

Approche multimodale d'analyse des adaptations osseuses *ex-vivo*

par

Annie LEVASSEUR

THÈSE PRÉSENTÉE À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DU
DOCTORAT EN GÉNIE
Ph. D.

MONTRÉAL, LE 20 FÉVRIER 2020

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Annie Levasseur, 2020



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CETTE THÈSE A ÉTÉ ÉVALUÉE

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Yvan Petit, directeur de thèse
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Mme Heidi-Lynn Ploeg, codirectrice de thèse
Department of Mechanical and Material Engineering at Queen's University

Mme Nicola Hagemeister, présidente du jury
Département de génie de la production automatisée à l'École de technologie supérieure

Mme Sophie Lerouge, membre du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Mme. Isabelle Villemure, membre externe indépendant du jury
Département de génie mécanique à Polytechnique Montréal

M. Mohamed Benderdour, membre externe
Département de chirurgie à l'Université de Montréal

ELLE A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 18 DÉCEMBRE 2019

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

Never never never give up.

N'abandonnez jamais, jamais, jamais.

Winston Churchill

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur ainsi que ma codirectrice de recherche de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissée prendre en charge la réalisation de ce projet. Merci Yvan PETIT pour tes conseils constructifs et judicieux. Il n'y a rien de mieux qu'un passage à ton bureau pour se faire ramener sur le droit chemin. Merci Heidi-Lynn PLOEG pour ton soutien. Malgré la distance, je savais qu'il était toujours possible de compter sur toi. Ce fut un privilège d'évoluer sous votre direction et de partager votre passion pour la recherche.

Dans un deuxième temps, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet. Merci à Mohamed BENDERDOUR, Francis VALLIÈRES, Julio FERNANDES, et Quin SHI du Laboratoire de Recherche en Orthopédie de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal de m'avoir ouvert les portes sur un nouveau monde. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour votre accueil et votre patience. Le passage d'ingénieurs dans un laboratoire de culture cellulaire n'est pas toujours de tout repos. C'est une source de contamination !!!

Merci Sylvain NICHOLS, Marco BOSA ainsi qu'à tous les propriétaires d'animaux qui ont malheureusement eu à séjourner au centre hospitalier universitaire vétérinaire de Saint-Hyacinthe, pour les dons d'échantillons. Votre collaboration fut essentielle à la réalisation du projet.

Merci Irène LONDONO, du centre de recherche du CHU Sainte-Justine, pour ton aide lors de l'imagerie des échantillons. Ton dévouement et ta grande disponibilité pour nous accommoder lors du démarrage d'une culture furent grandement appréciés.

Merci à Éric MARCOUX, Louis-David ARCHAMBEAULT, Mario CORBIN, et Simon LAFLAMME, tous membres du personnel de soutien à l'École de technologie supérieure. Vos conseils, recommandations et services rendus ont contribué à faciliter le parcours.

VIII

Merci à tous les étudiants du LIO-HSCM pour leur soutien. Qui de mieux placés que des collègues pour comprendre et partager les hauts et les bas auxquels nous sommes confrontés. Un merci particulier à Florian GUILLAUME mon binôme. Tout aurait été très différent sans ton aide lors des fameuses nuits blanches de mise en culture. Ton esprit critique et rationnel m'a également beaucoup aidée à me structurer et à ne pas trop m'éloigner de l'essentiel. Merci également à Lucien DIOTALEVI, assistant de recherche au LIO-HSCM, pour tes précieux conseils qui m'ont permis de dompter et venir à bout d'ARAMIS.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue au cours des dernières années. Merci pour tout. Je vous suis sincèrement reconnaissante.

Approche multimodale d'analyse des adaptations osseuses *ex-vivo*

Annie LEVASSEUR

RÉSUMÉ

La culture *ex-vivo* est une méthode expérimentale qui consiste à maintenir en vie des tissus biologiques hors de leur milieu physiologique d'origine. Des échantillons sont prélevés de donneurs et placés dans un bioréacteur qui vise à reproduire un environnement similaire à celui rencontré dans l'organisme vivant. Cette méthode expérimentale a pour avantage de permettre la réalisation d'essais et de mesures qu'il serait autrement impossible d'effectuer directement sur des sujets vivants pour des raisons éthiques ou techniques.

La culture *ex-vivo* est utilisée notamment pour étudier les modifications de l'os trabéculaire en réponse à l'application d'une stimulation mécanique. Contrairement aux expérimentations *in-vivo*, qui sont réalisées sur des modèles animaux vivants, la culture *ex-vivo* permet une étude plus approfondie du tissu en contrôlant l'environnement dans lequel il évolue. Cependant, la caractérisation des changements subis lors de la culture a été identifiée comme étant un aspect à améliorer dans la mise en place de ce type d'expérimentation. La combinaison de multiples méthodes de mesure pour documenter les changements subis durant la période de culture est une approche rarement utilisée, malgré le fait qu'il soit reconnu important dans la littérature de considérer plusieurs facteurs pour évaluer la qualité osseuse.

L'objectif de cette thèse est de valider l'hypothèse que le suivi des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo* peut être amélioré par la combinaison de multiples modalités de mesure. Pour ce faire, un modèle de culture *ex-vivo* a été utilisé pour générer des adaptations osseuses par l'application d'un chargement mécanique. En raison de leur caractère non destructif et de leur haut niveau de résolution, la corrélation d'images et la micro-tomographie à rayons X ont été identifiées comme étant des méthodes de mesure potentielles pour caractériser l'évolution des échantillons durant la période de culture. Préalablement à leur utilisation, une série d'expérimentations a été effectuée pour évaluer la capacité de ces méthodes à détecter des modifications du tissu osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*. Les résultats ont montré la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayons X pour détecter, suite à une période de culture de 14 jours, des modifications osseuses supérieures au seuil de sensibilité de mesure de la méthode. Quant à la corrélation d'images, les résultats ont démontré la possibilité d'utiliser cette méthode de mesure, sans application d'un motif stochastique à base de peinture potentiellement nuisible à l'intégrité des échantillons, pour caractériser le comportement mécanique d'échantillons osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*. Une fois les méthodes de caractérisation mises en place, une analyse multimodale des adaptations osseuses issues d'une culture *ex-vivo* a été réalisée. Les résultats ont montré que la complémentarité des changements mesurés par micro-tomographie à rayons X et par corrélation d'images, de même que la prise en considération des adaptations locales plutôt que globales, améliorent l'interprétation des résultats d'adaptation issus de la culture.

À terme, ce projet doctoral a contribué à l'avancement des connaissances relativement à la caractérisation des adaptations osseuses dans le cadre de culture *ex-vivo*. Sa réalisation a permis de démontrer la possibilité d'améliorer le suivi de l'évolution d'échantillons osseux par la combinaison de multiples modalités de mesure. L'utilisation d'une approche multimodale aura pour répercussion d'étendre les champs d'application de la culture *ex-vivo* et ainsi faire progresser les connaissances relativement au comportement du tissu osseux. La culture *ex-vivo* pourra éventuellement être utilisée pour étudier de nombreux phénomènes liés au processus de remodelage osseux dont la croissance, la résorption, l'ostéoporose, le renforcement osseux dû à l'application de mise en charge, l'incidence de fracture, l'ostéointégration, etc.

Mots clés : culture *ex-vivo*, adaptations osseuses, micro-tomographie à rayons X, corrélation d'images, analyse multimodale, os trabéculaire

Multimodal approach for the analysis of *ex-vivo* bone adaptations

Annie LEVASSEUR

ABSTRACT

Ex vivo culture is an experimental method that consists to keep biological tissues alive outside their original physiological environment. Samples are taken from donors and placed in a bioreactor that aims to reproduce an environment similar to that of the living organism. The advantage of this experimental method is to allow tests and measurements that would otherwise be impossible to carry out directly on living subjects for ethical or technical reasons.

Ex vivo culture is particularly used to study changes in the trabecular bone in response to the application of mechanical loading. Unlike *in-vivo* experiments, which are carried out on live animal models, *ex-vivo* culture allows a deeper study of the tissue by controlling the environment in which it evolves. However, the characterization of changes has been identified as an area to be improved in the implementation of this type of experimentation. The combination of multiple measurement methods to document changes during the culture period is rarely used, despite the fact that it is recognized important in the literature to consider several factors to assess bone quality.

The objective of this thesis is to validate the hypothesis that the monitoring of bone adaptations from *ex vivo* culture can be improved by combining multiple measurement modalities. To do this, an *ex-vivo* culture model was used to generate bone adaptations by applying mechanical loading to trabecular bone. Due to their non-destructive nature and high resolution, digital image correlation and X-ray micro-tomography have been identified as potential measurement methods to characterize the evolution of samples during the culture period. Prior to their use, a series of experiments were carried out to evaluate their ability to detect changes in bone tissue in an *ex vivo* culture context. The results showed the possibility of using X-ray micro-tomography to detect, after a 14-day culture period, bone changes above the sensitivity threshold of the method. As for digital image correlation, the results demonstrated the possibility of using this measurement method without the application of a stochastic paint pattern detrimental to the integrity of the samples, and to characterize the mechanical behaviour of bone samples in an *ex vivo* culture context. Once the characterization methods were implemented, a multimodal analysis of bone adaptations from an *ex vivo* culture was performed. The results showed that the complementarity of changes measured by X-ray micro-tomography and digital image correlation, as well as the consideration of local rather than global adaptations, improve the interpretation of bone adaptations.

Ultimately, this project contributed to the advancement of knowledge regarding the characterization of bone adaptations in *ex vivo* culture. Its realization proved possible to improve the monitoring of bone samples evolution by combining multiple measurement methods. The use of a multimodal approach will have the effect of expanding the scope of application of *ex-vivo* culture and thus advancing knowledge about bone tissue behaviour. *Ex-vivo* culture may eventually be used to study many phenomena related to the bone remodeling

process including growth, resorption, osteoporosis, bone reinforcement due to external load application, fracture incidence, osseointegration, etc.

Keywords: *ex-vivo* culture, bone adaptations, X-ray micro-tomography, digital image correlation, multimodal analysis, trabecular bone

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DES CONNAISSANCES	3
1.1 Tissus osseux	3
1.1.1 Structures et composition.....	3
1.1.2 Remodelage osseux.....	4
1.2 Culture osseuse <i>ex-vivo</i>	6
1.2.1 Modèles de culture osseuse.....	7
1.2.2 Outils et méthodes de culture.....	9
1.3 Outils et méthodes de caractérisation de la qualité osseuse.....	14
1.3.1 Densité osseuse	14
1.3.2 Microstructure.....	16
1.3.3 Propriétés mécaniques	20
CHAPITRE 2 PROBLÉMATIQUE DE RECHERCHE	25
2.1 Problématique	25
2.2 Hypothèse et objectifs.....	26
CHAPITRE 3 BIOREACTEUR MULTIFONCTIONNEL	29
3.1 Exigences	29
3.2 Configurations.....	30
3.2.1 Culture osseuse	30
3.2.2 Acquisition d'images micro-CT	34
CHAPITRE 4 UTILISATION DE LA CORRÉLATION D'IMAGES DANS UN CONTEXTE DE CULTURE OSSEUSE <i>EX-VIVO</i>	37
4.1 Matériel et méthodes.....	37
4.2 Résultats.....	41
4.3 Discussion.....	51
CHAPITRE 5 VALIDATION DE L'UTILISATION DE LA MICRO-TOMOGRAPHIE À RAYONS X DANS UN CONTEXTE DE CULTURE <i>EX-VIVO</i>	53
5.1 Matériel et méthodes.....	53
5.2 Résultats.....	61
5.3 Discussion.....	65
CHAPITRE 6 ÉVALUATION MULTIMODALE DES ADAPTATIONS OSSEUSES ISSUES DE CULTURE <i>EX-VIVO</i>	67
6.1 Matériel et méthodes.....	67
6.2 Résultats.....	69
6.3 Discussion.....	79

CHAPITRE 7 DISCUSSION	83
CONCLUSION	91
RECOMMANDATIONS	93
ANNEXE I QUALITÉ DE SURFACE DES ÉCHANTILLONS	99
ANNEXE II PREUVE DE SOUMISSION D'ARTICLE	101
BIBLIOGRAPHIE	103

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1-1	Composition de milieux de culture recensés dans la littérature.....13
Tableau 1-2	Paramètres structuraux de l'os trabéculaire18
Tableau 1-3	Résultats changements structuraux mesurés par micro-tomographie à rayons X.....19
Tableau 5-1	Variation de mesure et erreur de précision obtenus pour les échantillons du groupe contrôle.61
Tableau 5-2	Changements de mesure de densités et de paramètres structuraux obtenus pour chaque échantillon du groupe non-stimulé et stimulé.....64
Tableau-A I-1	Tolérance de planéité et angle d'inclinaison des surfaces de coupe d'échantillons d'os trabéculaire bovins99

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1-1	Schématisation de l'os cortical et de l'os trabéculaire.....	4
Figure 1-2	Représentation schématique du processus de remodelage osseux.....	5
Figure 1-3	Modèles de culture osseuses <i>ex-vivo</i> et leur application.....	8
Figure 1-4	Types d'os utilisés chez les rongeurs pour la culture osseuse <i>ex-vivo</i>	9
Figure 1-5	Utilisation de plaque de puits pour la culture <i>ex-vivo</i>	10
Figure 1-6	Exemple de bioréacteurs à perfusion utilisés afin d'étudier <i>ex-vivo</i> la réponse physiologique de l'os trabéculaire à l'application de la charge mécanique	11
Figure 1-7	Influence de l'intensité de chargement sur le développement du tissu osseux par une augmentation marquée des ostéoïdes et de la rigidité	14
Figure 1-8	Méthodes d'imageries utilisées pour la caractérisation à différentes échelles de la microstructure de l'os	17
Figure 1-9	Modes de chargement utilisés pour mesurer les propriétés mécaniques ...	21
Figure 1-10	Module de Young d'échantillons osseux issus de culture <i>ex-vivo</i>	21
Figure 1-11	Exemples d'échantillons avec motif stochastique: a) vertèbre porcine, b) tendon d'Achille humain	22
Figure 2-1	Structure de la thèse en fonction de l'approche méthodologique utilisée	27
Figure 3-1	Bioréacteur assemblé en configuration de culture osseuse.....	30
Figure 3-2	Vue explosée de l'enceinte de culture sans capot.....	31
Figure 3-3	Liaison linéaire-annulaire qui permet à la tige de compression de s'incliner en présence de surface présentant des irrégularités	32
Figure 3-4	Montage expérimental utilisé pour solliciter mécaniquement les échantillons	33

Figure 3-5	Enceinte de culture assemblée en configuration pour l'acquisition d'images micro-CT	34
Figure 3-6	Vue explosée de la chambre de culture en configuration pour l'acquisition d'images micro-CT	35
Figure 4-1	Étapes effectuées pour la préparation des échantillons : a) extraction, b) fraisage, c) coupe.....	38
Figure 4-2	Plan d'expérience.....	39
Figure 4-3	Montages expérimentaux utilisés pour la sollicitation mécanique des échantillons	40
Figure 4-4	Comparaison de la commande de déplacement moyen donnée à l'appareil de tests mécanique et les déplacements moyens des cinq échantillons mesurés avec les deux systèmes de mesure a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$)	42
Figure 4-5	Exemples de la distribution des déplacements mesurés par corrélation d'images avec et sans motif stochastique à base de peinture pour deux des échantillons sollicités mécaniquement entre les plateaux de compression	43
Figure 4-6	Exemples de la distribution des déplacements mesurés par corrélation d'images avec et sans motif stochastique à base de peinture pour deux des échantillons sollicités mécaniquement dans l'enceinte de culture	44
Figure 4-7	Comparaison de la mesure de déplacement moyen des cinq échantillons obtenue par corrélation d'images avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$)	45
Figure 4-8	Distribution des déformations calculées par corrélation d'images avec et sans motif stochastique pour deux des cinq échantillons lors de sollicitations mécaniques entre les plateaux de compression. La référence est obtenue préalablement à l'application de la précharge.....	47
Figure 4-9	Distribution des déformations calculées par corrélation d'images avec et sans motif stochastique pour deux des cinq échantillons lors de sollicitations mécaniques dans l'enceinte de culture. La référence est obtenue préalablement à l'application de la précharge.....	48

Figure 4-10	Comparaison de la déformation moyenne des cinq échantillons obtenue par corrélation d'images avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$).....	49
Figure 4-11	Comparaison de la déformation maximale moyenne obtenue par corrélation d'images pour les cinq échantillons avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture.....	50
Figure 4-12	Exemple de distribution de la planéité de surface d'un échantillon d'ilium bovin.....	52
Figure 5-1	Plan d'expérience.....	54
Figure 5-2	Étapes pour procéder à la préparation d'échantillons d'os trabéculaire de 10 mm de hauteur, 10 mm d'épaisseur et 13,7 mm de diamètre.	55
Figure 5-3	Réorientation des images micro-CT reconstruites pour corriger tout mauvais positionnement de l'échantillon dans l'enceinte de culture ou de l'enceinte à l'intérieur de l'appareil micro-CT.	57
Figure 5-4	Étapes de segmentation de l'os trabéculaire à partir des images micro-CT. 1) Identification des images dans lesquelles l'échantillon peut être visualisé. 2) Définition de la région d'intérêt. 3) Image finale segmentée.....	58
Figure 5-5	Densité et paramètres structuraux quantifiés : a) densité minérale apparente, b) densité minérale tissulaire, c) fraction volumique, d) épaisseur trabéculaire et e) espacement trabéculaire.....	59
Figure 5-6	Changements de mesure (a) de densité minérale apparente et (b) de densité minérale tissulaire obtenus pour le groupe non-stimulé et stimulé. Les lignes pointillées représentent la valeur du critère de sensibilité déterminé avec les échantillons contrôles.....	62
Figure 5-7	Changements de mesure (a) de l'épaisseur trabéculaire, (b) de l'espacement trabéculaire et (c) du volume de fraction obtenus pour le groupe non-stimulé et stimulé. La ligne pointillée représente la valeur du critère de sensibilité.	63
Figure 6-1	Illustration de la méthode utilisée pour effectuer l'analyse a) globale et b) par régions d'intérêts des déplacements et des déformations obtenus par corrélation d'images	69

Figure 6-2	Éléments ayant nuis aux acquisitions par corrélation d'images; a) fissures b) rayures, c) et d) tâches dans la vitre de l'enceinte de culture	70
Figure 6-3	Comparaison des déplacements obtenus par corrélation d'images au a) 1 ^{ier} , b) 6 ^{ième} et c) 14 ^{ième} jour de culture pour l'échantillon non-stimulé et stimulé.....	71
Figure 6-4	Comparaison des déformations obtenues par corrélation d'images au a) 1 ^{ier} , b) 6 ^{ième} et c) 14 ^{ième} jour de culture pour l'échantillon non-stimulé et stimulé.....	72
Figure 6-5	Comparaison de la raideur mesurée par l'appareil de test mécanique à divers instants au cours de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé	73
Figure 6-6	Comparaison de la densité minérale apparente (ρ_{app}) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé (mauve) et b) stimulé (vert). La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.	74
Figure 6-7	Comparaison de la densité minérale tissulaire (ρ_{tissu}) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé (mauve) et b) stimulé (vert). La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.	75
Figure 6-8	Comparaison de la fraction volumique de tissu osseux (BV/TV) obtenu par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.	76
Figure 6-9	Comparaison de l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.	77

Figure 6-10	Comparaison de la distance entre les travées osseuses (Tb.Sp) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S»,«C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.	78
Figure 6-11	Illustration de l'interprétation des adaptations osseuses par région d'intérêt pour a) l'échantillon non-stimulé et b) l'échantillon stimulé mécaniquement. Les barres rectangulaires représentent l'évolution les travées osseuses au cours de la période de culture	81
Figure 7-1	Contenant hermétique avec bouchon	94
Figure 7-2	Proposition de modification du capot de l'enceinte de culture a) prototype utilisé dans le cadre de ce projet et b) modifications suggérées	95
Figure 7-3	Module de stimulation mécanique développé au LIO-HSCM par Nicolas Bibeau, Youcef Hocine et Jeffry Santiagos pour être utilisé à l'intérieur d'un incubateur.....	96
Figure 7-4 :	Proposition de protocole expérimental visant l'ajout de cellules primaires pour favoriser et améliorer le développement d'adaptations osseuses.....	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

α -MEM	Milieu essentiel alpha-minium
BGJb	Milieu Biggers, Gwatkin et Judah
BMC	Densité minérale osseuse
BV/TV	Fraction volumique d'os
CO ₂	Gaz Carbonique
Cu-Al	Cuivre-Aluminium
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbeco
DXA	Absorptiométrie à rayon X
HR-pQCT	Tomographie à haute résolution
ICC	Coefficient de corrélation intra-classe
IRM	Résonance magnétique à haute résolution
LVDT	Transformateur différentiel variable linéaire
Micro-CT	Micro-tomographie à rayons X
n	Nombre d'échantillons

ρ	Densité
PE _{SD}	Erreur de précision
PBS	Solution de tampon phosphate salin
QCT	Tomodensitométrie
RH	Humidité relative
Tb.Sp	Séparation trabéculaire
Tb.Th.	Épaisseur des travées

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

UNITÉS MÉCANIQUES

MPa	mégapascal
N	newton
N/mm	newton par millimètre
N/mm ²	newton par millimètre carré
°	degré
Hz	hertz

UNITÉS GÉOMÉTRIQUES

mm	millimètre
µm	micromètre

UNITÉS CALORIFIQUES

°C	degré celcius
----	---------------

UNITÉS DE MASSE

g/cm ³	gramme par centimètre cube
-------------------	----------------------------

UNITÉS DE QUANTITÉ DE MATIÈRE

ml/h	millilitre par heure
µg/ml	microgramme par millilitre
µm/jour	micromètre par jour
unité/ml	unité par millilitre

UNITÉS ÉLECTRIQUE

kV	kilovolt
uA	microampère

INTRODUCTION

La culture *ex-vivo* est une méthode expérimentale qui consiste à maintenir en vie des tissus biologiques en dehors de leur milieu physiologique d'origine (Marino, Staines, Brown, Howard-Jones, & Adamczyk, 2016). Les échantillons de tissus sont prélevés de donneurs et placés dans un bioréacteur qui vise à reproduire un environnement similaire à celui rencontré chez l'organisme vivant. La culture *ex-vivo* présente de nombreux avantages par rapport à la méthodologie *in-vivo* réalisée sur des modèles vivants. Elle permet entre autres la réalisation d'essais et de mesures qu'il serait autrement impossible d'effectuer directement sur des sujets vivants pour des raisons éthiques ou techniques. Tout en étant moins coûteuse et moins complexe à mettre en place que les expériences *in-vivo*, la culture *ex-vivo* permet une étude plus approfondie du tissu en contrôlant l'environnement dans lequel il évolue.

La culture *ex-vivo* est utilisée pour caractériser le comportement du tissu osseux selon différentes situations. Elle est notamment utilisée pour étudier les modifications de l'os trabéculaire en réponse à l'application d'une stimulation mécanique (Birmingham et al., 2015; Birmingham, Niebur, McNamara, & McHugh, 2016; Chan et al., 2009; David et al., 2008; Endres, Kratz, Wunsch, & Jones, 2009; Meyer et al., 2016; Vivanco et al., 2013). Une difficulté associée à la réalisation de culture *ex-vivo* concerne la capacité à documenter l'évolution des échantillons au cours de la période de culture sans nuire à leur fonctionnement. De plus, la combinaison de multiples méthodes de mesure est une approche rarement utilisée.

Deux types d'expérimentations ont été menées dans le but de valider l'hypothèse que le suivi des adaptations osseuses issues d'une culture *ex-vivo* peut être amélioré par la combinaison de multiples modalités de mesure en raison de la prise en considération de plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la qualité osseuse. Tout d'abord, les principaux outils et méthodes utilisées pour effectuer une culture osseuse *ex-vivo* et pour caractériser la qualité osseuse sont exposés (CHAPITRE 1). À la lumière de cette revue, la problématique et les objectifs de recherche de ce projet doctoral sont établis (CHAPITRE 2). Le chapitre 3 présente les outils et méthodes utilisés dans le cadre de ce projet, pour mettre en culture *ex-vivo* des échantillons

d'os trabéculaire et générer le développement d'adaptations osseuses. Le chapitre 4 et le chapitre 5 présentent respectivement une série d'expérimentations effectuées pour évaluer la possibilité d'utiliser la corrélation d'images et la micro-tomographie à rayons X comme méthodes de mesure pour détecter des modifications du tissu osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*. Par la suite, une analyse multimodale des adaptations osseuses issues de la réalisation d'une culture *ex-vivo* est présentée (CHAPITRE 6). Une discussion est présentée dans le chapitre 7, suivie d'une conclusion et des perspectives associées à la réalisation de ce projet.

CHAPITRE 1

REVUE DES CONNAISSANCES

Ce chapitre présente les connaissances actuelles en lien avec le tissu osseux et la culture *ex-vivo*. Le métabolisme du tissu osseux, les outils et méthodes utilisées pour effectuer une culture osseuse *ex-vivo* de même que les méthodes de caractérisation de la qualité osseuse sont les thèmes abordés.

1.1 Tissus osseux

1.1.1 Structures et composition

Le tissu osseux se distingue des autres tissus biologiques par la complexité de sa structure (Keaveny, Morgan, Niebur, & Yeh, 2001; Mow, Ratcliffe, & Woo, 1990). Il s'agit d'un matériau hautement hiérarchisé dont chaque niveau d'organisation contribue à sa réponse mécanique globale (Turner, 2009; Zysset, 2009).

Le tissu osseux se présente sous deux formes: l'os trabéculaire et l'os cortical (Figure 1-1). À l'échelle macroscopique, l'os trabéculaire apparaît comme étant une structure finement striée dont le réseau de ramification est orienté selon les lignes de chargements (Langton & Njeh, 2004). Ce réseau de ramification (tiges et plaques interconnectées) crée des pores de différentes dimensions résultant en une structure de densité et de porosité variable (Datta, Ng, Walker, Tuck, & Varanasi, 2008; Huiskes & van Rietbergen, 2005). Quant à l'os cortical, il apparaît comme étant une paroi dense qui entoure l'os trabéculaire (Datta et al., 2008; Hadjidakis & Androulakis, 2006; Huiskes & van Rietbergen, 2005).

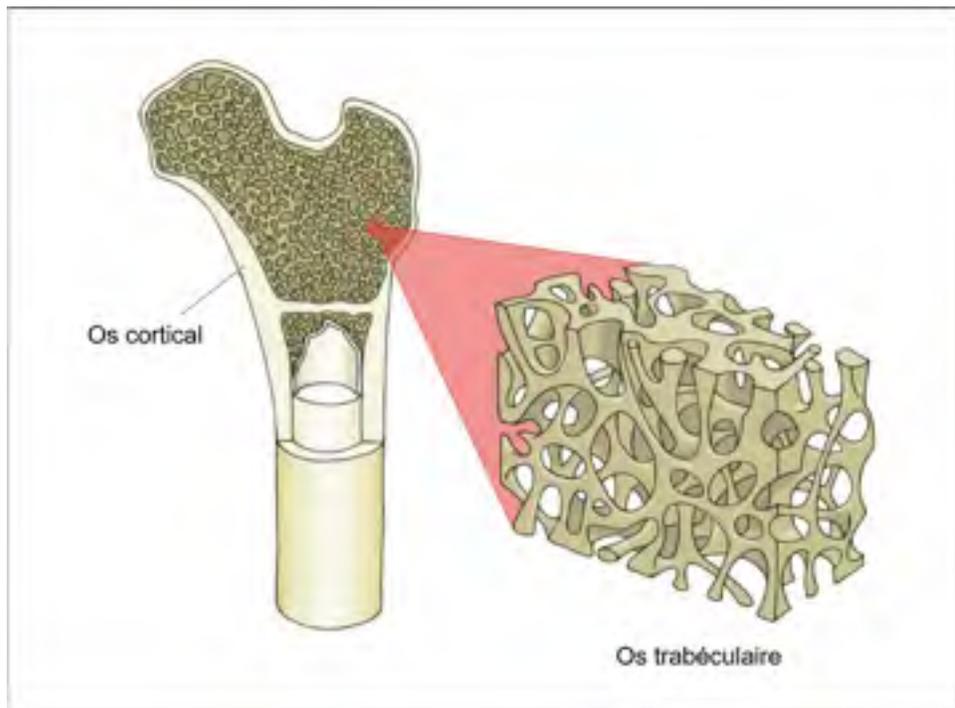


Figure 1-1 Schématisation de l'os cortical et de l'os trabéculaire
Adaptée de Wilkin et al. (2012)

Le tissu osseux est constitué d'une matrice inorganique (35%), d'une matrice organique (65%), d'eau et de cellules (Cowin, 2001; Langton & Njeh, 2004). La matrice inorganique, qui est principalement composée de cristaux d'hydroxyapatites localisés entre des fibres de collagène, joue un rôle important dans l'intégrité mécanique de l'os et sa capacité à résister à différentes mise en charge (Cowin, 2001; Huiskes & van Rietbergen, 2005). La matrice organique qui est majoritairement composée de collagène est responsable de la flexibilité de l'os (Currey, 2012). Quant aux cellules osseuses, elles sont responsables du développement et du maintien de l'intégrité du tissu osseux (Langton & Njeh, 2004).

1.1.2 Remodelage osseux

L'os est un tissu vivant qui a pour particularité de constamment se renouveler et s'adapter aux sollicitations physiologiques et mécaniques auxquelles il est soumis (Guda, Labella, Chan, & Hale, 2014; Huiskes & van Rietbergen, 2005; Katsimbri, 2017; Langton & Njeh, 2004; Marino et al., 2016). Il suit un cycle permanent de formation et de destruction appelé le remodelage

osseux. En se renouvelant en permanence, le remodelage osseux permet à l'os d'être solide et résistant (Huiskes & van Rietbergen, 2005).

Le processus de remodelage osseux se divise en cinq phases (Clarke, 2008; Katsimbri, 2017; Matsuo & Irie, 2008) (Figure 1-2). Lors de l'activation, les ostéocytes qui sont des cellules emprisonnées à l'intérieur des travées osseuses détectent des signaux causés par des stimulations mécaniques et biochimiques et déclenchent l'activation ainsi que le recrutement des ostéoclastes (Datta et al., 2008; Huiskes & van Rietbergen, 2005; Katsimbri, 2017; Langton & Njeh, 2004). À leur arrivée, les ostéoclastes qui sont les cellules responsables de la résorption adhèrent à la surface des travées osseuses pour y dissoudre les composantes organiques et inorganiques du tissu (Huiskes & van Rietbergen, 2005). La durée de cette phase peut atteindre de 2 à 3 semaines (Hadjidakis & Androulakis, 2006; Katsimbri, 2017; Matsuo & Irie, 2008; Sommerfeldt & Rubin, 2001).

