coated disc (grain size 1200, LaboPol-1, Struers), then with a diamanted solution of 1 μm (Struers). For each donor, two samples were made from the collected bones.

Following the cut of bones, X-ray computed tomography was performed (Phoenix Nanotom, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany; resolution of 8 μm) to visualize the bone microarchitecture. To calibrate the tissue mineral density, two phantoms of 0,25 and 0,75 $\text{gHA}\cdot\text{cm}^{-3}$ were used. All samples were analysed with CTan (Skyscan, Bruker®, Kontich, Belgium) to determine bone porosity and tissue mineral density (TMD).

Microscopic Young's modulus and hardness were measured through nanoindentation (NI) tests prior to cell culture with a Berkovitch tip (Agilent Nanoindenter G200, ScienTec, Les Ulis, France)(Imbert et al., 2014; Pernelle et al., 2017). A constant strain rate of 0.05 s^{-1} with a maximum depth of 2000 nm was imposed with a continuous stiffness measurement method. The mechanical properties were measured with the data from 500 to 1500 nm in depth with 90 points tested per sample (Hoc et al., 2006).

5.1.3.2 *Osteoclast culture on bone samples*

The culture, seeding and analysis of the resorption assay was made accordingly to a protocol previously published (Pernelle et al., 2017). Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the buffy coats of healthy donors (EFS, Lyon, France). Cells were selected with centrifugation through a chemical gradient (Ficoll, Eurobio®, and Percoll, GE Healthcare®), then depleted with a murine monoclonal antibody cocktail against human CD19, CD3, CD56 and CD235a (Immunotech, Beckman-Coulter®). The collected monocytes were expanded and differentiated in microwells with α -MEM (Life Technologies®) supplemented with 10% bovine serum (FBS, Pan biotech Dutscher®), L-glutamine 2 mM (Gibco®), penicillin 100U/mL (Gibco®), macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) (PeproTech®). The cells were cultured for six days (*Day 1 to 3*: M-CSF = 50 ng/mL and RANKL = 30 ng/mL; *Day 4 to 6*: M-CSF = 25 ng/mL and RANKL = 100 ng/mL) at 37°C, 5% CO₂ and in a humid atmosphere. Adherent osteoclasts were detached with Accutase (Sigma-Aldrich®, USA) and seeded on bone slices at a density of 3.12×10^5 cells/cm² with α -MEM supplemented with M-CSF (25 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL).

After 72 hours, cultures were stopped and cells were fixed with paraformaldehyde (PFA). The samples were then stored in PBS at 4°C before being analysed.

Cells were stained with an acid phosphatase leukocyte kit to detect tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) (Sigma-Aldrich®, USA). Cells with a purple cytoplasm and more than three nuclei were considered as mature osteoclasts.

Once the cells were removed, bones were coloured with toluidine blue to localize the resorption areas. The coloration is associated with raking light and enables to differentiate between the unresorbed and resorbed areas.

5.1.4 Results

Groups	Age	BMI	Sex	Sillence OI Type	BP history	Anatomic site	Porosity (%)	TMD (gHA.cm ⁻³)	Young modulus (GPa)	Hardness (GPa)
OI never treated with BP: OI-NT										
OI-NT	10	20,8	M	Type III	No	Femur	29,9	1,20	17,75	0,61
Healthy controls :CT										
C1	14	31	M	NV	No	Hip	8,4	0,98	20,00	0,66
C2	13	19,2	F	NV	No	Tibia	4,9	1,08	19,10	0,56
C3	17	17,4	M	NV	No	Tibia	8,8	1,06	20,13	0,69
Mean ± SD C									$19,74 \pm 0,46$	$0,64 \pm 0,05$
OI treated with BP :OIBP										
OIBP_1	4	22,7	M	Type III	Yes	Femur	47,6	1,20	16,00	0,56
OIBP_2	14	27,5	M	Type III	Yes	Tibia	29,4	1,13	18,10	0,70
OIBP_3	17	0	M	Type III	Yes	Tibia	11,4	1,09	17,75	0,60
Mean ± SD OIBP									$17,28 \pm 0,92$	$0,62 \pm 0,06$

Tableau 5-1 Mechanical and structural properties of the three groups.

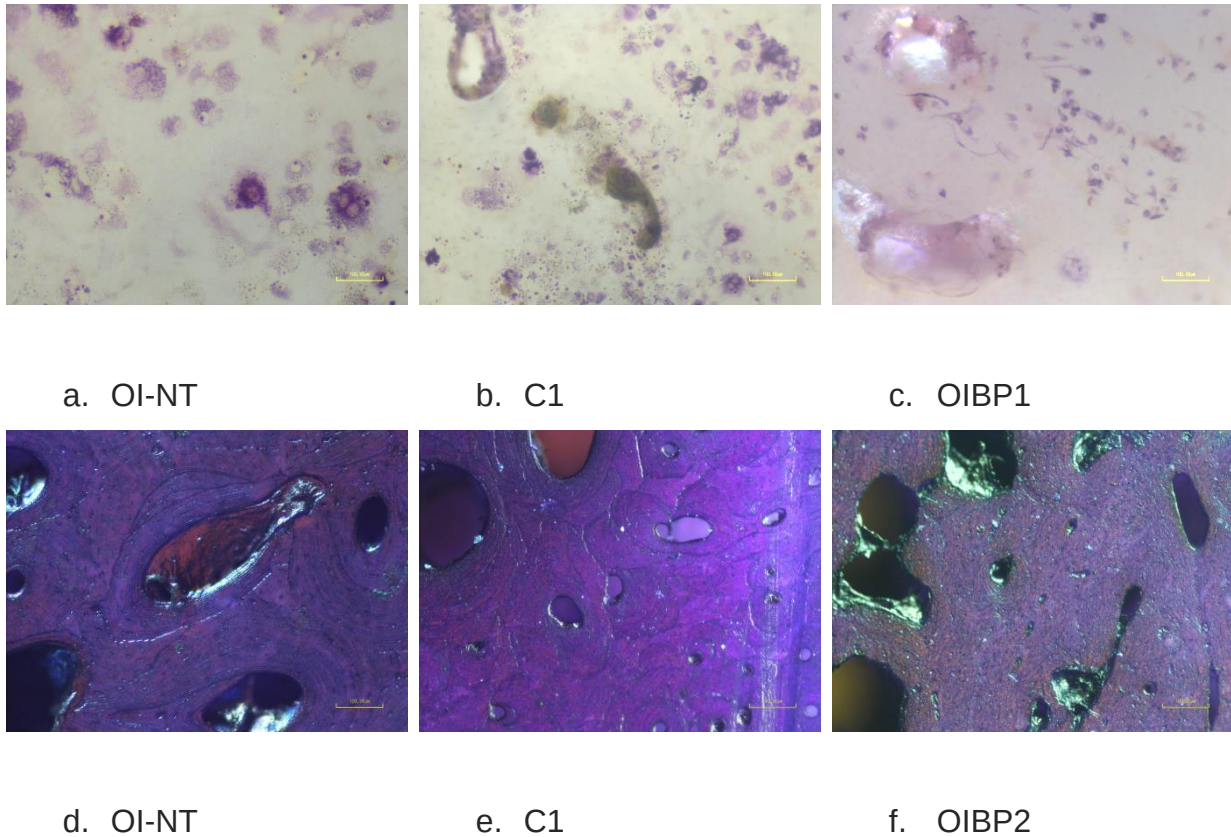


Figure 5-1 a, b, c: Pictures taken of the cells colored in purple with TRAP staining. In the cytoplasm of the cells, the number of nucleus can be counted. Scale bar = 100µm
d, e, f: Bone colored with Toluidine blue. Darker zones with a white border are resorbed zone Scale bar = 200µm.

5.1.4.1 *OI-NT mechanical, structural, and pattern resorption compared to CT*

In term of structural properties, OI-NT bone had a higher porosity than CT bone (29.9% vs $7.4 \pm 1.8\%$). OI-NT had also a higher tissue mineral density than CT (1.20 gHA.cm^{-3} vs $1.04 \pm 0.04 \text{ gHA.cm}^{-3}$). The Young modulus and hardness of OI-NT were lower than those of CT (respectively 17.75 GPa and 0.61 GPa vs $19.74 \pm 0.46 \text{ GPa}$ and $0.64 \pm 0.05 \text{ GPa}$).

The cells cultured were plurinucleated and did not exhibit any delay to develop when seeded on OI-NT and CT bones, as it can be seen on Figure 5-1.a and b.

As it has been recently proven, human osteoclasts seeded on human bone tend to resorb specific zones (Pernelle et al., 2017) which have lower mechanical properties in term of Young modulus, hardness, and different chemical properties than unresorbed zones. For CT and OI-NT bones, toluidine blue coloration revealed this specific resorption pattern (Figure 5-1 d and e). Some zones, and more specifically, some osteons are resorbed while some others remained intact.

When the mechanical values of the bones were compared with the resorption pattern, the same non-random behaviour appeared: lower Young modulus and hardness in the resorbed zones compared to the unresorbed zones: for OI-NT the mean value of the Young modulus and hardness in the unresorbed area were 19,4 GPa and 0.70 GPa versus 17,2GPa and 0.52 GPa in the resorbed zones (Mann-Whitney Wilcoxon test, $p = 1.10^{-3}$ and $p = 2.10^{-6}$). Similarly for CT, the Young modulus and hardness were 21.2 GPa and 0.68 GPa in unresorbed zones, significantly higher than 19.2 GPa and 0.59 GPa in resorbed aereas (Mann-Whitney Wilcoxon test, $p = 6.4.10^{-9}$ and $p = 1.5 10^{-7}$).

5.1.4.2 OI-NT mechanical, structural, and pattern resorption compared to OIBP

In term of structural properties, OI-NT bone had a similar porosity to OIBP group (29.9% vs $29.5 \pm 14.8\%$), which was consistent with previous observations made with OI treated with BP (Imbert et al., 2015). OI-NT had a tissue mineral density similar to OIBP (1.20 gHA.cm^{-3} vs $1.14 \pm 0.05 \text{ gHA.cm}^{-3}$). The Young modulus and hardness of OI-NT were also similar to those of OIBP (respectively 17.75 GPa and 0.61 GPa vs $17.82 \pm 0.92 \text{ GPa}$ and $0.62 \pm 0.06 \text{ GPa}$) which was consistent with previous studies (Fan et al., 2006; Imbert et al., 2014).

In term of cells maturity, cells seeded on OIBP1 had a less mature states compared to OI-NT, with more fusiform precursors and less pluri-nucleated cells (Figure 5-1.c).

In term of resorption pattern, contrary to OINT, OIBP did not exhibit specific resorption pattern (Figure 5-1 d and f) which was consistent as BP inhibits osteoclasts resorption (Gossiel et al., 2016; Weber et al., 2006).

5.1.5 Discussion

The bone intracortical porosity of the patient studied was very high (~30%) compared to that of healthy children (~7%) (Imbert et al., 2015). The mechanism of trabecularization of bone microarchitecture caused by an excessive remodelling rate operated with a net disequilibrium in favour of resorption and not bone formation (Jones et al., 1999; Rauch et al., 2002). This increased porosity compared to healthy bones, has been linked to bone fragility as the large pores within the cortical bone tend to concentrate the stress (Albert et al., 2014; Carriero et al., 2014; Vardakastani et al., 2014). In the same way, the tissue mineral density is higher for the OI-NT patient than for healthy patients (Boyde et al., 1999; Roschger et al., 2008b;

Vanleene et al., 2012). In terms of mechanical properties, the microscopic Young's modulus and hardness are lower for the patient studied than those of healthy patients (healthy adult patient: ~21.0 GPa and ~0.73 GPa (Pernelle et al., 2017)) and close to values obtained for children OI in other studies (17.6 GPa, and ~0.65 GPa (Imbert et al., 2014)); 17.5 GPa and ~0.66 GPa (Albert et al., 2013)). The incorporation of BP into the bone does not adversely affect the mechanical properties of the OI bone (Weber et al., 2006). Therefore, the bone micro-architectural and mechanical characteristics of the patient analysed in the present study are representative of OI pathology trends given in the literature (Albert et al., 2013; Fan et al., 2006; Imbert et al., 2014).

Healthy human osteoclasts seeded on cortical human adult bone did resorb in specific zones (Pernelle et al., 2017) with a low Young's modulus associated with a low quality of mineral. OI-NT have a higher mineral density, but significantly lower Young's modulus suggesting that OI-NT have mineral of poor quality, which is confirmed in the literature by Raman spectroscopy measurements (Imbert et al., 2014). In this context, all the points of OI-NT microstructure are weaker compared to a healthy microstructure so a more homogenous resorption of OI-NT could then have been expected. By contrast, for the patient bones, toluidine blue coloration revealed that a portion of osteons were specifically resorbed, while others remained intact (Figure 5-1d).