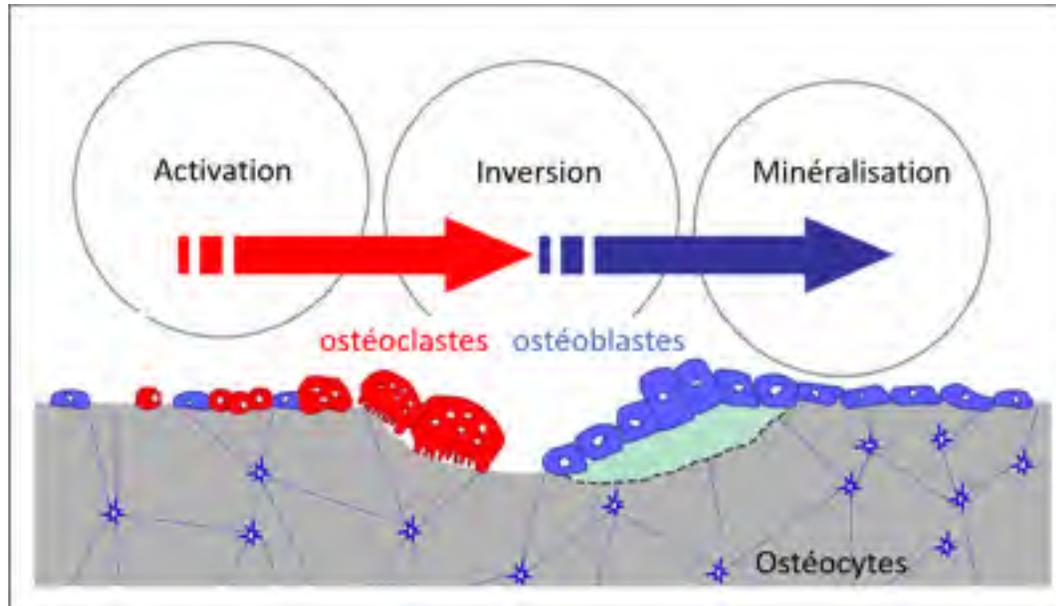


Figure 1-2 Représentation schématique du processus de remodelage osseux
Adaptée de Matuso et al. (2018)

Une fois la résorption terminée, une période sans activité apparente, appelé phase d'inversion, prend place. Durant cette période qui s'échelonne sur quelques jours, les ostéoclastes entrent

en apoptose et laissent place aux ostéoblastes qui sont les cellules responsables de la phase de formation osseuse. Au cours de la formation osseuse, les ostéoblastes déposent des couches successives de tissu osseux immature (ostéoïde) pour combler les cavités créées par les ostéoclastes (Huiskes & van Rietbergen, 2005; Katsimbri, 2017; Langton & Njeh, 2004; Sommerfeldt & Rubin, 2001). Éventuellement, une matrice osseuse minéralisée se formera autour d'eux et ils se transformeront en ostéocytes (Huiskes & van Rietbergen, 2005; Sommerfeldt & Rubin, 2001). Cette phase de minéralisation est beaucoup plus longue et dure plusieurs semaines avant d'être entièrement complétée.

1.2 Culture osseuse *ex-vivo*

La culture *ex-vivo* est une approche expérimentale qui consiste à maintenir en vie des tissus biologiques en dehors de leur milieu physiologique d'origine (Marino et al., 2016). Cette méthode expérimentale présente de nombreux avantages par rapport à la méthodologie *in-vivo* qui est réalisée directement sur des animaux vivants. Tout d'abord, la culture *ex-vivo* se dispense de la prise en charge d'animaux, qui est une étape onéreuse dans la mise en place d'expérimentation *in-vivo* (Abubakar, Noordin, Azmi, Kaka, & Loqman, 2016). Elle permet de multiplier le nombre d'essais réalisés avec un seul donneur (animal), minimisant ainsi l'utilisation de nombreux animaux pour les études précliniques. Cette méthode permet également la réalisation d'essais et l'acquisition de mesures qu'il serait autrement impossible d'effectuer directement sur des sujets vivants pour des raisons éthiques ou techniques. De plus, la culture *ex-vivo* permet une étude plus approfondie du tissu en raison d'un meilleur contrôle des conditions expérimentales et de l'environnement dans lequel il évolue. Néanmoins, il est important de rappeler que la culture *ex-vivo* reste une représentation simplifiée du fonctionnement physiologique des tissus ou des organes étudiés. La durée de vie limitée des échantillons est également une limitation associée à la réalisation de ce type d'expérimentation (Marino et al., 2016).

1.2.1 Modèles de culture osseuse

La réalisation de culture osseuse *ex-vivo* nécessite l'accès à des échantillons prélevés dans les heures suivant le décès du donneur pour en préserver la viabilité. L'utilisation de modèles animaux est priorisée relativement à l'utilisation d'un modèle humain en raison de l'accessibilité aux échantillons (Marino et al., 2016; Sheng, Wang, Xu, Zhu, & Zhou, 2010). La sélection des donneurs peut également être plus facilement contrôlée afin de répondre à des critères de sélection spécifiques (Cotterill, Kostuik, D'Angelo, Fernie, & Maki, 1986). Advenant l'utilisation d'échantillons osseux humains, ceux-ci proviendraient de biopsies effectuées auprès d'une population présentant une plus grande diversité tant au niveau de l'âge que de la qualité osseuse (Sheng et al., 2010). La possibilité d'obtenir des échantillons provenant d'une population saine et jeune est également très peu probable (Sheng et al., 2010). Par conséquent, l'utilisation d'un modèle animal permet d'assurer une certaine homogénéité dans la population de laquelle les échantillons sont prélevés, ce qui facilitera éventuellement les analyses en éliminant la variabilité liée aux donneurs eux-mêmes.

Différents modèles animaux sont utilisés pour effectuer de la culture osseuse *ex-vivo* (Abubakar et al., 2016; Marino et al., 2016) (Figure 1-3). Les rongeurs, dont le rat et la souris, sont utilisés pour étudier la croissance et le développement du tissu. Il s'agit du modèle animal le plus couramment utilisé en raison de sa grande disponibilité et de son faible coût (Abubakar et al., 2016). Comparativement à la souris, le rat a pour avantage d'être de plus grande taille, ce qui facilite la préparation des échantillons sans en altérer les structures (Abubakar et al., 2016). Quant à la souris, son utilisation gagne en popularité en raison de la possibilité de la modifier génétiquement (Abubakar et al., 2016). Le modèle bovin est quant à lui principalement utilisé pour étudier la réponse physiologique de l'os trabéculaire à l'application de charges mécaniques (Chan et al., 2009; David et al., 2008; Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). Il est préféré à l'utilisation du modèle de rongeurs en raison de la similitude de sa structure lamellaire avec celle du tissu osseux humain, ce qui améliore la transposition des interprétations obtenues à des applications humaines (Abubakar et al., 2016).

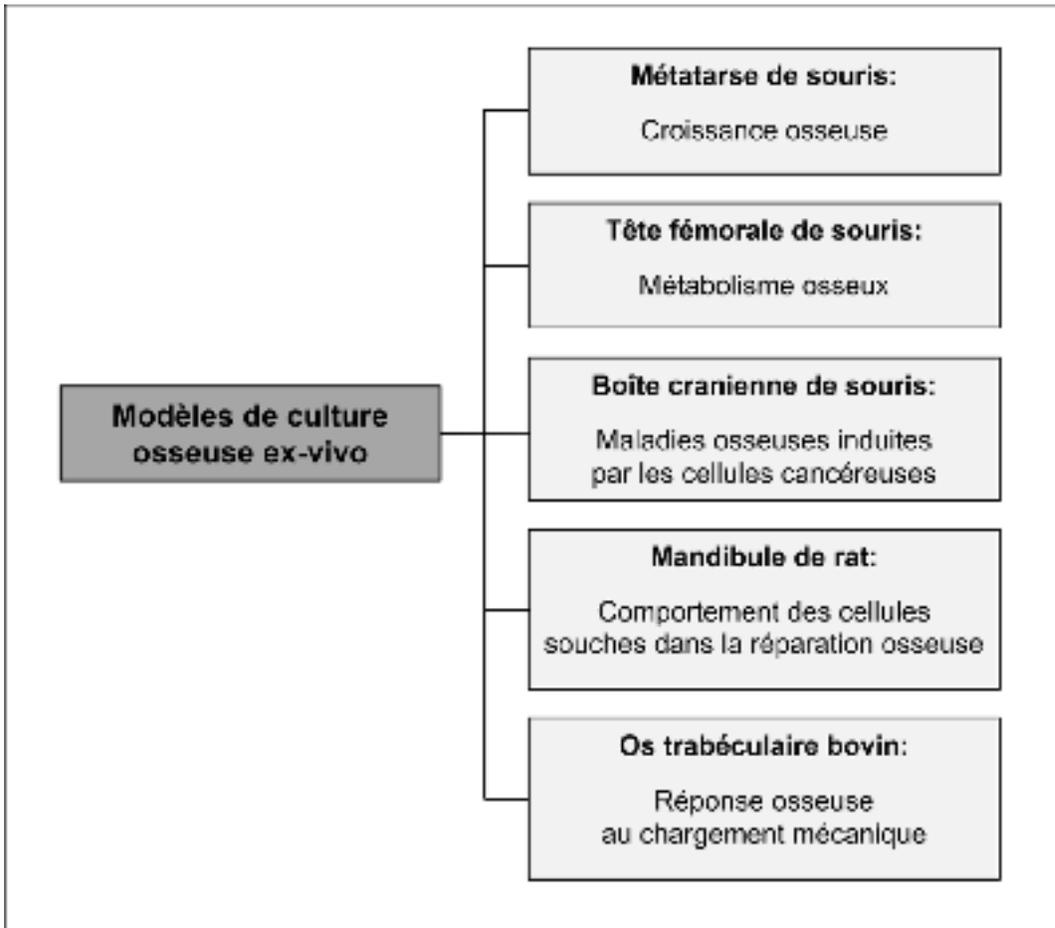


Figure 1-3 Modèles de culture osseuses *ex-vivo* et leur application
Adaptée de Marino et al. (2016)

Aucun consensus n'est établi relativement au type d'os à utiliser. Le choix du site d'extraction est déterminé en fonction des objectifs de recherche, et influencé par des considérations techniques. Par exemple, chez le rongeur, le métatarse est le type d'os le plus fréquemment utilisé (Abubakar et al., 2016) (Figure 1-4). Les raisons exactes de son utilisation ne sont pas connues, mais pourraient être associées à la petite taille de l'os qui peut être facilement mis en culture dans des plaques de puits (Abubakar et al., 2016) La possibilité d'obtenir un grand nombre d'échantillons à partir d'un seul animal (cinq métatarses par membre) est également un élément de justification favorable à l'utilisation de ce type d'échantillons (Abubakar et al., 2016).

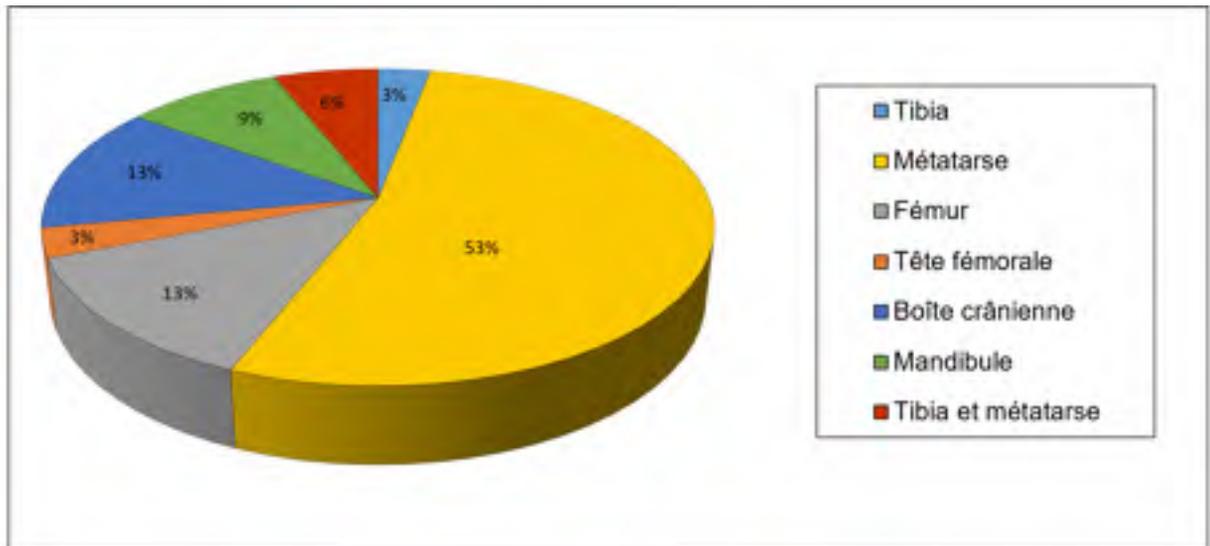


Figure 1-4 Types d'os utilisés chez les rongeurs pour la culture osseuse *ex-vivo*
Adaptée de Abubakar et al. (2016)

Chez le modèle bovin, les échantillons osseux utilisés pour la culture *ex-vivo* sont prélevés de sternums (Vivanco et al., 2013), de métacarpes (Davies et al., 2006) et d'ulnas (Endres et al., 2009). Les raisons exactes du choix de l'utilisation de ces types d'os ne sont pas toujours connues et bien documentées. Seule l'utilisation du sternum a été justifiée par le fait qu'il s'agit d'un os soumis à un faible chargement, donc davantage susceptible de présenter des adaptations osseuses liées à l'application d'un chargement mécanique (Vivanco et al., 2013).

1.2.2 Outils et méthodes de culture

Suite à leur prélèvement, les échantillons sont mis en culture pour les maintenir en vie et éventuellement étudier leur comportement. Pour ce faire, différents outils et méthodes ont été mis au point. L'utilisation de plaque de puits est la méthode la plus simple pour mettre en culture des échantillons osseux (Marino et al., 2016) (Figure 1-5). La simplicité de cette méthode a pour avantage d'être facilement accessible et de nécessiter l'accès à peu d'équipement spécialisé. Néanmoins, cette méthode se limite à l'utilisation d'échantillons de petite taille (ex. : os métatarsiens et tête fémorale de souris) en raison de la dimension des puits.



Figure 1-5 Utilisation de plaque de puits pour la culture *ex-vivo*
Adaptée de Marino et al. (2016)

En contrepartie, l'utilisation d'un bioréacteur à perfusion est la méthode la plus complexe pour mettre en culture des échantillons osseux. Divers modèles ont été développés afin de répondre aux besoins spécifiques associés à leur champs d'exploitation (Birmingham et al., 2015; Hagenmuller, Hitz, Merkle, Meinel, & Muller, 2010; Marino et al., 2016; Zong ming et al., 2013) (Figure 1-6). Le principe d'utilisation reste néanmoins similaire peu importe le modèle.

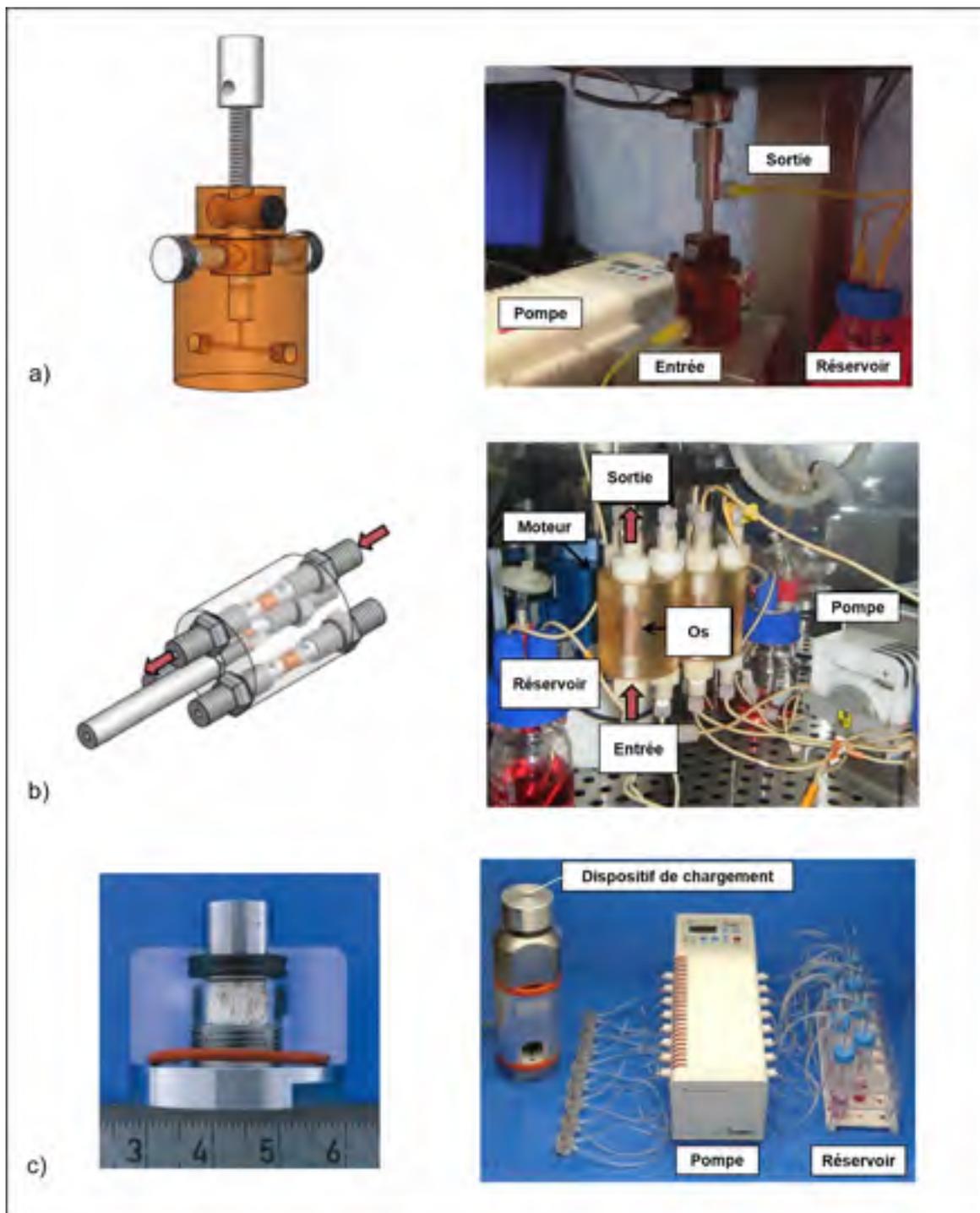


Figure 1-6 Exemple de bioréacteurs à perfusion utilisés afin d'étudier *ex-vivo* la réponse physiologique de l'os trabéculaire à l'application de la charge mécanique
Adaptée de a) Marino et al. (2016), b) Birmingham et al. (2015) et c) Davies et al. (2006)

Tout d'abord les échantillons sont placés à l'intérieur d'une ou plusieurs enceintes de culture. Par la suite, les enceintes sont remplies de milieu de culture par l'intermédiaire d'une pompe de distribution reliée à un réservoir (Bancroft, Sikavitsas, & Mikos, 2003). L'utilisation d'une pompe de distribution a pour avantage d'assurer le renouvellement et la perfusion du milieu de culture à l'intérieur de la chambre et des échantillons (Abubakar et al., 2016). Autrement, les échanges se limitent à leur périphérie (Bancroft et al., 2003). Un débit de 7ml/h est généralement utilisé dans les études visant à étudier la réponse physiologique de l'os trabéculaire à la charge mécanique car des études antérieures ont démontré que ce taux ne stimule pas les échantillons osseux par l'application de forces de cisaillement (Endres et al., 2009).

Une grande variété de milieu de culture est disponible sur le marché pour assurer et soutenir la croissance cellulaire. Les milieux standards les plus utilisés sont le milieu Eagle modifié de Dulbeco (DMEM), le milieu essentiel alpha-minium (α -MEM), et le milieu Biggers, Gwatkin et Judah (BGJb) (Abubakar et al., 2016). Constitué d'acides aminés, de vitamines, de glucose, de sel et minéraux, ils contiennent tous les nutriments de base nécessaires au développement des cellules du tissu osseux (Abubakar et al., 2016). Des suppléments tels que l'albumine de sérum bovin, le sérum de veau fœtal, l'acide ascorbique, le glycérolphosphate de sodium, la glutamine ainsi que des antibiotiques sont par la suite ajoutés pour compléter le milieu de culture et prévenir les risques de contamination bactériennes (Abubakar et al., 2016). (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 Composition de milieux de culture recensés dans la littérature

Auteurs	Type de tissu osseux	Composition du milieu de culture
Birmingham et al. (2016)	Os trabéculaire Vertèbres Mouton	DMEM Sérum de veau foetal (10%) Antibiotiques antimycosiques (2 %) β -glycerolphosphate (20 mM) Acide ascorbique (50 μ M)
David et al. (2008)	Veau Ulna et sternum	DMEM Sérum de veau foetal (10%) Acide ascorbique
Endres et al. (2009)	Os trabéculaire Vache Ulna	DMEM Sérum de veau foetal (10%) Glutamine (2mM) Pénicilline (50 000 IU/L) Streptomycine (375 000 IU/L) β -glycerolphosphate (5 mM) Vitamine C (5 mg/L) Hepes (10mM) Bicarbonate de sodium (0.12 g/L)
Vivanco et al. (2013)	Os trabéculaire Vache Sternum	DMEM Sérum de veau foetal (10%) Glutamine (2mM) Pénicilline (50 000 IU/L) Streptomycine (50 000 IU/L) Vitamine C (10 mg/L) Bicarbonate de sodium (0.12 g/L) Hepes (10mM)

L'application d'un chargement mécanique a été démontré comme étant un élément favorable au développement d'adaptations osseuses (Abubakar et al., 2016; David et al., 2008; Davies et al., 2006; Endres et al., 2009; Marino et al., 2016; Rahman et al., 2016; Vivanco et al., 2013). Certains modèles de bioréacteur, dont celui développé par Smith et al. (2001), offrent donc la possibilité de solliciter mécaniquement les échantillons afin de favoriser le développement d'adaptations osseuses lors de la culture. L'intensité du chargement appliqué a été démontrée comme étant un facteur ayant une influence sur les modifications du tissu osseux. Endres et al. (2009) ont rapporté que des déformations comprises entre 1000 et 4000 microdéformations sont favorables au développement du tissu osseux bovin (Figure 1-7). Les modifications les plus importantes du tissu soit l'augmentation de la raideur et l'épaisseur d'os nouvellement

formé) ont été rapportées pour des sollicitations comprises entre 2000 et 4000 microdéformations. En dessous de ces valeurs, l'os réagit mais de façon moins importante.

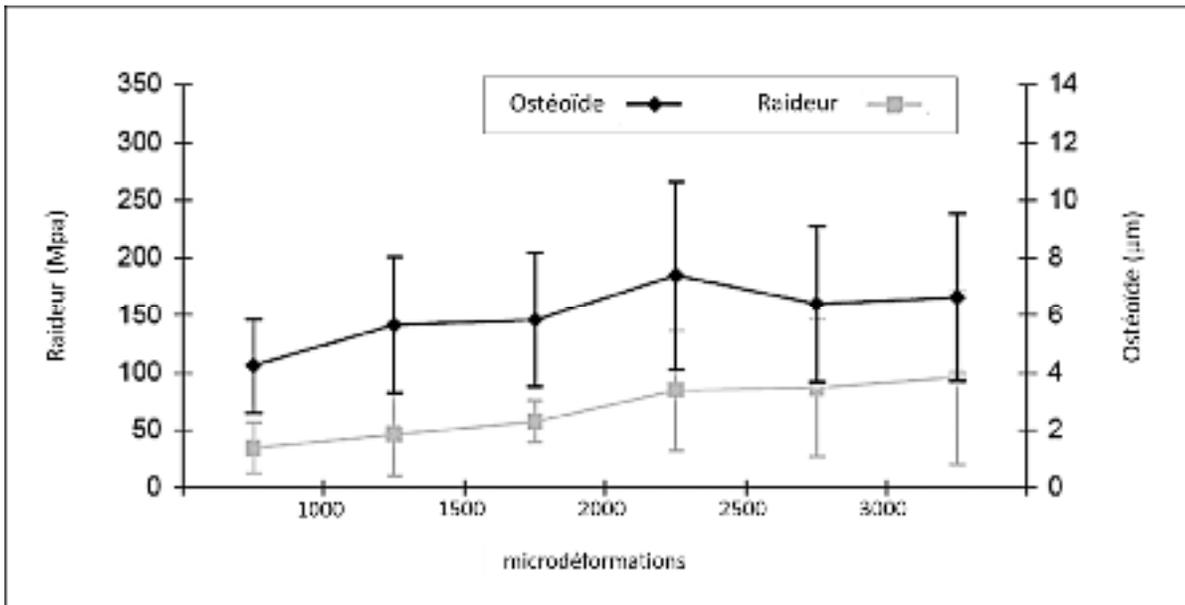


Figure 1-7 Influence de l'intensité de chargement sur le développement du tissu osseux par une augmentation marquée des ostéoïdes et de la rigidité

Adaptée de Endres et al. (2009)

1.3 Outils et méthodes de caractérisation de la qualité osseuse

Au terme de la période de culture, les propriétés et les caractéristiques de l'os doivent être mesurées pour documenter les changements subis par les échantillons. La densité osseuse, la microstructure et les propriétés mécaniques sont les principaux paramètres répertoriés dans la littérature comme étant à considérer pour évaluer la qualité osseuse (Guda et al., 2014; Huiskes & van Rietbergen, 2005; McDonnell, McHugh, & O'Mahoney, 2007)

1.3.1 Densité osseuse

La densité osseuse correspond à la masse de tissu osseux exprimé en g/cm^3 (Huiskes & van Rietbergen, 2005). La popularité de l'utilisation de ce paramètre pour évaluer la qualité de l'os est issue du fait qu'il s'agit du seul paramètre pouvant être facilement mesuré en milieu clinique

(Huiskes & van Rietbergen, 2005). Dans un contexte clinique, les méthodes les plus couramment utilisées pour y arriver sont l'absorptiométrie à rayon X (*dual energy X-ray absorptiometry* ou DXA) et la tomodensitométrie (*quantitative computed tomography* ou QCT) (Cowin, 2001; McDonnell et al., 2007). La micro-tomographie à rayons X (*Micro-computed tomography* ou micro-CT) est également une méthode de mesure utilisée pour quantifier la densité mais son utilisation est limitée à la réalisation de recherche préclinique (Cowin, 2001; McDonnell et al., 2007).

Le principe de base de ces trois méthodes d'imagerie consiste à mesurer l'atténuation des rayons X lors de leur passage à travers l'os et les tissus environnants (Cowin, 2001). Plus les faisceaux de rayons X sont atténués, plus la quantité de matière osseuse présente dans la voie de transmission est élevée (Cowin, 2001). Pour mesurer la densité osseuse, l'acquisition d'images se fait en association avec des objets de calibrage (Adams, 2009; Cowin, 2001). Ces objets de calibrage sont fabriqués d'un matériau ayant une valeur de densité minérale connue et similaire à celle de l'os. Leur utilisation est nécessaire afin de pouvoir convertir le coefficient d'atténuation mesuré (nombre CT) en densité minérale osseuse par l'établissement d'une équation de régression linéaire (Adams, 2009; Cowin, 2001; Link & Lang, 2014).

Ces trois méthodes d'imagerie ont pour avantage d'être non-destructives, de pouvoir tenir compte de l'hétérogénéité de l'échantillon et de permettre un suivi continu de la qualité osseuse. L'absorptiométrie à rayon X a pour avantage comparativement à la tomodensitométrie de permettre la mesure de la densité minérale osseuse (*bone mineral content* ou BMC), en plus de la mesure de la densité osseuse (Cowin, 2001). Par contre, elle est limitée à l'estimation d'une densité surfacique étant donné qu'elle repose sur la prise de radiographies planaires. Quant à la micro-tomographie à rayons X, elle a pour avantage d'être une méthode de mesure à l'échelle microscopique pouvant également permettre la mesure de la géométrie des travées osseuses. Comparativement à l'absorptiométrie à rayon X, la micro-tomographie et la tomodensitométrie permettent d'obtenir de l'information en trois dimensions (Cowin, 2001).

L'importance de la composante minérale sur la qualité de l'os est sans contredit. Des travaux de recherche reliés à la caractérisation de la densité osseuse ont permis notamment: (1) d'illustrer la distribution de la densité osseuse (Dougherty, 1996; Hussein & Morgan, 2013), (2) de fournir de l'information concernant l'évolution de la mesure de la densité osseuse selon l'âge (Dougherty, 1996), et (3) de prédire le risque de fracture (O'Neill et al., 2002). Aucune étude de ce genre n'est rapportée dans un contexte de culture *ex-vivo*. De plus, la densité osseuse n'est pas un paramètre qui est pris en considération lors de l'évaluation des changements subis par les échantillons suite à la réalisation de culture *ex-vivo* (David et al., 2008; Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013).

1.3.2 Microstructure

La microstructure fait référence à la géométrie et aux dimensions des travées osseuses. Jusqu'à tout récemment, ces paramètres étaient quantifiés uniquement par la réalisation d'histologie qui est reconnue comme étant la méthode de référence pour documenter la microstructure de l'os (Bouxsein et al., 2010). Ces dernières années, le développement de nouvelles méthodes d'imageries telles que la tomographie périphérique à haute résolution (*high resolution peripheral quantitative computed tomography ou HR-pQCT*), la résonance magnétique à haute résolution (*IRM*) et la micro-tomographie à rayons X (micro-CT), ont permis de caractériser la microstructure de l'os à différentes résolutions (Chappard, 2012; Donnelly, 2011) (Figure 1-8). Comparativement à l'histologie, ces méthodes d'imagerie ont pour principal avantage de permettre une évaluation non-destructive de la microstructure de l'os. Un suivi continu de l'évolution des changements structuraux peut donc être envisagé et les échantillons peuvent être réutilisés pour la réalisation d'essais ou d'analyses supplémentaires (Bouxsein et al., 2010).

L'utilisation de la tomographie et de la résonance magnétique à haute résolution ne sera que très brièvement abordée car la résolution actuelle de ces appareils de mesure est très proche de la taille des travées osseuses (Cheung et al., 2013). Sachant que le taux d'apposition minérale rapporté pour l'os trabéculaire porcin est de l'ordre de 2 $\mu\text{m}/\text{jour}$ (Birmingham et al., 2015),

l'utilisation de ces méthodes de mesure pour quantifier les changements structuraux induits aux échantillons osseux lors de la culture *ex-vivo* apparaît être inadaptée.

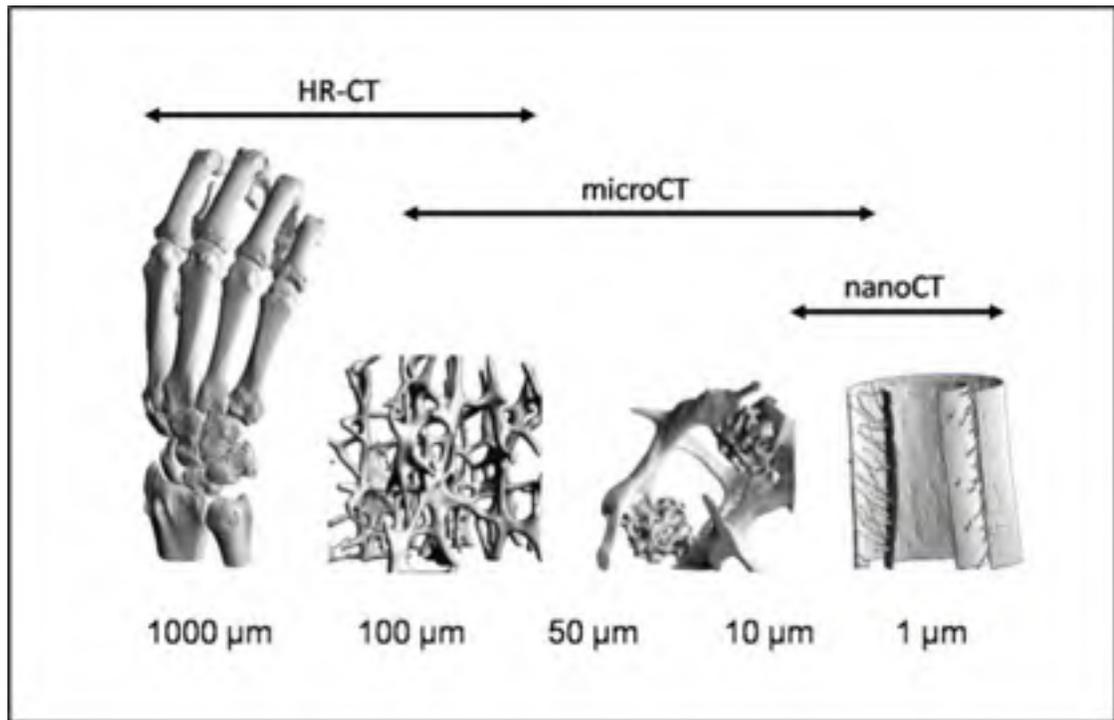


Figure 1-8 Méthodes d'imageries utilisées pour la caractérisation à différentes échelles de la microstructure de l'os
Adaptée de Stauber (2008)

La micro-tomographie à rayons X est de plus en plus fréquemment utilisée pour décrire l'architecture de l'os et tend à devenir la méthode de référence pour documenter les changements structuraux du tissu osseux (Bouxsein et al., 2010; Donnelly, 2011). La fraction volumique d'os (BV/TV) est un ratio entre le volume de tissus osseux et le volume total de la région d'intérêt. L'épaisseur des travées (Tb.Th.) correspond à l'épaisseur moyenne des travées osseuses. La séparation trabéculaire (Tb.Sp.) est la distance moyenne entre les travées osseuses. Ces trois paramètres sont ceux qui sont minimalement quantifiés pour décrire la morphologie et documenter les modifications de l'os (Bouxsein et al., 2010; Huiskes & van Rietbergen, 2005) (Tableau 1-2).