When the mechanical values of the bones were compared with the resorption pattern, as in healthy adults bone (Pernelle et al., 2017), the osteons with a lower Young's modulus were first targeted. Moreover, the relative difference between the Young's modulus of the resorbed zones and the unresorbed zones was found to be in the same range: -12% for OI-NT and -15% for adult patients (Pernelle et al., 2017). Thus, the pattern of resorption by osteoclasts is not only the resorption of the osteons with lower mechanical properties under a specific threshold, but the resorption of osteons with relatively lower mechanical properties inside the microstructure. It seems that regardless of the mineral quality or local mechanical properties of the whole bone, the osteoclasts targeted the weakness point inside the cortical microstructure. This result is in agreement with osteoclast resorption behaviour observed on different substrates with a resorption rate inversely proportional to the density (Jones et al., 1995)

It is a highly interesting case to have a severe OI patient who was not treated with BP. In fact, most of the samples available for research come from samples extracted during surgeries, but, often the donors who undergo surgery suffer from severe OI and have been treated with BP to increase bone mass. Thus, studying the influence of the disease on the resorption pattern of the osteoclast on the bone was not possible, due to the inhibition of the resorption potency of osteoclast by BP. To date and to our knowledge, it is the first case description of a resorption test on OI bone by human osteoclasts. Some previous studies on OI have already been published with some patients who did not received BP (Albert et al., 2013, 2014; Fratzl-Zelman et al., 2016a; Grabner et al., 2001; Letocha et al., 2005; Rauch et al., 2005; Vardakastani et al., 2014; Weber et al., 2006), but the effect of the disease on resorption potency was never studied.

5.1.6 Conclusion

For the first time, the response of osteoclasts on bone samples from a patient suffering from severe OI was measured. On OI-NT bone, the resorption pattern was similar to that of healthy adults bone (Pernelle et al., 2017), despite exhibiting generally lower mechanical properties. On OIBP, BP efficiently inhibits bone resorption, even if it is only with the remnants of the treatment which were incorporated into the bone.

5.2 Discussion et conclusion

Nous avons pu montrer dans ce chapitre, certes sur un seul donneur osseux, que le comportement de résorption d'ostéoclastes humains sains ensemencés sur du tissu osseux OI était qualitativement similaire à celui d'ostéoclastes ensemencés sur du tissu sain. Les ostéons aux modules de Young et à la dureté les plus faibles étaient résorbés en priorité comme cela a été observé sur les os d'adultes sains ou sur les os des enfants sains. Il paraît donc logique de penser que les ostéons résorbés des tissus osseux OI présentent les mêmes caractéristiques que les ostéons résorbés des tissus osseux sains comparés aux ostéons non résorbés. Cela se traduirait pour les ostéons résorbés en termes de cristallinité, de module de Young et de dureté plus faibles, et de taux de substitution en carbonate plus élevé mais aussi de MMR (mineral to matrix ratio) plus faible. Or le tissu osseux des patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite se caractérise par cette cristallinité plus faible, ce taux de substitution en carbonate plus élevé (voir chapitre 3), un module de Young et une dureté plus faibles (Imbert et al., 2014), mais en revanche un ratio MMR plus élevé. Il est donc intéressant de constater que la résorption a respecté le même schéma de résorption sur l'os OI que sur les os sains, malgré un MMR supérieur. Par ailleurs, cette résorption doit être plus généralisée, les ostéoclastes résorbant plus facilement les zones aux modules de Young et à la dureté plus faibles (Pernelle et al., 2017) plus présentes dans le tissu OI. Ceci pourrait expliquer en partie la plus grande porosité du tissu OI (Jones et al., 1999), du fait d'un remodelage plus actif qui remplace plus rapidement l'os de module de Young et de dureté plus faibles plus présents dans le tissu osseux OI.

Conclusion

Apport de la spectroscopie Raman à l'étude de l'ostéogénèse imparfaite

Durant cette thèse, nous avons pu étudier le tissu osseux de son organisation nanoscopique à son fonctionnement cellulaire. Bien sûr, cette thèse ne présente qu'un aspect des caractéristiques osseuses, mais s'inscrit cependant dans une continuité de développement des techniques d'étude du tissu osseux pour mieux comprendre sa genèse, son fonctionnement et ses pathologies comme l'ostéogénèse imparfaite qui a fait l'objet de ce travail de recherche.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons montré que la spectroscopie Raman apportait de nouveaux éléments sur la nano-structure osseuse. Cette technique est complémentaire à la nanoindentation, à la tomographie à rayon X et à la microscopie électronique. Qui plus est, comme les techniques citées ci-avant, elle ne nécessite aucune préparation particulière, à la différence de la transformée de Fourier à infra-rouge qui apporte des informations similaires en terme d'organisation de la nanostructure, mais qui requiert une déshydratation des tissus.

Relation entre génétique et structure osseuse OI

Appliquée à l'étude du tissu osseux de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite, cette technique de caractérisation des tissus osseux a permis de différencier des échantillons osseux touchés par des mutations différentes, ou tout du moins de les classer en groupes de patients distincts.

Le groupe avec les patients souffrant d'OI types cliniques III, VII et VIII est un groupe homogène en termes de module de Young, de dureté, de ratio de ces deux paramètres, de porosité, de TMD, de ratio MMR, de taux de substitution en carbonate, de cristallinité ou de maturité du collagène. Comparé aux échantillons contrôle, ces types d'OI présentent une porosité, un ratio MMR, une maturité du collagène significativement supérieurs, et une cristallinité et un ratio module de Young sur dureté significativement inférieurs. La TMD a tendance à être supérieure,

ainsi que la dureté, tandis que le module de Young, et le taux de substitution en carbonate sont inférieurs aux valeurs des échantillons contrôle.

Le patient souffrant d'OI type clinique VI se caractérise majoritairement par une hyper-minéralisation due à une sous-production de collagène, avec un MMR supérieur à celui des échantillons contrôle mais aussi à celui des échantillons OI de type III, VII ou VIII.

Le patient souffrant d'OI type clinique XI se caractérise par un taux de substitution en carbonate supérieur à celui des échantillons contrôle mais aussi à celui des échantillons OI de type III, VII ou VIII.

Phénomène de résorption sur les tissus osseux

L'autre aspect de cette thèse portait sur l'étude du métabolisme osseux, et plus particulièrement sur l'étude de la résorption, étape clé dans le remodelage osseux.

Nous avons pu montrer que le comportement de résorption du tissu osseux humain par des ostéoclastes humains n'était pas aléatoire, que ce soit dans le cas de tissu adulte sain ou dans le cas de tissu de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite. Les ostéoclastes avaient tendance à résorber en priorité les zones aux propriétés mécaniques et à la cristallinité plus faibles, zones correspondant aux les ostéons les plus jeunes du tissu osseux.

Ces expériences ont permis de montrer que le remodelage osseux n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît au premier abord, et surtout, que ce phénomène est important dans la régulation de la calcémie. En résorbant les zones les moins minéralisées, plus faciles et rapides à résorber en priorité, le remodelage permet une réponse rapide à un besoin en calcium dans le sang.

Résorption sur du tissu osseux OI

Il a aussi été intéressant d'observer la résorption du tissu osseux pathologique, et plus particulièrement encore une fois celle du tissu osseux de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite.

Le tissu osseux de patients qui avaient reçu un traitement aux bisphosphonates n'a pas été résorbé, ce qui confirme l'effet d'inhibition de la résorption des ostéoclastes par ce traitement.

En revanche, le tissu osseux non traité aux bisphosphonates présentait le même mécanisme de résorption que le tissu osseux sain : les zones aux propriétés mécaniques les plus faibles étaient résorbées en priorité. Ce mécanisme n'était donc qualitativement pas perturbé par la pathologie. Qui plus est, ce mécanisme permet d'expliquer la plus grande porosité du tissu osseux OI par une résorption facilitée du fait des faibles module de Young et dureté des tissus. Cette résorption accélérée, associée à un remodelage excessif, est une des composantes de la fragilité osseuse des patients OI.

Perspectives

À l'avenir, ces protocoles de caractérisation des tissus osseux pourront être adaptés à l'étude d'autres pathologies du métabolisme osseux pour en voir et comprendre leurs effets sur la nanostructure du tissu osseux. Ainsi, une des applications possibles peut être l'étude de l'ostéoporose, de l'arthrose, ou bien le suivi de traitements et leurs effets sur les os.

Par ailleurs, du point de vue de l'ostéogénèse imparfaite, ces techniques pourront être appliquées à des tissus minéralisés autres que les os : En effet, la maladie étant majoritairement due à une malformation ou à un défaut dans la gestion du collagène, d'autres tissus minéralisés, tels que les dents, sont souvent atteints. Ces tissus sont plus faciles à prélever et il sera alors facile de relier génétique et propriétés mécaniques et structurelles. Par exemple, avec un nombre suffisant d'échantillons, il pourrait être possible de corréler les propriétés mécaniques et structurelles des échantillons OI de type génétique III en fonction des substitutions effectuées dans les hélices de tropocollagène. Une meilleure connaissance des différentes mutations, et

surtout, de leurs impacts sur le métabolisme osseux, permettra de mieux traiter ces maladies.

Par ailleurs, comprendre le fonctionnement des ostéoclastes facilitera l'étude d'autres maladies et de la réaction de cellules humaines saines confrontées à d'autres anomalies du métabolisme osseux. En outre, il serait intéressant de quantifier plus précisément leur action, en évaluant le volume résorbé sur des os de patients OI.

Enfin, utiliser cette technique d'observation du processus de résorption des ostéoclastes humains serait intéressant pour l'étude de l'influence des stimuli mécaniques sur les ostéoclastes. En effet, la résorption des ostéoclastes peut-elle être modifiée par des vibrations imitant ainsi la marche, des effets de pointe, qui simuleraient les micro-fissures ?

L'os n'a pas fini de nous faire des surprises...

Références

- Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., and Dequeker, J. (1998). Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139, 663–670.
- Akchurin, T., Aissiou, T., Kemeny, N., Prosk, E., and Komarova, S.V. (2008). Complex Dynamics of Osteoclast Formation and Death in Long-Term Cultures. *PLoS One*.
- Akkus, O., Adar, F., and Schaffler, M.B. (2004). Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone* 34, 443–453.
- Albert, C., Jameson, J., Toth, J.M., Smith, P., and Harris, G. (2013). Bone properties by nanoindentation in mild and severe osteogenesis imperfecta. *Clin. Biomech.* 28, 110–116.
- Albert, C., Jameson, J., Smith, P., and Harris, G. (2014). Reduced diaphyseal strength associated with high intracortical vascular porosity within long bones of children with osteogenesis imperfecta. *Bone* 66, 121–130.
- Al-Jallad, H., Palomo, T., Roughley, P., Glorieux, F.H., McKee, M.D., Moffatt, P., and Rauch, F. (2015). The effect of SERPINF1 in-frame mutations in osteogenesis imperfecta type VI. *Bone* 76, 115–120.
- Andereg, F., Geblinger, D., Horvath, P., Charnley, M., Textor, M., Addadi, L., and Geiger, B. (2011). Substrate Adhesion Regulates Sealing Zone Architecture and Dynamics in Cultured Osteoclasts. *PLoS ONE* 6.
- Andersen, P.E., and Hauge, M. (1989). Osteogenesis imperfecta: a genetic, radiological, and epidemiological study. *Clin. Genet.* 36, 250–255.
- Andriotis, O.G., Chang, S.W., Vanleene, M., Howarth, P.H., Davies, D.E., Shefelbine, S.J., Buehler, M.J., and Thurner, P.J. (2015). Structure–mechanics relationships of collagen fibrils in the osteogenesis imperfecta mouse model. *J. R. Soc. Interface* 12.
- Arundel, P., and Bishop, N. (2010). Diagnosing osteogenesis imperfecta. *Paediatr. Child Health* 20, 225–231.
- Aruwajoye, O.O., Kim, H.K.W., and Aswath, P.B. (2015). Bone Apatite Composition of Necrotic Trabecular Bone in the Femoral Head of Immature Piglets. *Calcif. Tissue Int.* 96, 324–334.
- Aubry-Rozier, B., Unger, S., Bregou Bourgeois, A., Freymond Morisod, M., Vaswani, A., Schneider, P., and Bonafé, L. (2015). Nouveautés dans l'ostéogénèse imparfaite : de la recherche à la prise en charge multidisciplinaire. *Rev. Médicale Suisse* 11, 657–662.
- Awonusi, A., Morris, M.D., and Tecklenburg, M.M.J. (2007). Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. *Calcif. Tissue Int.* 81, 46–52.

Bailey, A.J., Paul, R.G., and Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* 106, 1–56.

Bakker, A., Klein-Nulend, J., and Burger, E. (2004). Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1163–1168.

Bala, Y., and Seeman, E. (2015). Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment. *Calcif. Tissue Int.* 97, 308–326.

Bala, Y., Depalle, B., Douillard, T., Meille, S., Clément, P., Follet, H., Chevalier, J., and Boivin, G. (2011). Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: An instrumented indentation study. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4, 1473–1482.

Bala, Y., Farlay, D., and Boivin, G. (2013). Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporos Int* 24, 2153–2166.

Bansil, R., Yannas, I.V., and Stanley, H.E. (1978). Raman spectroscopy: a structural probe of glycosaminoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 535–542.

Bardai, G., Moffatt, P., Glorieux, F.H., and Rauch, F. (2016). DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA.*

Barnes, A.M., Cabral, W.A., Weis, M., Makareeva, E., Mertz, E.L., Leikin, S., Eyre, D., Trujillo, C., and Marini, J.C. (2012). Absence of FKBP10 in recessive type XI osteogenesis imperfecta leads to diminished collagen cross-linking and reduced collagen deposition in extracellular matrix. *Hum. Mutat.* 33, 1589–1598.

Baron, R. (2001). L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/Sciences* 17, 1260–1269.

Baron, R., Gertner, J.M., Lang, R., and Vignery, A. (1983). Increased bone turnover with decreased bone formation by osteoblasts in children with osteogenesis imperfecta tarda. *Pediatr. Res.* 17, 204–207.

Baron, R., Ferrari, S., and Russell, R.G. (2011). Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone* 48, 677–692.

Bart, Z.R., Hammond, M.A., and Wallace, J.M. (2014). Multi-scale analysis of bone chemistry, morphology and mechanics in the oim model of osteogenesis imperfecta. *Connect. Tissue Res.* 55, 4–8.

Bastos, F., Perez, L.T., Narváes, C.P. de L., Costa, O., Silva, R.C.S. da, Van-Dunem, J.C.V.D., Miranda, S.M. da R.N. de, Cordeiro, L.B., Maia, P.C.S., Airosa, L. de F.L.M., et al. (2010). Severe osteogenesis imperfecta: case report. *Einstein São Paulo Braz.* 8, 480–482.

Bazin, D., Chappard, C., Combes, C., Carpentier, X., Rouzière, S., André, G., Matzen, G., Allix, M., Thiaudière, D., Reguer, S., et al. (2009). Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. *Osteoporos. Int.* 20, 1065–1075.

Belinsky, G.S., Ward, L., and Chung, C. (2016). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) normalizes matrix defects in iPSCs derived from Osteogenesis imperfecta Type VI. *Rare Dis.* 4.

Ben Amor, I.M., Glorieux, F.H., and Rauch, F. (2011). Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *J. Osteoporos.* 2011, 540178.

Bertinetti, L., Masic, A., Schuetz, R., Barbetta, A., Seidt, B., Wagermaier, W., and Fratzl, P. (2015). Osmotically driven tensile stress in collagen-based mineralized tissues. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 52, 14–21.

Bi, X., Patil, C.A., Lynch, C.C., Pharr, G.M., Mahadevan-Jansen, A., and Nyman, J.S. (2011). RAMAN AND MECHANICAL PROPERTIES CORRELATE AT WHOLE BONE- AND TISSUE- LEVELS IN A GENETIC MOUSE MODEL. *J. Biomech.* 44, 297–303.

Bishop, N. (2016). Bone Material Properties in Osteogenesis Imperfecta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*

Blouin, S., Fratzl-Zelman, N., Glorieux, F.H., Roschger, P., Klaushofer, K., Marini, J.C., and Rauch, F. (2017). Hypermineralization and high osteocyte lacunar density in osteogenesis imperfecta type V bone indicate exuberant primary bone formation. *J. Bone Miner. Res.* n/a-n/a.

Bogan, R., Riddle, R.C., Li, Z., Kumar, S., Nandal, A., Faugere, M.-C., Boskey, A., Crawford, S.E., and Clemens, T.L. (2013). A Mouse Model for Human Osteogenesis Imperfecta Type VI. *J. Bone Miner. Res.* 28, 1531–1536.

Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L.G., Meunier, P.J., and Delmas, P.D. (2008). The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* 43, 532–538.

Boskey, A.L., and Coleman, R. (2010). Aging and Bone. *J. Dent. Res.* 89, 1333–1348.

Boskey, A.L., and Villarreal-Ramirez, E. (2016). Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biol.* 52–54, 43–59.

Boyce, B.F. (2013). Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 92, 860–867.

Boyce, B.F., and Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res. Ther.* 9, S1.

Boyde, A., Travers, R., Glorieux, F.H., and Jones, S.J. (1999). The Mineralization Density of Iliac Crest Bone from Children with Osteogenesis Imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* 64, 185–190.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.

Brandi, M.L. (2009). Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* 48, iv3-iv8.

Bregou Bourgeois, A., Aubry-Rozier, B., Bonafé, L., Laurent-Applegate, L., Pioletti, D.P., and Zambelli, P.-Y. (2016). Osteogenesis imperfecta: from diagnosis and multidisciplinary treatment to future perspectives. *Swiss Med. Wkly.* 146, w14322.

Brizola, E., and Shapiro, J.R. (2015). Bisphosphonate Treatment of Children and Adults with Osteogenesis Imperfecta: Unanswered Questions. *Calcif. Tissue Int.* 97, 101–103.

Brunetti, G., Papadia, F., Tummolo, A., Fischetto, R., Nicastro, F., Piacente, L., Ventura, A., Mori, G., Oranger, A., Gigante, I., et al. (2016). Impaired bone remodeling in children with osteogenesis imperfecta treated and untreated with bisphosphonates: the role of DKK1, RANKL, and TNF- α . *Osteoporos. Int.* 1–11.

Brunner, M., Jurdic, P., Tuckerman, J.P., Block, M.R., and Bouvard, D. (2013). New insights into adhesion signaling in bone formation. *Int Rev Cell Mol Biol* 305, 1–68.

Bruzzaniti, A., and Baron, R. (2006). Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7, 123–139.

Buchwald, T., Kozielski, M., Szybowicz, M., aw, Buchwald, T., Kozielski, M., Szybowicz, M., and aw (2012a). Determination of Collagen Fibers Arrangement in Bone Tissue by Using Transformations of Raman Spectra Maps, Determination of Collagen Fibers Arrangement in Bone Tissue by Using Transformations of Raman Spectra Maps. *J. Spectrosc. J. Spectrosc.* 27, 27, 107, 107–117, 117.

Buchwald, T., Niciejewski, K., Kozielski, M., Szybowicz, M., Siatkowski, M., and Krauss, H. (2012b). Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 17, 017007.

Buckley, K., Kerns, J.G., Birch, H.L., Gikas, P.D., Parker, A.W., Matousek, P., and Goodship, A.E. (2014). Functional adaptation of long bone extremities involves the localized “tuning” of the cortical bone composition; evidence from Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 19, 111602.

Burger, E.H., Klein-Nulend, J., and Smit, T.H. (2003). Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon—a proposal. *J. Biomech.* 36, 1453–1459.

Burket, J., Gourion-Arsiquaud, S., Havill, L.M., Baker, S.P., Boskey, A.L., and van der Meulen, M.C.H. (2011). Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. *J. Biomech.* 44, 277–284.

Burket, J.C., Brooks, D.J., MacLeay, J.M., Baker, S.P., Boskey, A.L., and van der Meulen, M.C.H. (2013). Variations in nanomechanical properties and tissue composition within trabeculae from an ovine model of osteoporosis and treatment. *Bone* 52, 326–336.

Burr, D. (2002a). Targeted and Nontargeted Remodeling. *Bone* 30, 2–4.

Burr, D.B. (2002b). The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 31, 8–11.

Burr, D.B., Schaffler, M.B., and Frederickson, R.G. (1988). Composition of the cement line and its possible mechanical role as a local interface in human compact bone. *J. Biomech.* 21, 939–945.

Carden, A., Rajachar, R.M., Morris, M.D., and Kohn, D.H. (2003). Ultrastructural changes accompanying the mechanical deformation of bone tissue: a Raman imaging study. *Calcif Tissue Int* 72, 166–175.

Cardoso, L., Herman, B.C., Verborgt, O., Laudier, D., Majeska, R.J., and Schaffler, M.B. (2009). Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Min. Res* 24, 597–605.

Carretta, R., Stussi, E., Muller, R., and Lorenzetti, S. (2013). Within subject heterogeneity in tissue-level post-yield mechanical and material properties in human trabecular bone. *J Mech Behav Biomed Mater* 24, 64–73.

Carretta, R., Stussi, E., Muller, R., and Lorenzetti, S. (2015). Prediction of Local Ultimate Strain and Toughness of Trabecular Bone Tissue by Raman Material Composition Analysis. *BioMed Res. Int.* 2015, e457371.

Carriero, A., Doube, M., Vogt, M., Busse, B., Zustin, J., Levchuk, A., Schneider, P., Müller, R., and Shefelbine, S.J. (2014). Altered lacunar and vascular porosity in osteogenesis imperfecta mouse bone as revealed by synchrotron tomography contributes to bone fragility. *Bone* 61, 116–124.

Charlier, P., Perciaccante, A., and Bianucci, R. (2016). Oldest medical description of osteogenesis imperfecta (17th Century, France). *Clin. Anat. N. Y. N.*

Ciapetti, G., Di Pompo, G., Avnet, S., Martini, D., Diez-Escudero, A., Montufar, E.B., Ginebra, M.-P., and Baldini, N. (2017). Osteoclast differentiation from human blood precursors on biomimetic calcium-phosphate substrates. *Acta Biomater.*

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3, S131–S139.

Coleman, R.M., Aguilera, L., Quinones, L., Lukashova, L., Poirier, C., and Boskey, A. (2012). Comparison of bone tissue properties in mouse models with collagenous and non-collagenous genetic mutations using FTIRI. *Bone* 51, 920–928.

Cowin, S.C. (2001). *Bone mechanics handbook* (Boca Raton, FL: CRC Press).

Cundy, T. (2012). Recent Advances in Osteogenesis Imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* 90, 439–449.

Currey, J.D. (1962). Stress Concentrations in Bone. *J. Cell Sci.* s3-103, 111–133.

Currey, J.D. (2013). *Bones: Structure and Mechanics*. (Princeton: Princeton University Press).

Currey, J., Brear, K., and Zioupos, P. (1996). The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora ERRATUM. *J. Biomech.* 30, 1001.

Davis, M.S., Kovacic, B.L., Marini, J.C., Shih, A.J., and Kozloff, K.M. (2012). Increased susceptibility to microdamage in Brl/+ mouse model for osteogenesis imperfecta. *Bone* 50, 784–791.

Delaisse, J.-M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *BoneKEy Rep.* 3.

Despang, F., Bernhardt, A., Lode, A., Dittrich, R., Hanke, T., Shenoy, S.J., Mani, S., John, A., and Gelinsky, M. (2015). Synthesis and physicochemical, in vitro and in vivo evaluation of an anisotropic, nanocrystalline hydroxyapatite bisque scaffold with parallel-aligned pores mimicking the microstructure of cortical bone. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, E152–E166.

Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* 14, 407–416.

Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., and Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J. Cell Sci.* 118, 2901–2911.

Detsch, R., and Boccaccini, A.R. (2015). The role of osteoclasts in bone tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 1133–1149.

Detsch, R., Hagmeyer, D., Neumann, M., Schaefer, S., Vortkamp, A., Wuelling, M., Ziegler, G., and Epple, M. (2010). The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta Biomater.* 6, 3223–3233.

Dominguez, L.J., Bella, G.D., Belvedere, M., and Barbagallo, M. (2011). Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonates. *Biogerontology* 12, 397–408.

Dong, X.N., Guda, T., Millwater, H.R., and Wang, X. (2009). Probabilistic Failure Analysis of Bone Using a Finite Element Model of Mineral-Collagen Composites. *J. Biomech.* 42, 202–209.

Dong, X.N., Zoghi, M., Ran, Q., and Wang, X. (2010). Collagen mutation causes changes of the microdamage morphology in bone of an OI mouse model. *Bone* 47, 1071–1075.

Dong, X.N., Qin, A., Xu, J., and Wang, X. (2011). IN SITU ACCUMULATION OF ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS (AGES) IN BONE MATRIX AND ITS CORRELATION WITH OSTEOCLASTIC BONE RESORPTION. *Bone* 49, 174–183.

Donnelly, E., Boskey, A.L., Baker, S.P., and van der Meulen, M.C.H. (2009). Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J. Biomed. Mater. Res. A* 92A, 1048–1056.