Tableau 1-2 Paramètres structuraux de l'os trabéculaire

Paramètres structuraux	Abréviations	Unités
Volume total	TV	mm ³
Volume osseux	BV	mm ³
Surface osseuse	BS	mm ²
Fraction volumique de l'os	BV/TV	%
Densité de surface osseuse	BS/TV	mm ² / mm ³
Surface osseuse spécifique	BS/BV	mm ² / mm ³
Connectivité	Conn.D	1/ mm ³
Structural model index	SMI	-----
Nombre de trabécules	Tb.N	1/ mm
Épaisseur trabéculaire	Tb.Th	mm
Séparation trabéculaire	Tb.Sp	mm
Écart-type de l'épaisseur trabéculaire	Tb.Th.SD	mm
Écart-type de la séparation trabéculaire	Tb.Sp.Sd	-----
Degré d'anisotropie	DA	-----
<i>Mean intercept length</i>	MIL	-----

Le principal avantage de cette méthode d'imagerie est sa haute résolution (6 à 20 µm) qui est favorable à la mesure des paramètres structuraux (Chappard, 2012). Néanmoins, l'utilisation de cet appareil de mesure est limitée par la taille des échantillons pouvant être imagés. Tout dépendant du modèle d'appareil utilisé, la taille maximale des échantillons varie de 14 mm de diamètre x 36 mm de longueur pour les anciens modèles à 100 mm de diamètre x 140 mm de longueur pour les plus récents (Donnelly, 2011)

Des travaux de recherche reliés à la caractérisation de la microstructure de l'os ont permis notamment d'illustrer la distribution de la microstructure à l'intérieur d'un même échantillon (Gong et al., 2006; Hulme, Boyd, & Ferguson, 2007; Hussein & Morgan, 2013) et d'étudier les changements pouvant être induits par une maladie ou un traitement (Li, Dai, Jiang, & Qiu,

2012; Morgan et al., 2009; Perilli, Baleani, Ohman, Baruffaldi, & Viceconti, 2007; Steiniche, 1995; Tamada et al., 2005; Zhang et al., 2010). Une fois de plus, aucune étude de ce genre n'est répertoriée dans un contexte de culture *ex-vivo*.

Les changements structuraux issus de culture *ex-vivo* sont généralement quantifiés par la réalisation d'analyses histomorphométriques (Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). David et al. (2008) est le seul auteur à avoir été répertorié relativement à l'utilisation de la micro-tomographie à rayons X pour caractériser la microstructure d'échantillons d'os trabéculaire bovins (sternum), suite à 21 jours de culture *ex-vivo*. La fraction volumique de l'os (BV/TV), l'épaisseur des travées osseuse (Tb. Th), l'indice de modèle structurel (SMI) et le degré d'anisotropie (DA) ont été déterminés pour un groupe contrôle, dont les échantillons n'ont pas été mis en culture, et deux groupes de culture, soit un groupe pour lequel les échantillons étaient stimulés mécaniquement et l'autre pas. Les résultats ont montré que le volume osseux ne réagit pas de manière significative à la contrainte mécanique tandis que les paramètres structuraux ont tous augmenté de manière significative (Tableau 1-3).

Tableau 1-3 Résultats changements structuraux mesurés par micro-tomographie à rayons X
Adaptée de David (2008)

Paramètres	Groupe Contrôle (n=12)	Groupe Non-stimulé (n=10)	Groupe Simulé (n=10)
BV/TV (%)	11.16 ± 0.82	10.73 ± 0.80	13.9 ± 0.79
Tb.Th (µm)	84.30 ± 5.00	84.5 ± 3.19	104.2 ± 5.09 ^{a,b}
SMI	1.24 ± 0.06	1.38 ± 0.07	0.87 ± 0.07 ^{a,b}
DA	1.58 ± 0.003	1.45 ± 0.05	1.64 ± 0.10 ^a

p < 0.05 par rapport au ^agroupe contrôle et au ^bgroupe non-stimulé mécaniquement

Peu d'études relativement à la précision et la répétabilité des mesures effectuées par micro-tomographie à rayons X sont présentées dans la littérature (Le Garff et al., 2017; Mulder, Koolstra, & Van Eijden, 2004; Nagele et al., 2004; Pelletti et al., 2017; Postnov, Vinogradov, Van Dyck, Saveliev, & De Clerck, 2003). Selon Mulder et al. (2004), l'erreur d'atténuation

linéaire est en moyenne de 10% et peut être considérée comme étant adéquate pour évaluer le degré de minéralisation de l'os en développement. Pelletti et al. (2017) ont rapporté des erreurs moyennes inférieures à 0,5% et une excellente fiabilité inter-observateurs ($ICC > 0,995$) dans l'évaluation de l'accord de mesure du diamètre d'objet de calibrage et d'entailles produites sur de l'os, mais aucune étude ne rapporte l'exactitude et la précision des mesures sur des caractéristiques de taille semblable aux travées osseuses. Le Garff et al. (2017) ont montré que le volume osseux et la distance entre les travées osseuses peuvent varier respectivement de 30% et 50% entre deux acquisitions sans recalage des images, et recommandent d'effectuer cette méthode, de même qu'une analyse de précision de mesure préalablement à toutes analyses micro-CT. D'autre part, Nagele et al. (2004) ont obtenu des mesures micro-CT très reproductibles (coefficient de variation entre 0,64% et 1,29% pour BV/TV), même lors de petits déplacements de la région d'intérêt.

1.3.3 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques font référence à la capacité d'un matériau à résister à une mise en charge qui lui est appliquée. De façon générale, leur évaluation est effectuée par la réalisation d'essais mécaniques. Pour ce faire, les échantillons osseux ayant été extraits de spécimens entiers sont soumis à différents modes de chargements à l'aide d'appareils de tests mécanique (Figure 1-9). Les propriétés mécaniques telles que le module de Young (MPa), la force à rupture (N), la raideur (N/mm), la contrainte (N/mm^2) ainsi que la déformation (%) peuvent par la suite être extraits de la courbe force/déplacement ayant été enregistrée. Que ce soit en mode statique ou dynamique, l'utilisation de la mesure des déplacements et des forces de réactions détermine le comportement mécanique global du tissu osseux (Donnelly, 2011) et ne tient pas compte de l'inhomogénéité de la structure de l'os trabéculaire.

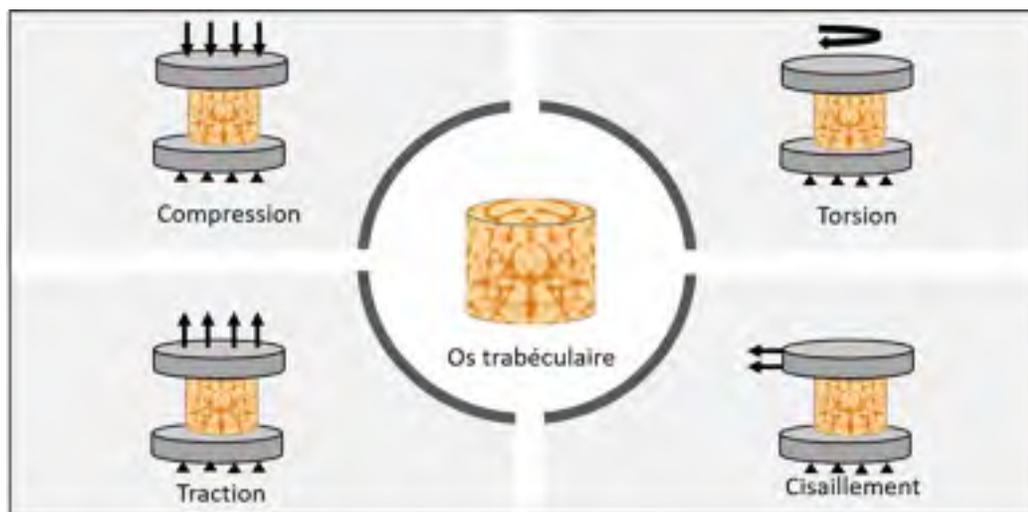


Figure 1-9 Modes de chargement utilisés pour mesurer les propriétés mécaniques
Adaptée de Wu et al. (2018)

Dans le cadre de culture *ex-vivo*, l'évaluation des propriétés mécaniques peut également être effectuée par la réalisation d'essais mécaniques selon le modèle de bioréacteur utilisé. Le bioréacteur Zetos développé par Smith et al. (2001) a permis à Vivanco et al. (2003), de même qu'à David et al. (2008), de quantifier le module de Young d'échantillons d'os trabéculaire bovins soumis à une sollicitation mécanique durant 21 jours de culture. Dans les deux cas, les résultats ont démontré une augmentation des propriétés mécaniques associée à la sollicitation des échantillons (Figure 1-10).

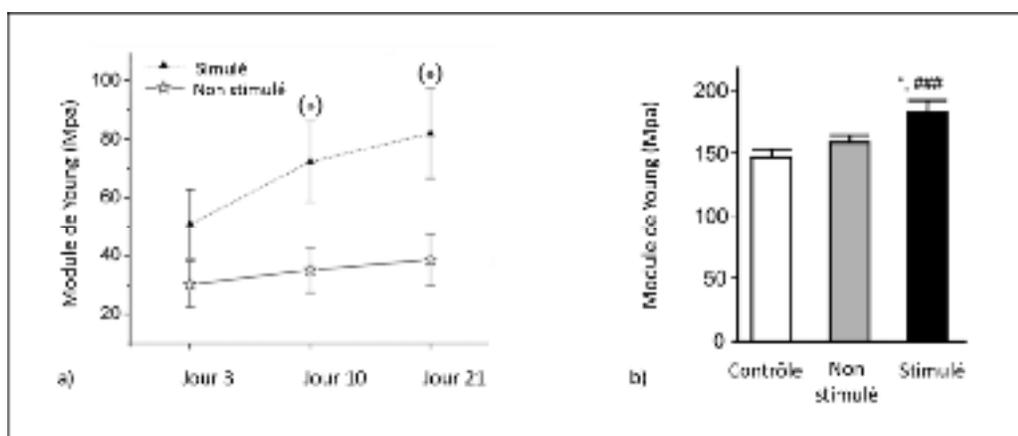


Figure 1-10 : Module de Young d'échantillons osseux issus de culture *ex-vivo*
Adaptée de Vivanco et al. (2013) et de David et al. (2008)

La corrélation d'images est une méthode de mesure optique qui permet de mesurer les champs de déplacements et de déformations d'un motif stochastique appliqué à la surface d'objets (Freddi, Olmi, & Cristofolini, 2015; Palanca, Tozzi, & Cristofolini, 2016) (Figure 1-11). Le principe de fonctionnement de cette méthode repose sur l'acquisition, par un système de caméra, d'une série d'images de l'objet à tester dans son état d'origine et déformé (Freddi et al., 2015). Par la suite, un logiciel et des algorithmes calculent les déplacements des motifs visibles sur la surface de l'objet, ce qui permet d'obtenir le champs de déplacement et, par dérivation, le champs des déformations (Freddi et al., 2015).

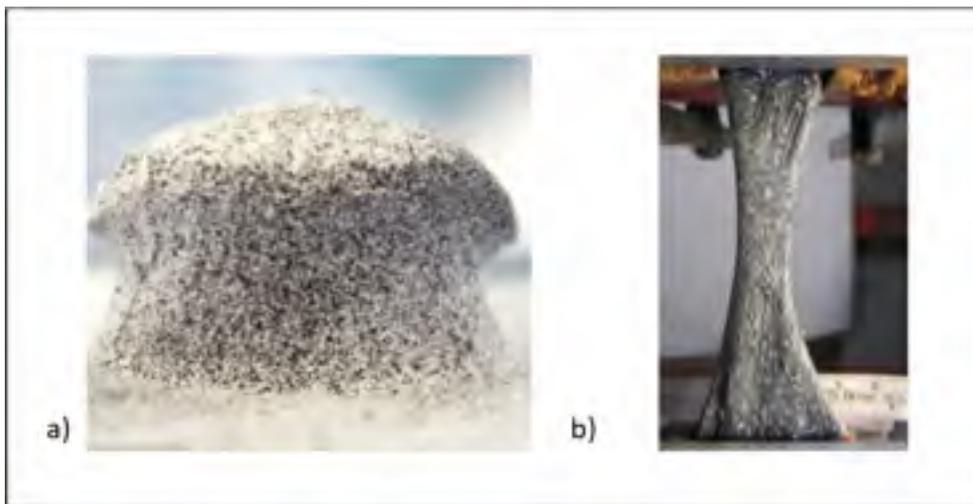


Figure 1-11 Exemples d'échantillons avec motif stochastique:
a) vertèbre porcine, b) tendon d'Achille humain
Adaptée de Palanca et al. (2016)

La corrélation d'images a pour avantage de permettre, suite à une mesure plein champs, la visualisation de la distribution des déformations et la localisation de leur concentration (Freddi et al., 2015; Palanca et al., 2016; Sutton, Orteu, & Schreier, 2009). Ceci a pour effet de fournir une description plus détaillée du comportement des échantillons testés (Freddi et al., 2015; Palanca et al., 2016). Étant une méthode de mesure non-destructive et sans contact, la corrélation d'images a également pour avantage de mesurer les déformations des échantillons sans en perturber la réponse mécanique (Freddi et al., 2015).

Pour permettre au logiciel de reconnaître sans équivoque chaque point de la surface de l'échantillon et de suivre leur déplacement, la surface de l'échantillon doit présenter un motif aléatoire et contrasté (Freddi et al., 2015). Pour ce faire, l'application de peinture en aérosol noire et blanche est la méthode la plus couramment utilisée pour générer un motif stochastique (Freddi et al., 2015). Toujours est-il que les peintures utilisées ne doivent pas modifier les propriétés de l'échantillon testé. Lorsqu'un motif stochastique est présent de façon naturelle sur la surface de l'objet testé, il est suggéré de quantifier les déformations en suivant le mouvement de ses caractéristiques structurales (Liu & Morgan, 2007; Palanca et al., 2016). Aucune étude faisant état de l'utilisation de la corrélation d'images pour documenter la distribution et la localisation des déformations dans un contexte de culture *ex-vivo* n'a été répertorié.

CHAPITRE 2

PROBLÉMATIQUE DE RECHERCHE

Ce chapitre décrit la problématique de recherche de ce projet doctoral et présente les objectifs et hypothèses qui en découlent. L'approche méthodologique, ainsi qu'une vue d'ensemble de la structure de cette thèse y sont également présentées.

2.1 Problématique

La revue des connaissances a permis de mettre en évidence les avantages de l'utilisation de la culture *ex-vivo* pour l'étude du comportement du tissu osseux. Contrairement aux expérimentations *in-vivo* qui sont effectuées directement sur des modèles animaux vivants, la culture *ex-vivo* est une approche expérimentale qui permet une étude plus approfondie du tissu en contrôlant l'environnement dans lequel il évolue. La culture *ex-vivo* a pour avantage de nécessiter l'accès à une quantité moins importante de ressources pour la mise en place des expérimentations et de permettre de multiplier le nombre d'essais réalisés avec un seul donneur (animal), minimisant ainsi l'utilisation d'animaux pour les études précliniques.

Une difficulté associée à la culture *ex-vivo* est la capacité de documenter l'évolution des échantillons au cours de la période de culture sans nuire à leur survie. La revue des connaissances a permis de constater que la combinaison de multiples méthodes de mesure pour documenter et quantifier les changements subis par les échantillons durant la période de culture, est une approche rarement utilisée. La combinaison de multiples méthodes de mesure semble être difficile à mettre en place en raison de la conception inadaptée des modèles de bioréacteurs présentement disponibles. Étant donné que plusieurs facteurs contribuent à la qualité osseuse, différentes caractéristiques dont la composition de l'os, les propriétés mécaniques et la microstructure sont à considérer lors de l'évaluation de l'intégrité de l'os.

Dans un deuxième temps, il a été constaté que les méthodes de caractérisation utilisées lors de culture *ex-vivo* considèrent le tissu osseux comme un matériau homogène. Elles ne prennent pas en considération le fait que le remodelage osseux est un processus de restructuration locale. Il apparaît par conséquent pertinent de consacrer des efforts pour améliorer les outils et méthodes de mesures utilisées pour caractériser le tissu osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*. L'utilisation d'un modèle de culture osseuse *ex-vivo* multifonctionnel est donc proposé dans le cadre de ce projet doctoral pour améliorer le suivi et l'évolution des échantillons durant la période de culture. Ce modèle sera exploité pour améliorer la compréhension des adaptations osseuses d'échantillons soumis à une stimulation mécanique.

2.2 Hypothèse et objectifs

L'objectif de cette thèse est d'améliorer le suivi des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*. Il est émis comme hypothèse que le suivi des adaptations pourrait être amélioré par la combinaison de multiples modalités de mesure. Afin de corroborer cette hypothèse, le projet est divisé en trois sous-objectifs qui consistent à :

- O1 évaluer la possibilité d'utiliser la corrélation d'images comme méthode de mesure pour caractériser le comportement mécanique d'échantillons osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*;
- O2 évaluer la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayon X (micro-CT) pour détecter des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*;
- O3 évaluer l'apport de l'utilisation de multiples modalités de mesure pour le suivi d'adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*.

La Figure 2-1 illustre comment les objectifs définis s'articulent les uns par rapport aux autres et comment ils sont abordés à l'intérieur de ce document.

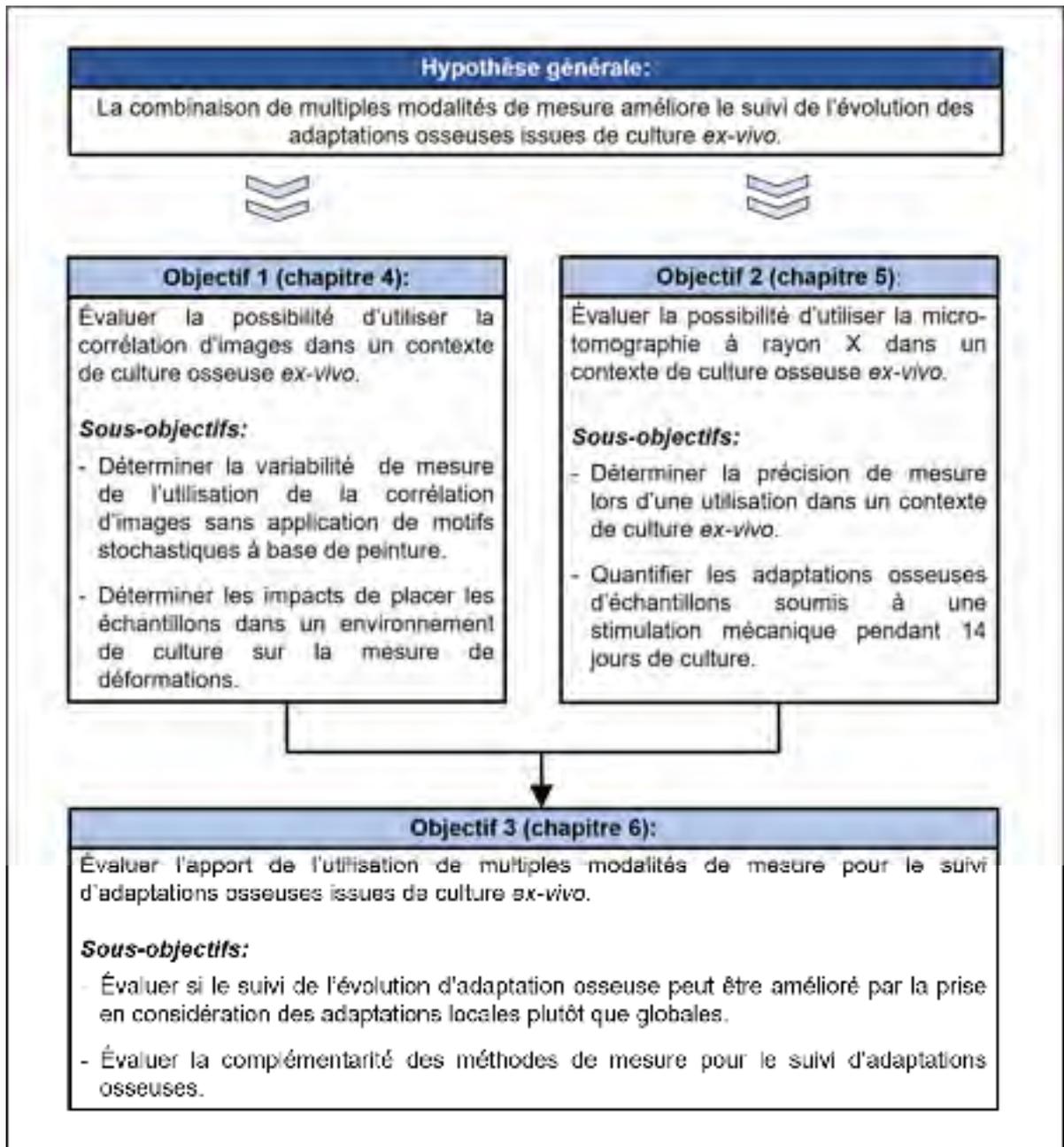


Figure 2-1 Structure de la thèse en fonction de l'approche méthodologique utilisée

Dans un premier temps, les caractéristiques du bioréacteur utilisé pour la mise en culture *ex-vivo* des échantillons d'os trabéculaire sont présentées dans le CHAPITRE 3. Par la suite, le CHAPITRE 4 présente une première série d'expérimentations réalisées pour évaluer la possibilité d'utiliser la corrélation d'images comme méthode de mesure pour caractériser le

comportement mécanique d'échantillons osseux durant la période de culture. Les variations de mesure associées à l'utilisation de la corrélation d'images sans application d'un motif stochastique exogène, ainsi que l'impact de placer l'échantillon dans une enceinte de culture sur la mesure des déformations y sont présentés. Le CHAPITRE 5 présente une seconde série d'expérimentations réalisées pour évaluer la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayons X pour détecter des adaptations osseuses issues de la culture *ex-vivo*. La précision de mesure ainsi que la possibilité d'utiliser cette méthode de mesure pour détecter des adaptations sur des échantillons osseux soumis à une stimulation mécanique pendant 14 jours de culture y sont présentées. Cette même série d'expérimentations a été utilisée pour évaluer la possibilité d'améliorer le suivi de l'évolution d'échantillons osseux lors de culture *ex-vivo* par la combinaison de multiples modalités de mesures. Les résultats obtenus à ce sujet sont présentés dans le CHAPITRE 6. Finalement, le CHAPITRE 7 met en évidence les accomplissements associés à la réalisation de ce projet et présente les perspectives reliées à sa réalisation.

CHAPITRE 3

BIOREACTEUR MULTIFONCTIONNEL

Ce chapitre présente le bioréacteur utilisé dans le cadre de ce projet doctoral pour la mise en culture *ex-vivo* d'échantillon osseux. Dans un premier temps, une description sommaire des exigences auxquelles le bioréacteur est en mesure de se conformer est présentée. Par la suite, les caractéristiques des différentes configurations du bioréacteur utilisées pour effectuer de la culture osseuse *ex-vivo* sont présentées.

3.1 Exigences

Le développement d'un outil de recherche nécessite préalablement à sa conception le déploiement de la fonction qualité. Cette approche consiste à identifier les besoins et exigences des utilisateurs, et à les traduire en terme de fonctions et de requis auxquels doivent répondre l'outil à développer. Le cahier des charges détaillant les besoins et attentes des utilisateurs, ainsi que les lignes directrices qui ont orientées le processus de développement du bioréacteur ont été mis en place en collaboration avec Florian GUILLAUME, étudiant au doctorat à l'École de technologie supérieure. Une description détaillée de l'approche utilisée ainsi que les différentes solutions proposées seront présentées lors du dépôt de sa thèse. Néanmoins, les exigences auxquelles le bioréacteur est en mesure de répondre sont brièvement énumérées ci-dessous, puisqu'un certain nombre ont été définies spécifiquement pour les besoins de ce projet. Le bioréacteur développé devra :

- permettre de maintenir en vie des échantillons de tissus osseux *ex-vivo*;
- permettre d'appliquer un chargement mécanique pour stimuler le processus de formation osseuse;
- être compatible avec l'utilisation de multiples méthodes de mesure, dont la corrélation d'images et la micro-tomographie à rayons X, pour suivre et caractériser l'évolution des adaptations osseuses des échantillons durant la période de culture.

3.2 Configurations

Le bioréacteur utilisé a pour particularité d'être compatible avec l'utilisation de multiples méthodes de mesure telles que la corrélation d'images et la micro-tomographie à rayon X. Par conséquent, des modifications doivent être apportées à son assemblage pour répondre aux exigences du contexte et des conditions dans lequel il est employé.

3.2.1 Culture osseuse

La Figure 3-1 présente le bioréacteur assemblé dans la configuration utilisée pour la réalisation de culture d'explants osseux. Cette configuration est constituée d'un système de perfusion (pompe et éprouvette), d'une enceinte de culture et son capot.

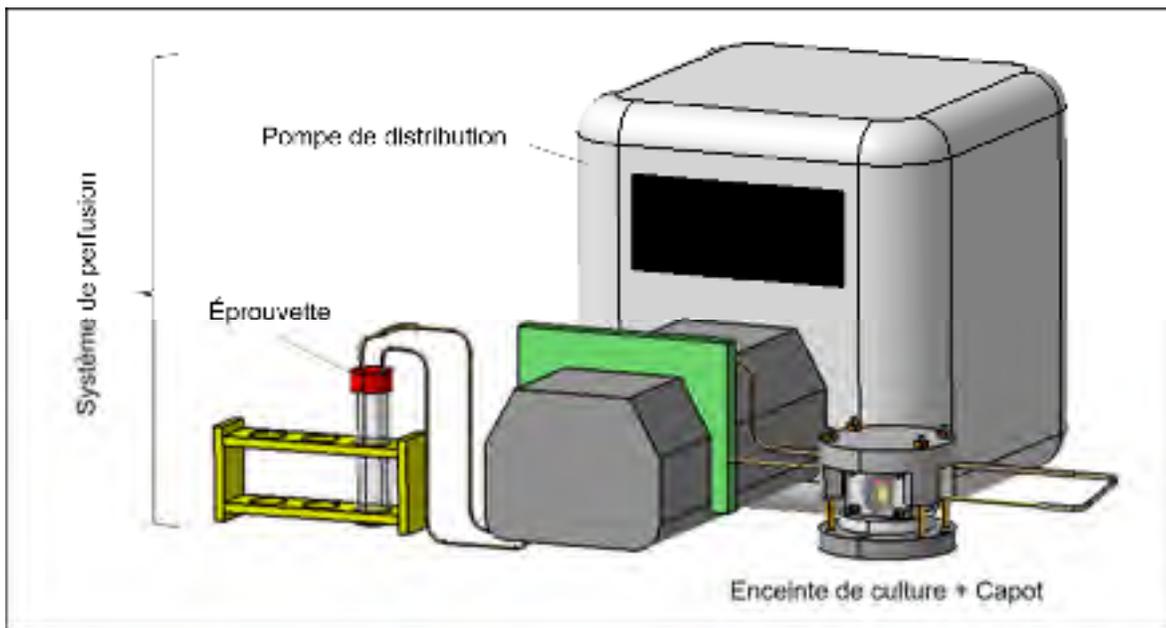


Figure 3-1 Bioréacteur assemblé en configuration de culture osseuse

La Figure 3-2 présente une vue explosée de l'enceinte de culture. La chambre fabriquée en polycarbonate est utilisée comme réceptacle stérile à l'intérieur duquel est placé l'échantillon d'os trabéculaire pour toute la période de culture. Elle permet d'accueillir des échantillons d'un diamètre de 13.7 mm, d'une hauteur 10 mm et d'une épaisseur de 10 mm. Une vitre de

polycarbonate constitue la fenêtre de visualisation. Elle permet de voir en tout temps l'échantillon et de prendre connaissance de l'état du milieu de culture tout au long de la période d'incubation. Cette vitre permet également à l'enceinte de culture d'être utilisée en combinaison avec des outils de mesure optique (ARAMIS 5M, Gom) pour effectuer, par corrélation d'images, l'acquisition des déplacements et le calcul des déformations subies par l'échantillon lors de sa stimulation ou de la caractérisation de son comportement mécanique.

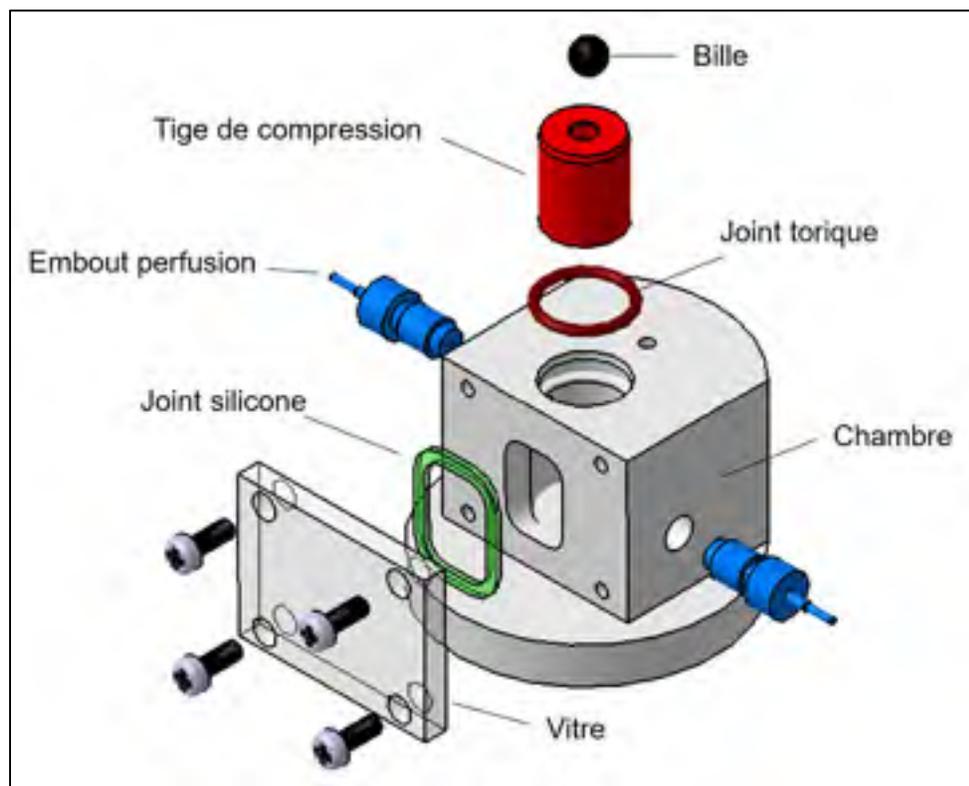


Figure 3-2 Vue explosée de l'enceinte de culture sans capot

Une tige de compression fabriquée en acier inoxydable sert à appliquer un chargement mécanique en compression aux échantillons pour stimuler le processus de formation osseuse ou caractériser leur comportement mécanique. Une liaison linéaire-annulaire entre le capot et la tige de compression permet à la tige de s'incliner (max 5°) et de s'adapter aux surfaces des échantillons qui ne sont pas parfaitement planes et susceptibles de présenter des défauts de parallélisme entre elles (Figure 3-3). Cette caractéristique de l'enceinte de culture permet

d'assurer la transmission de la stimulation mécanique sur toute la surface de l'échantillon, malgré les défauts de celui-ci. Un joint torique positionné à l'intérieur de la chambre et entourant la tige de compression assure l'étanchéité du bioréacteur. Un joint en silicone (Dragon Skin 10, Smooth-On) conçu au laboratoire et positionné à l'interface de la chambre et de la vitre évite également toutes fuites du milieu de culture et tout contact avec l'air ambiant.

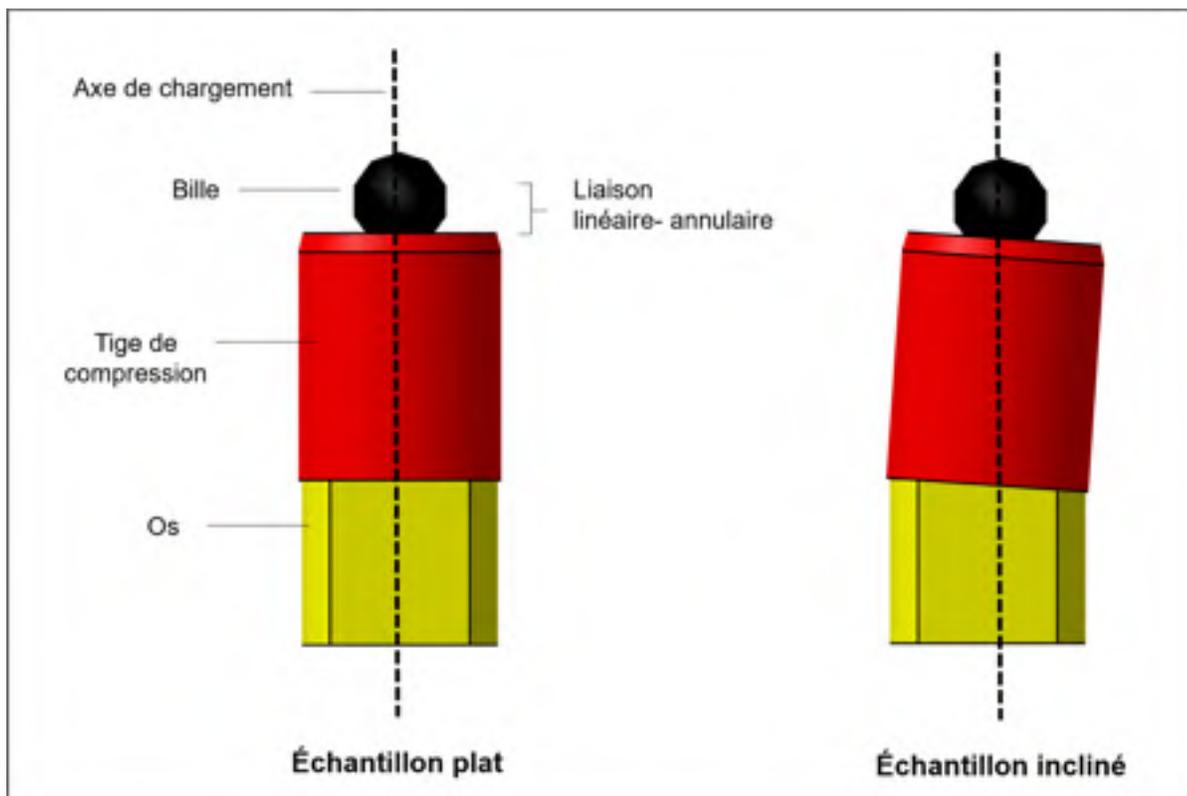


Figure 3-3 Liaison linéaire-annulaire qui permet à la tige de compression de s'incliner en présence de surface présentant des irrégularités

L'enceinte de culture développée est compatible avec l'appareil de test mécanique traction-compression Electroforce 3220 de TA Instrument (Figure 3-4). Pour ce faire, une plaque de fixation en acier inoxydable positionnée sous la chambre assure sa solidarisation de l'enceinte de culture avec l'appareil de test mécanique. Le chargement mécanique est appliqué à l'échantillon par l'intermédiaire du piston de l'appareil de test mécanique qui s'appuie sur la surface d'un capot et transmet le chargement. Le capteur LVDT (Electroforce 3220, TA Instrument, Del, USA) de l'appareil de test mécanique, ainsi qu'une cellule de force de 225N

(modèle 1516DW-100, TA Instrument, Del, USA) positionnée sous l'enceinte de culture, permettent respectivement l'enregistrement des déplacements et des forces lors de la culture osseuse. Finalement, le capot fabriqué en acier inoxydable et son système de fixation (boulons et écrous) assurent l'application et le maintien d'une charge statique sur l'échantillon lorsque l'enceinte de culture n'est pas placée dans l'appareil de test mécanique.

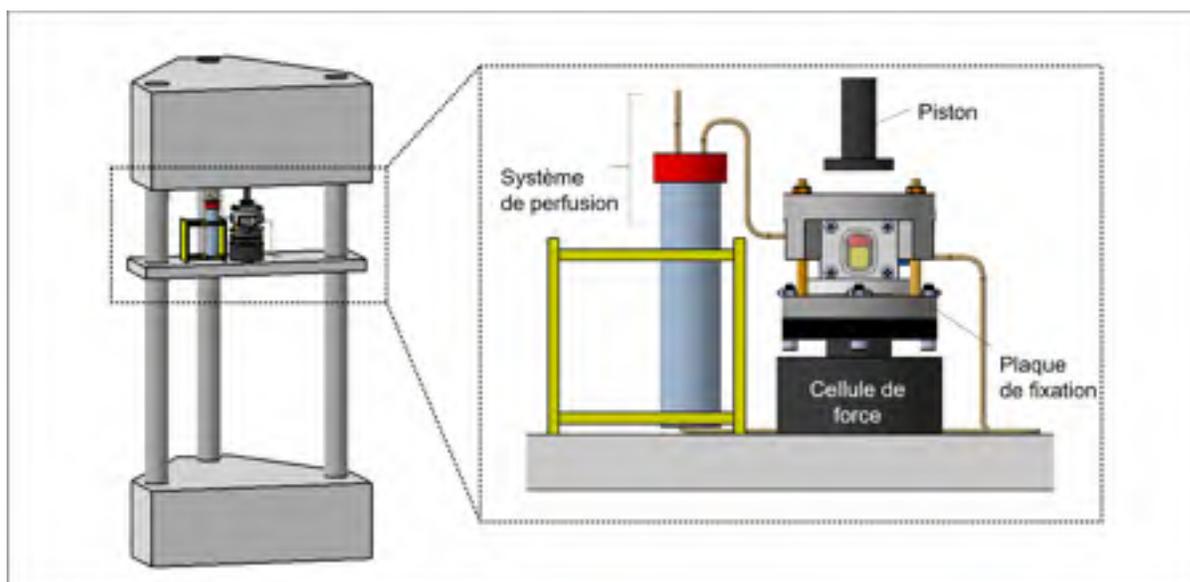


Figure 3-4 Montage expérimental utilisé pour solliciter mécaniquement les échantillons

Lors de la période de culture, toutes les composantes du bioréacteur sont placées dans un incubateur (Forma Serie II, Thermo Fisher, Mass, USA) à 37°C (111% RH et 5% CO₂) pour reproduire un environnement similaire à celui d'un sujet vivant. Le tissu osseux est maintenu en vie à l'intérieur de l'enceinte de culture par l'apport d'un milieu de culture composé de BGJb, de sérum fœtal bovin (10%) et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, 10%) (Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). Une pompe péristaltique (Masterflex L/S, modèle 07523-90, Cole-Parmer Instrument, Ill, USA) reliée via un système de tubes (modèle 06447-26 et 06449-26, Cole-Parmer Instrument, Ill, USA) et d'embouts (Masterflex, item 40612-43, Cole-Parmer Instrument, Ill, USA) à l'enceinte de culture et à un réservoir (tube conique 50 ml, Sarstedt, Mtl, CA) assure la perfusion et le renouvellement du milieu de culture à un débit constant de 7 ml/h (Endres et al., 2009).

3.2.2 Acquisition d'images micro-CT

La Figure 3-5 présente le bioréacteur assemblé dans la configuration utilisée pour l'acquisition d'images micro-CT.

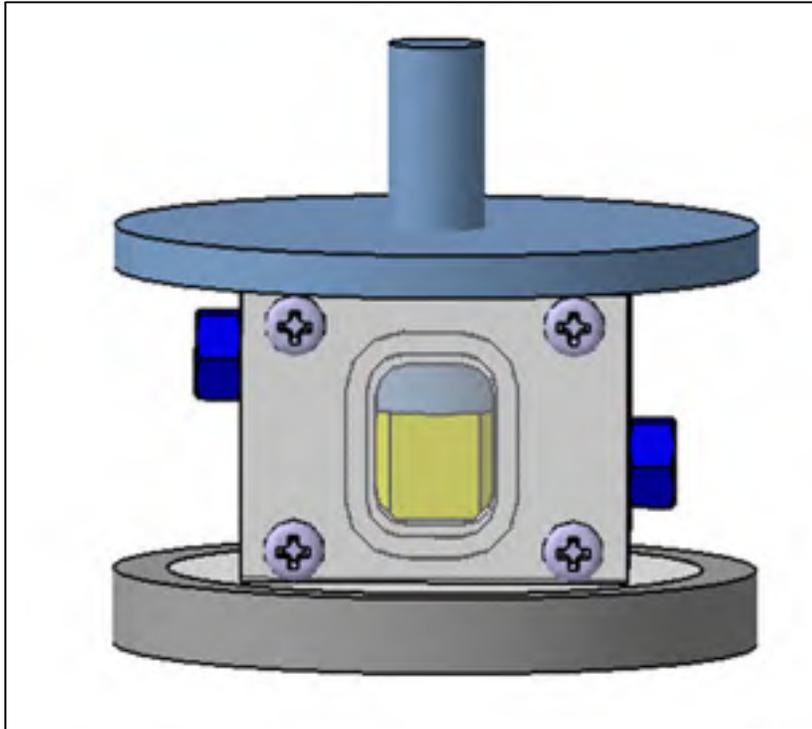


Figure 3-5 Enceinte de culture assemblée en configuration pour l'acquisition d'images micro-CT

Cette configuration est compatible avec le lit de positionnement de l'appareil micro-CT Skyscan 1176 (Bruker BioSpin Corp. Manning Park.). Pour assembler l'enceinte de culture en configuration d'imagerie, le capot et la tige de compression en acier inoxydable sont retirés et remplacés par un capot en polycarbonate (Figure 3-6). Un compartiment intégré au capot micro-CT a été prévu pour insérer des objets de calibration nécessaires à la détermination de la densité minérale osseuse des échantillons. Par la suite, les embouts de perfusion sont retirés et remplacés par des bouchons filetés pour assurer l'étanchéité de la chambre lors du transport, et éviter tout déversement de milieu de culture dans l'appareil micro-CT. Finalement, un socle

cylindrique fabriqué en polycarbonate est ajouté à la base de la chambre de culture pour assurer le centrage de l'enceinte de culture dans le lit de l'appareil micro-CT.

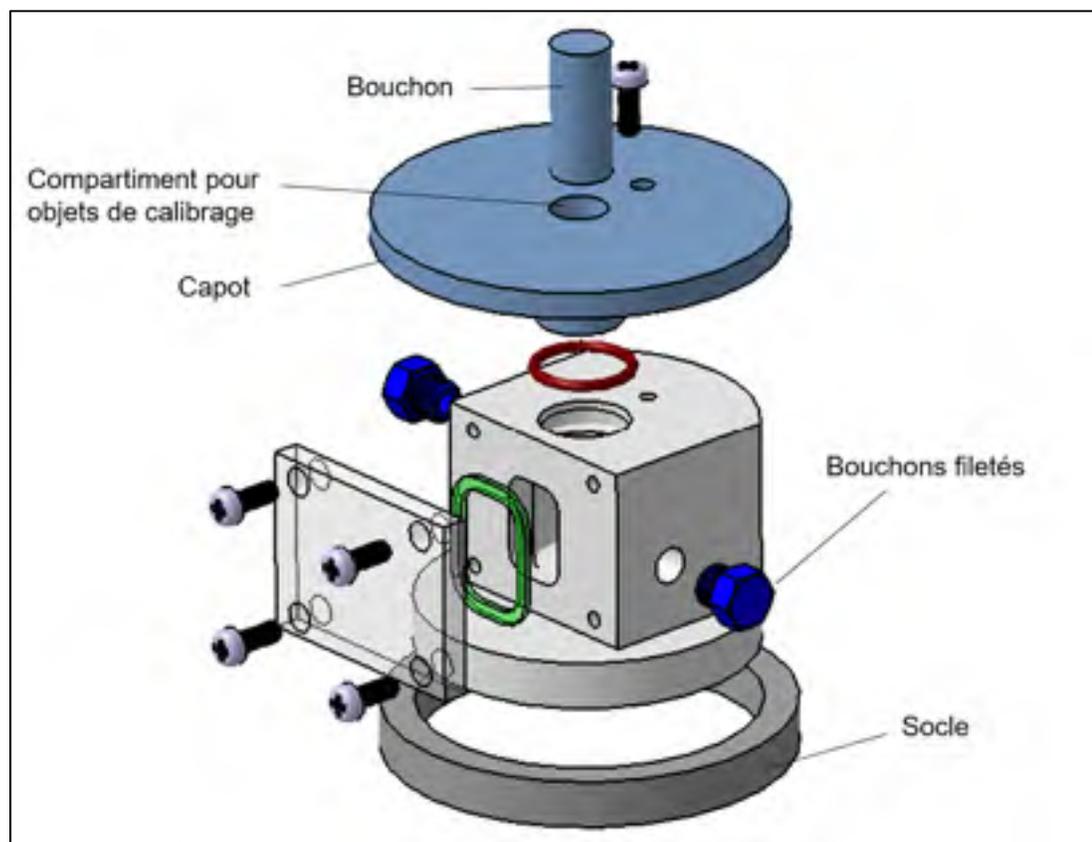


Figure 3-6 Vue explosée de la chambre de culture en configuration pour l'acquisition d'images micro-CT

CHAPITRE 4

UTILISATION DE LA CORRÉLATION D'IMAGES DANS UN CONTEXTE DE CULTURE OSSEUSE *EX-VIVO*

Ce chapitre présente l'étude effectuée pour réaliser le premier objectif de cette thèse qui est de d'évaluer la possibilité d'utiliser la corrélation d'images comme méthode de mesure pour caractériser le comportement mécanique d'échantillons osseux dans un contexte de culture *ex-vivo*. L'accomplissement de cette étude a permis dans un premier temps de déterminer la variation de mesure de la corrélation d'images lors de son utilisation sans application d'un motif stochastique à base de peinture. L'application d'une peinture sur l'échantillon ne sera pas possible dans le contexte d'une culture *ex-vivo* puisqu'elle risque d'atteindre l'intégrité de l'échantillon en raison de sa toxicité. Par la suite, l'impact de placer l'échantillon dans une enceinte de culture sur la mesure des déformations par corrélation d'images sera déterminé.

4.1 Matériel et méthodes

Cinq échantillons d'os trabéculaire ont été prélevés sur les os iliaques de deux vaches âgées de quatre et sept ans. Ce type d'os a été choisi car il est soumis à un faible chargement donc, davantage susceptible de présenter éventuellement des adaptations osseuses liées à l'application d'un chargement mécanique dans le cadre de culture *ex-vivo*. Les échantillons cylindriques ont été extraits de diverses régions à l'aide d'une perceuse à colonne et d'un outil de carottage commercial (scie emporte-pièce, Bosch) (Figure 4-1a). Une fois extraits, les échantillons cylindriques d'un diamètre de 13,7 mm ont été fixés dans un support de coupe conçu au laboratoire. Une perceuse à colonne, une mini-table de translation (micro compound table KT70, Proxxon®) ainsi qu'une fraise en carbure de tungstène (Dremel® 9902) ont par la suite été utilisées pour obtenir des surfaces planes nécessaires à l'acquisition des mesures par corrélation d'images (Figure 4-1b). Les extrémités des échantillons ont ensuite été coupées à l'aide d'un outil de coupe manuel de type Dremel® muni d'une scie à lame rotative (HSS

47362, Samona/RDK) pour obtenir des échantillons d'une hauteur de dix mm (Figure 4-1c). Une fois la préparation terminée, les échantillons ont été entreposés dans un congélateur à -20°C .

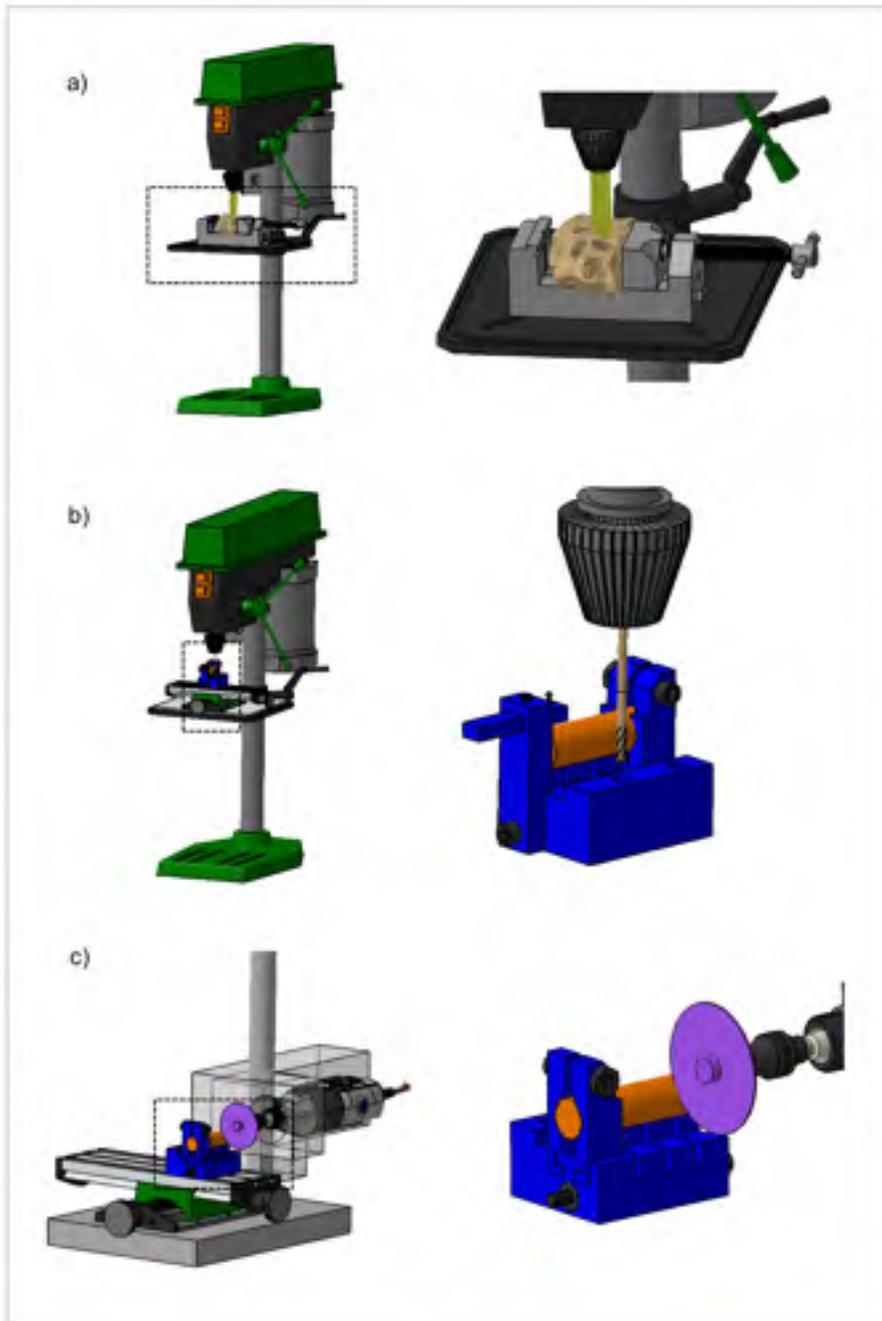


Figure 4-1 Étapes effectuées pour la préparation des échantillons : a) extraction, b) fraisage, c) coupe.

La sollicitation mécanique des échantillons a été effectuée en deux parties (Figure 4-2). La première partie a été réalisée sans application de peinture en utilisant comme motif aléatoire la porosité naturelle du tissu osseux.

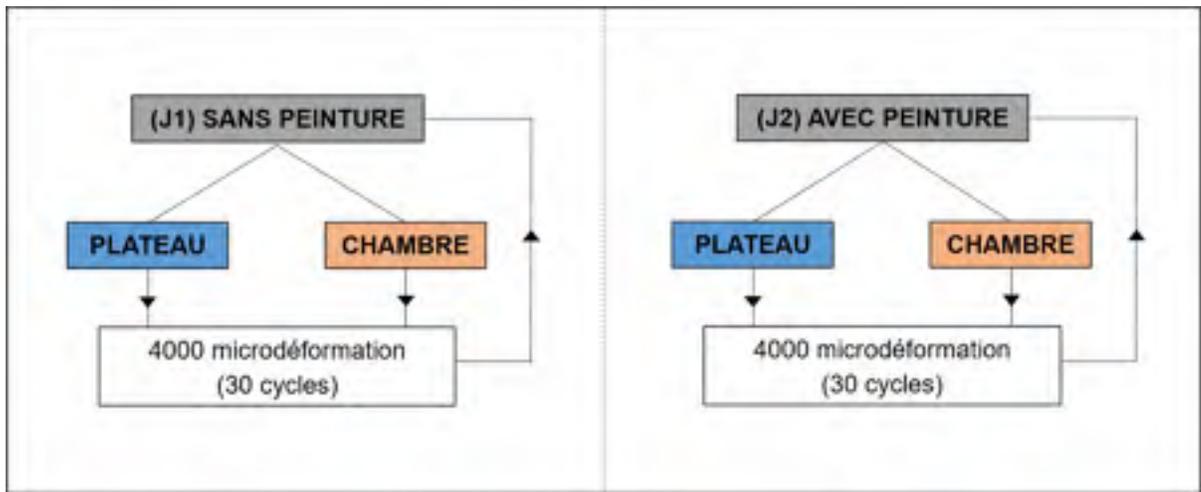


Figure 4-2 Plan d'expérience

Les échantillons ont été décongelés douze heures à température pièce et placés dans un appareil de test mécanique (Electroforce 3220, TA Instrument, De, USA). Ils ont été sollicités mécaniquement selon deux modalités (Figure 4-3) soit: a) entre deux plateaux de compression et b) à l'intérieur d'une enceinte remplie de milieu de culture (BGJb). L'ordre de sollicitation a été déterminé aléatoirement. Un temps de séchage de 120 minutes a été alloué à l'échantillon lorsque la première sollicitation mécanique était réalisée dans l'enceinte de culture.

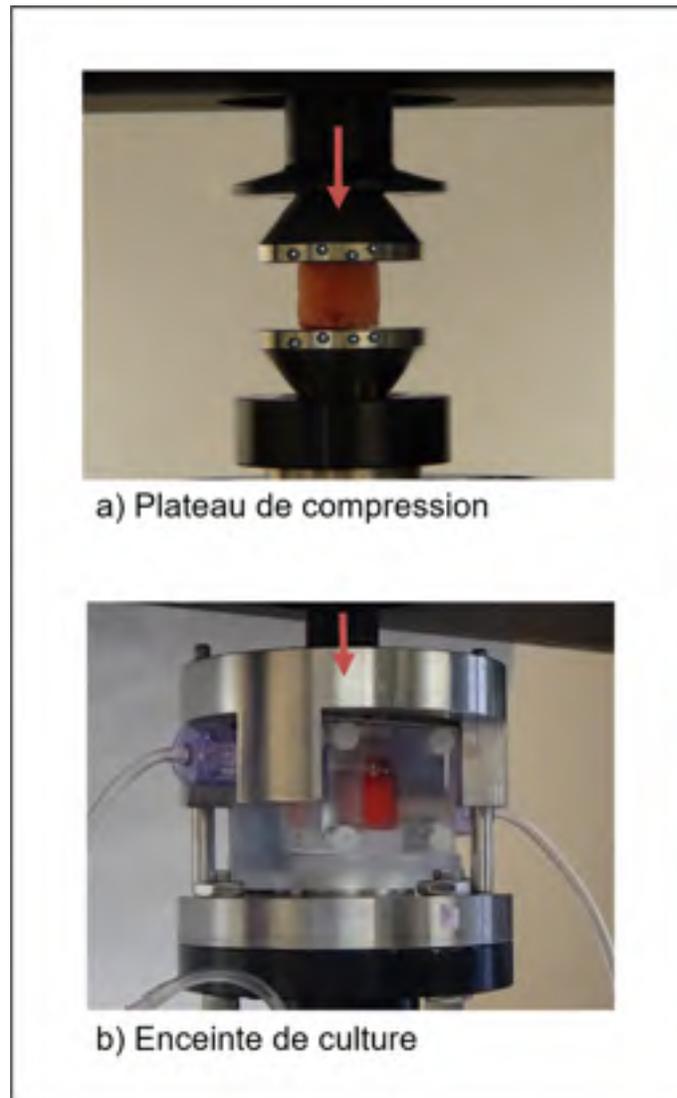


Figure 4-3 Montages expérimentaux utilisés pour la sollicitation mécanique des échantillons

Un système de mesure optique (ARAMIS 5M, Gom, BS, DE) a été utilisé pour quantifier le déplacement de marqueurs de référence apposés sur le plateau et la tige de compression, de même que le déplacement et la déformation du motif stochastique présent à la surface de l'échantillon. Parallèlement, le capteur LVDT de l'appareil de test mécanique (Electroforce 3220, TA Instruments, De, USA) a été utilisé pour mesurer le déplacement imposé pendant l'essai. La déformation résultante a été calculée en divisant le déplacement par la hauteur initiale de l'échantillon.

Le déplacement moyen de la tige de compression mesuré par le capteur LVDT de l'appareil de test ainsi que par le système de mesure optique a été comparé à la commande prévue être appliquée sur l'appareil de test mécanique. Cette comparaison permettra de s'assurer que l'appareil de test mécanique applique correctement le chargement exigé. La moyenne de déplacement et de déformation obtenue avec et sans motif stochastique a été comparée pour chacune des conditions de chargement (plateau et enceinte de culture). Cette comparaison permettra de quantifier l'effet de l'absence du motif lors de la réalisation de corrélation d'images. Le déplacement moyen et la déformation moyenne obtenus dans l'enceinte de culture ont été comparés à aux valeurs rapportées entre les plateaux de compression pour déterminer les différences associées à l'utilisation de la corrélation d'images dans un contexte de culture *ex-vivo*. Un test statistique de Wilcoxon a été utilisé (STATISTICA, version 7.1) pour déterminer s'il existe des différences entre les groupes. Les tests statistiques ont été jugés significatifs à $p < 0,05$.

4.2 Résultats

La Figure 4-4 compare la commande de déplacement prévue être appliquée par l'appareil de test mécanique aux déplacements mesurés avec les deux systèmes de mesure. Le déplacement moyen mesuré par le système optique pour les cinq échantillons s'écarte de la commande prévue être appliquée ($p = 0.043$) et du déplacement mesuré par le capteur LVDT ($p = 0.043$). Le déplacement moyen du plateau et de la tige de compression est plus petit que la commande ($-7,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$ et $-8,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$) et que le déplacement mesuré par le capteur LVDT ($-7,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$ et $-8,1 \pm 2,3 \mu\text{m}$). Aucune différence significative n'est rapportée entre la commande et

le déplacement mesuré par le capteur LVDT ($p_{\text{plateau}} = 0,500$ et $p_{\text{enceinte}} = 0,275$).

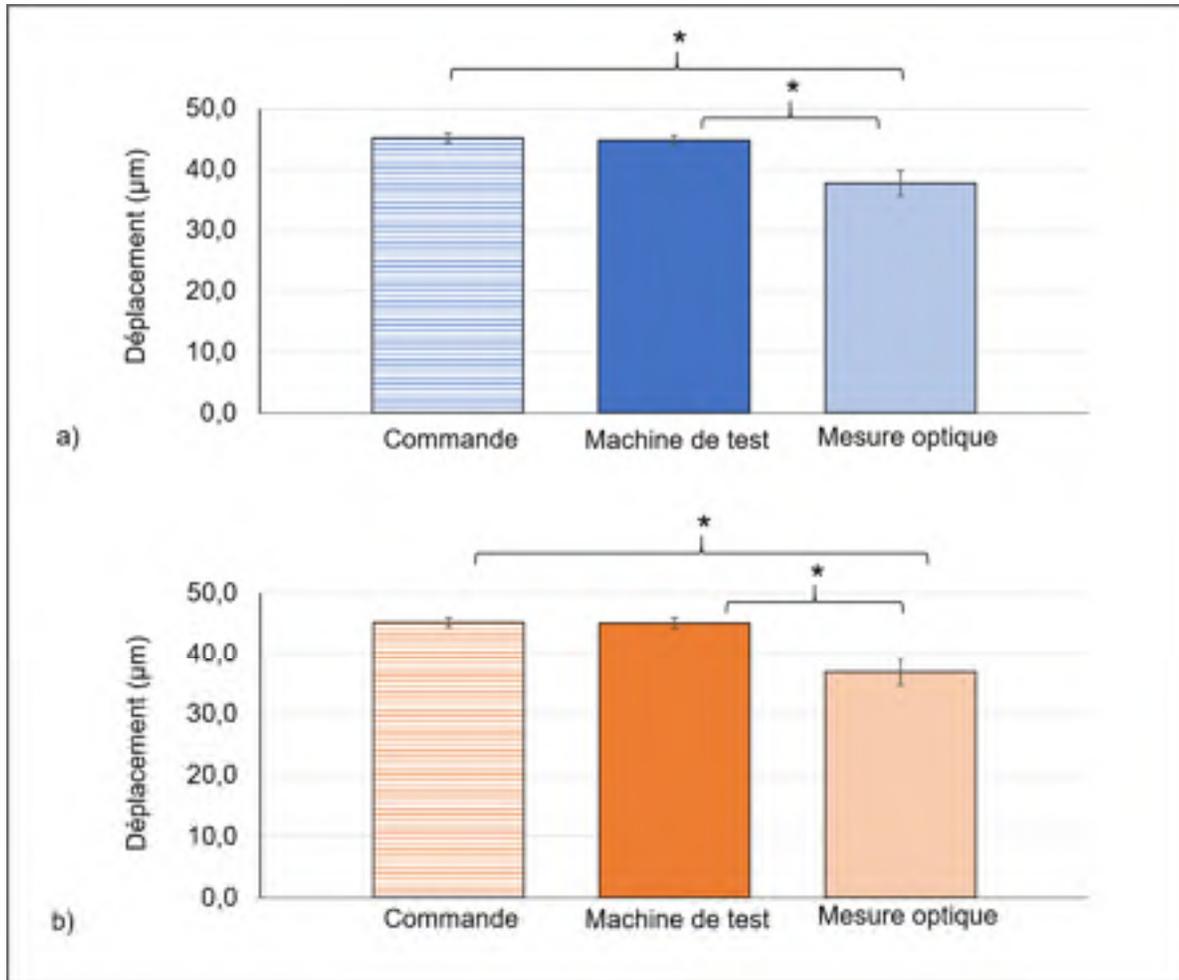


Figure 4-4 Comparaison de la commande de déplacement moyen donnée à l'appareil de tests mécanique et les déplacements moyens des cinq échantillons mesurés avec les deux systèmes de mesure a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$)

La Figure 4-5 et la Figure 4-6 comparent visuellement la distribution des déplacements mesurée par corrélation d'images entre les plateaux de compression et dans l'enceinte de culture pour deux des cinq échantillons. La comparaison du chargement avec et sans motif stochastique à base de peinture démontre une similitude de la distribution des déplacements uniquement dans le cadre de l'utilisation des plateaux de compression. La comparaison des deux modalités de chargement démontre que la distribution des déplacements mesurés à l'intérieur de l'enceinte de culture diffère légèrement de ce qui est perçu entre les plateaux de

compression. Les résultats obtenus démontrent également que le chargement n'est pas appliqué uniformément sur toute la surface des échantillons, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de l'enceinte de culture.