Donnelly, E., Chen, D.X., Boskey, A.L., Baker, S.P., and Meulen, M.C.H. van der (2010). Contribution of Mineral to Bone Structural Behavior and Tissue Mechanical Properties. *Calcif. Tissue Int.* 87, 450–460.

Dooley, K.A., McCormack, J., Fyhrie, D.P., and Morris, M.D. (2009). Stress mapping of undamaged, strained, and failed regions of bone using Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 14, 044018.

Drake, M.T., Clarke, B.L., and Lewiecki, E.M. (2015). The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clin. Ther.* 37, 1837–1850.

Draper, E.R., Morris, M.D., Camacho, N.P., Matousek, P., Towrie, M., Parker, A.W., and Goodship, A.E. (2005). Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy. *J. Bone Miner. Res.* 20, 1968–1972.

Drissi, H., and Sanjay, A. (2016). The Multifaceted Osteoclast; Far and Beyond Bone Resorption. *J. Cell. Biochem.* 117, 1753–1756.

Eriksen, E.F., Eghbali-Fatourehchi, G.Z., and Khosla, S. (2007). Remodeling and vascular spaces in bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22, 1–6.

Esmonde-White, K.A., Esmonde-White, F.W.L., Morris, M.D., and Roessler, B.J. (2011). Fiber-optic Raman Spectroscopy of Joint Tissues. *The Analyst* 136, 1675–1685.

Fan, Z., Swadener, J.G., Rho, J.Y., Roy, M.E., and Pharr, G.M. (2002). Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation. *J. Orthop. Res.* 20, 806–810.

Fan, Z., Smith, P.A., Eckstein, E.C., and Harris, G.F. (2006). Mechanical properties of OI type III bone tissue measured by nanoindentation. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79A, 71–77.

Fan, Z.F., Smith, P., Rauch, F., and Harris, G.F. (2007). Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta. *Compos. Part B Eng.* 38, 411–415.

Fantner, G.E., Rabinovych, O., Schitter, G., Thurner, P., Kindt, J.H., Finch, M.M., Weaver, J.C., Golde, L.S., Morse, D.E., Lipman, E.A., et al. (2006). Hierarchical interconnections in the nano-composite material bone: Fibrillar cross-links resist fracture on several length scales. *Compos. Sci. Technol.* 66, 1205–1211.

Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C., and Meunier, P.J. (2004). The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 34, 783–789.

Fonseca, J.E. (2008). Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. *Rheumatol. Oxf.* 47 Suppl 4, iv17-19.

Forlino, A., and Marini, J.C. (2015). Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*.

Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Misof, B.M., Pfeffer, S., Glorieux, F.H., Klaushofer, K., and Rauch, F. (2009). Normative data on mineralization density distribution in iliac bone biopsies of children, adolescents and young adults. *Bone* 44, 1043–1048.

Fratzl-Zelman, N., Schmidt, I., Roschger, P., Glorieux, F.H., Klaushofer, K., Fratzl, P., Rauch, F., and Wagermaier, W. (2014). Mineral particle size in children with osteogenesis imperfecta type I is not increased independently of specific collagen mutations. *Bone* 60, 122–128.

Fratzl-Zelman, N., Schmidt, I., Roschger, P., Roschger, A., Glorieux, F.H., Klaushofer, K., Wagermaier, W., Rauch, F., and Fratzl, P. (2015). Unique micro- and nano-scale mineralization pattern of human osteogenesis imperfecta type VI bone. *Bone* 73, 233–241.

Fratzl-Zelman, N., Bächinger, H.-P., Vranka, J.A., Roschger, P., Klaushofer, K., and Rauch, F. (2016a). Bone matrix hypermineralization in prolyl-3 hydroxylase 1 deficient mice. *Bone* 85, 15–22.

Fratzl-Zelman, N., Barnes, A.M., Weis, M., Carter, E., Hefferan, T.E., Perino, G., Chang, W., Smith, P.A., Roschger, P., Klaushofer, K., et al. (2016b). Non-Lethal Type VIII Osteogenesis Imperfecta Has Elevated Bone Matrix Mineralization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20161334.

Freeman, J.J., Wopenka, B., Silva, M.J., and Pasteris, J.D. (2001). Raman Spectroscopic Detection of Changes in Bioapatite in Mouse Femora as a Function of Age and In Vitro Fluoride Treatment. *Calcif. Tissue Int.* 68, 156–162.

Frith, J.C., Mönkkönen, J., Auriola, S., Mönkkönen, H., and Rogers, M.J. (2001). The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum.* 44, 2201–2210.

Gaberel, T., Rochey, A., di Palma, C., Lucas, F., Touze, E., and Emery, E. (2016). Ruptured intracranial aneurysm in patients with osteogenesis imperfecta: 2 familial cases and a systematic review of the literature. *Neurochirurgie.* 62, 317–320.

Gallant, M.A., Brown, D.M., Organ, J.M., Allen, M.R., and Burr, D.B. (2013). Reference-point indentation correlates with bone toughness assessed using whole-bone traditional mechanical testing. *Bone* 53, 301–305.

Gamsjaeger, S., Masic, A., Roschger, P., Kazanci, M., Dunlop, J.W.C., Klaushofer, K., Paschalis, E.P., and Fratzl, P. (2010). Cortical bone composition and orientation as a function of animal and tissue age in mice by Raman spectroscopy. *Bone* 47, 392–399.

Gamsjaeger, S., Hofstetter, B., Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Roschger, A., Fratzl, P., Brozek, W., Masic, A., Misof, B.M., Glorieux, F.H., et al. (2014a). Pediatric reference Raman data for material characteristics of iliac trabecular bone. *Bone* 69, 89–97.

Gamsjaeger, S., Klaushofer, K., and Paschalis, E.P. (2014b). Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage. *J. Raman Spectrosc.* 45, 794–800.

- Gamulin, O., Serec, K., Bilić, V., Balarin, M., Kosović, M., Drmić, D., Brčić, L., Seiwerth, S., and Sikirić, P. (2013). Monitoring the healing process of rat bones using Raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* *1044*, 308–313.
- Gautieri, A., Uzel, S., Vesentini, S., Redaelli, A., and Buehler, M.J. (2009). Molecular and Mesoscale Mechanisms of Osteogenesis Imperfecta Disease in Collagen Fibrils. *Biophys. J.* *97*, 857–865.
- Geblinger, D., Geiger, B., and Addadi, L. (2009). Surface-induced regulation of podosome organization and dynamics in cultured osteoclasts. *Chembiochem* *10*, 158–165.
- Geblinger, D., Addadi, L., and Geiger, B. (2010). Nano-topography sensing by osteoclasts. *J. Cell Sci.* *123*, 1503–1510.
- Geblinger, D., Zink, C., Spencer, N.D., Addadi, L., and Geiger, B. (2012). Effects of surface microtopography on the assembly of the osteoclast resorption apparatus. *J. R. Soc. Interface* *9*, 1599–1608.
- Gentleman, E., Swain, R.J., Evans, N.D., Boonrungsiman, S., Jell, G., Ball, M.D., Shean, T.A.V., Oyen, M.L., Porter, A., and Stevens, M.M. (2009). Comparative materials differences revealed in engineered bone as a function of cell-specific differentiation. *Nat. Mater.* *8*, 763–770.
- Gentsch, C., Delling, G., and Kaiser, E. (2003). Microstructural classification of resorption lacunae and perforations in human proximal femora. *Calcif Tissue Int* *72*, 698–709.
- Georgess, D., Machuca-Gayet, I., Blangy, A., and Jurdic, P. (2014). Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adhes. Migr.* *8*, 192–204.
- Gibson, L.J. (2005). Biomechanics of cellular solids. *J. Biomech.* *38*, 377–399.
- Gjaltema, R.A.F., van der Stoel, M.M., Boersema, M., and Bank, R.A. (2016). Disentangling mechanisms involved in collagen pyridinoline cross-linking: The immunophilin FKBP65 is critical for dimerization of lysyl hydroxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 7142–7147.
- Glorieux, F.H. (2007). Experience with bisphosphonates in osteogenesis imperfecta. *Pediatrics* *119 Suppl 2*, S163-5.
- Glorieux, F.H., Ward, L.M., Rauch, F., Lalic, L., Roughley, P.J., and Travers, R. (2002). Osteogenesis Imperfecta Type VI: A Form of Brittle Bone Disease with a Mineralization Defect. *J. Bone Miner. Res.* *17*, 30–38.
- Goff, M.G., Slyfield, C.R., Kummari, S.R., Tkachenko, E.V., Fischer, S.E., Yi, Y.H., Jekir, M.G., Keaveny, T.M., and Hernandez, C.J. (2012). Three-dimensional characterization of resorption cavity size and location in human vertebral trabecular bone. *Bone* *51*, 28–37.
- Golcuk, K., Mandair, G.S., Callender, A.F., Sahar, N., Kohn, D.H., and Morris, M.D. (2006). Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1758*, 868–873.

Goldberg, S.R., Georgiou, J., Glogauer, M., and Grynblas, M.D. (2012). A 3D scanning confocal imaging method measures pit volume and captures the role of Rac in osteoclast function. *Bone* 51, 145–152.

Gong, B., Mandair, G.S., Wehrli, F.W., and Morris, M.D. (2014). Novel Assessment Tools for Osteoporosis Diagnosis and Treatment. *Curr. Osteoporos. Rep.* 12, 357–365.

Goodyear, S.R., Gibson, I.R., Skakle, J.M.S., Wells, R.P.K., and Aspden, R.M. (2009). A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone* 44, 899–907.

Gossiel, F., Hoyle, C., McCloskey, E.V., Naylor, K.E., Walsh, J., Peel, N., and Eastell, R. (2016). The effect of bisphosphonate treatment on osteoclast precursor cells in postmenopausal osteoporosis: The TRIO study. *Bone* 92, 94–99.

Gourion-Arsiquaud, S., Lukashova, L., Power, J., Loveridge, N., Reeve, J., and Boskey, A.L. (2013). Fourier Transformed Infra-Red Imaging of Femoral Neck Bone: Reduced Heterogeneity of Mineral-to-Matrix and Carbonate-to-Phosphate and more Variable Crystallinity in Treatment-Naïve Fracture Cases compared to Fracture-Free Controls. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 28, 150–161.

Grabner, B., Landis, W.J., Roschger, P., Rinnerthaler, S., Peterlik, H., Klaushofer, K., and Fratzl, P. (2001). Age- and genotype-dependence of bone material properties in the osteogenesis imperfecta murine model (oim). *Bone* 29, 453–457.

Granke, M., Makowski, A.J., Uppuganti, S., and Nyman, J.S. (2016). Prevalent role of porosity and osteonal area over mineralization heterogeneity in the fracture toughness of human cortical bone. *J. Biomech.*

Gupta, H. s., Stachewicz, U., Wagermaier, W., Roschger, P., Wagner, H. d., and Fratzl, P. (2006a). Mechanical modulation at the lamellar level in osteonal bone. *J. Mater. Res.* 21, 1913–1921.

Gupta, H.S., Seto, J., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Boesecke, P., and Fratzl, P. (2006b). Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17741–17746.

Hammond, M.A., Gallant, M.A., Burr, D.B., and Wallace, J.M. (2014). Nanoscale changes in collagen are reflected in physical and mechanical properties of bone at the microscale in diabetic rats. *Bone* 60, 26–32.

Hammond, M.A., Berman, A.G., Pacheco-Costa, R., Davis, H.M., Plotkin, L.I., and Wallace, J.M. (2016). Removing or truncating connexin 43 in murine osteocytes alters cortical geometry, nanoscale morphology, and tissue mechanics in the tibia. *Bone* 88, 85–91.

Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* 122, 1791–1802.

Hefti, T., Frischherz, M., Spencer, N.D., Hall, H., and Schlottig, F. (2010). A comparison of osteoclast resorption pits on bone with titanium and zirconia surfaces. *Biomaterials* 31, 7321–7331.

Helfrich, M.H., Crockett, J.C., Hocking, L.J., and Coxon, F.P. (2007). The pathogenesis of osteoclast diseases: Some knowns, but still many unknowns. *BoneKEy-Osteovision* 4, 61–77.

Hengsberger, S., Kulik, A., and Zysset, P. (2002). Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. *Bone* 30, 178–184.

Henriksen, K., Leeming, D.J., Byrjalsen, I., Nielsen, R.H., Sorensen, M.G., Dziegiel, M.H., Martin, T.J., Christiansen, C., Qvist, P., and Karsdal, M.A. (2007). Osteoclasts prefer aged bone. *Osteoporos Int* 18, 751–759.

Henriksen, K., Karsdal, M.A., and Martin, T.J. (2014). Osteoclast-derived coupling factors in bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 94, 88–97.

Herman, B.C., Cardoso, L., Majeska, R.J., Jepsen, K.J., and Schaffler, M.B. (2010). Activation of bone remodeling after fatigue: differential response to linear microcracks and diffuse damage. *Bone* 47, 766–772.