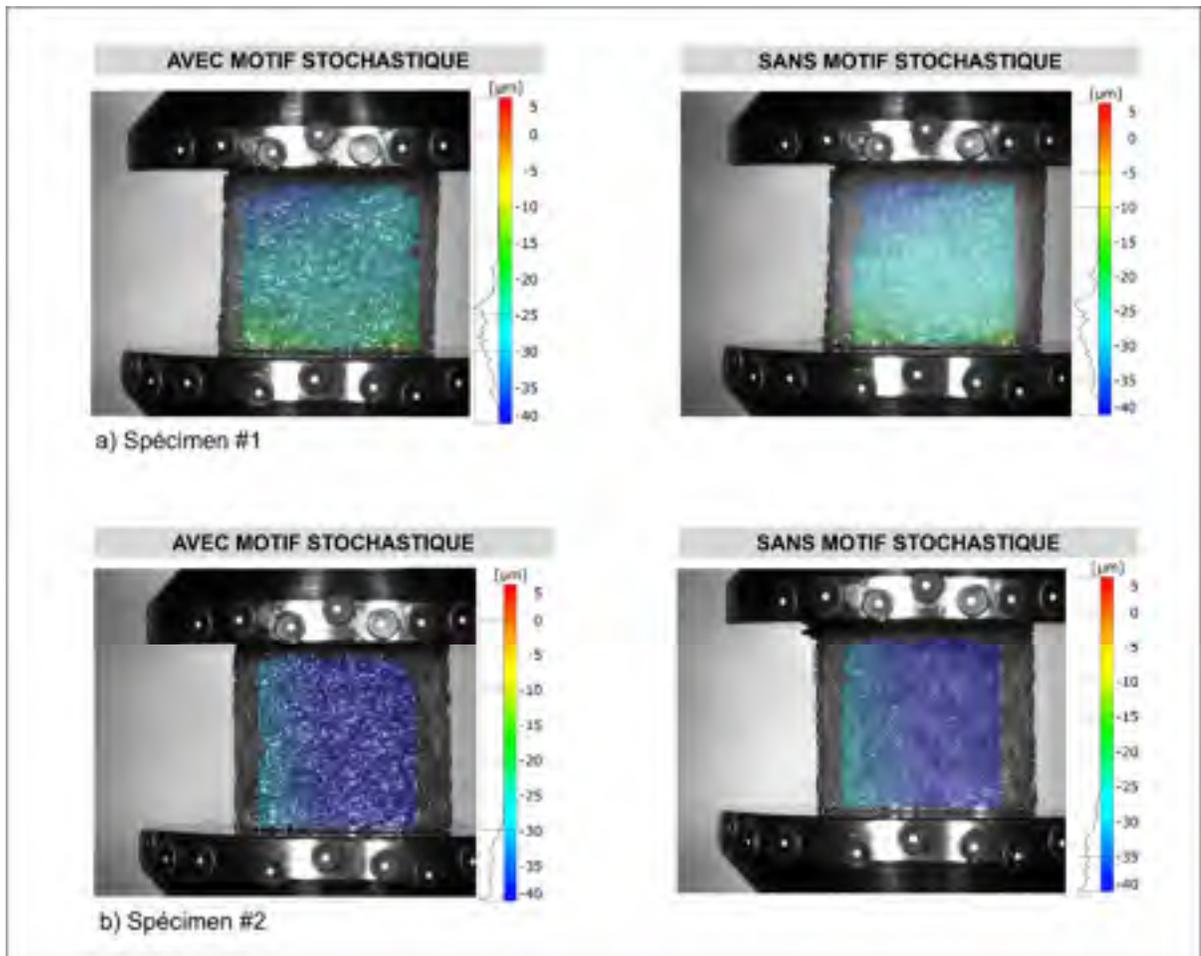


Figure 4-5 Exemples de la distribution des déplacements mesurés par corrélation d'images avec et sans motif stochastique à base de peinture pour deux des échantillons sollicités mécaniquement entre les plateaux de compression

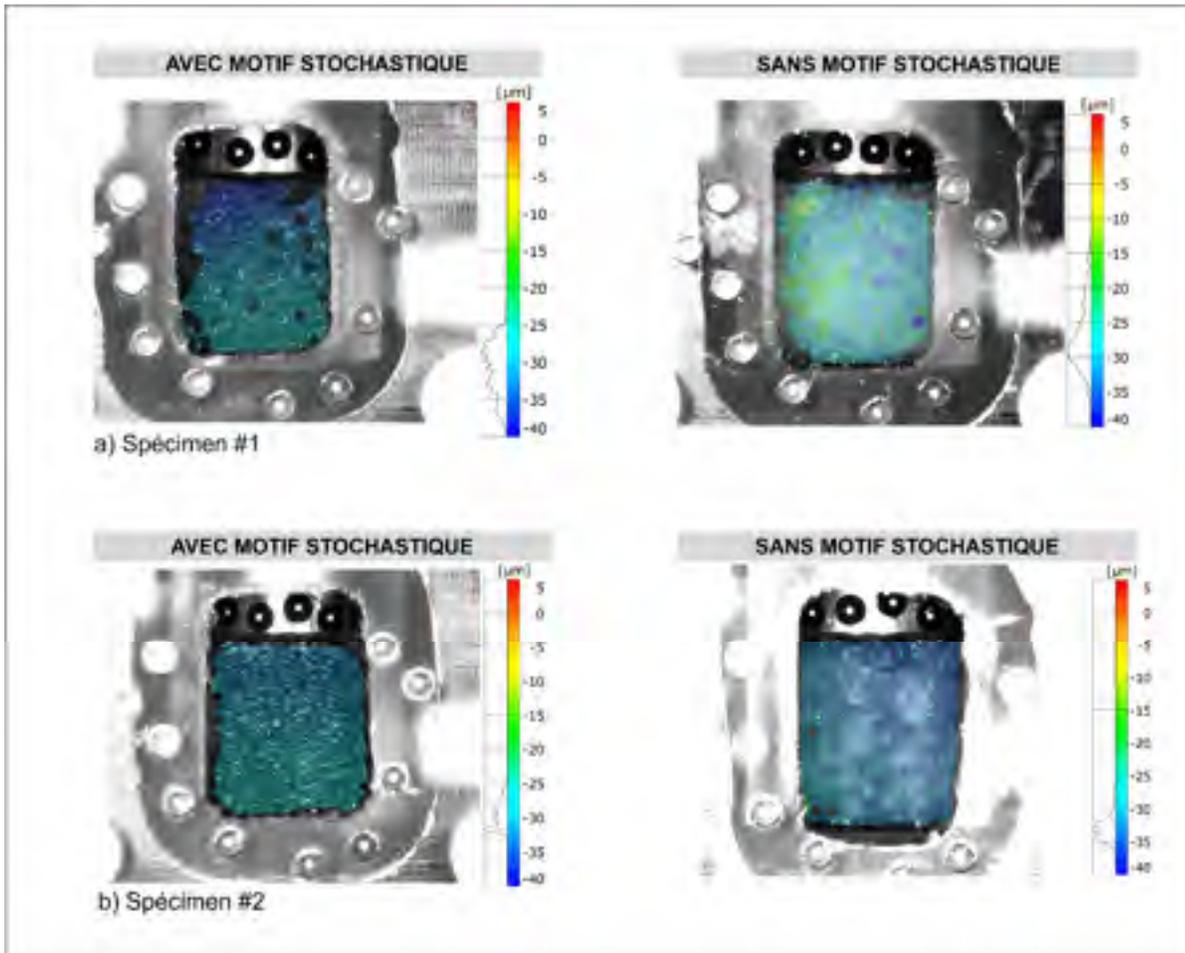


Figure 4-6 Exemples de la distribution des déplacements mesurés par corrélation d'images avec et sans motif stochastique à base de peinture pour deux des échantillons sollicités mécaniquement dans l'enceinte de culture

La Figure 4-7 compare numériquement les déplacements moyens des cinq échantillons mesurés avec et sans motif stochastique pour les plateaux de compression et dans l'enceinte de culture. Ces mesures sont également comparées à la commande donnée à l'appareil de test mécanique. Pour l'ensemble des essais, le déplacement moyen perçu par les échantillons est moins élevé que la commande prévue être appliquée ($p = 0,041$). La différence la plus élevée est de 21.4 μm pour les plateaux et 19.9 μm pour l'enceinte de culture.

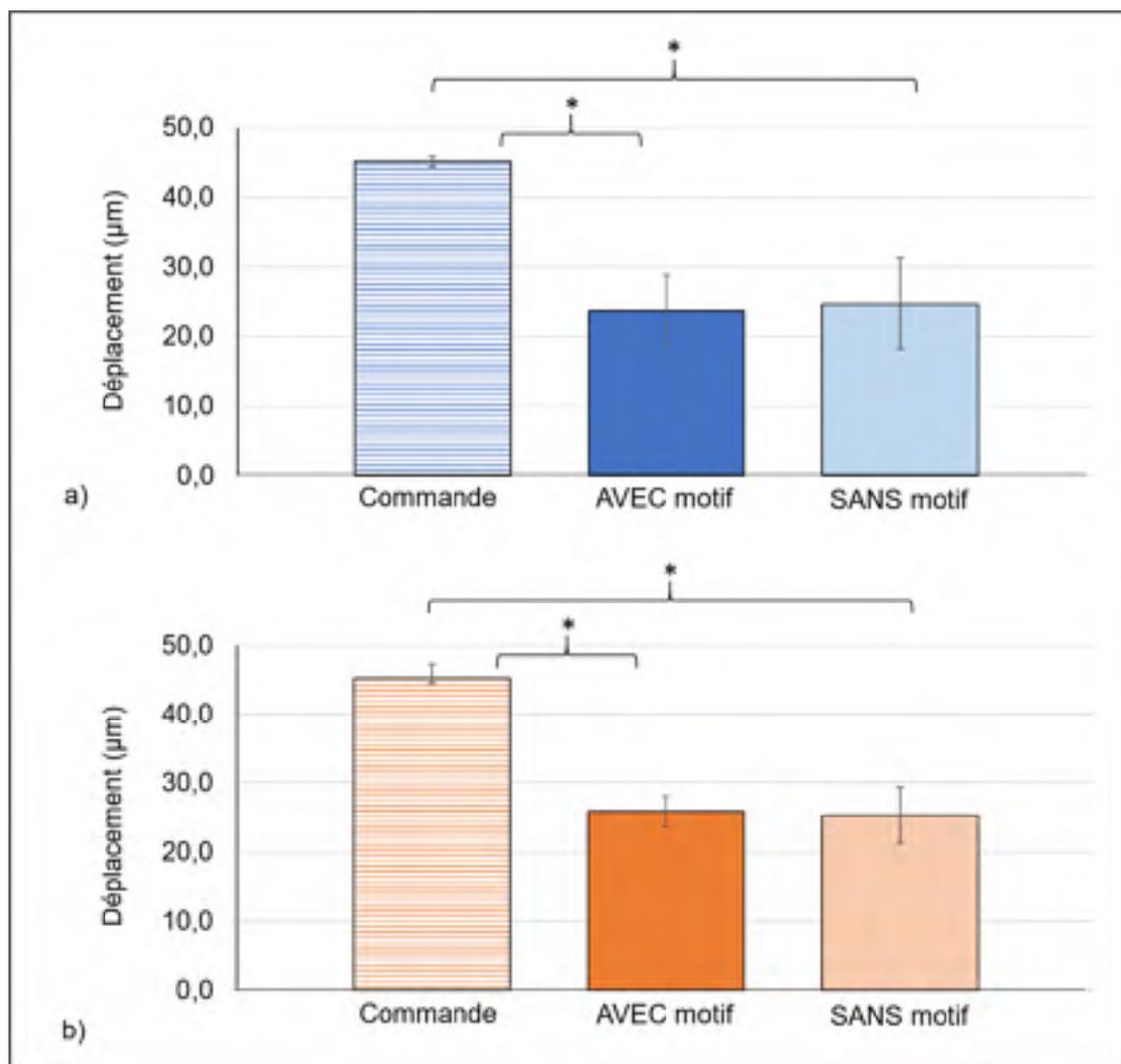


Figure 4-7 Comparaison de la mesure de déplacement moyen des cinq échantillons obtenue par corrélation d'images avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$)

Bien que les distributions de déplacement dans les échantillons semblent varier (Figure 4-5 et Figure 4-6), les déplacements moyens mesurés sans motif stochastique sont similaires aux déplacements moyens mesurés avec motif stochastique que ce soit entre les plateaux ou dans l'enceinte de culture (Figure 4-7). En effet, aucune différence statistique liée à la présence d'un motif stochastique n'est rapportée tant pour les chargements entre plateaux ($p = 0,224$) que dans le bioréacteur ($p = 0,404$). L'analyse statistique ne rapporte également aucune différence

significative liée au montage expérimental utilisé avec ($p = 0,500$) ou sans motif stochastique ($p = 0,685$).

La Figure 4-8 et la Figure 4-9 comparent la distribution des déformations entre les plateaux de compression et dans l'enceinte de culture pour 2 des 5 échantillons. La comparaison du chargement avec et sans motif stochastique démontre une similitude de la distribution des déformations uniquement dans le cadre de l'utilisation des plateaux de compression. La comparaison des deux modalités de chargement démontre que la distribution des déformations à l'intérieur de l'enceinte de culture avec motif stochastique diffère légèrement de ce qui est mesuré entre les plateaux de compression, ce qui suggère une influence de la vitre et du milieu de culture. La différence est plus importante en l'absence de motif stochastique. Il est à noter que dans tous les cas, les déformations perçues lors de la sollicitation mécanique ne correspondent pas à du bruit de mesure car elles diffèrent de la mesure de référence obtenue sans application de chargement (Figure 4-8 et Figure 4-9). Les résultats obtenus démontrent également que les déformations appliquées ne sont pas distribuées uniformément sur toute la surface de l'échantillon que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur du bioréacteur. Elles sont principalement localisées à proximité des surfaces de chargement, ce qui suggère un effet de bord dû aux imperfections géométriques des échantillons.

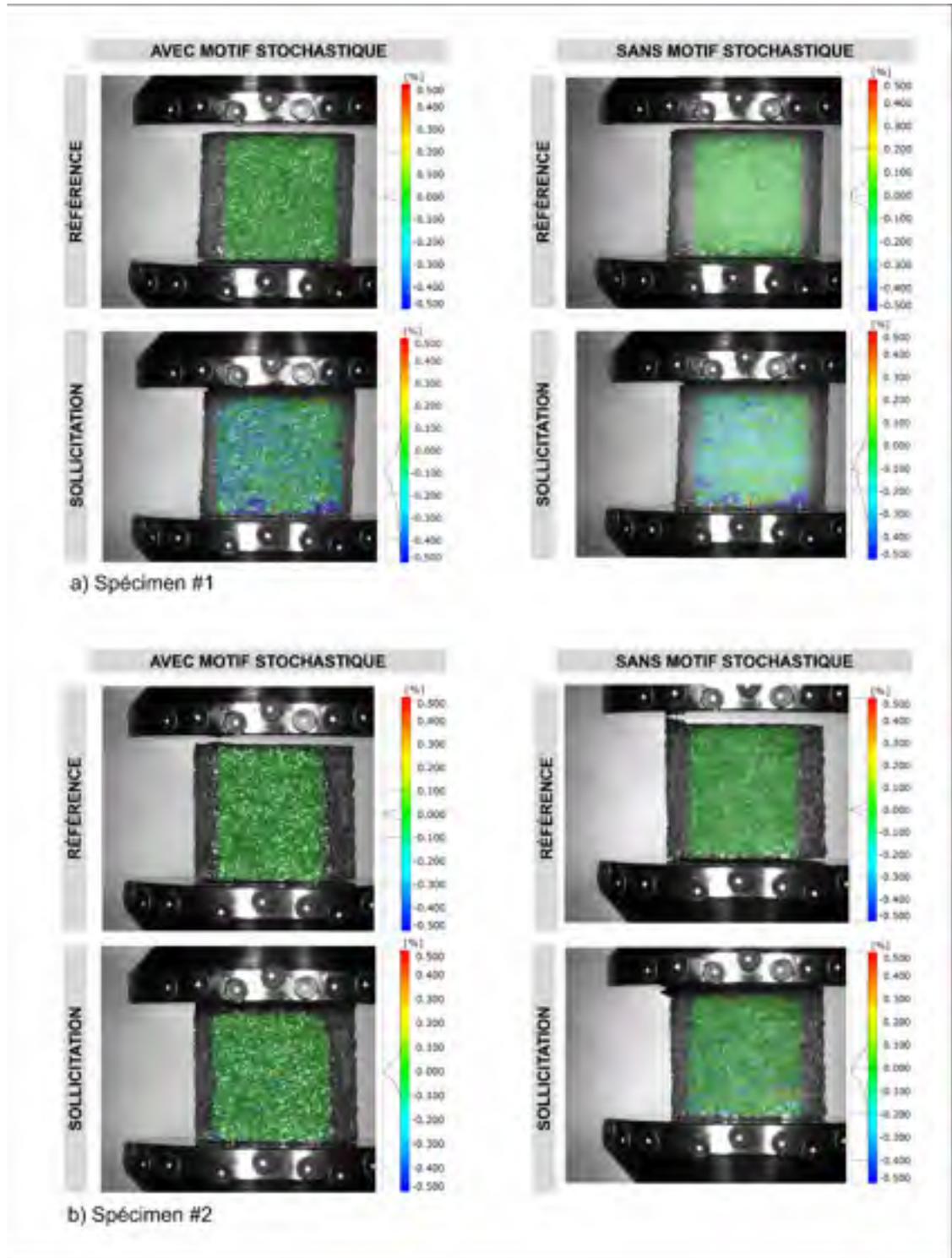


Figure 4-8 Distribution des déformations calculées par corrélation d'images avec et sans motif stochastique pour deux des cinq échantillons lors de sollicitations mécaniques entre les plateaux de compression. La référence est obtenue préalablement à l'application de la précharge

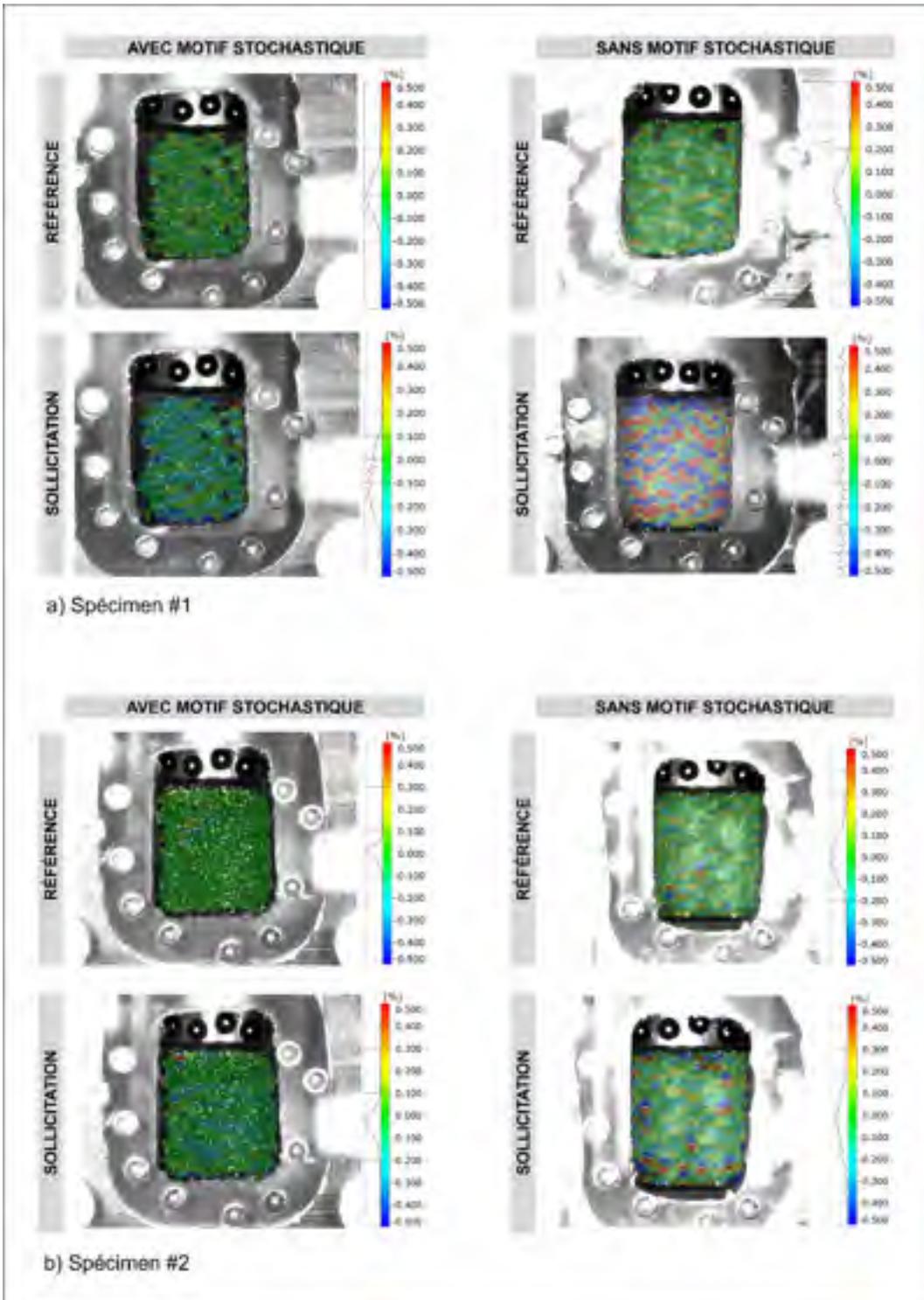


Figure 4-9 Distribution des déformations calculées par corrélation d'images avec et sans motif stochastique pour deux des cinq échantillons lors de sollicitations mécaniques dans l'enceinte de culture. La référence est obtenue préalablement à l'application de la précharge

La Figure 4-10 compare numériquement la déformation moyenne obtenue avec et sans motif stochastique entre les plateaux de compression et dans l'enceinte de culture. Ces valeurs sont également comparées à la déformation prévue être appliquée par l'appareil de test mécanique. Pour l'ensemble des essais, la déformation moyenne perçue par les échantillons est moins élevée ($\Delta_{\max \text{ plateau}} = -0.301\%$, $\Delta_{\max \text{ chambre}} = -0.308\%$) que le chargement prévu leur être appliqué ($p = 0.043$). La déformation prévue être appliquée n'est atteinte, voire surpassée que localement (Figure 4-11, Figure 4-8, Figure 4-9).

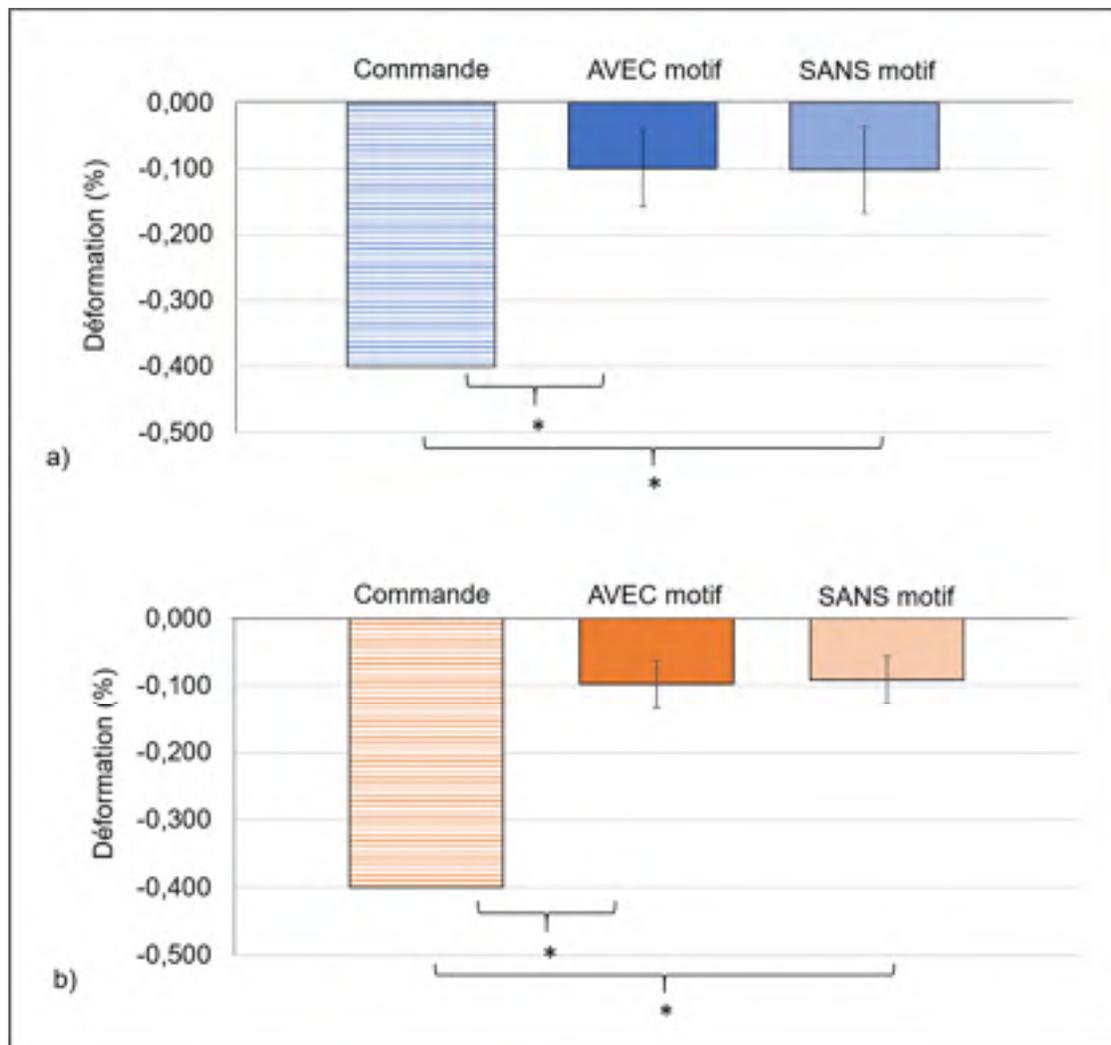


Figure 4-10 Comparaison de la déformation moyenne des cinq échantillons obtenue par corrélation d'images avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture. L'astéris (*) indique une différence statistiquement significative ($p < 0.05$)

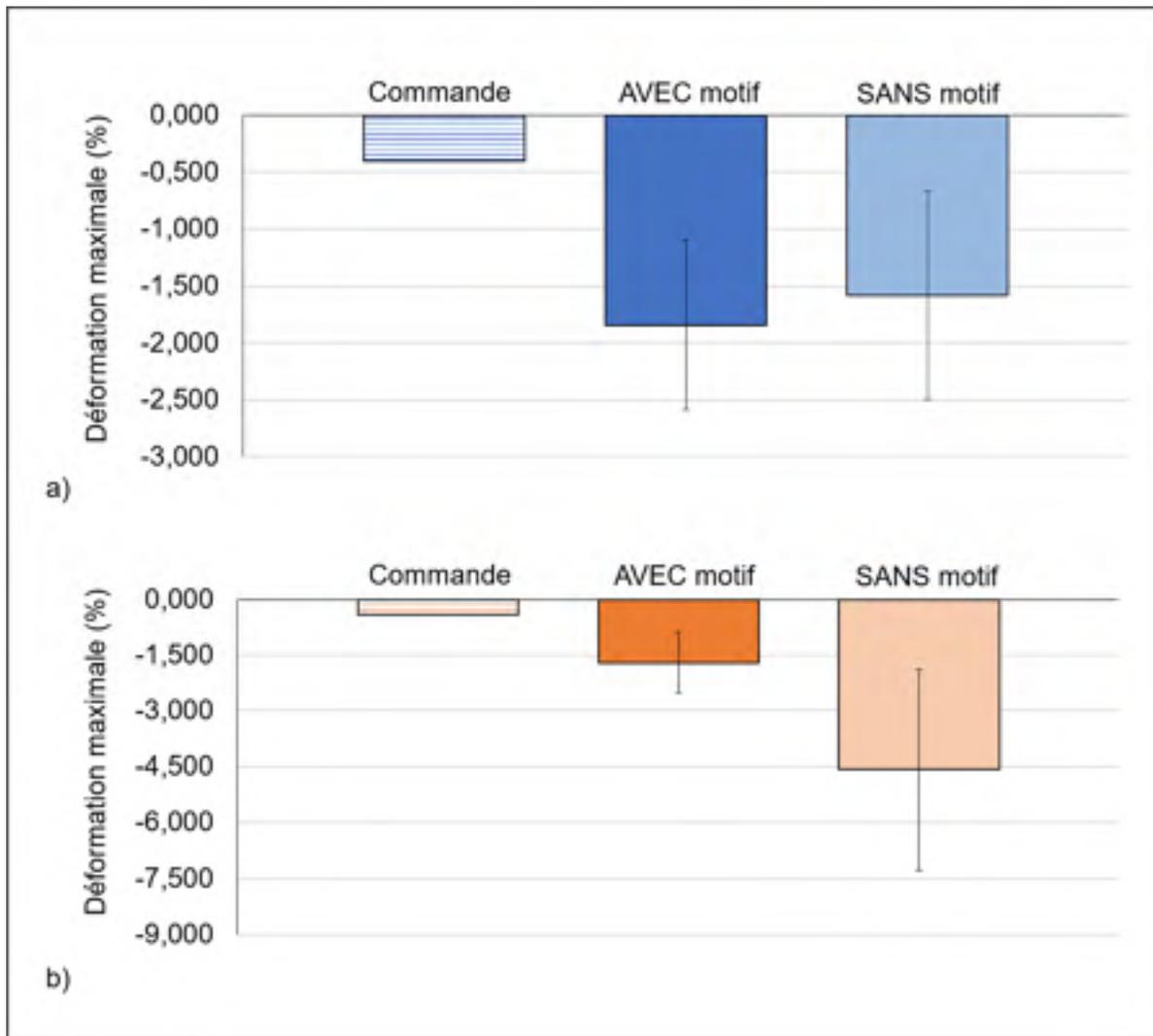


Figure 4-11 Comparaison de la déformation maximale moyenne obtenue par corrélation d'images pour les cinq échantillons avec et sans motif stochastique a) entre les plateaux de compression et b) dans l'enceinte de culture

Bien que les distributions de déformation semblent différer, la déformation moyenne avec et sans motif stochastique est similaire, tant pour les chargements entre les plateaux ($p = 0,893$) que dans l'enceinte de culture ($p = 0,144$) (Figure 4-10). L'analyse statistique ne rapporte également aucune différence significative liée au montage expérimental utilisé que ce soit avec ($p = 0,500$), ou sans motif stochastique ($p = 0,500$).

4.3 Discussion

Cette étude a permis dans un premier temps de s'assurer que la corrélation d'images est en mesure de quantifier adéquatement le chargement appliqué aux échantillons. Une différence moyenne de 8.3 μm a été obtenue entre le déplacement mesuré par le système de mesure optique et celui mesuré par l'appareil de test mécanique. Bien que cette différence soit statistiquement significative, elle est malgré tout considérée comme étant acceptable car elle est de l'ordre de la résolution du système de mesure optique (8 μm).

Dans un deuxième temps, cette étude a permis de confirmer qu'il est possible de quantifier les déformations sur des échantillons d'os trabéculaire bovin à l'aide de la méthode de corrélation d'images sans appliquer un motif stochastique. Les essais réalisés entre les plateaux de compression avec et sans motif stochastique ont montré que l'exposition des travées osseuses et de la porosité de l'os à une source lumineuse crée des jeux d'ombres. Ceux-ci sont perçus par le système de mesure optique comme étant un motif stochastique approprié pour mesurer les déplacements et les déformations à la surface des échantillons.

Dans un contexte de culture osseuse, les échantillons d'os trabéculaire sont maintenus en vie dans un bioréacteur. Les essais réalisés avec et sans motif stochastique n'ont montré aucune différence significative entre la moyenne de déplacement et de déformation obtenue dans l'enceinte de culture ou entre les plateaux de compression de l'appareil de tests mécanique (Figure 4-7 et Figure 4-10). Il est néanmoins important de porter une attention particulière à certains facteurs qui pourraient affecter la mesure dans l'enceinte de culture. D'une part, le milieu de culture assombrit légèrement le jeu d'ombres créé par le motif stochastique naturel de l'os. Dans le contexte d'une culture *ex-vivo* où le milieu de culture peut changer de couleur ou de texture en fonction de l'environnement biologique (pH, carence en nutriments, etc), ce facteur pourrait potentiellement affecter la mesure. La vitre de l'enceinte de culture, qui est aussi une source de reflets et d'impuretés, peut également influencer le motif stochastique détecté. Par exemple, le dépôt de corps gras sur la surface intérieure de la vitre lors de la culture

ex-vivo pourrait rendre l'image floue et nuire à la détection du motif stochastique naturel de l'échantillon.

L'utilisation de la corrélation d'images a également permis de mettre en évidence que le chargement perçu par l'échantillon lors de sa stimulation mécanique diffère significativement de celui prévu lui être appliqué. Cette différence peut être expliquée par la présence d'irrégularités aux surfaces de contact de l'échantillon avec le plateau ou la tige de compression. La réalisation de tests préliminaires visant à vérifier la qualité de surface d'échantillons d'ilium bovin, non détaillée dans ce document, a permis d'observer la présence de protubérances (Figure 4-12 et voir Annexe I) ainsi que des défauts de parallélisme entre les surfaces de chargement (1 à 5°). Ces imperfections créées lors de la coupe des échantillons sont susceptibles d'empêcher l'application uniforme de la sollicitation mécanique. Cependant, cette différence de mesure est moins importante lors de l'utilisation de l'enceinte de culture, ce qui laisse présager la capacité de la tige de compression à s'adapter aux irrégularités des surfaces des échantillons et à assurer une transmission uniforme de la stimulation mécanique.

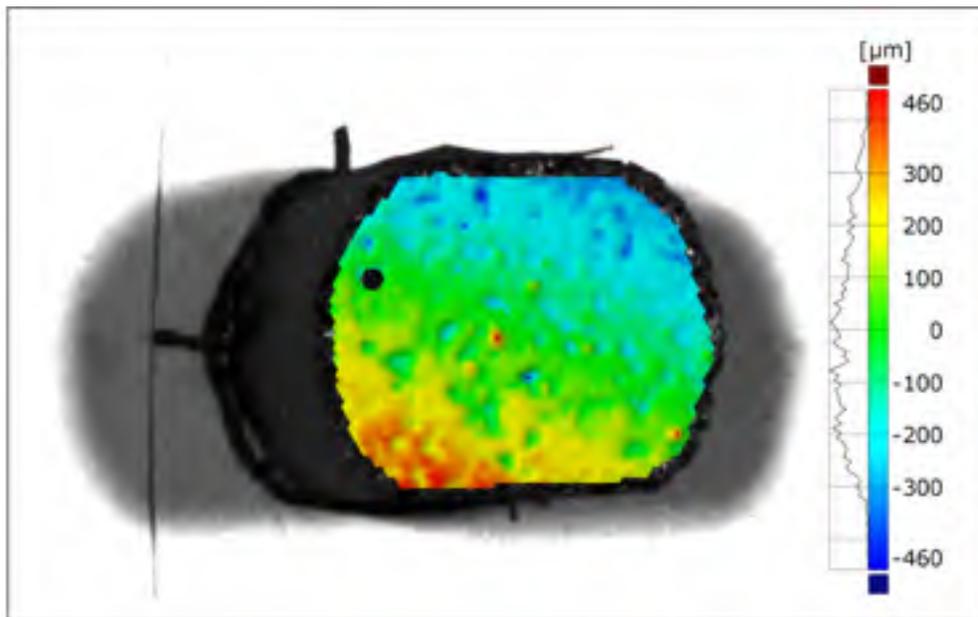


Figure 4-12 Exemple de distribution de la planéité de surface d'un échantillon d'ilium bovin

CHAPITRE 5

VALIDATION DE L'UTILISATION DE LA MICRO-TOMOGRAPHIE À RAYONS X DANS UN CONTEXTE DE CULTURE *EX-VIVO*

Ce chapitre présente l'étude effectuée pour accomplir le deuxième objectif de cette thèse qui est d'évaluer la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayons X pour détecter des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*. La réalisation de cette étude a permis dans un premier temps de déterminer la précision de mesure de la micro-tomographie à rayons X dans un contexte de culture *ex-vivo*. La possibilité d'utiliser cette méthode de mesure pour détecter des adaptations osseuses sur des échantillons osseux soumis à une stimulation mécanique pendant 14 jour de culture a par la suite été déterminée.

5.1 Matériel et méthodes

Neuf échantillons d'os trabéculaire prélevés sur les os iliaques d'une vache âgée de quatre ans et d'une vache de sept ans ont été utilisés. Les os iliaques ont été prélevés immédiatement après le sacrifice des animaux et conservés dans une solution stérile de tampon phosphate salin (PBS) et d'antibiotique (500 unités/ml de pénicilline et 500 µg/ml de streptomycine). Les échantillons ont été préparés dans les quatre heures suivant le sacrifice des animaux et divisés en deux groupes: un groupe contrôle et un groupe de culture (Figure 5-1). Les échantillons du groupe contrôle prélevés sur le premier animal (vache #1) ont été utilisés pour évaluer la précision de mesure de l'appareil micro-CT. Les échantillons du groupe de culture ont été prélevés sur le deuxième animal (vache #2) et séparés en deux sous-groupes (stimulé et non-stimulé) pour vérifier si la méthode de mesure testée permet de quantifier les adaptations osseuses induites par une stimulation mécanique lors de culture *ex-vivo*.

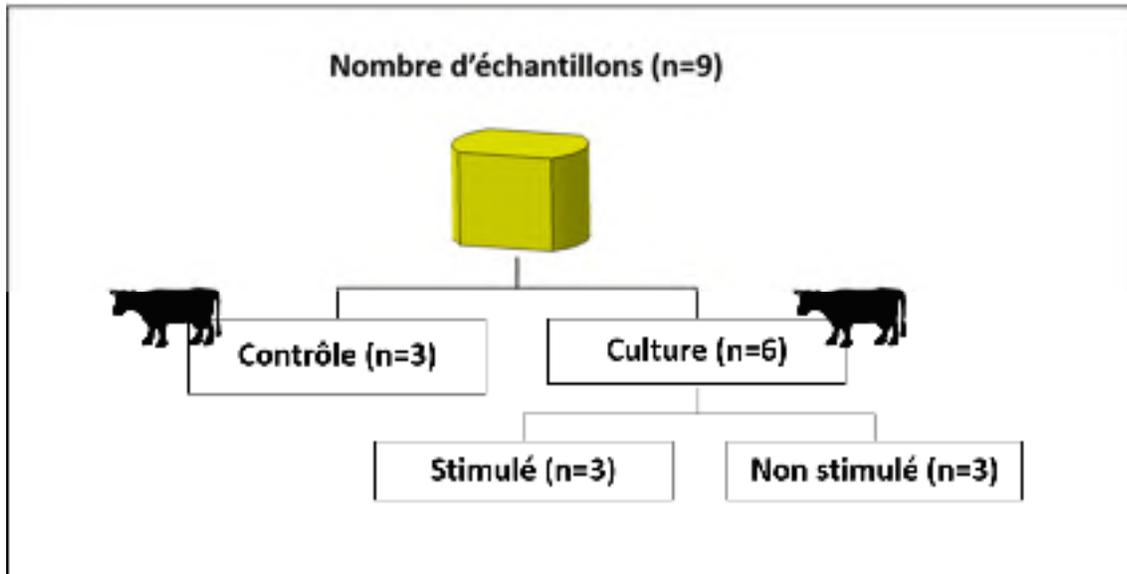


Figure 5-1 Plan d'expérience

La Figure 5-2 illustre les étapes de préparation des échantillons. Des échantillons cylindriques, d'un diamètre de 13.7 mm ont été extraits de diverses régions de l'os iliaque à l'aide d'une perceuse à colonne et d'un outil de carottage commercial (Lenox, sku# 30011). Une fois extraits, les échantillons ont été fixés dans un support de coupe conçu au laboratoire et fraisés (Dremel 9902) afin d'obtenir deux surfaces planes à une distance de 10 mm l'une de l'autre, pour faciliter l'insertion et le positionnement des échantillons dans l'enceinte de culture. Les extrémités des échantillons ont ensuite été coupées avec un outil de coupe manuel de type Dremel muni d'une lame de scie rotative (HSS 47362, Samona/RDK) pour obtenir une longueur de 10 mm. Toutes les étapes de préparation des échantillons ont été effectuées sous irrigation constante avec une solution de PBS stérile à quatre degrés Celsius, pour prévenir l'augmentation de température et la mort cellulaire à la surface de coupe (David et al., 2008; Endres et al., 2009). Avant d'être placés dans les enceintes pour la culture, les échantillons ont été lavés quatre fois avec une solution stérile de PBS et d'antibiotique à température ambiante (500 unités/ml de pénicilline et 500 µg/ml de streptomycine) pour éliminer tous résidus osseux laissés par le processus de préparation. Les échantillons ont également été immergés dans cette même solution pendant une heure, pour minimiser le risque de contamination durant la culture (Endres et al., 2009).

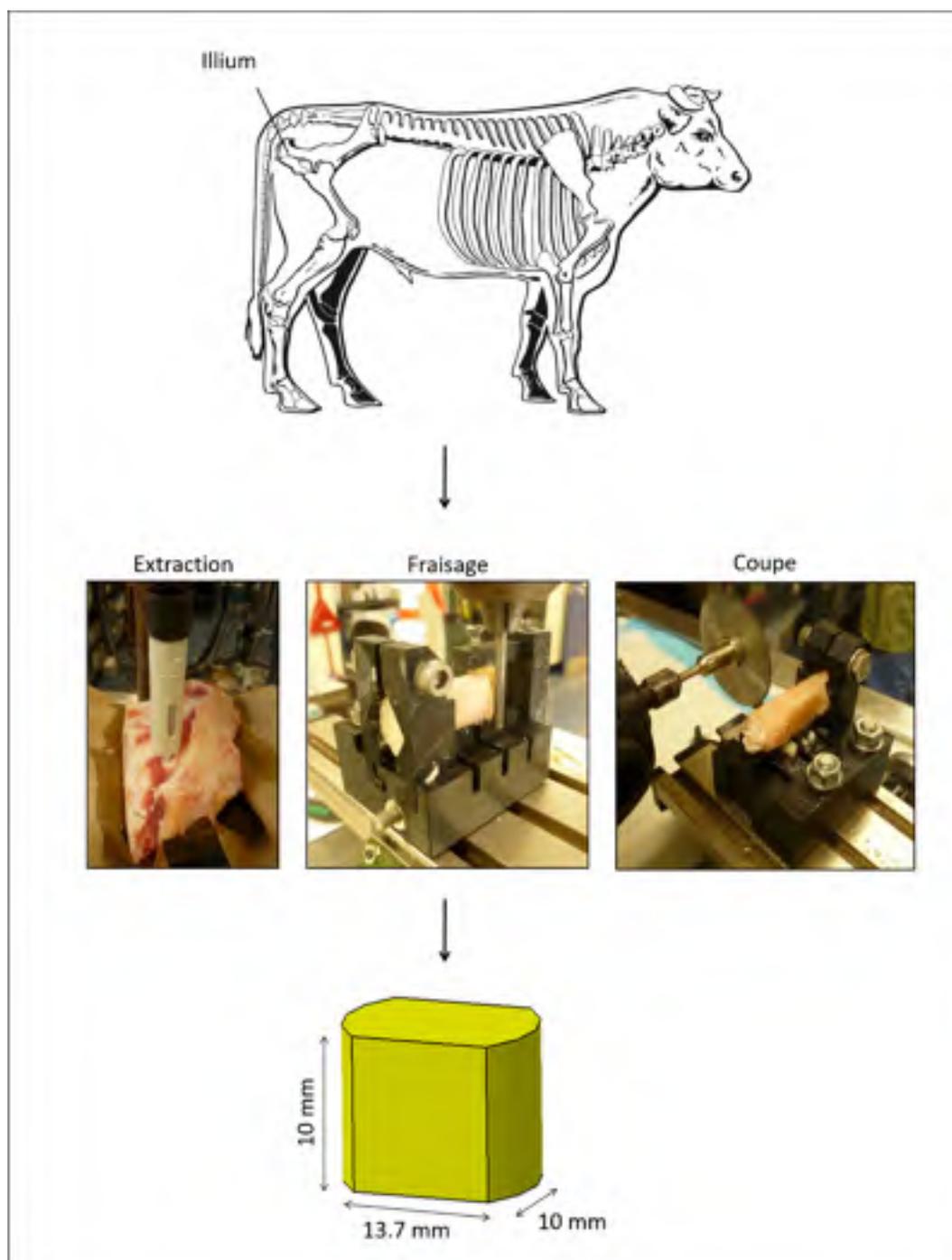


Figure 5-2 Étapes pour procéder à la préparation d'échantillons d'os trabéculaire de 10 mm de hauteur, 10 mm d'épaisseur et 13,7 mm de diamètre.

Les échantillons du groupe de culture ont été insérés dans une enceinte de culture et placés dans un incubateur (Forma Serie II, Thermo Fisher, Ma, USA) à 37°C (111% RH, 95% air et

5% CO₂) pendant 14 jours. Ils ont été incubés dans un milieu de culture composé de BGJb, de sérum fœtal bovin (10%) et d'une solution d'antibiotique (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) (Vivanco et al., 2013). La moitié des échantillons du groupe de culture ont été soumis quotidiennement à un chargement mécanique pour stimuler les adaptations osseuses. Pour ce faire, les enceintes de culture ont été retirées de l'incubateur et placées dans un appareil de tests mécaniques (Electroforce 3220, TA Instrument, De, USA) (Figure 3-4). Une précharge de 25 N a été appliquée pour assurer le contact entre l'échantillon et la tige de compression. La précharge a été suivie par l'application de 300 cycles de chargement à une amplitude de 4000 microdéformations et une fréquence de 1 Hz. Ce mode de chargement dynamique a été démontré comme étant favorable au dépôt d'os nouvellement formé (Endres et al., 2009). Après le chargement cyclique, les enceintes de culture ont été remises dans l'incubateur. Le milieu de culture de tous les échantillons a été changé aux 3 jours et conservé dans un congélateur à -80°C. A la fin de la période de culture, les échantillons ont été retirés des enceintes de culture et fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% pendant quatre heures. Les échantillons ont ensuite été conservés à quatre degrés Celsius dans une solution de PBS stérile.

Tous les échantillons ont été imagés à l'aide d'un appareil micro-CT (Skyscan 1176, Bruker BioSpin Corp., Ma, USA). Les échantillons ont été imagés à l'intérieur des enceintes de culture à une résolution de huit µm (65 kV, 385 uA, filtre 1mm Cu-Al). L'acquisition des images micro-CT a été effectuée en présence de deux objets de calibrage (Bruker BioSpin Corp. Manning Park. MA, SP- 4002, 0,25 et 0,75 g/cm³ hydroxyapatite de calcium) afin de convertir les valeurs de niveau de gris mesurées en densité minérale apparente (Adams, 2009; Cowin, 2001; Levasseur, Ploeg, & Petit, 2012). Les échantillons du groupe contrôle (n = 3) ont été imagés à deux reprises au cours de la même séance pour quantifier la variabilité de la mesure entre deux acquisitions consécutives. Les échantillons du groupe de culture (n = 6) ont été imagés avant et après la période de culture pour quantifier les adaptations osseuses induits par la stimulation mécanique pendant la culture *ex-vivo*.

Les reconstructions d'images micro-CT ont été réalisées à l'aide du logiciel NRecon version 1.6.8.0 (Bruker BioSpin Corp., Ma, USA). Les mêmes paramètres de reconstruction ont été utilisés pour tous les échantillons (-1000 ; 5000 HU, *post-alignment* -1.50 , *smoothing* 0 , *ring artefact* 20 , *beam hardening* 20%) pour limiter la variabilité induite par le processus de reconstruction. Avant la segmentation, les images micro-CT ont été réorientées dans les plans transversal et sagittal (Data viewer software, version 1.4.4.4 64-bit, Bruker BioSpin Corp., Ma, USA) pour s'assurer que les bords des échantillons soient perpendiculaires à l'axe de rotation de la source de rayons X et ainsi corriger tout mauvais positionnement des échantillons dans l'enceinte de culture ou un mauvais positionnement de l'enceinte de culture dans l'appareil micro-CT (Figure 5-3).

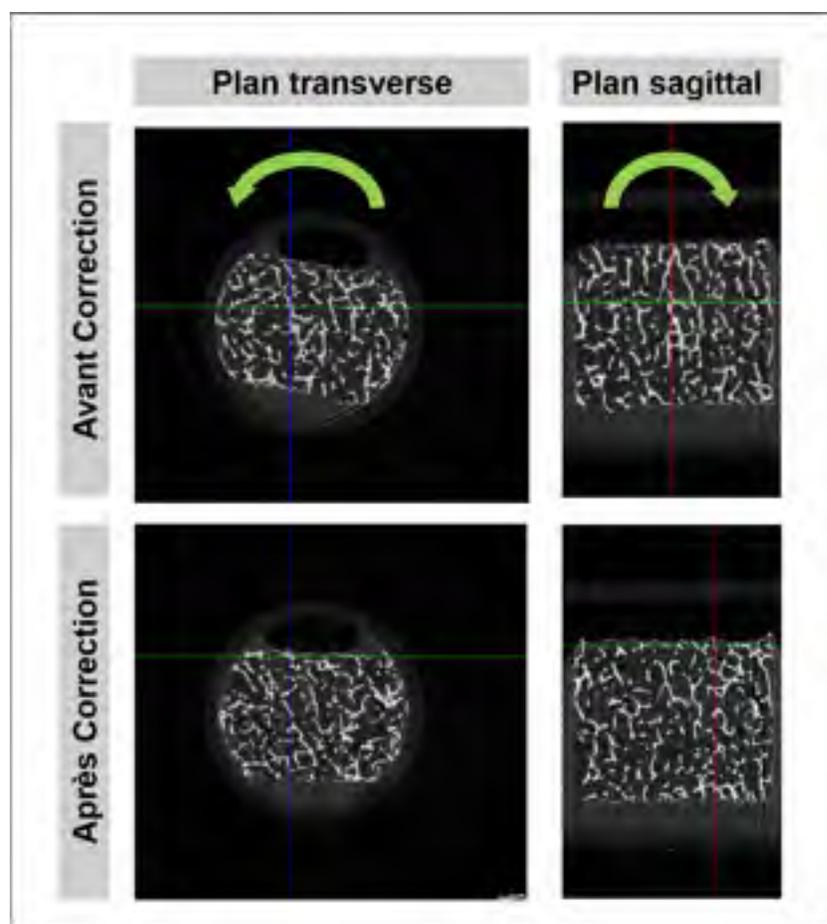


Figure 5-3 Réorientation des images micro-CT reconstruites pour corriger tout mauvais positionnement de l'échantillon dans l'enceinte de culture ou de l'enceinte à l'intérieur de l'appareil micro-CT.

La segmentation des images des échantillons a été réalisée avec le logiciel CT Analyser (version 1.12.11.0, Bruker BioSpin Corp, Ma, USA). La Figure 5-4 illustre les étapes utilisées pour segmenter les images. La même procédure a été utilisée pour tous les échantillons afin limiter la variabilité induite par la méthode.

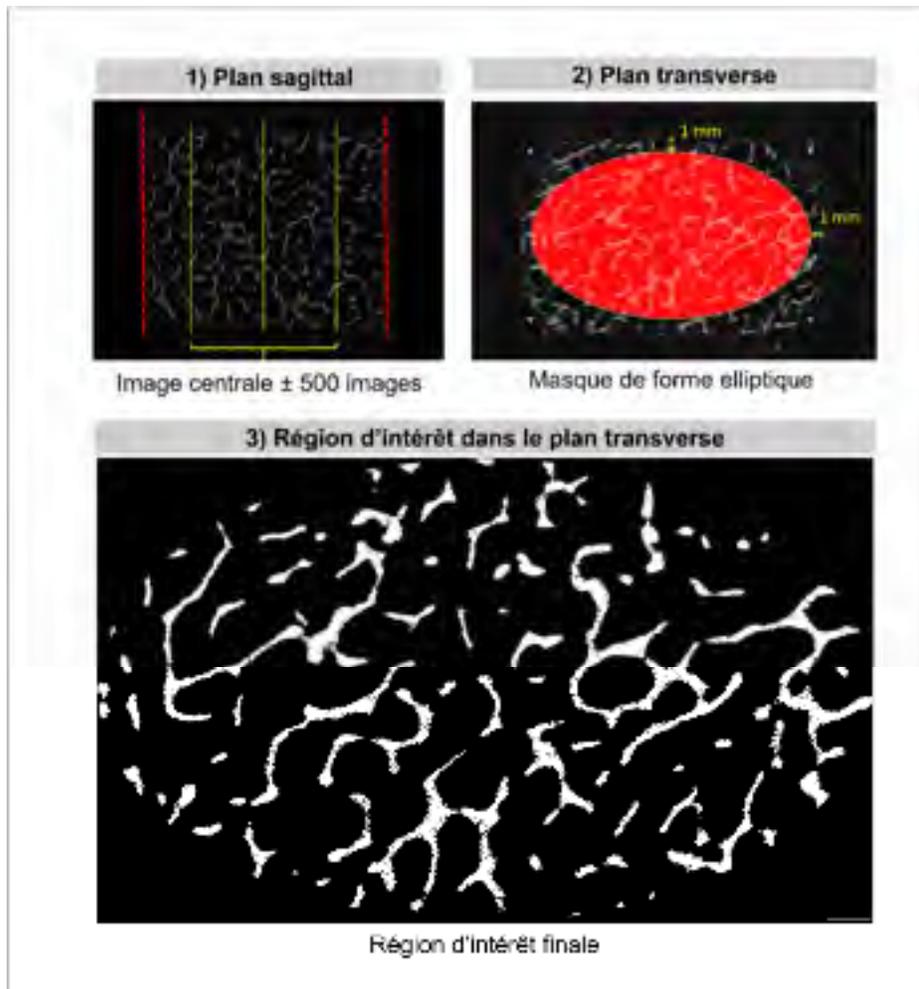


Figure 5-4 Étapes de segmentation de l'os trabéculaire à partir des images micro-CT. 1) Identification des images dans lesquelles l'échantillon peut être visualisé. 2) Définition de la région d'intérêt. 3) Image finale segmentée

La première étape consiste à identifier dans le plan sagittal la première et la dernière image dans laquelle l'échantillon peut être visualisé (Figure 5-4). Par la suite, un masque elliptique a été défini dans l'image centrale de la série passant à 1 mm des bords de l'échantillon (Figure

5-4). La forme elliptique a été choisie pour éliminer les défauts de coupe de l'échantillon et exclure les résidus qui ont pu subsister suite au processus de préparation. Le masque elliptique a ensuite été propagé à 500 images au-dessus et au-dessous de l'image centrale pour couvrir presque en totalité la hauteur de l'échantillon (8 mm) (Figure 5-4). Le seuil de segmentation (42) a d'abord été défini sur les échantillons du groupe contrôle et utilisé pour tous les échantillons afin de limiter l'impact de la segmentation sur la variabilité des résultats. De petites corrections ont ensuite été appliquées aux images pour supprimer les îlots de moins de 10 pixels.

La densité minérale et les paramètres structuraux ont été calculés à l'aide du logiciel CT Analyser (version 1.12.11.0, Bruker BioSpin Corp., Ma, USA). Deux types de densité ont été calculés : 1) la densité minérale apparente, qui comprend les vides entre les travées, et 2) la densité minérale tissulaire, qui comprend uniquement l'os (Figure 5-5 a et b).

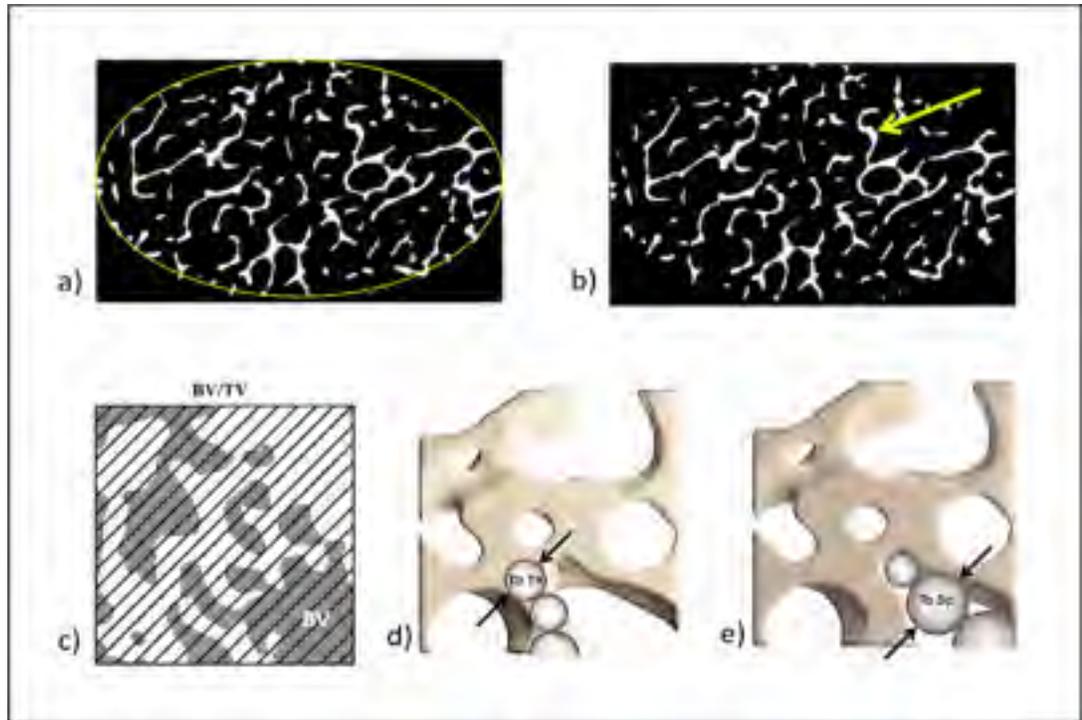


Figure 5-5 Densité et paramètres structuraux quantifiés : a) densité minérale apparente, b) densité minérale tissulaire, c) fraction volumique, d) épaisseur trabéculaire et e) espacement trabéculaire
Adapté de Gashti et al. (2013)

La fraction volumique de l'os (BV/TV), qui est un ratio entre le volume osseux segmenté et le volume total de la région d'intérêt, l'espacement trabéculaire (Tb.Sp.), qui correspond à la distance moyenne entre les travées osseuse, et l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) ont également été calculés (Bouxsein et al., 2010; Parfitt et al., 1987) (Figure 5-5 c,d et e). Le traitement des images a été effectué trois fois pour les échantillons du groupe contrôle et une fois pour les échantillons du groupe de culture.

Les mesures de densité minérale et de paramètres structuraux obtenues sur les échantillons du groupe contrôle ont été utilisées pour évaluer la variabilité et la répétabilité de la méthode. Tout d'abord, des tests de Wilcoxon ont été effectués pour déterminer s'il existe des différences significatives entre deux acquisitions d'images successives (variabilité de mesure). Un test Kruskal-Wallis a également été effectué pour déterminer s'il existe une différence significative lors de la répétition des analyses (répétabilité). Les erreurs de précision (PE_{SD}) ont été calculées selon l'équation 5.1 pour déterminer la sensibilité de la méthode (Le Garff et al., 2017). La plus grande valeur de variation entre la variabilité de mesure et l'erreur de précision sera considérée comme étant la sensibilité de la méthode et sera utilisée comme critère de sensibilité pour la détection d'adaptations osseuses.

$$PE_{SD} = \sqrt{\sum_1^n \frac{\text{Écart type}}{n}} \quad (5.1)$$

Les changements de densité et de paramètres structuraux observés à la fin de la culture *ex vivo* ont été comparés aux critères de sensibilité afin de vérifier si les changements observés sont attribuables à la culture *ex vivo* ou à la méthode de mesure. Par la suite, les changements de densité et de paramètres structuraux obtenus pour les échantillons stimulés ont été comparés aux échantillons non-stimulés pour déterminer l'effet de la stimulation mécanique sur les adaptations osseuses. Des tests de Mann-Whitney ont été effectués pour déterminer toute différence significative entre les groupes. L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel STATISTICA (version 7.1) avec un niveau de signification fixé à 0,05.

5.2 Résultats

Le Tableau 5-1 présente la moyenne et l'écart-type des variations des mesures obtenues entre deux acquisitions successives des échantillons du groupe contrôle, ainsi que l'erreur de précision (PE_{SD}). L'analyse statistique révèle que la densité et les mesures des paramètres structuraux sont significativement différents entre deux acquisitions ($p = 0.008$) sauf pour la distance entre les travées ($p = 0.515$). Aucune différence significative n'est rapportée lorsque la méthode d'analyse est répétée à plusieurs reprises ($p \geq 0,787$). La variation de mesure est le critère qui démontre la plus grande variabilité entre deux acquisitions, à l'exception de l'espacement trabéculaire (Tableau 5-1). Ces valeurs ont donc été utilisées comme critère de sensibilité pour vérifier que les changements observés suite à la culture *ex-vivo* sont dus à des adaptations osseuses. Pour l'espacement trabéculaire, l'erreur de précision a été utilisée comme critère de sensibilité.

Tableau 5-1 Variation de mesure et erreur de précision obtenus pour les échantillons du groupe contrôle.