Hernandez, C.J., and Keaveny, T. (2006). A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 39, 1173–1181.

Hillier, M.L., and Bell, L.S. (2007). Differentiating Human Bone from Animal Bone: A Review of Histological Methods. *J. Forensic Sci.* 52, 249–263.

Hoc, T., Henry, L., Verdier, M., Aubry, D., Sedel, L., and Meunier, A. (2006). Effect of microstructure on the mechanical properties of Haversian cortical bone. *Bone* 38, 466–474.

Homan, E.P., Rauch, F., Grafe, I., Lietman, C., Doll, J.A., Dawson, B., Bertin, T., Napierala, D., Morello, R., Gibbs, R., et al. (2011). Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2798–2803.

Homan, E.P., Lietman, C., Grafe, I., Lenington, J., Morello, R., Napierala, D., Jiang, M.-M., Munivez, E.M., Dawson, B., Bertin, T.K., et al. (2014). Differential Effects of Collagen Prolyl 3-Hydroxylation on Skeletal Tissues. *PLoS Genet.* 10.

Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A., Koo, W.W.K., Gordon, P.L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J.C., Pyeritz, R.E., et al. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 5, 309–313.

Hoyer-Kuhn, H., Netzer, C., Koerber, F., Schoenau, E., and Semler, O. (2014). Two years' experience with denosumab for children with Osteogenesis imperfecta type VI. *Orphanet J. Rare Dis.* 9.

Hoyer-Kuhn, H., Franklin, J., Allo, G., Kron, M., Netzer, C., Eysel, P., Hero, B., Schoenau, E., and Semler, O. (2016). Safety and efficacy of denosumab in children with osteogenesis imperfecta - a first prospective trial. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 16, 24–32.

Hu, S., Planus, E., Georgess, D., Place, C., Wang, X., Albiges-Rizo, C., Jurdic, P., and Geminard, J.C. (2011). Podosome rings generate forces that drive saltatory osteoclast migration. *Mol. Biol. Cell* 22, 3120–3126.

Huang, T.T.Y., He, L.-H., Darendeliler, M.A., and Swain, M.V. (2010). Correlation of mineral density and elastic modulus of natural enamel white spot lesions using X-ray microtomography and nanoindentation. *Acta Biomater.* 6, 4553–4559.

Hudson, D.M., Kim, L.S., Weis, M., Cohn, D.H., and Eyre, D.R. (2012). Peptidyl 3-Hydroxyproline Binding Properties of Type I Collagen Suggest a Function in Fibril Supramolecular Assembly. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 2417–2424.

Hurtel-Lemaire, A.S., Mentaverri, R., Caudrillier, A., Cournarie, F., Wattel, A., Kamel, S., Terwilliger, E.F., Brown, E.M., and Brazier, M. (2009). The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem* 284, 575–584.

Ilkka, V., Heidi, A., Helena, V., Outi, T., Marja, E., Helena, R., Marjut, E., Outi, M., and Janna, W.-S. (2016). Timing of dental development in osteogenesis imperfecta patients with and without bisphosphonate treatment. *Bone*.

Imbert, L., Auregan, J.C., Pernelle, K., and Hoc, T. (2014). Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level. *Bone* 65, 18–24.

Imbert, L., Aurégan, J.-C., Pernelle, K., and Hoc, T. (2015). Microstructure and compressive mechanical properties of cortical bone in children with osteogenesis imperfecta treated with bisphosphonates compared with healthy children. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 46, 261–270.

Ishikawa, Y., Vranka, J., Wirz, J., Nagata, K., and Bächinger, H.P. (2008). The Rough Endoplasmic Reticulum-resident FK506-binding Protein FKBP65 Is a Molecular Chaperone That Interacts with Collagens. *J. Biol. Chem.* 283, 31584–31590.

Jilka, R.L., Noble, B., and Weinstein, R.S. (2013). Osteocyte apoptosis. *Bone* 54, 264–271.

Jones, S.J., Arora, M., and Boyde, A. (1995). The rate of osteoclastic destruction of calcified tissues is inversely proportional to mineral density. *Calcif. Tissue Int.* 56, 554–558.

Jones, S.J., Glorieux, F.H., Travers, R., and Boyde, A. (1999). The Microscopic Structure of Bone in Normal Children and Patients with Osteogenesis Imperfecta: A Survey Using Backscattered Electron Imaging. *Calcif. Tissue Int.* 64, 8–17.

Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., and Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 195–202.

Kalajzic, I., Terzic, J., Rumboldt, Z., Mack, K., Naprta, A., Ledgard, F., Gronowicz, G., Clark, S.H., and Rowe, D.W. (2002). Osteoblastic Response to the Defective Matrix in the Osteogenesis Imperfecta Murine (oim) Mouse. *Endocrinology* 143, 1594–1601.

Kang, H., Aryal A.C., S., and Marini, J.C. (2016). Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl. Res.*

Kanno, J., Saito-Hakoda, A., Kure, S., and Fujiwara, I. (2017). Responsiveness to pamidronate treatment is not related to the genotype of type I collagen in patients with osteogenesis imperfecta. *J. Bone Miner. Metab.* 1–8.

Karim, L., and Vashishth, D. (2012). Heterogeneous glycation of cancellous bone and its association with bone quality and fragility. *PLoS One* 7, e35047.

Katti, K.S., Gu, C., and Katti, D.R. (2015). Anisotropic properties of human cortical bone with osteogenesis imperfecta. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 15, 155–167.

Kavukcuoglu, N.B., Arteaga-Solis, E., Lee-Arteaga, S., Ramirez, F., and Mann, A.B. (2007). Nanomechanics and Raman spectroscopy of fibrillin 2 knock-out mouse bones. *J. Mater. Sci.* 42, 8788–8794.

Kavukcuoglu, N.B., Patterson-Buckendahl, P., and Mann, A.B. (2009). Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2, 348–354.

Kazanci, M., Roschger, P., Paschalis, E.P., Klaushofer, K., and Fratzl, P. (2006). Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation–composition. *J. Struct. Biol.* 156, 489–496.

Kazanci, M., Wagner, H.D., Manjubala, N.I., Gupta, H.S., Paschalis, E., Roschger, P., and Fratzl, P. (2007). Raman imaging of two orthogonal planes within cortical bone. *Bone* 41, 456–461.

Keller, J., Brink, S., Busse, B., Schilling, A.F., Schinke, T., Amling, M., and Lange, T. (2012). Divergent Resorbability and Effects on Osteoclast Formation of Commonly Used Bone Substitutes in a Human In Vitro-Assay. *PLoS ONE* 7.

Kerns, J.G., Gikas, P.D., Buckley, K., Shepperd, A., Birch, H.L., McCarthy, I., Miles, J., Briggs, T.W.R., Keen, R., Parker, A.W., et al. (2014). Evidence from Raman Spectroscopy of a Putative Link Between Inherent Bone Matrix Chemistry and Degenerative Joint Disease. *Arthritis Rheumatol.* 66, 1237–1246.

Kim, G., Boskey, A.L., Baker, S.P., and van der Meulen, M.C.H. (2012). Improved prediction of rat cortical bone mechanical behavior using composite beam theory to integrate tissue level properties. *J. Biomech.* 45, 2784–2790.

Kim, G., Cole, J.H., Boskey, A.L., Baker, S.P., and van der Meulen, M.C. (2014). Reduced tissue-level stiffness and mineralization in osteoporotic cancellous bone. *Calcif Tissue Int* 95, 125–131.

- Kleinhans, C., Schmid, F.F., Schmid, F.V., and Kluger, P.J. (2015). Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *J Biotechnol.*
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R.G., Veldhuijzen, J.P., and Van Loon, J.J. (2003). MICROGRAVITY AND BONE CELL MECHANOSENSITIVITY. *Adv Space Res* 32, 1551–1559.
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R.G., and Mullender, M.G. (2005). Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol Paris* 53, 576–580.
- Klein-Nulend, J., van Oers, R.F.M., Bakker, A.D., and Bacabac, R.G. (2015). Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *J. Biomech.* 48, 855–865.
- Knott, L., and Bailey, A.J. (1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22, 181–187.
- Kohn, D.H., Sahar, N.D., Wallace, J.M., Golcuk, K., and Morris, M.D. (2008). Exercise Alters Mineral and Matrix Composition in the Absence of Adding New Bone. *Cells Tissues Organs* 189, 33–37.
- Kozielski, M., Buchwald, T., Szybowicz, M., Błaszczak, Z., Piotrowski, A., and Ciesielczyk, B. (2011). Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 1653–1661.
- Kuhn, L.T., Gryn timer, M.D., Rey, C.C., Wu, Y., Ackerman, J.L., and Glimcher, M.J. (2008). A Comparison of the Physical and Chemical Differences Between Cancellous and Cortical Bovine Bone Mineral at Two Ages. *Calcif. Tissue Int.* 83, 146–154.
- Labernadie, A., Bouissou, A., Delobelle, P., Balor, S., Voituriez, R., Proag, A., Fourquaux, I., Thibault, C., Vieu, C., Poincloux, R., et al. (2014). Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nat Commun* 5, 5343.
- Lakes, R., and Saha, S. (1979). Cement Line Motion in Bone. *Science* 204, 501–503.
- Letocha, A.D., Cintas, H.L., Troendle, J.F., Reynolds, J.C., Cann, C.E., Chernoff, E.J., Hill, S.C., Gerber, L.H., and Marini, J.C. (2005). Controlled Trial of Pamidronate in Children With Types III and IV Osteogenesis Imperfecta Confirms Vertebral Gains but Not Short-Term Functional Improvement. *J. Bone Miner. Res.* 20, 977–986.
- Li, H., Jiang, X., Delaney, J., Franceschetti, T., Bilic-Curcic, I., Kalinovsky, J., Lorenzo, J.A., Grcevic, D., Rowe, D.W., and Kalajzic, I. (2010). Immature Osteoblast Lineage Cells Increase Osteoclastogenesis in Osteogenesis Imperfecta Murine. *Am. J. Pathol.* 176, 2405–2413.
- Li, T., Chang, S.-W., Rodriguez-Florez, N., Buehler, M.J., Shefelbine, S., Dao, M., and Zeng, K. (2016). Studies of chain substitution caused sub-fibril level differences in stiffness and ultrastructure of wildtype and oim/oim collagen fibers using multifrequency-AFM and molecular modeling. *Biomaterials* 107, 15–22.

Lieber, C.A., and Mahadevan-Jansen, A. (2003). Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.* 57, 1363–1367.

Lietman, C.D., Rajagopal, A., Homan, E.P., Munivez, E., Jiang, M.-M., Bertin, T.K., Chen, Y., Hicks, J., Weis, M., Eyre, D., et al. (2014). Connective tissue alterations in *Fkbp10*^{-/-} mice. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4822–4831.

Lietman, C.D., Lim, J., Grafe, I., Chen, Y., Ding, H., Bi, X., Ambrose, C.G., Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Klaushofer, K., et al. (2017). *Fkbp10* Deletion in Osteoblasts Leads to Qualitative Defects in Bone. *J. Bone Miner. Res.* n/a-n/a.

Lindahl, K., Kindmark, A., Rubin, C.-J., Malmgren, B., Grigelioniene, G., Söderhäll, S., Ljunggren, Ö., and Åström, E. (2016). Decreased fracture rate, pharmacogenetics and BMD response in 79 Swedish children with osteogenesis imperfecta types I, III and IV treated with Pamidronate. *Bone* 87, 11–18.

Lowenstein, E.J. (2009). Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv. Syst.* 25, 515–516.

Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., and Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One* 2, e179.

Mabilleau, G., Pascaretti-Grizon, F., Basle, M.F., and Chappard, D. (2012). Depth and volume of resorption induced by osteoclasts generated in the presence of RANKL, TNF-alpha/IL-1 or LIGHT. *Cytokine* 57, 294–299.

Mandair, G.S., and Morris, M.D. (2015). Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *BoneKEY Rep.* 4.

Marini, J.C., Cabral, W.A., and Barnes, A.M. (2010). Null mutations in *LEPRE1* and *CRTAP* cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res.* 339, 59–70.

Marshall, G.W., Jr. (1993). Dentin: Microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 24, 606–617.

Martin, R.B. (2002). Is All Cortical Bone Remodeling Initiated by Microdamage? *Bone* 30, 8–13.

Masci, M., Wang, M., Imbert, L., Barnes, A.M., Spevak, L., Lukashova, L., Huang, Y., Ma, Y., Marini, J.C., Jacobsen, C.M., et al. (2016). Bone mineral properties in growing *Col1a2*^{+/G610C} mice, an animal model of osteogenesis imperfecta. *Bone* 87, 120–129.