	Variation de mesure¹ Moyenne ± Écart-type	Erreur de précision PE_{SD}
Densité minérale apparente (g/cm³)	-0,018 ± 0,001*	5x10 ⁻⁴
Densité minérale tissulaire (g/cm³)	-0,022 ± 0,002*	2x10 ⁻³
Épaisseur trabéculaire (µm)	-0,40 ± 0,14*	2x10 ⁻²
Espacement trabéculaire (µm)	-0,25 ± 1,06	7x10 ⁻¹ *
Fraction volumique (%)	-0,06 ± 0,02*	2x10 ⁻²

¹Comprend tous les échantillons (n=3) et toutes les répétitions (3)

*Indique les valeurs utilisées comme critère de sensibilité

Après 14 jours de culture *ex-vivo*, avec et sans stimulation mécanique, les mesures de densités (Figure 5-6) et de paramètres structuraux diminuent (Figure 5-7). La variation moyenne de la densité minérale apparente et de la densité minérale tissulaire du groupe non-stimulé (-0,055 ±

0,002 g/cm³ et $-0,061 \pm 0,003$ g/cm³) est supérieure au critère de sensibilité le plus élevé déterminé sur les échantillons du groupe contrôle (apparente = 0,018 g/cm³, tissulaire = 0,022 g/cm³) (Figure 5-6 a-b). La variation moyenne de la densité minérale apparente et de la densité minérale tissulaire du groupe stimulé ($-0,038 \pm 0,022$ g/cm³ et $-0,025 \pm 0,037$ g/cm³) est également supérieure au critère de sensibilité le plus élevé (Figure 5-6 a- b). Aucune différence significative n'est rapportée entre le groupe stimulé et le groupe non-stimulé ($p_{\text{apparente}} = 0,513$ et $p_{\text{tissulaire}} = 0,275$).

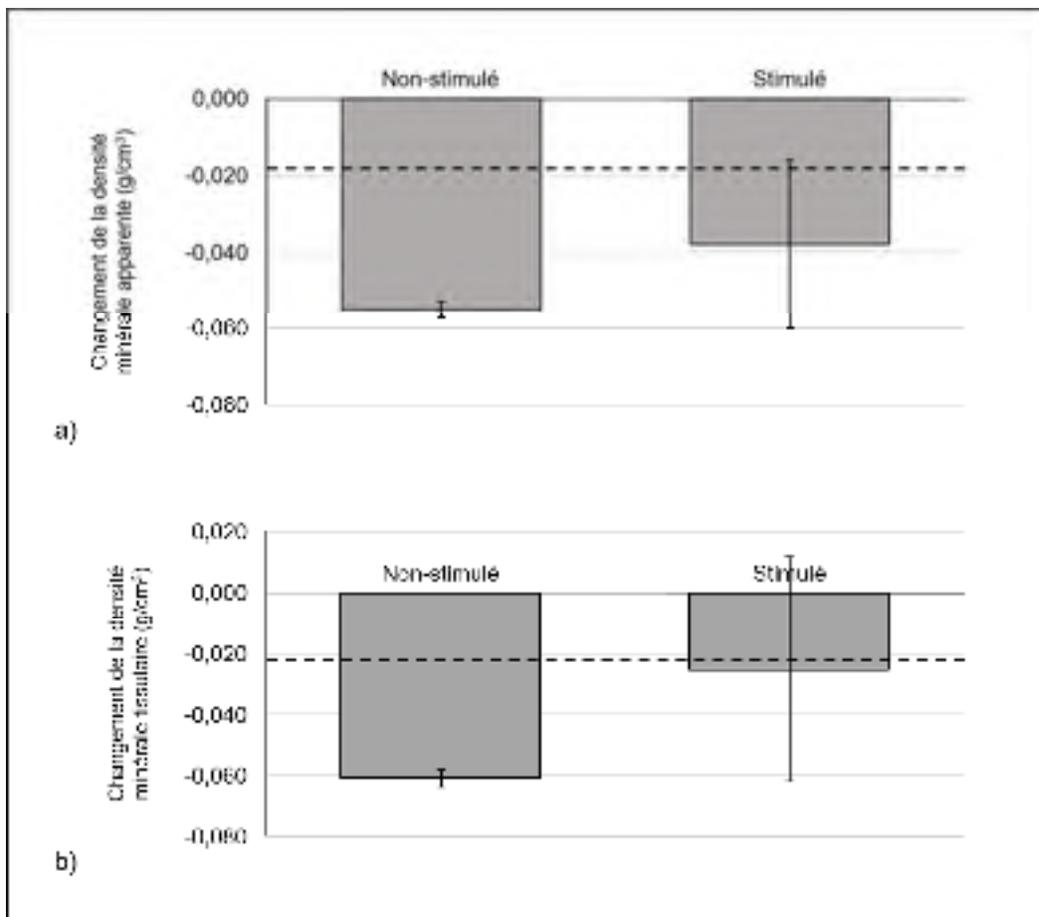


Figure 5-6 Changements de mesure (a) de densité minérale apparente et (b) de densité minérale tissulaire obtenus pour le groupe non-stimulé et stimulé. Les lignes pointillées représentent la valeur du critère de sensibilité déterminé avec les échantillons contrôles.

Les variations moyennes de l'épaisseur trabéculaire ($-15,30 \pm 1,44$ μm), de l'espacement trabéculaire ($0,94 \pm 2,65$ μm) et de la fraction volumique ($-0,80 \pm 0,10$ %) du groupe non-

stimulé sont supérieures au critère de sensibilité déterminé sur les échantillons contrôles (Tb.Th = 0,40 μm , Tb.Sp = 0,7 μm et BV/TV = 0,06 %) (Figure 5-7 a-b-c).

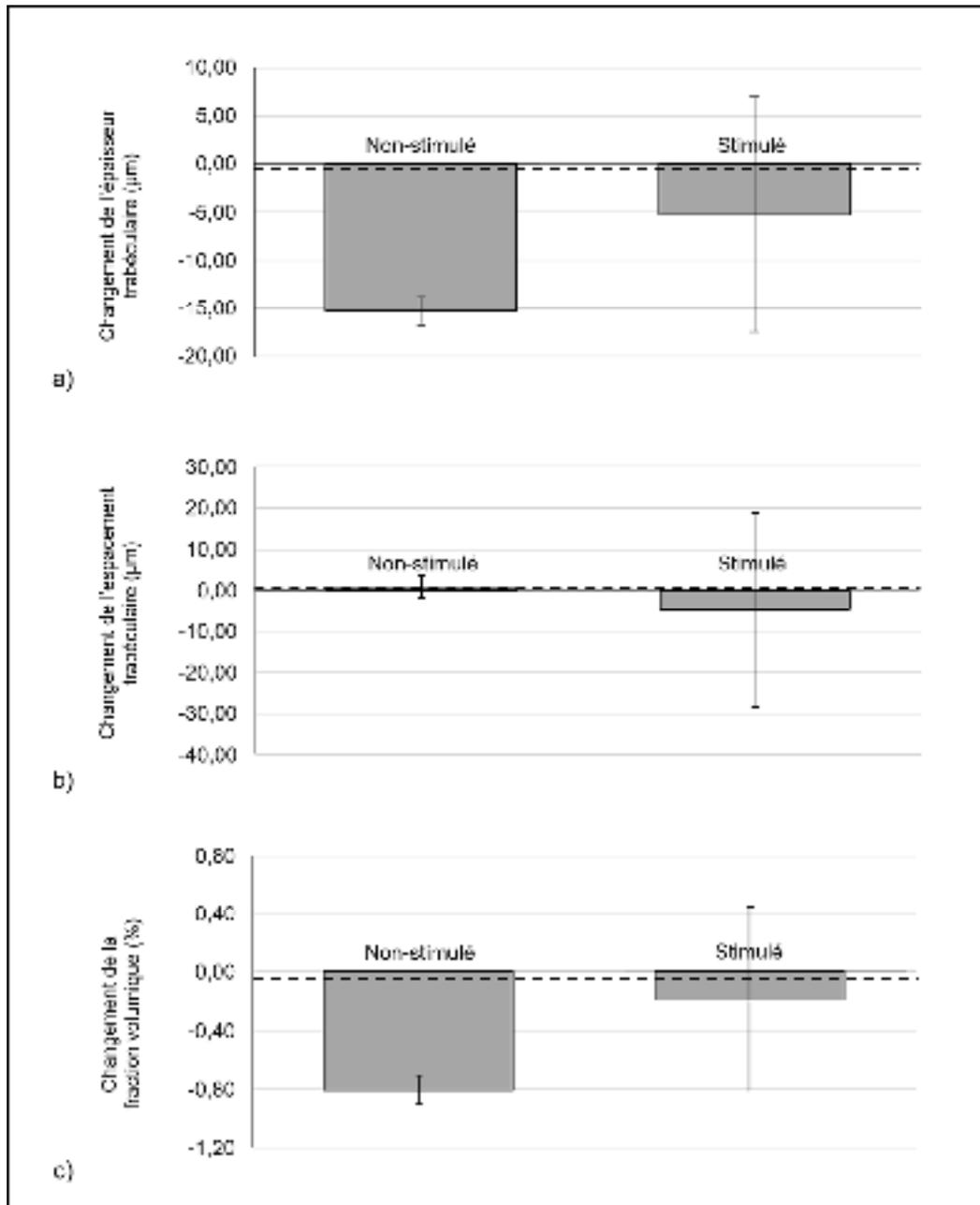


Figure 5-7 Changements de mesure (a) de l'épaisseur trabéculaire, (b) de l'espacement trabéculaire et (c) du volume de fraction obtenus pour le groupe non-simulé et stimulé. La ligne pointillée représente la valeur du critère de sensibilité.

Les changements moyens obtenus pour le groupe stimulé montrent également une plus grande variation ($Tb.Th = -5,27 \pm 12,21 \mu m$, $Tb.Sp = -4,84 \pm 23,58 \mu m$ et $BV/TV = -0,19 \pm 0,63n\%$) que le critère de sensibilité (Figure 5-7 a-b-c). Aucune différence significative n'a été rapportée entre le groupe stimulé et non-stimulé mécaniquement ($p_{Tb.Th} = 0,513$, $p_{Tb.Sp} = 0,513$ et $p_{BV/TV} = 0,275$).

L'analyse de chaque échantillon individuellement a révélé qu'un échantillon du groupe stimulé présentait des changements de densité plus faibles (apparent = $-0,16 g/cm^3$ et tissulaire = $0,11g/cm^3$) que le critère de sensibilité défini à partir des échantillons du groupe contrôle, et qu'un échantillon du groupe non-stimulé présentait un changement de l'espacement trabéculaire ($-0,31\mu m$) plus faible que le critère de sensibilité correspondant (Tableau 5-2). L'inclusion de ces échantillons pour le calcul de la variation moyenne implique par conséquent une sous-estimation des changements attribuables à la stimulation mécanique.

Tableau 5-2 Changements de mesure de densités et de paramètres structuraux obtenus pour chaque échantillon du groupe non-stimulé et stimulé.

Échantillons	Non- stimulé			Stimulé		
	1	2	3	1	2	3
Densité minérale apparente (g/cm^3)	-0,057	-0,055	-0,053	-0,060	-0,016*	-0,038
Densité minérale tissulaire (g/cm^3)	-0,064	-0,059	-0,060	-0,063	+0,011*	-0,024
Fraction volumique (%)	-0,92	-0,75	-0,74	-0,85	+0,42	-0,14
Épaisseur trabéculaire (μm)	-13,66	-16,38	-15,85	-16,76	-6,60	+7,57
Espacement trabéculaire (μm)	-0,85	-0,31*	+3,98	+7,59	-32,03	+9,93

* indique les valeurs qui sont inférieures au critère de sensibilité

5.3 Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si la micro-tomographie à rayons X est une méthode de mesure apte à quantifier des adaptations osseuses résultant de culture *ex-vivo*. Un protocole expérimental a été proposé pour (1) déterminer la précision de mesure à l'aide d'échantillons contrôles et (2) déterminer la capacité de cette méthode à détecter des adaptations osseuses sur des échantillons soumis à une stimulation mécanique pendant 14 jour de culture. Cette étude est la première à valider que la micro-tomographie à rayon X est en mesure de détecter des adaptations osseuses résultant de culture *ex-vivo*.

Les changements de densité et de paramètres structuraux observés entre deux acquisitions consécutives sont en accord avec les travaux précédents (Le Garff et al., 2017; Nagele et al., 2004). Les amplitudes de variation sont cependant difficiles à comparer en raison de l'utilisation de différents modèles d'appareil micro-CT, type d'échantillons, paramètres d'acquisition et méthodes d'analyse. Néanmoins, d'après la présente étude, la recommandation de Le Garff et al. (2017) d'effectuer une analyse de la précision de mesure préalablement à toutes analyses micro-CT paraît raisonnable.

Cette étude suggère que la micro-tomographie à rayon X possède la précision requise pour détecter des adaptations osseuses résultant d'une culture *ex vivo*, puisque les variations de mesure estimées entre deux acquisitions successives sont inférieures aux changements moyens observés après 14 jours de culture. Les variations les plus importantes ont été utilisées comme critère de sensibilité pour s'assurer que les changements de densité et de paramètres structuraux observés correspondent à des adaptations osseuses et non à la variabilité associée à l'acquisition et à l'analyse des images.

Les changements de mesure observés suggèrent que les échantillons ont subi de la résorption osseuse. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui révèlent que la résorption osseuse peut durer jusqu'à 2 semaines avant le début du processus de formation osseuse (Hadjidakis & Androulakis, 2006; Katsimbri, 2017; Matsuo & Irie, 2008). L'analyse

histologique du tissu et du milieu de culture auraient permis de confirmer cette hypothèse en détectant la présence de cellules de résorption osseuse (ostéoclastes) et de biomarqueurs du processus de résorption osseuse. Dans cette étude, une contamination fongique du milieu de culture a forcé l'arrêt de la culture de tous les échantillons après 14 jours. L'allongement de la culture sur une plus longue période aurait probablement permis de détecter des changements plus importants et éventuellement, de la formation osseuse.

Les résultats obtenus entre les échantillons stimulés et non-stimulés n'ont pas permis de confirmer que l'application du chargement mécanique choisi stimule le processus de remodelage osseux, tel que rapporté dans la littérature (David et al., 2008; Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). Selon David et al. (2008), la fraction volumique ne réagit pas de façon significative à l'application d'un chargement mécanique ($\Delta_{\text{stimulé} - \text{non stimulé}} = 3.17 \%$), tandis que les paramètres structuraux, dont l'épaisseur des travées, augmentent de façon significative ($\Delta_{\text{stimulé} - \text{non stimulé}} = 19.7 \mu\text{m}$). Quant à Vivanco et al. (2013), aucune différence statistique n'a été rapportée entre les paramètres histomorphométriques mesurés dans le groupe stimulé et non-stimulé mécaniquement ($\Delta \text{BV/TV}_{\text{stimulé-non stimulé}} = -0.6\%$, $\Delta \text{Tb.Th}_{\text{stimulé-non stimulé}} = 2 \mu\text{m}$).

Les changements observés dans le cadre de cette étude sont moins importants que ceux rapportés précédemment (Vivanco et al., 2013). Cependant, les échantillons stimulés semblent avoir subi moins de résorption que les échantillons non-stimulés mécaniquement. L'utilisation d'échantillons prélevés de différents sites anatomiques (ulna et sternum vs ilium) ainsi que l'âge moins élevé des animaux (six-huit mois vs quatre-sept ans) peuvent expliquer ces différences. La période de culture plus courte peut également expliquer les variations moins importantes obtenues au cours de cette étude. Néanmoins, les changements de densité et de paramètres structuraux observés confirment que les échantillons osseux ont fait l'objet d'une réorganisation pendant la période de culture.

CHAPITRE 6

ÉVALUATION MULTIMODALE DES ADAPTATIONS OSSEUSES ISSUES DE CULTURE *EX-VIVO*

Ce chapitre présente l'étude effectuée pour réaliser le troisième objectif de cette thèse qui est d'évaluer la possibilité d'améliorer le suivi de l'évolution d'échantillons osseux lors de culture *ex-vivo* par la combinaison de multiples modalités de mesures. L'accomplissement de cette étude a permis dans un premier temps de documenter les adaptations osseuses issues de cultures *ex-vivo* par l'utilisation d'un système de mesure optique, la réalisation d'essais mécaniques et l'acquisition d'images. Par la suite, la complémentarité des modalités de mesure, de même que la possibilité d'améliorer le suivi de l'évolution des échantillons par la prise en considération des adaptations locales ont été déterminées.

6.1 Matériel et méthodes

Les échantillons utilisés pour cette étude (n=6) sont les mêmes que ceux mis en culture pour valider la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayon X pour détecter *ex-vivo* des adaptations osseuses (CHAPITRE 5). Conséquemment, la méthode de préparation des échantillons, la méthode de mise en culture, ainsi que la procédure d'acquisition d'images micro-CT sont identiques à celles présentées dans le CHAPITRE 5. Des méthodes de mesure additionnelles, dont la corrélation d'images et l'acquisition des forces et des déplacements appliqués aux échantillons par l'appareil de test mécanique, ont été utilisées pour bonifier le suivi de l'évolution des échantillons lors de la culture.

En plus d'être soumis quotidiennement à un chargement mécanique pour stimuler les adaptations osseuses, tous les échantillons mis en culture ont été soumis à un test mécanique à trois reprises au cours de la période de culture (jour 1,6 et 14) pour faire un suivi de l'évolution de leurs propriétés mécaniques. Les enceintes de culture ont donc été retirées de l'incubateur

et placées dans un appareil de test mécanique (Electroforce 3220, TA Instrument, DE, USA). Une précharge de 25N a été appliquée pour assurer un contact entre l'échantillon et la tige de compression. La précharge a été suivie par l'application d'un chargement quasi-statique de 4000 microdéformations à une vitesse de 0.01mm/s. Le chargement a été maintenu cinq secondes avant de décharger l'échantillon et de répéter la procédure à deux reprises. La cellule de force et le capteur LVDT de l'appareil de test mécanique (Electroforce 3220, TA Instruments, DE, USA) ont été utilisés pour mesurer la force et le déplacement appliqués aux échantillons au cours des essais. La courbe force-déplacement a par la suite été utilisée pour déterminer la raideur (k) des échantillons à mi-parcours de la période de maintien. Les valeurs obtenues à différents instants au cours de la période de culture pour le groupe d'échantillons stimulés et non-stimulés mécaniquement ont été comparés.

Parallèlement aux outils de mesure de l'appareil de test mécanique, un système de mesure optique (ARAMIS 5M, Gom, BS, DE) a été utilisé pour quantifier, par corrélation d'images, les déplacements et les déformations du motif stochastique présent à la surface de l'échantillon. L'analyse des déplacements et des déformations a été effectuée de deux façons. Dans un premier temps, la valeur moyenne (mesure globale) a été déterminée pour toute la surface de l'échantillon (Figure 6-1a). Par la suite, les analyses ont été raffinées et délimitées à trois régions d'intérêts correspondant à la portion supérieure, la portion centrale et la portion inférieure de l'échantillon (Figure 6-1b). Les valeurs obtenues pour chacune des régions ont été comparées entre elles ainsi qu'à la mesure globale. Les valeurs obtenues à différents instants au cours de la période de culture pour le groupe d'échantillons stimulés et non-stimulés mécaniquement ont également été comparés.

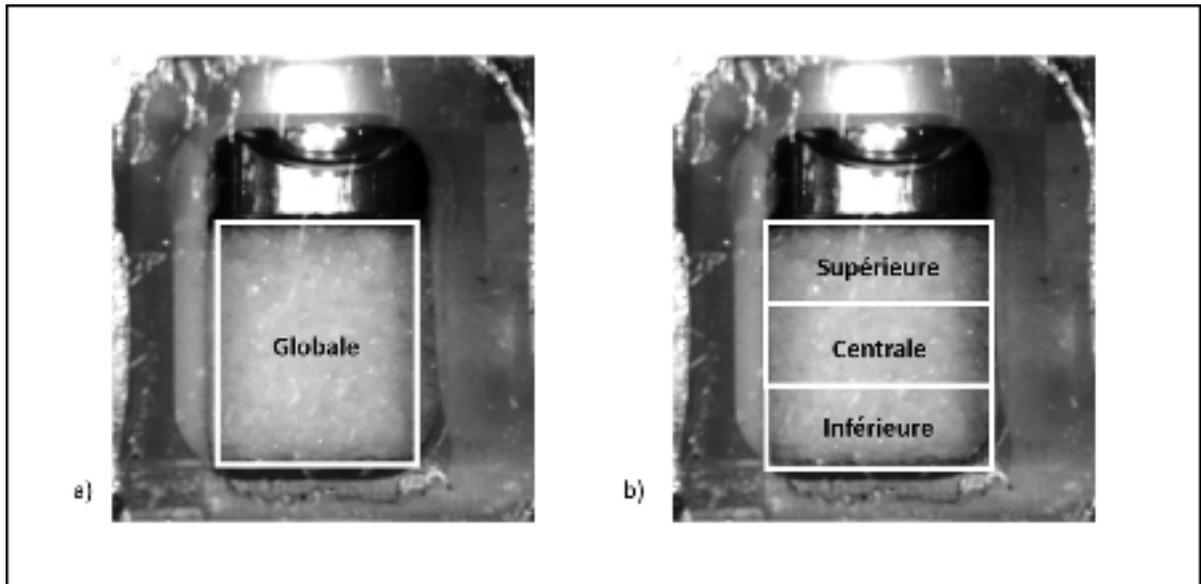


Figure 6-1 Illustration de la méthode utilisée pour effectuer l'analyse a) globale et b) par régions d'intérêts des déplacements et des déformations obtenus par corrélation d'images

Finally, the samples were imaged by micro-tomography with X-rays at the beginning and at the end of the culture period as mentioned in CHAPTER 5. Density and structural parameters were measured for the entire volume of the sample (global measurement) as well as for the three same regions of interest used for the analysis of displacements and deformations by image correlation (Figure 6-1). The values obtained for each region of interest were compared with each other as well as with the global measurement. The comparison of measurements obtained at the beginning and at the end of the culture period for the group of stimulated and non-stimulated samples was also performed.

6.2 Résultats

The presence of cracks, scratches and stains on the surface of the culture chamber glass made it difficult to acquire displacements and deformations by image correlation for four of the six samples (Figure 6-2). Consequently, the results of only two samples, one in the stimulated group and the other in the non-mechanically stimulated group, are presented.

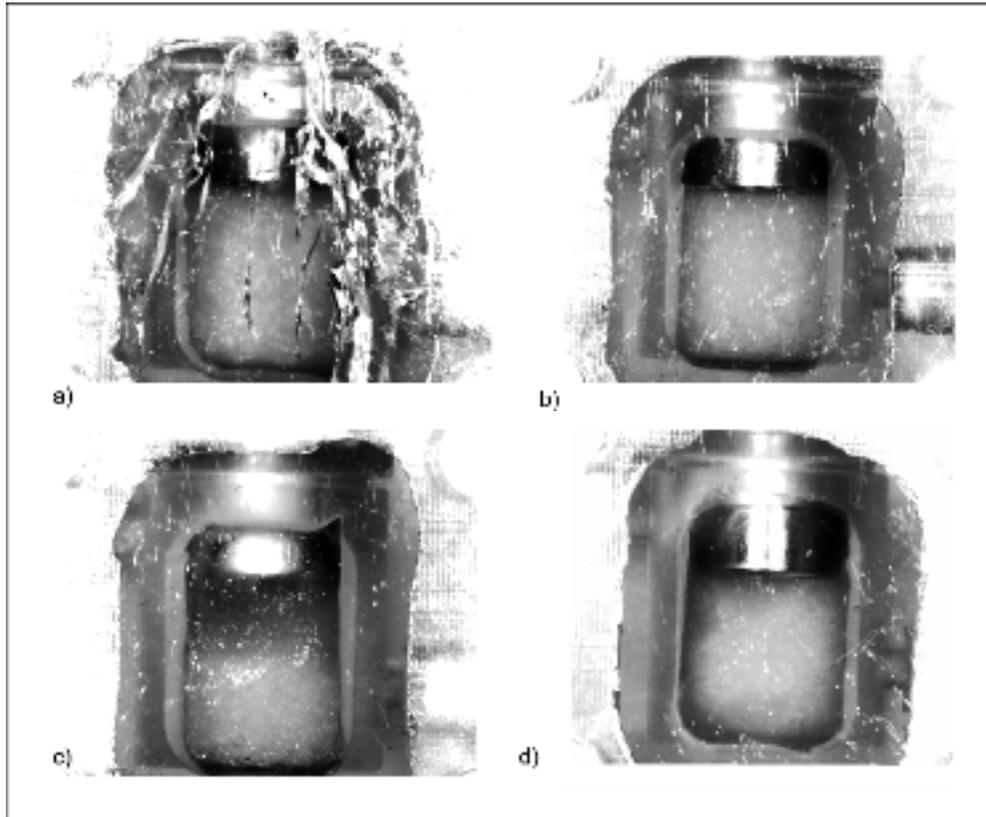


Figure 6-2 Éléments ayant nuits aux acquisitions par corrélation d'images;
 a) fissures b) rayures, c) et d) tâches dans la vitre de l'enceinte de culture

La Figure 6-3 présente les déplacements mesurés par corrélation d'images au 1^{ier}, 6^{ième} et 14^{ième} jour de culture pour les deux échantillons conservés pour l'analyse. Les résultats démontrent une variation de la mesure globale et locale dans le temps. Pour les deux échantillons, le déplacement global augmente au 6^{ième} jour de culture ($\Delta_{\text{non-stimulé}} = 3 \mu\text{m}$, $\Delta_{\text{stimulé}} = 13 \mu\text{m}$). Par la suite, le déplacement l'échantillon non-stimulé se stabilise par rapport à la mesure obtenue au 6^{ième} jour de culture, et il diminue pour l'échantillon stimulé mécaniquement ($\Delta_{\text{stimulé}} = - 8,6 \mu\text{m}$).

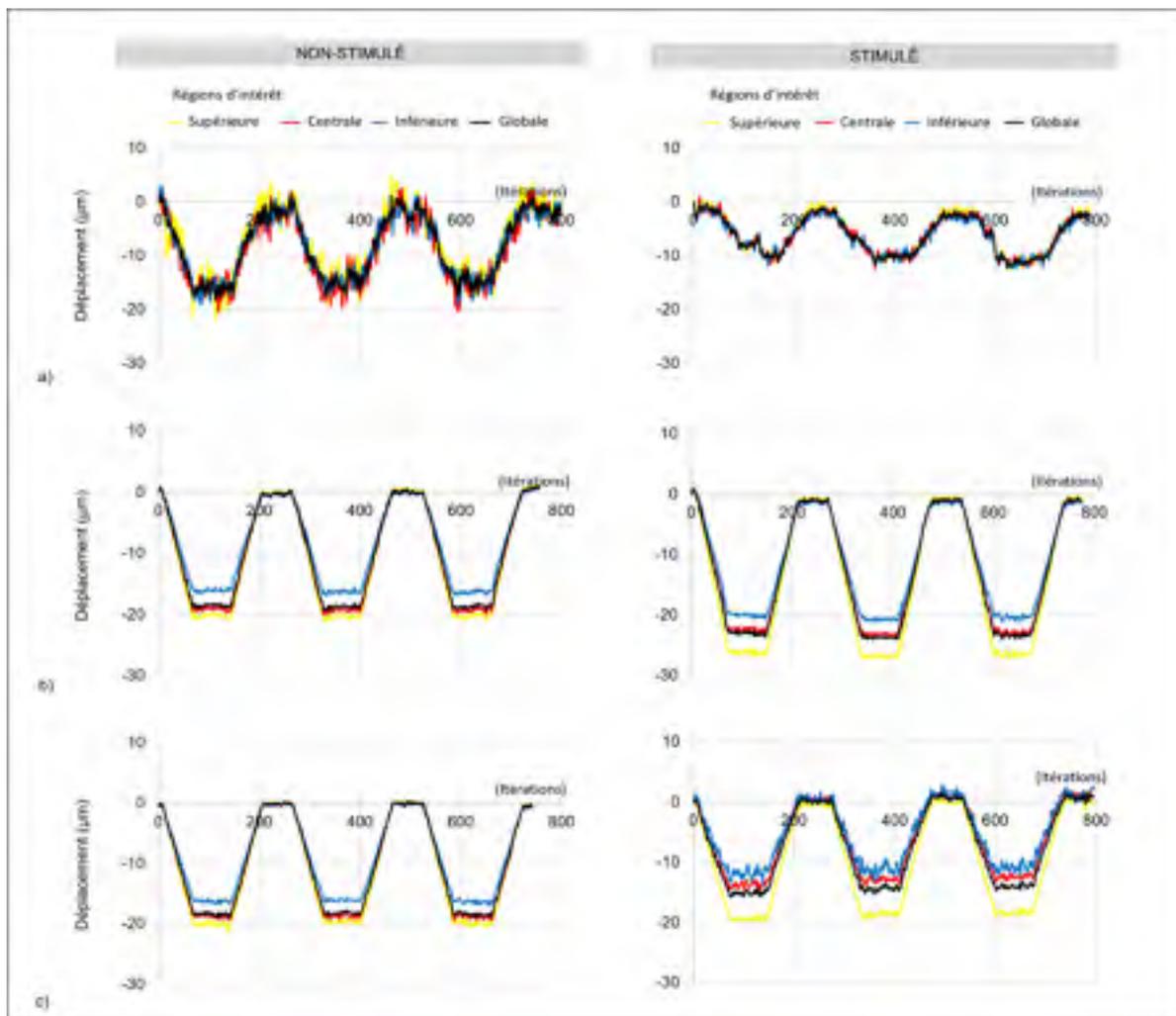


Figure 6-3 Comparaison des déplacements obtenus par corrélation d'images au a) 1^{ier}, b) 6^{ième} et c) 14^{ième} jour de culture pour l'échantillon non-stimulé et stimulé

L'analyse par région d'intérêt révèle une distribution non-uniforme des déplacements sur la surface des échantillons à partir du 6^{ième} jour de culture. La mesure de déplacement est plus élevée dans la portion supérieure que dans la portion inférieure et ce, pour les deux échantillons. La variation des mesures locales suit la même tendance que la variation des mesures globales. Les variations locales augmentent au 6^{ième} jour de culture pour les deux échantillons. Par la suite, elles restent constantes pour l'échantillon non-stimulé et diminuent pour l'échantillon stimulé.

La Figure 6-4 présente les déformations mesurées au 1^{ier}, 6^{ième} et 14^{ième} jour de culture. Les résultats montrent une variation de la mesure globale et locale au cours de la période de culture. Les déformations globales de l'échantillon non-stimulé augmentent au 6^{ième} jour de culture pour ensuite diminuer au 14^{ième} jour. Quant à l'échantillon stimulé, elles augmentent tout au long de la période de culture. L'analyse par région d'intérêt révèle une distribution non-uniforme des déformations sur la surface des échantillons à partir du 6^{ième} jour de culture. Pour l'échantillon non-stimulé, la mesure de déformation varie principalement dans la portion supérieure de l'échantillon. Elle augmente au 6^{ième} jour de culture pour ensuite diminuer au 14^{ième}. Les variations de mesure de l'échantillon stimulé sont également principalement ciblées dans la portion supérieure de l'échantillon et leur augmentation est plus importante au 14^{ième} jour de culture.