McCreadie, B.R., Morris, M.D., Chen, T., Sudhaker Rao, D., Finney, W.F., Widjaja, E., and Goldstein, S.A. (2006). Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone* 39, 1190–1195.

Meganck, J.A., Begun, D.L., McElderry, J.D., Swick, A., Kozloff, K.M., Goldstein, S.A., Morris, M.D., Marini, J.C., and Caird, M.S. (2013). Fracture healing with alendronate treatment in the *Brtl*^{+/+} mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone* 56, 204–212.

- Mohsin, S., O'Brien, F.J., and Lee, T.C. (2006). Microcracks in compact bone: a three-dimensional view. *J. Anat.* 209, 119–124.
- Morris, M.D., and Mandair, G.S. (2011). Raman Assessment of Bone Quality. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469, 2160–2169.
- Murillo, A., Guerrero, C.A., Acosta, O., and Cardozo, C.A. (2010). Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol. Res.* 43, 205–224.
- Nakamura, M., Hentunen, T., Salonen, J., Nagai, A., and Yamashita, K. (2013). Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 3141–3151.
- Nalla, R.K., Kruzic, J.J., Kinney, J.H., Balooch, M., Ager III, J.W., and Ritchie, R.O. (2006). Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Mater. Sci. Eng. C* 26, 1251–1260.
- Newman, C.L., Moe, S.M., Chen, N.X., Hammond, M.A., Wallace, J.M., Nyman, J.S., and Allen, M.R. (2014). Cortical Bone Mechanical Properties Are Altered in an Animal Model of Progressive Chronic Kidney Disease. *PLoS ONE* 9, e99262.
- Nyman, J.S., Makowski, A.J., Patil, C.A., Masui, T.P., O'Quinn, E.C., Bi, X., Guelcher, S.A., Nicollela, D.P., and Mahadevan-Jansen, A. (2011). Measuring differences in compositional properties of bone tissue by confocal Raman spectroscopy. *Calcif. Tissue Int.* 89, 111–122.
- Ojanen, X., Isaksson, H., Töyräs, J., Turunen, M.J., Malo, M.K.H., Halvari, A., and Jurvelin, J.S. (2015). Relationships between tissue composition and viscoelastic properties in human trabecular bone. *J. Biomech.* 48, 269–275.
- Oliver, W.C., and Pharr, G.M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.* 7, 1564–1583.
- Ong, H.H., Wright, A.C., and Wehrli, F.W. (2012). Deuterium nuclear magnetic resonance unambiguously quantifies pore and collagen-bound water in cortical bone. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 2573–2581.
- Orkoulas, M.G., Vardaki, M.Z., and Kontoyannis, C.G. (2012). Study of bone matrix changes induced by osteoporosis in rat tibia using Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 63, 404–408.
- Ortner, D.J. (1975). Aging effects on osteon remodeling. *Calcif. Tissue Res.* 18, 27–36.
- Oxlund, H., Barckman, M., Ørtoft, G., and Andreassen, T.T. (1995). Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 17, S365–S371.
- Palomo, T., Glorieux, F.H., Schoenau, E., and Rauch, F. (2016). Body Composition in Children and Adolescents with Osteogenesis Imperfecta. *J. Pediatr.* 169, 232–237.

- Parfitt, A. m., Mundy, G. r., Roodman, G. d., Hughes, D. e., and Boyce, B. f. (1996). Theoretical perspective: A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 150–159.
- Patel, R. m., Nagamani, S. c. s., Cuthbertson, D., Campeau, P. m., Krischer, J. p., Shapiro, J. r., Steiner, R. d., Smith, P. a., Bober, M. b., Byers, P. h., et al. (2015). A cross-sectional multicenter study of osteogenesis imperfecta in North America – results from the linked clinical research centers. *Clin. Genet.* *87*, 133–140.
- Penel, G., Delfosse, C., Descamps, M., and Leroy, G. (2005). Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone* *36*, 893–901.
- Pernelle, K., Imbert, L., Bosser, C., Auregan, J.-C., Cruel, M., Ogier, A., Jurdic, P., and Hoc, T. (2017). Microscale mechanical and mineral heterogeneity of human cortical bone governs osteoclast activity. *Bone* *94*, 42–49.
- Perosky, J.E., Khoury, B.M., Jenks, T.N., Ward, F.S., Cortright, K., Meyer, B., Barton, D.K., Sinder, B.P., Marini, J.C., Caird, M.S., et al. (2016). Single dose of bisphosphonate preserves gains in bone mass following cessation of sclerostin antibody in *Brtl/+* osteogenesis imperfecta model. *Bone* *93*, 79–85.
- Pfaff, M., and Jurdic, P. (2001). Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and integrin $\alpha V\beta 3$. *J. Cell Sci.* *114*, 2775–2786.
- Pinheiro, A.L.B., Soares, L.G.P., Marques, A.M.C., Aciole, J.M.S., de Souza, R.A., and Silveira, L. (2014). Raman ratios on the repair of grafted surgical bone defects irradiated or not with laser ($\lambda 780$ nm) or LED ($\lambda 850$ nm). *J. Photochem. Photobiol. B* *138*, 146–154.
- Piper, K., Boyde, A., and Jones, S.J. (1992). The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anat. Embryol. (Berl.)* *186*, 291–299.
- Place, E.S., Evans, N.D., and Stevens, M.M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat. Mater.* *8*, 457–470.
- Poundarik, A.A., Diab, T., Sroga, G.E., Ural, A., Boskey, A.L., Gundberg, C.M., and Vashishth, D. (2012). Dilatational band formation in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19178–19183.
- Qin, Z., Gautieri, A., Nair, A.K., Inbar, H., and Buehler, M.J. (2012). Thickness of hydroxyapatite nanocrystal controls mechanical properties of the collagen-hydroxyapatite interface. *Langmuir* *28*, 1982–1992.
- Raeisi Najafi, A., Arshi, A.R., Eslami, M.R., Fariborz, S., and Moeinzadeh, M.H. (2007). Micromechanics fracture in osteonal cortical bone: A study of the interactions between microcrack propagation, microstructure and the material properties. *J. Biomech.* *40*, 2788–2795.

Ramasamy, J.G., and Akkus, O. (2007). Local variations in the micromechanical properties of mouse femur: The involvement of collagen fiber orientation and mineralization. *J. Biomech.* *40*, 910–918.

Ranzoni, A.M., Corcelli, M., Hau, K.-L., Kerns, J.G., Vanleene, M., Shefelbine, S., Jones, G.N., Moschidou, D., Dala-Ali, B., Goodship, A.E., et al. (2016). Counteracting bone fragility with human amniotic mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* *6*.

Rauch, F., and Glorieux, F.H. (2004). Osteogenesis imperfecta. *The Lancet* *363*, 1377–1385.

Rauch, F., and Glorieux, F.H. (2005). Osteogenesis imperfecta, current and future medical treatment. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* *139C*, 31–37.

Rauch, F., Travers, R., Parfitt, A.M., and Glorieux, F.H. (2000). Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta. *Bone* *26*, 581–589.

Rauch, F., Travers, R., Plotkin, H., and Glorieux, F.H. (2002). The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J. Clin. Invest.* *110*, 1293–1299.

Rauch, F., Plotkin, H., Zeitlin, L., and Glorieux, F.H. (2003). Bone Mass, Size, and Density in Children and Adolescents With Osteogenesis Imperfecta: Effect of Intravenous Pamidronate Therapy. *J. Bone Miner. Res.* *18*, 610–614.

Rauch, F., Land, C., Cornibert, S., Schoenau, E., and Glorieux, F.H. (2005). High and low density in the same bone: a study on children and adolescents with mild osteogenesis imperfecta. *Bone* *37*, 634–641.

Rauch, F., Lalic, L., Roughley, P., and Glorieux, F.H. (2009). Relationship Between Genotype and Skeletal Phenotype in Children and Adolescents With Osteogenesis Imperfecta. *J. Bone Miner. Res.* 091123190932048-30.

Reid, S.A. (1986). Effect of mineral content of human bone on in vitro resorption. *Anat. Embryol. (Berl.)* *174*, 225–234.

Rho, J.-Y., Tsui, T.Y., and Pharr, G.M. (1997). Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* *18*, 1325–1330.

Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., and Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* *20*, 92–102.

Rho, J.-Y., Zioupos, P., Currey, J., and Pharr, G.M. (2002). Microstructural elasticity and regional heterogeneity in human femoral bone of various ages examined by nano-indentation. *J. Biomech.* *35*, 189–198.

Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Rabourdin-Combe, C., Jurdic, P., and Servet-Delprat, C. (2004). Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* *104*, 4029–4037.

Roschger, A., Gamsjaeger, S., Hofstetter, B., Masic, A., Blouin, S., Messmer, P., Berzlanovich, A., Paschalis, E.P., Roschger, P., Klaushofer, K., et al. (2014). Relationship between the v2PO4/amide III ratio assessed by Raman spectroscopy and the calcium content measured by quantitative backscattered electron microscopy in healthy human osteonal bone. *J. Biomed. Opt.* 19, 065002–065002.

Roschger, P., Plenck, H., Klaushofer, K., and Eschberger, J. (1995). A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. *Scanning Microsc.* 9, 75-86; discussion 86-88.

Roschger, P., Paschalis, E.P., Fratzl, P., and Klaushofer, K. (2008a). Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone* 42, 456–466.

Roschger, P., Fratzl-Zelman, N., Misof, B.M., Glorieux, F.H., Klaushofer, K., and Rauch, F. (2008b). Evidence that Abnormal High Bone Mineralization in Growing Children with Osteogenesis Imperfecta is not Associated with Specific Collagen Mutations. *Calcif. Tissue Int.* 82, 263–270.

Rowe, D.W., and Shapiro, J.R. (1998). Chapter 23 - Osteogenesis Imperfecta. In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, L.V. Avioli, and S.M. Krane, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 651–695.

Ruffoni, D., Fratzl, P., Roschger, P., Klaushofer, K., and Weinkamer, R. (2007). The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. *Bone* 40, 1308–1319.

Rumpler, M., Wurger, T., Roschger, A., Zwettler, E., Peterlik, H., Fratzl, P., and Klaushofer, K. (2012). Microcracks and Osteoclast Resorption Activity In Vitro. *Calcif Tissue Int* 90, 230–238.

Rumpler, M., Wurger, T., Roschger, P., Zwettler, E., Sturmlechner, I., Altmann, P., Fratzl, P., Rogers, M.J., and Klaushofer, K. (2013). Osteoclasts on bone and dentin in vitro: mechanism of trail formation and comparison of resorption behavior. *Calcif Tissue Int* 93, 526–539.

Ruppel, M.E., Miller, L.M., and Burr, D.B. (2008). The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos. Int.* 19, 1251–1265.

Russell, R.G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 49, 2–19.

Russell, R.G.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H., and Rogers, M.J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos. Int.* 19, 733–759.

Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E., and Jurdic, P. (2008). Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 459–468.

Schilling, A.F., Linhart, W., Filke, S., Gebauer, M., Schinke, T., Rueger, J.M., and Amling, M. (2004). Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 25, 3963–3972.

Schnitzler, C.M., and Mesquita, J.M. (2013). Cortical porosity in children is determined by age-dependent osteonal morphology. *Bone* 55, 476–486.

Shaker, J.L., Albert, C., Fritz, J., and Harris, G. (2015). Recent developments in osteogenesis imperfecta. *F1000Research* 4.

Shen, J., Fan, L., Yang, J., Shen, A.G., and Hu, J.M. (2010). A longitudinal Raman microspectroscopic study of osteoporosis induced by spinal cord injury. *Osteoporos. Int.* 21, 81–87.

Sillence, D.O., Senn, A., and Danks, D.M. (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* 16, 101–116.

Silva, M.J., Brodt, M.D., Wopenka, B., Thomopoulos, S., Williams, D., Wassen, M.H., Ko, M., Kusano, N., and Bank, R.A. (2006). Decreased Collagen Organization and Content Are Associated With Reduced Strength of Demineralized and Intact Bone in the SAMP6 Mouse. *J. Bone Miner. Res.* 21, 78–88.

Skedros, J.G., Bloebaum, R.D., Bachus, K.N., Boyce, T.M., and Constantz, B. (1993b). Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 57–64.

Skedros, J.G., Bloebaum, R.D., Bachus, K.N., and Boyce, T.M. (1993a). The meaning of graylevels in backscattered electron images of bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 47–56.

Søe, K., Merrild, D.M., and Delaissé, J.-M. (2013). Steering the osteoclast through the demineralization-collagenolysis balance. *Bone* 56, 191–198.

Sønju Clasen, A.B., and Ruyter, I.E. (1997). Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv. Dent. Res.* 11, 523–527.

Spence, G., Patel, N., Brooks, R., Bonfield, W., and Rushton, N. (2010). Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: The effect of carbonate substitution. *J. Biomed. Mater. Res. A* 92A, 1292–1300.

Tai, K., Dao, M., Suresh, S., Palazoglu, A., and Ortiz, C. (2007). Nanoscale heterogeneity promotes energy dissipation in bone. *Nat. Mater.* 6, 454–462.

Tang, S.Y., and Vashishth, D. (2010). Non-enzymatic glycation alters microdamage formation in human cancellous bone. *Bone* 46, 148–154.

Tarnowski, C.P., Ignelzi, M.A., and Morris, M.D. (2002). Mineralization of Developing Mouse Calvaria as Revealed by Raman Microspectroscopy. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1118–1126.

Taylor, D., Hazenberg, J.G., and Lee, T.C. (2007). Living with cracks: Damage and repair in human bone. *Nat. Mater.* 6, 263–268.

Teitelbaum, S.L. (2000). Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 289, 1504–1508.

Timlin, J.A., Carden, A., and Morris, M.D. (1999). Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects. *Appl. Spectrosc.* 53, 1429–1435.

Timlin, J.A., Carden, A., Morris, M.D., Rajachar, R.M., and Kohn, D.H. (2000). Raman Spectroscopic Imaging Markers for Fatigue-Related Microdamage in Bovine Bone. *Anal. Chem.* 72, 2229–2236.

Traub, W., Arad, T., Vetter, U., and Weiner, S. (1994). Ultrastructural studies of bones from patients with osteogenesis imperfecta. *Matrix Biol.* 14, 337–345.

Trejo, P., and Rauch, F. (2016). Osteogenesis imperfecta in children and adolescents-new developments in diagnosis and treatment. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA.*

Turner, C.H., Rho, J., Takano, Y., Tsui, T.Y., and Pharr, G.M. (1999). The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J. Biomech.* 32, 437–441.

Turunen, M.J., Saarakkala, S., Rieppo, L., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S., and Isaksson, H. (2011). Comparison between infrared and Raman spectroscopic analysis of maturing rabbit cortical bone. *Appl. Spectrosc.* 65, 595–603.

Uveges, T.E., Collin-Osdoby, P., Cabral, W.A., Ledgard, F., Goldberg, L., Bergwitz, C., Forlino, A., Osdoby, P., Gronowicz, G.A., and Marini, J.C. (2008). Cellular Mechanism of Decreased Bone in Brtl Mouse Model of OI: Imbalance of Decreased Osteoblast Function and Increased Osteoclasts and Their Precursors. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1983–1994.

Valcourt, U., Merle, B., Gineyts, E., Viguet-Carrin, S., Delmas, P.D., and Garnero, P. (2007). Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J. Biol. Chem.* 282, 5691–5703.

Van Dijk, F.S., Pals, G., Van Rijn, R.R., Nikkels, P.G.J., and Cobben, J.M. (2010). Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 1–5.

Vanderoost, J., and van Lenthe, G.H. (2014). From histology to micro-CT: Measuring and modeling resorption cavities and their relation to bone competence. *World J Radiol* 6, 643–656.

Vanleene, M., Porter, A., Guillot, P.-V., Boyde, A., Oyen, M., and Shefelbine, S. (2012). Ultra-structural defects cause low bone matrix stiffness despite high mineralization in osteogenesis imperfecta mice. *Bone* 50, 1317–1323.

Vardakastani, V., Saletti, D., Skalli, W., Marry, P., Allain, J.M., and Adam, C. (2014). Increased intra-cortical porosity reduces bone stiffness and strength in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. *Bone* 69, 61–67.

Varghese, B.J., Aoki, K., Shimokawa, H., Ohya, K., and Takagi, Y. (2006). Bovine deciduous dentine is more susceptible to osteoclastic resorption than permanent dentine: results of quantitative analyses. *J. Bone Miner. Metab.* *24*, 248–254.

Vaughan, T.J., McCarthy, C.T., and McNamara, L.M. (2012). A three-scale finite element investigation into the effects of tissue mineralisation and lamellar organisation in human cortical and trabecular bone. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* *12*, 50–62.

Venturi, G., Monti, E., Dalle Carbonare, L., Corradi, M., Gandini, A., Valenti, M.T., Boner, A., and Antoniazzi, F. (2012). A novel splicing mutation in FKBP10 causing osteogenesis imperfecta with a possible mineralization defect. *Bone* *50*, 343–349.

Verborgt, O., Gibson, G.J., and Schaffler, M.B. (2000). Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling After Fatigue In Vivo. *J. Bone Miner. Res.* *15*, 60–67.

Wagermaier, W., Klaushofer, K., and Fratzl, P. (2015). Fragility of Bone Material Controlled by Internal Interfaces. *Calcif. Tissue Int.* 1–12.

Wallace, J.M., Golcuk, K., Morris, M.D., and Kohn, D.H. (2009). Inbred Strain-Specific Effects of Exercise in Wild Type and Biglycan Deficient Mice. *Ann. Biomed. Eng.* *38*, 1607–1617.

Wang, C., Wang, Y., Huffman, N.T., Cui, C., Yao, X., Midura, S., Midura, R.J., and Gorski, J.P. (2009). Confocal Laser Raman Microspectroscopy of Biomineralization Foci in UMR 106 Osteoblastic Cultures Reveals Temporally Synchronized Protein Changes Preceding and Accompanying Mineral Crystal Deposition. *J. Biol. Chem.* *284*, 7100–7113.

Wang, J., Liu, Y., Song, L., Lv, F., Xu, X., San, A., Wang, J., Yang, H., Yang, Z., Jiang, Y., et al. (2017). Novel Mutations in SERPINF1 Result in Rare Osteogenesis Imperfecta Type VI. *Calcif. Tissue Int.* *100*, 55–66.

Wang, X., Shen, X., Li, X., and Mauli Agrawal, C. (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* *31*, 1–7.

Wang, Y., Azaïs, T., Robin, M., Vallée, A., Catania, C., Legriel, P., Pehau-Arnaudet, G., Babonneau, F., Giraud-Guille, M.-M., and Nassif, N. (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat. Mater.* *11*, 724–733.

Ward, L., Bardai, G., Moffatt, P., Al-Jallad, H., Trejo, P., Glorieux, F.H., and Rauch, F. (2016). Osteogenesis Imperfecta Type VI in Individuals from Northern Canada. *Calcif. Tissue Int.* 1–7.

Weber, M., Roschger, P., Fratzl-Zelman, N., Schöberl, T., Rauch, F., Glorieux, F.H., Fratzl, P., and Klaushofer, K. (2006). Pamidronate does not adversely affect bone intrinsic material properties in children with osteogenesis imperfecta. *Bone* *39*, 616–622.

Weis, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.-J., and Eyre, D.R. (2010). Location of 3-Hydroxyproline Residues in Collagen Types I, II, III, and V/XI Implies a Role in Fibril Supramolecular Assembly. *J. Biol. Chem.* *285*, 2580–2590.

- Yamada, S., Tadano, S., Fujisaki, K., and Kodaki, Y. (2013). Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur. *J. Biomech.* *46*, 31–35.
- Yamamoto, T., Uchida, K., Naruse, K., Suto, M., Urabe, K., Uchiyama, K., Suto, K., Moriya, M., Itoman, M., and Takaso, M. (2012). Quality assessment for processed and sterilized bone using Raman spectroscopy. *Cell Tissue Bank.* *13*, 409–414.
- Yao, X., Carleton, S.M., Kettle, A.D., Melander, J., Phillips, C.L., and Wang, Y. (2013). Gender-dependence of bone structure and properties in adult osteogenesis imperfecta murine model. *Ann Biomed Eng* *41*, 1139–1149.
- Yavorsky, A., Hernandez-Santana, A., McCarthy, G., and McMahon, G. (2008). Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis – analytical approaches and challenges. *The Analyst* *133*, 302–318.
- Yeni, Y.N., Yerramshetty, J., Akkus, O., Pechey, C., and Les, C.M. (2006). Effect of Fixation and Embedding on Raman Spectroscopic Analysis of Bone Tissue. *Calcif. Tissue Int.* *78*, 363–371.
- Yerramshetty, J.S., and Akkus, O. (2008). The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone* *42*, 476–482.
- Yerramshetty, J., Kim, D.-G., and Yeni, Y.N. (2009). Increased microstructural variability is associated with decreased structural strength but with increased measures of structural ductility in human vertebrae. *J. Biomech. Eng.* *131*, 094501.
- Yerramshetty, J.S., Lind, C., and Akkus, O. (2006). The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone* *39*, 1236–1243.
- Yovich, S., Seydel, U., Papadimitriou, J.M., Nicholson, G.C., Wood, D.J., and Zheng, M.H. (1998). Evidence that failure of osteoid bone matrix resorption is caused by perturbation of osteoclast polarization. *Histochem. J.* *30*, 267–273.
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* *13*, 791–801.
- Zebaze, R.M.D., Jones, A.C., Pandy, M.G., Knackstedt, M.A., and Seeman, E. (2011). Differences in the degree of bone tissue mineralization account for little of the differences in tissue elastic properties. *Bone* *48*, 1246–1251.
- Zeitlin, L., Rauch, F., Travers, R., Munns, C., and Glorieux, F.H. (2006). The effect of cyclical intravenous pamidronate in children and adolescents with osteogenesis imperfecta Type V. *Bone* *38*, 13–20.
- Zhang, H., Doty, S.B., Hughes, C., Dempster, D., and Camacho, N.P. (2007). Increased Resorptive Activity and Accompanying Morphological Alterations in Osteoclasts Derived From the Oim/Oim Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta. *J. Cell. Biochem.* *102*, 1011–1020.
- Zhao, J., Lui, H., McLean, D.I., and Zeng, H. (2007). Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* *61*, 1225–1232.

Zysset, P.K., Edward Guo, X., Edward Hoffler, C., Moore, K.E., and Goldstein, S.A. (1999). Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J. Biomech.* 32, 1005–1012.

Table des illustrations

<i>Figure 1-1 Organisation d'un os long au niveau macroscopique (Histology Atlas, by Yves Clermont, Michael Lalli & Zsuzsanna Bencsath-Makkai)</i>	<i>15</i>
<i>Figure 1-2 Organisation de l'épiphyse d'un os long autour des canaux de Havers et de Volkmann (Cowin and Cardoso, 2015)</i>	<i>16</i>
<i>Figure 1-3 Organisation en lamelles de directions différentes des fibrilles de collagène minéralisé (extrait de Weiner (Weiner et al., 1999)).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 1-4 Organisation d'une fibre de collagène au sein de l'ostéon au niveau nanoscopique (Rho et al., 1998)</i>	<i>18</i>
<i>Figure 1-5 Représentation des six niveaux d'organisation de l'os lui permettant de remplir chacun de ses rôles : de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. (Rho et al., 1998).....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 1-6 Courbe typique de l'os avec les différentes caractéristiques mécaniques : module de Young, limite d'élasticité, ténacité, contrainte ultime, contrainte et déformation à la rupture</i>	<i>20</i>
<i>Figure 1-7 Localisation du modelage et du remodelage osseux, coupe transversale de la diaphyse d'un os long</i>	<i>23</i>
<i>Figure 1-8 Schéma du cycle de remodelage osseux, représentant les différentes cellules et marqueurs sanguins l'influençant (Dominguez et al., 2011)</i>	<i>25</i>
<i>Figure 1-9 : Photos représentant le célèbre pianiste de jazz Michel Petrucciani, plus petite mère du monde Stacey Herald et jeune réalisatrice Leopoldine H Despointes, ces trois personnes ont en commun de souffrir d'ostéogénèse imparfaite.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 1-10 Modélisation des molécules de collagène normale (haut) et d'une souris modèle d'OI oim (bas) (Li et al., 2016) Sur chaque partie en haut, la molécule de collagène seule, puis l'assemblage des molécules les unes avec les autres pour former une fibrille, puis la même fibrille vu sur une période propre de l'agencement des molécules de collagène. Sur la modélisation oim, on peut remarquer la plus grande courbure de la protéine ce qui se traduit au niveau de l'arrangement fibrillaire par une région de gap plus importante dans laquelle peuvent se former plus de cristaux d'hydroxyapatite.</i>	<i>33</i>
<i>Figure 1-11 Différence entre l'hyperminéralisation des os OI et leur largeur(Fratzl-Zelman et al., 2014) Co : Contrôle, OI : ostéogénèse imparfaite</i>	<i>33</i>
<i>Figure 1-12 Coupe transversale d'os corticaux de patient sain (gauche) et OI (droite): les ostéons d'OI ont des formes peu circulaires qui concentrent les contraintes. Echelle 200µm</i>	<i>35</i>
<i>Figure 1-13 Radiographie d'un patient atteint d'une forme sévère d'OI, on observe la déformation des os longs</i>	<i>36</i>
<i>Figure 1-14 Clou d'allongement au niveau des fémurs</i>	<i>37</i>
<i>Figure 1-15 Stries typiques dues aux traitements aux BP visibles au niveau des genoux du patient</i>	<i>39</i>
<i>Figure 2-1 Principe de la Tomographie par rayon-X.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 2-2 Images en coupe obtenues par tomographie à rayon X</i>	<i>47</i>
<i>Figure 2-3 Histogramme de l'image MEB avant (en rouge) et après calibration (en bleu).....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 2-4 Différents éléments d'un nano-indenteur</i>	<i>50</i>

Figure 2-5 Cycle de charge et de décharge d'un nano-indenteur. P_{max} est la charge maximale d'indentation ; h_{max} la profondeur atteinte par l'indent à P_{max} ; h_f la profondeur de l'empreinte de l'indent après la décharge complète de l'échantillon ; S : rigidité de décharge.	51
Figure 2-6 Principe de la mesure du module de Young de manière continue (CSM) La charge augmente régulièrement tout en étant sollicitée de manière harmonique.	52
Figure 2-7 Hierarchical structural organization of bone (reprinted authorized by Rho et al., 1998). Hierarchical structural organization of bone, from bigger to smaller structures: cortical and cancellous bone; osteons with the Haversian systems; lamellae; collagen and mineral platelets.	56
Figure 2-8 The structure at a nanometre scale (reprinted authorized by Rho et al., 1998). The structure of collagen fibrils and platelets of carbonated hydroxyapatite.....	57
Figure 2-9 Information provided by Raman spectroscopy Raman spectrum provides a fingerprint of molecules and bonds that are present in the sample : Raman spectrum provides a fingerprint of molecules and bonds that are present in the sample:.....	59
Figure 2-10 Sketch of the smallest collagen motif. Structure of the smallest collagen molecule motif. i) C=O bonds are perpendicular to the collagen molecular axis. ii) C-N bonds are either parallel to the collagen molecular axis and perpendicular to it in the proline and hydroxyproline groups.	60
Figure 2-11 Typical Raman spectrum of bone tissue after baselining and filtering showing the main bands between 750 and 1800 cm^{-1} : the 960 cm^{-1} band corresponds to phosphate, the 1075 cm^{-1} band corresponds to the type B carbonate, the large 1250 cm^{-1} band corresponds to the Amide III band, and the large 1667 cm^{-1} band corresponds to the Amide I band.	63
Figure 3-1 Schéma de l'organisation hiérarchique du collagène. (Li et al., 2016).....	82
Figure 3-2 Transformations subies par les tropocollagènes, avec le rôle de chacune des protéines dans ces modifications (Kang et al., 2016), plus particulièrement CRTAP, P3H1 et FKBP10.	84
Figure 3-3 Schéma détaillant le rôle supposé de la protéine PEDF dans la minéralisation des os et dans leur vascularisation (Kang et al., 2016). Des signaux transmis par la protéine BRIL entraînent l'expression de PEDF, qui inhibe l'expression de VEGF chez les ostéoblastes en bloquant le signal Wtn. Ce faisant, BRIL régule l'activité entre PEDF et VEGF dans l'os.	86
Figure 3-4 Récapitulatif graphique des résultats obtenus. La maturité du collagène, la porosité, la cristallinité, le ratio de minéral sur la matrice, le ratio du module de Young sur la dureté, le ratio du module de Young sur la dureté sur le ratio MMR et l'intensité du pic d'amide I sont significativement différentes (*, $p<0.05$).	89
Figure 3-5 Ratio Module de Young sur dureté, significativement différents entre les groupes OI et CT.....	90
Figure 3-6 Récapitulatif graphique des résultats obtenus. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Les résultats des échantillons de type OI VII et VIII sont dans la fourchette des valeurs des échantillons de Type OI III.	92
Figure 3-7 CT versus groupe OI type III, VII et VIII. (*, $p<0.05$).....	94
Figure 3-8 Récapitulatif graphique des résultats obtenus en comparant les échantillons de type OI VI et XI au groupe formé par les échantillons d'OI type III, VII et VIII. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Sont entourés en rouge les résultats qui semblent supérieurs à la moyenne plus la déviation standard des	

échantillons de type OI III, VII et VIII, en bleu ceux qui semblent inférieur à la moyenne moins la déviation standard	96
Figure 3-9 Récapitulatif graphique des résultats obtenus en comparant les échantillons de type OI VI et XI aux échantillons contrôle. Aucun résultat n'a pu être testé statistiquement. Sont entourés en rouge les résultats qui semblent supérieurs à la moyenne plus la déviation standard des échantillons contrôle, en bleu ceux qui semblent inférieur à la moyenne moins la déviation standard	99
Figure 3-10 Corrélation E/H et MMR	100
Figure 4-1 Experimental design. The surface of each bone sample was characterized before seeding mature osteoclasts. First, nanoindentation and interferometer, respectively, provided local mechanical properties values and surface topography before resorption, respectively (Figure 1a). In parallel, monocytes from human donors were extracted from peripheral blood and differentiated into osteoclasts. Then, osteoclasts were seeded on each sample in an optimal medium for osteoclast activity. After 72 h, osteoclasts were stained with TRAP, counted and removed from the bone surface (Figure 1b). Next, the resorbed bone sample was stained by toluidine blue to determine the resorbed areas (intense violet). Analysis of the surface topography after resorption was carried out by interferometry on the same areas that were characterized before osteoclasts seeding. The variation of z (μm) at each point was measured and the mineral properties were characterized by Raman spectroscopy (Figure 1c).	117
Figure 4-2 Comparison of the resorption profile between bovine plexiform cortical bone and human haversian bone. Human osteoclasts were cultivated for 72h on samples of bovine cortical bone (a) and human bone (b), in the presence of MCSF (macrophage colony-stimulated factor) and RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand). Cells removal and staining with toluidine blue (staining of naked collagen fibers) allows – using tangential light - to visualize resorption lacunae created by osteoclasts. (a) Observation of resorbed bovine plexiform bone reveals the random distribution of small lacunae called “pits” (arrow). (b) Resorption of human haversian cortical bone reveals the resorption of some osteons (white arrow) but not others (star). Enlarged area corresponds to a zoom of arrow zone.	122
Figure 4-3 Human osteoclasts resorb specific human cortical bone osteons. (a) Control: human cortical bone stained with toluidine blue observed using tangential light in the absence of osteoclast culture. Staining is weak and homogeneous within the osteons. (b) (c) (d) After culture of human osteoclasts for 72 h on human cortical bone samples, osteoclasts resorbed some osteons (arrow), but not neighbouring osteons (star). The same resorption profile was observed for all of the human bone donors: (b) donor 1 (c) donor 2- (d) donor 3 and for all of the samples studied.	123
Figure 4-4 Human osteoclasts specifically resorb osteons that have a poor mineral content. Comparison of the same human cortical bone area with different approaches showed a correlation between mineral content and localization and depth of resorption.(a) Interferometry measurements before and after resorption of the same bone area allow a representation after treatment to be obtained with MATLAB software with a z variation (Δz) before and after resorption (μm). The red colour scale indicates the resorption areas, whereas the blue colour scale indicates no resorption. (b) Toluidine blue staining of a sample after resorption, which colours collagen fibres, specifically the naked ones resulting from osteoclast activity. The intense toluidine blue staining is	

<i>localized to the resorbed areas, and loss of matter is underlined with tangential light. (c) Backscattered SEM imaging of each samples before resorption reflected the degree of mineralization of each osteon. Mineralization differed from one osteon to another and from interstitial bone. The darkest osteons (arrow) correspond to youngest osteons with the lowest mineralization level. Therefore, the least mineralized areas (arrow) correspond to the most resorbed osteon (arrow).</i>	124
<i>Figure 4-5 Ostéoclastes plurinucléés, après 3 jours d'ensemencement dont les cytoplasmes ayant exprimé l'enzyme TRAP sont colorés. Les précurseurs des ostéoclastes sont encore fusiformes (Echelle, 100µm)</i>	133
<i>Figure 4-6 Nombre cumulé d'ostéons résorbés en fonction du temps d'ensemencement</i>	134
<i>Figure 4-7 Cellules différenciées et cultivées pendant 3 jours, colorées au TRAP. En rouge sont entourées les cellules ayant plus de trois noyaux, considérées comme des ostéoclastes matures sur l'os humain. Echelle= 100µm</i>	135
<i>Figure 4-8 Développement des ostéoclastes en fonction du temps</i>	136
<i>Figure 4-9 Capacité d'ostéons résorbés par ostéoclastes en fonction du temps</i>	136
<i>Figure 4-10 Modules de Young des zones résorbées et non résorbées (*, $p < 0,05$)</i>	138
<i>Figure 4-11 Évolution du module de Young des zones résorbées en fonction du temps d'ensemencement. Les zones résorbées à 3h et à 12h ne correspondaient pas à des zones testées auparavant, ce qui explique leur absence du graphique.</i>	139
<i>Figure 4-12 Sur le schéma ci-dessus, les petits ronds inclus dans le grand ovale sont des ostéons .Le grand oval représente le tissu cortical. Plus les ostéons sont foncés, plus ils sont minéralisés et plus leur module de Young est élevé. Les ostéons résorbés sont colorés en violet foncé Les ostéoclastes résorbent en priorité les ostéons au module de Young le plus faible, le moins minéralisé, puis progressivement s'attaquent aux ostéons les plus minéralisés .</i>	141
<i>Figure 4-13 Différences de vitesse entre la collagenolyse et la déminéralisation et implication sur le comportement migratoire des ostéoclastes. Si déminéralisation et collagenolyse ont lieu à des vitesses équivalentes, l'ostéoclastes aura tendance à résorber en continu et en migrant. Si la vitesse de déminéralisation est très supérieure à celle de la collagénolyse alors l'ostéoclaste ne résorbera que par intermittence et aura tendance à plus migrer. (schéma d'après Sjøe (Sjøe, 2013))</i>	142
<i>Figure 5-1 a, b, c: Pictures taken of the cells colored in purple with TRAP staining. In the cytoplasm of the cells, the number of nucleus can be counted. Scale bar = 100µm d, e, f: Bone colored with Tolluidine blue. Darker zones with a white border are resorbed zone Scale bar = 200µm</i>	153

Table des tableaux

<i>Tableau 1-1 Module de Young d'os corticaux humains adultes obtenus par nanoindentation. (SD) standard déviation ; (TI) tissu interstitiel.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 1-2 : Types d'ostéogénèse imparfaite classés par mutations et types de défauts ; Abréviations AD autosomale dominante, AR, autosomale récessive, XR récessive liée à X (Kang et al., 2016)</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 3-1 Paramètres d'acquisition de la tomographie à rayon X</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 3-2 Données patients, mutation les touchant et type OI génétique auquel ils sont rattachés, ainsi que les caractéristiques des patients contrôles (Kang et al., 2016)</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 4-1 Mechanical and mineral properties of each sample were analysed by nanoindentation and Raman spectroscopy. The Young's modulus and hardness values for each sample correspond to a mean value of 81 indents, and the mineral to matrix ratios, crystallinity and carbonate substitution rate correspond to a mean value of 30 points. Three human bone donors were used in this study</i>	<i>119</i>
<i>Tableau 4-2 Topographic analysis of the human cortical bone resorption profile. Each cortical bone sample was analysed by interferometry before and after resorption. Comparison of the topographic data allowed the quantification of resorbed areas delta z (µm) and resorbed surface percentage.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 4-3 Human osteoclasts resorb target areas with the lowest mechanical properties. Values of nanoindentation measurements obtained before resorption were superimposed on the toluidine blue resorption image obtained after resorption. Thus, each measurement was determined as a future resorbed area or unresorbed area. Osteoclasts preferentially resorbed areas with the lowest Young's modulus and hardness values. Statistics: (Mann-Whitney U-test).....</i>	<i>125</i>
<i>Tableau 4-4 Osteoclasts preferentially resorbed areas that had the lowest mineral content, contained small crystals, and whose maturation was the most advanced. The bone mineral characteristics were obtained with RAMAN microspectroscopy. The mineral/matrix ratios reflect the rates of mineralization, crystallinity reflects the size of the crystal, and the rate of carbonate substitution reflects the mineral maturation. Each value corresponds to a mean value of 9 samples, with 15 measurements per sample. Osteoclasts preferentially resorbed areas with the lowest levels of mineralization, the smallest crystals and areas with the highest rates of carbonate substitution. Statistics: (Mann-Whitney U-test).</i>	<i>126</i>
<i>Tableau 4-5 Caractéristiques des donneurs sanguins</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 4-6 Résumé des techniques utilisées pour les deux études.</i>	<i>133</i>
<i>Tableau 5-1 Mechanical and structural properties of the three groups.</i>	<i>152</i>