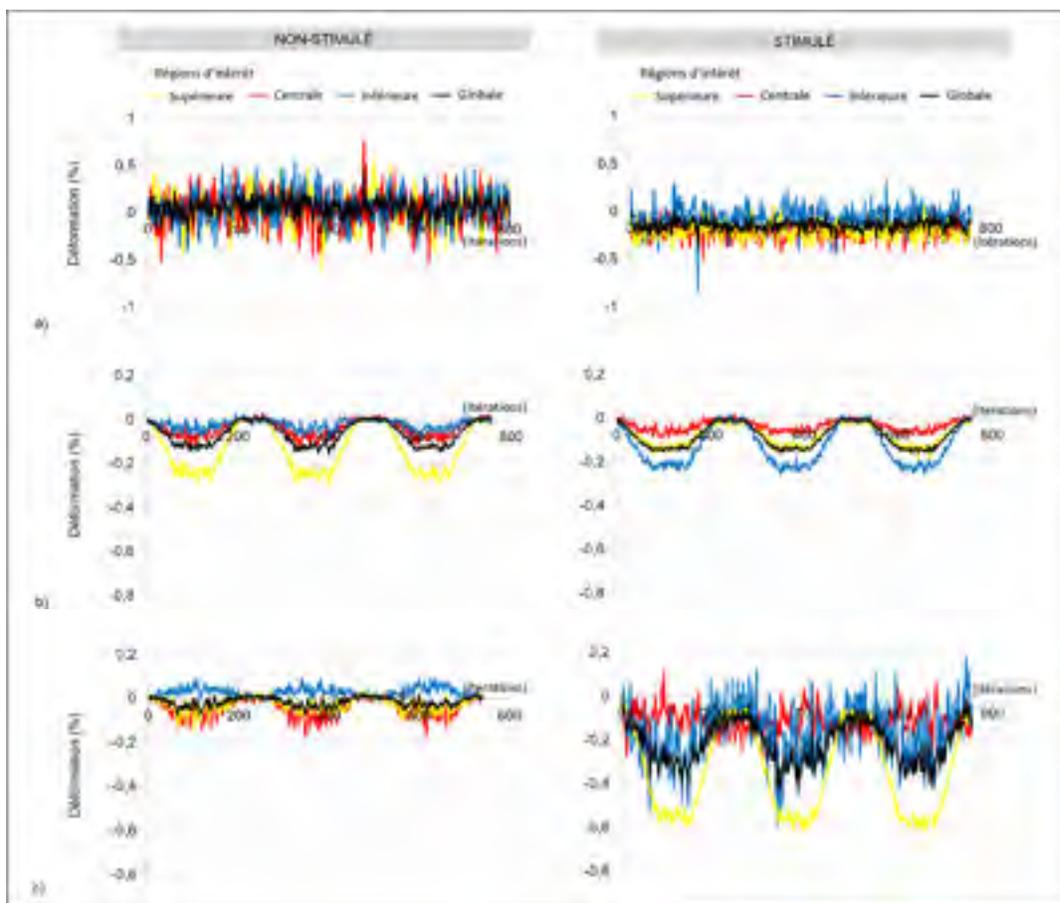


Figure 6-4 Comparaison des déformations obtenues par corrélation d'images au a) 1^{er}, b) 6^{ième} et c) 14^{ième} jour de culture pour l'échantillon non-stimulé et stimulé

La Figure 6-5 compare la raideur mesurée au 1^{ier}, 6^{ième} et 14^{ième} jour de culture pour les deux échantillons. La raideur de l'échantillon non-stimulé diminue de 646 N/mm entre le 1^{ier} et le 14^{ième} jour de culture. Quant à la raideur de l'échantillon stimulé, elle augmente de 100 N/mm. Il est à noter que la mesure des propriétés mécaniques au 6^{ième} et 14^{ième} jours de culture a été effectuée sans le capot de l'enceinte de culture, en raison d'un mauvais coulissement lors de l'application du chargement. De ce fait, la comparaison de la raideur entre le 6^{ième} et le 14^{ième} jour de culture rapporte une augmentation pour l'échantillon non-stimulé ($\Delta_{14-6} = 133\text{N/mm}$) et une diminution ($\Delta_{14-6} = 499\text{N/mm}$) pour l'échantillon stimulé.

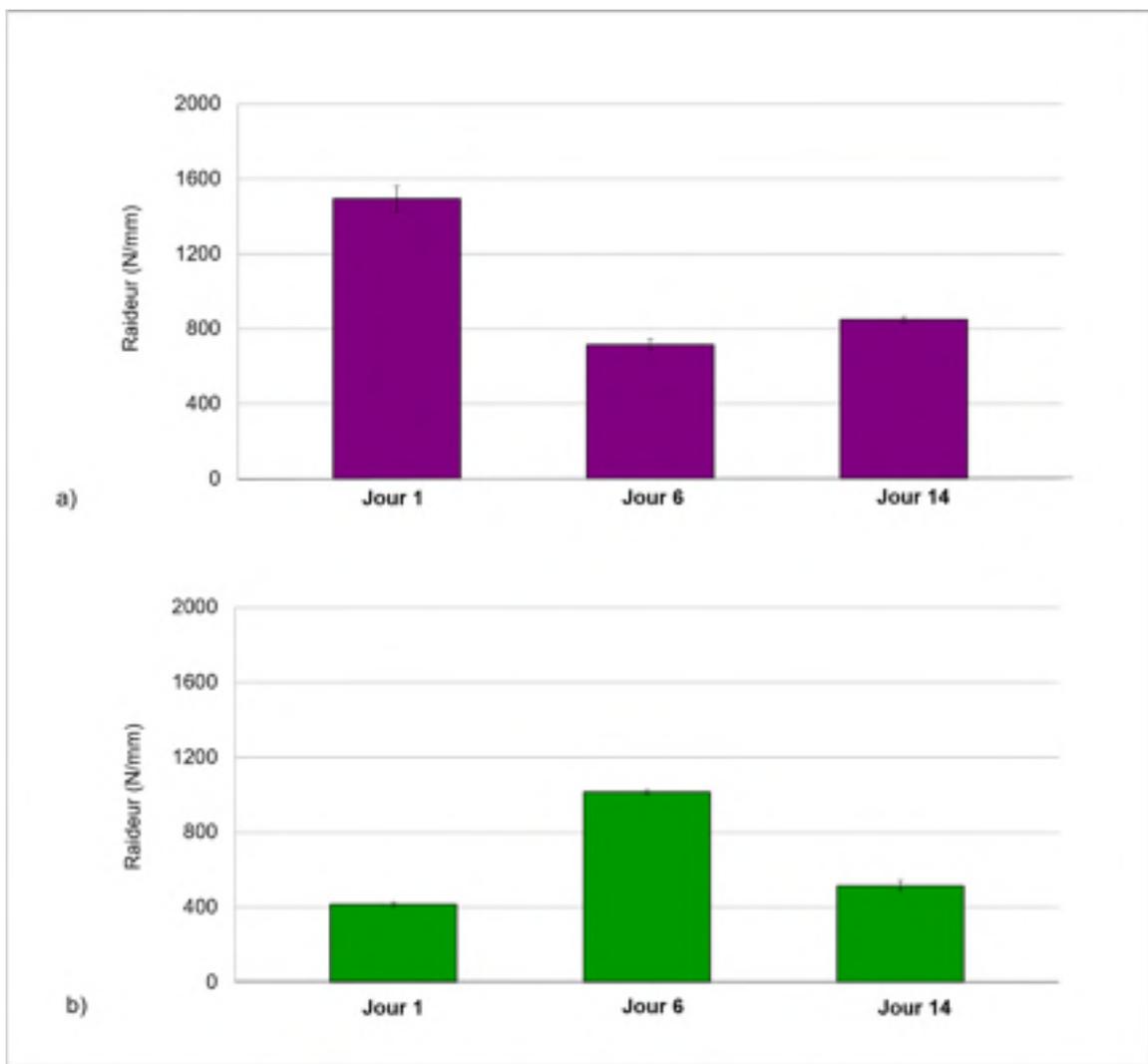


Figure 6-5 Comparaison de la raideur mesurée par l'appareil de test mécanique à divers instants au cours de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé

Les mesures de densité obtenues au début et à la fin de la période de culture sont présentées à la Figure 6-6 et la Figure 6-8. Au terme de la période de culture, une diminution de la mesure globale de la densité apparente ($\Delta_{J14-J1} = -0,05 \text{ g/cm}^3$) et tissulaire ($\Delta_{J14-J1} = -0,06 \text{ g/cm}^3$) supérieure au critère de sensibilité ($\epsilon_{\text{app}} = 0,018 \text{ g/cm}^3$, $\epsilon_{\text{tissu}} = 0,022 \text{ g/cm}^3$) défini lors d'une étude antérieure (CHAPITRE 5), est observée pour l'échantillon non-stimulé. Aucun changement n'est rapporté pour l'échantillon stimulé mécaniquement. La répartition et les variations de mesure de l'échantillon non-stimulé demeurent uniformes tout au long de la période de culture. En revanche, une augmentation de la densité apparente (ρ_{app}) et de la densité tissulaire (ρ_{tissu}) est rapportée dans la portion supérieure de l'échantillon stimulé ($\Delta_{\text{app}} = 0,02 \text{ g/cm}^3$, $\Delta_{\text{tissu}} = 0,09 \text{ g/cm}^3$), tandis qu'une diminution est observées dans la région centrale et inférieure ($\Delta_{\text{app}} = -0,03 \text{ g/cm}^3$, $\Delta_{\text{tissu}} = -0,02 \text{ g/cm}^3$).

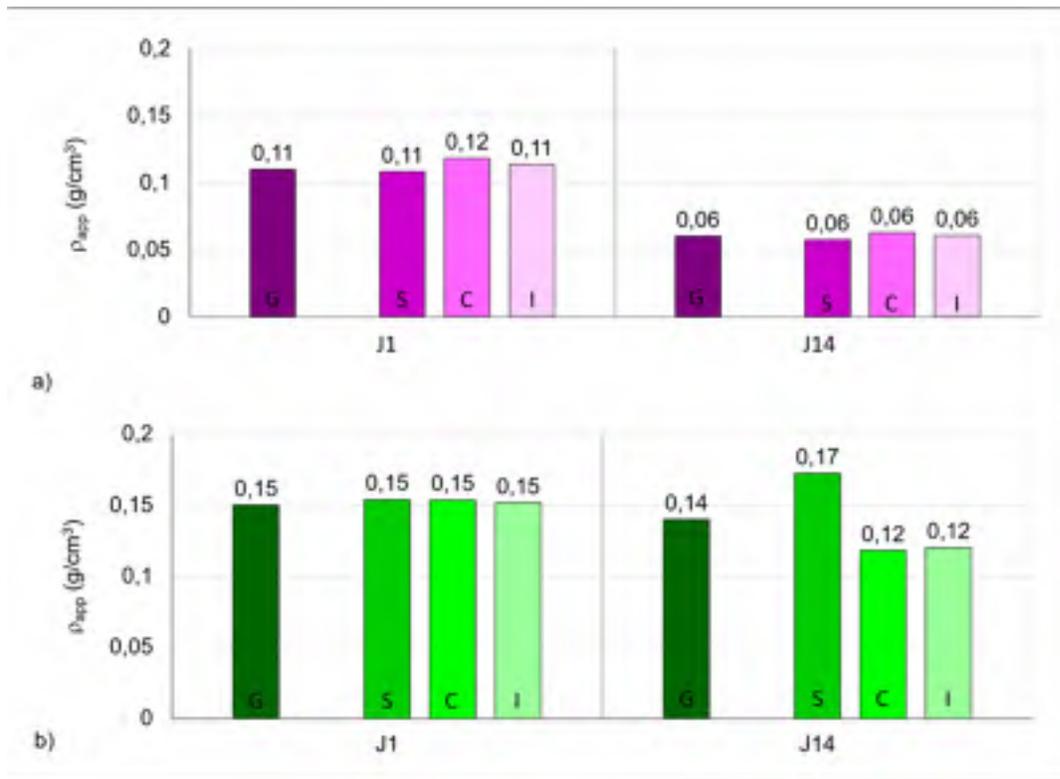


Figure 6-6 Comparaison de la densité minérale apparente (ρ_{app}) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé (mauve) et b) stimulé (vert). La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.

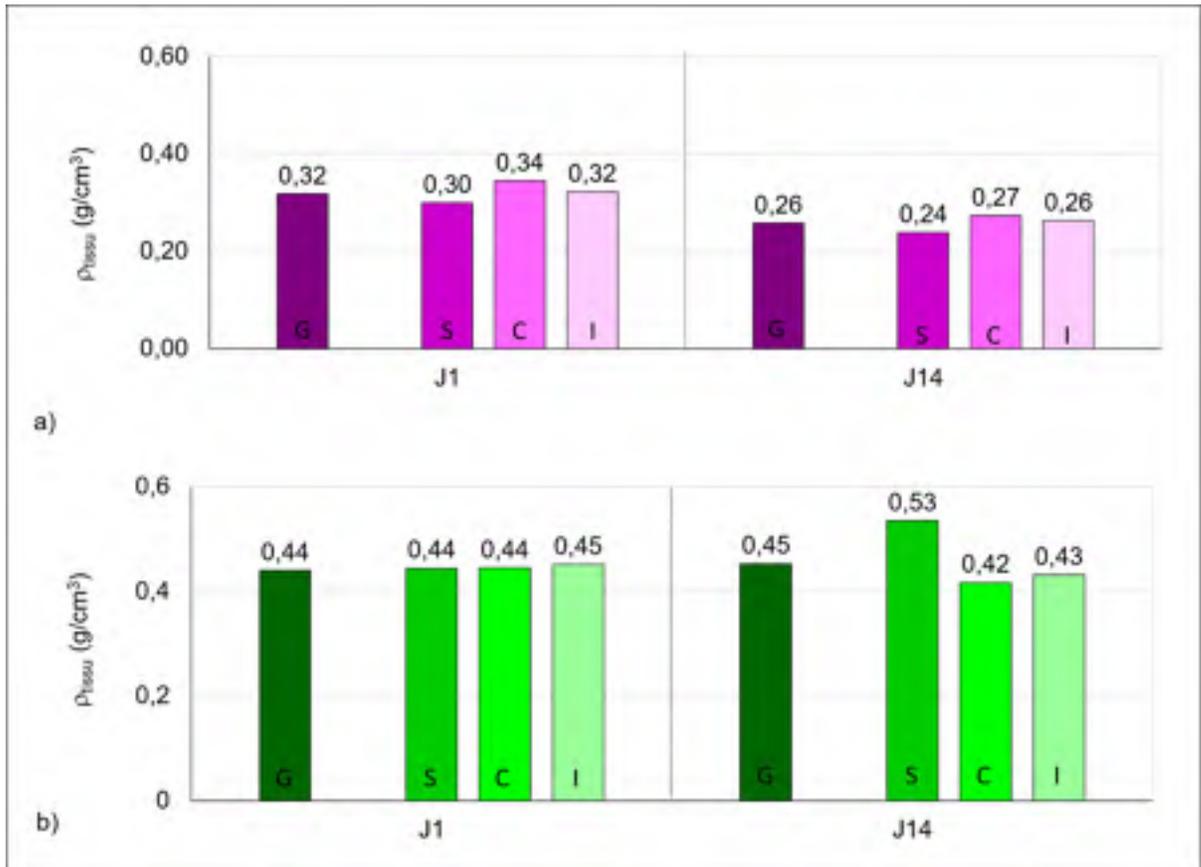


Figure 6-7 Comparaison de la densité minérale tissulaire (ρ_{tissu}) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé (mauve) et b) stimulé (vert). La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.

La Figure 6-8 compare la fraction volumique de tissu osseux (BV/TV) mesurée au 1^{ier}, 6^{ième} et 14^{ième} jour de culture pour les deux échantillons. Une diminution de la mesure globale de la fraction volumique est rapportée pour l'échantillon non-stimulé ($\Delta_{J14-J1} = -0,74\%$) tandis qu'une augmentation est observée pour l'échantillon stimulé mécaniquement ($\Delta_{J14-J1} = 0,42\%$). Dans les deux cas, les variations observées sont supérieures au critère de sensibilité de 0,06 % déterminé lors d'une étude antérieure (CHAPITRE 5). La diminution et la répartition de mesure pour l'échantillon non-stimulé est relativement uniforme. Pour l'échantillon stimulé, l'augmentation de la fraction volumique de tissu osseux est localisée dans la portion supérieure de l'échantillon tandis qu'une diminution est rapportée dans la

portion centrale et inférieure de l'échantillon (Figure 6-8). Ces changements locaux sont également supérieurs au critère de sensibilité établi précédemment (0,06 %) (CHAPITRE 5).

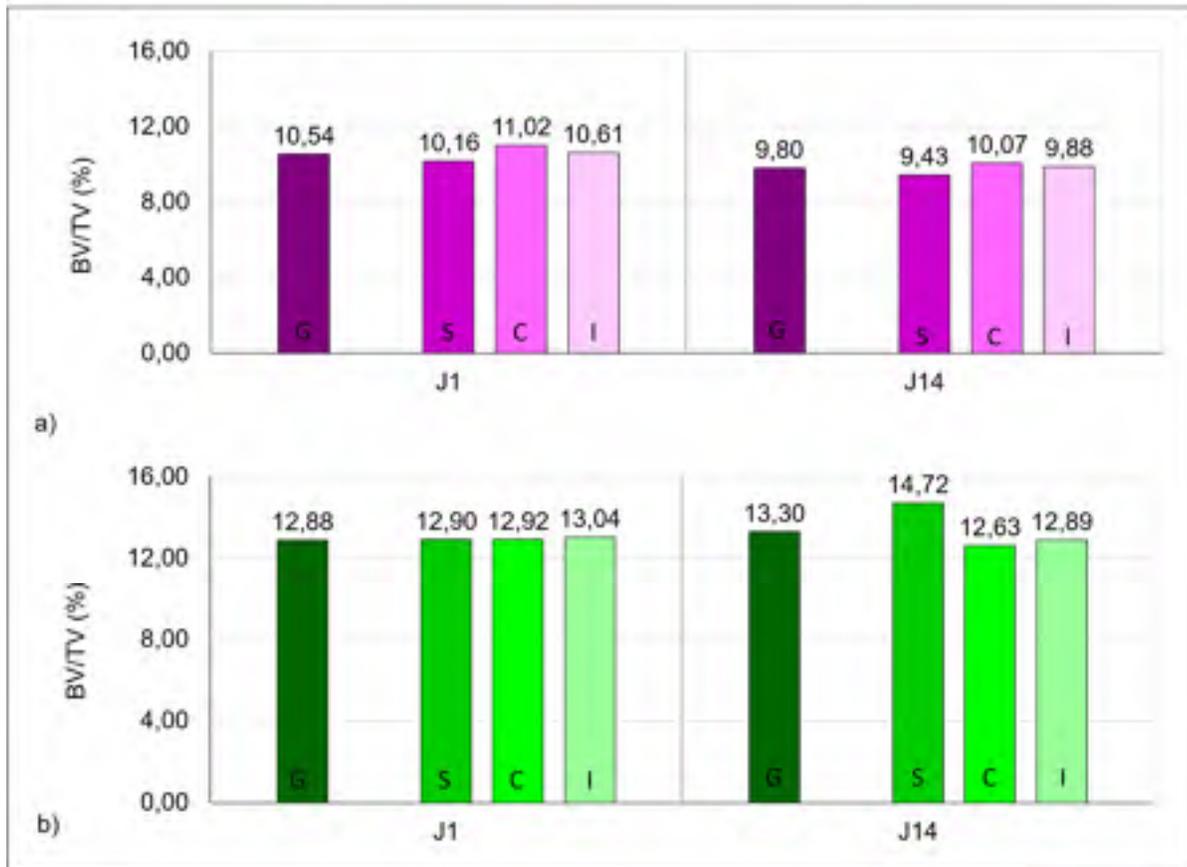


Figure 6-8 Comparaison de la fraction volumique de tissu osseux (BV/TV) obtenu par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.

Les mesures de l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th) sont présentées à la Figure 6-9. Une diminution de la mesure globale de l'épaisseur des travées, supérieure au critère de sensibilité de $0,4 \mu\text{m}$ (CHAPITRE 5), est rapportée pour les deux échantillons. La diminution est plus importante pour l'échantillon non-stimulé que pour celui stimulé. La répartition de l'épaisseur des travées n'est pas uniforme pour les deux échantillons. Au premier jour de culture, l'épaisseur des travées est plus importante dans la portion supérieure des deux échantillons.

Au terme de la culture, une diminution de l'épaisseur des travées est observée pour l'ensemble des régions d'intérêt de l'échantillon non-stimulé tandis qu'une diminution de l'épaisseur des travées est rapportée uniquement dans la portion supérieure de l'échantillon stimulé. Les changements observés dans les diverses régions d'intérêt sont également supérieurs au critère de sensibilité ($0,4 \mu\text{m}$) déterminé lors d'une étude antérieure (CHAPITRE 5).

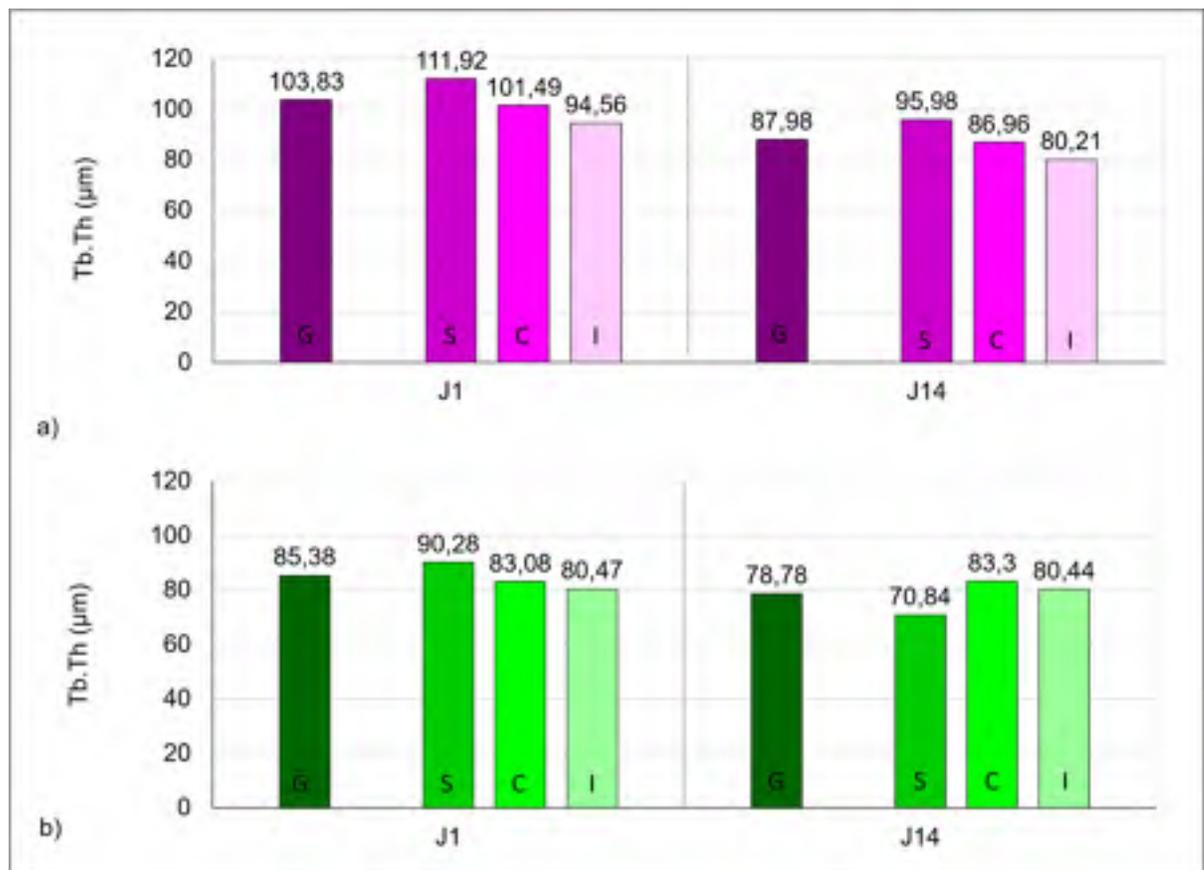


Figure 6-9 Comparaison de l'épaisseur des travées osseuses (Tb.Th) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.

Finalement, la Figure 6-10 compare la distance entre les travées osseuses (Tb.Sp) mesurée au 1^{ier}, 6^{ième} et 14^{ième} jour de culture pour les deux échantillons. La mesure globale de la distance entre les travées augmente pour l'échantillon non-stimulé et diminue pour l'échantillon

stimulé. La distance entre les travées osseuses n'est pas répartie uniformément dans les deux échantillons. Pour l'échantillon non-stimulé, la mesure dans les trois régions d'intérêt augmente au cours de la période de culture. Pour l'échantillon stimulé, l'analyse des régions d'intérêt révèle que la diminution de la distance entre les travées est spécifique à la portion supérieure de l'échantillon et qu'elle augmente dans la portion centrale et inférieure de l'échantillon. Dans tous les cas, les changements observés sont supérieurs aux critères de sensibilité de $0,7 \mu\text{m}$ établi lors d'une étude antérieure (CHAPITRE 5).

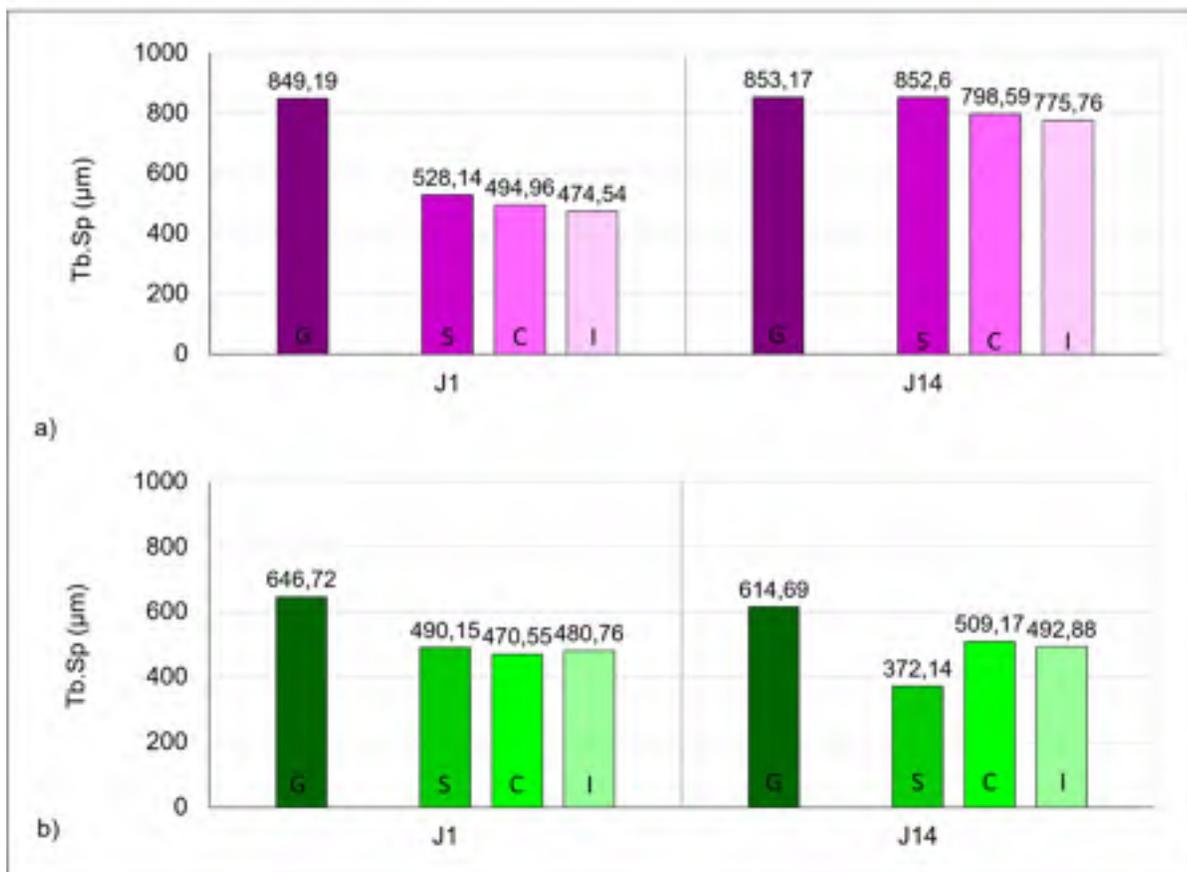


Figure 6-10 Comparaison de la distance entre les travées osseuses (Tb.Sp) obtenue par imagerie micro-CT au début et à la fin de la période de culture pour l'échantillon a) non-stimulé et b) stimulé. La colonne «G» correspond à la mesure globale tandis que les colonnes «S», «C» et «I» correspondent à la mesure locale dans la portion supérieure, centrale et inférieure de l'échantillon.

6.3 Discussion

L'objectif de cette étude est d'évaluer la possibilité d'améliorer le suivi d'adaptations osseuses dans un contexte de culture *ex vivo* par la combinaison de multiples modalités de mesure. Un protocole expérimental combinant l'utilisation de la micro-tomographie à rayons X, la réalisation d'essais mécaniques et la corrélation d'images a été proposé pour quantifier à différents instants au cours d'une incubation de 14 jours, les adaptations osseuses d'échantillons soumis à une stimulation mécanique et mettre en évidence l'apport de chacune des modalités de mesure.

Dans un premier temps, cette étude a permis de documenter par l'acquisition d'images micro-CT les adaptations structurales et les changements globaux associés à la composition minérale du tissu osseux. La diminution de la densité minérale et de la fraction volumique du tissu osseux, l'augmentation de la distance entre les travées osseuses, ainsi que la diminution de leur épaisseur suggèrent une détérioration du tissu de l'échantillon non-stimulé mécaniquement. Ces résultats sont en accord avec le fait que la résorption osseuse peut durer jusqu'à 2 semaines avant le début du processus de formation osseuse (Hadjidakis & Androulakis, 2006; Katsimbri, 2017; Matsuo & Irie, 2008). Des ambiguïtés ont cependant été rapportées dans les variations de mesure de l'échantillon stimulé. D'une part, l'augmentation de la fraction volumique et la diminution de la distance entre les travées suggèrent un renouvellement du tissu osseux tandis que la diminution de l'épaisseur des travées suggère une dégradation. De plus, l'absence de variation de densité suggère qu'aucun changement dans la composition du tissu ne s'est produit. Ces observations sont contradictoires et ont pour effet de nuire à l'interprétation des adaptations de l'échantillon stimulé mécaniquement.

Des travaux antérieurs ont démontré la possibilité d'utiliser la micro-tomographie à rayons X pour documenter la distribution de la densité et de la microstructure à l'intérieur d'un même échantillon (Chen, Shoumura, Emura, & Bunai, 2008; Gong et al., 2006; Gong, Zhang, Yeung, & Qin, 2005; Hulme et al., 2007; Hussein & Morgan, 2013). L'utilisation de cette approche dans le cadre de cette étude a permis de démontrer que la prise en compte de l'hétérogénéité

du tissu osseux améliore le suivi des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*. La Figure 6-11 illustre comment le raffinement des analyses par région d'intérêt permet de clarifier les ambiguïtés d'interprétation des adaptations de l'échantillon stimulé mécaniquement. Tout d'abord, la distribution de densité rapporte une augmentation de la densité minérale apparente et tissulaire dans la portion supérieure de l'échantillon ainsi qu'une diminution dans la portion centrale et inférieure qui dément qu'aucun changement ne s'est produit durant la culture l'échantillon stimulé. L'augmentation de densité, qui est spécifique à la portion supérieure de l'échantillon, suggère par la même occasion une influence favorable de l'application d'un chargement mécanique au processus de formation osseuse (Birmingham et al., 2015; Birmingham et al., 2016; Chan et al., 2009; David et al., 2008; Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). Deuxièmement, l'analyse des paramètres structuraux par région d'intérêt précise que la diminution de l'épaisseur et de la distance entre les travées est exclusive à la portion supérieure de l'échantillon. Cette clarification permet d'émettre comme hypothèse que, sous l'effet de l'application d'un chargement mécanique, les travées osseuses se sont restructurées pour s'adapter à la distribution de la charge qu'elles subissent (Huiskes & van Rietbergen, 2005; Langton & Njeh, 2004). Étant plus éloignées du site d'application du chargement, la réorganisation des travées osseuses dans les portions centrale et inférieure de l'échantillon est moindre. Elle se limite à une légère diminution du nombre de travées ce qui tend à corroborer avec l'augmentation de la distance entre les travées et la diminution du volume de fraction osseux mesurées pour ces régions d'intérêt. Quant à l'échantillon non-stimulé, les variations de mesures locales confirment l'interprétation des variations globales qui suggèrent une détérioration de la structure du tissu sans réellement fournir d'éléments d'information supplémentaires car les variations se sont avérées uniformes dans l'ensemble de l'échantillon.

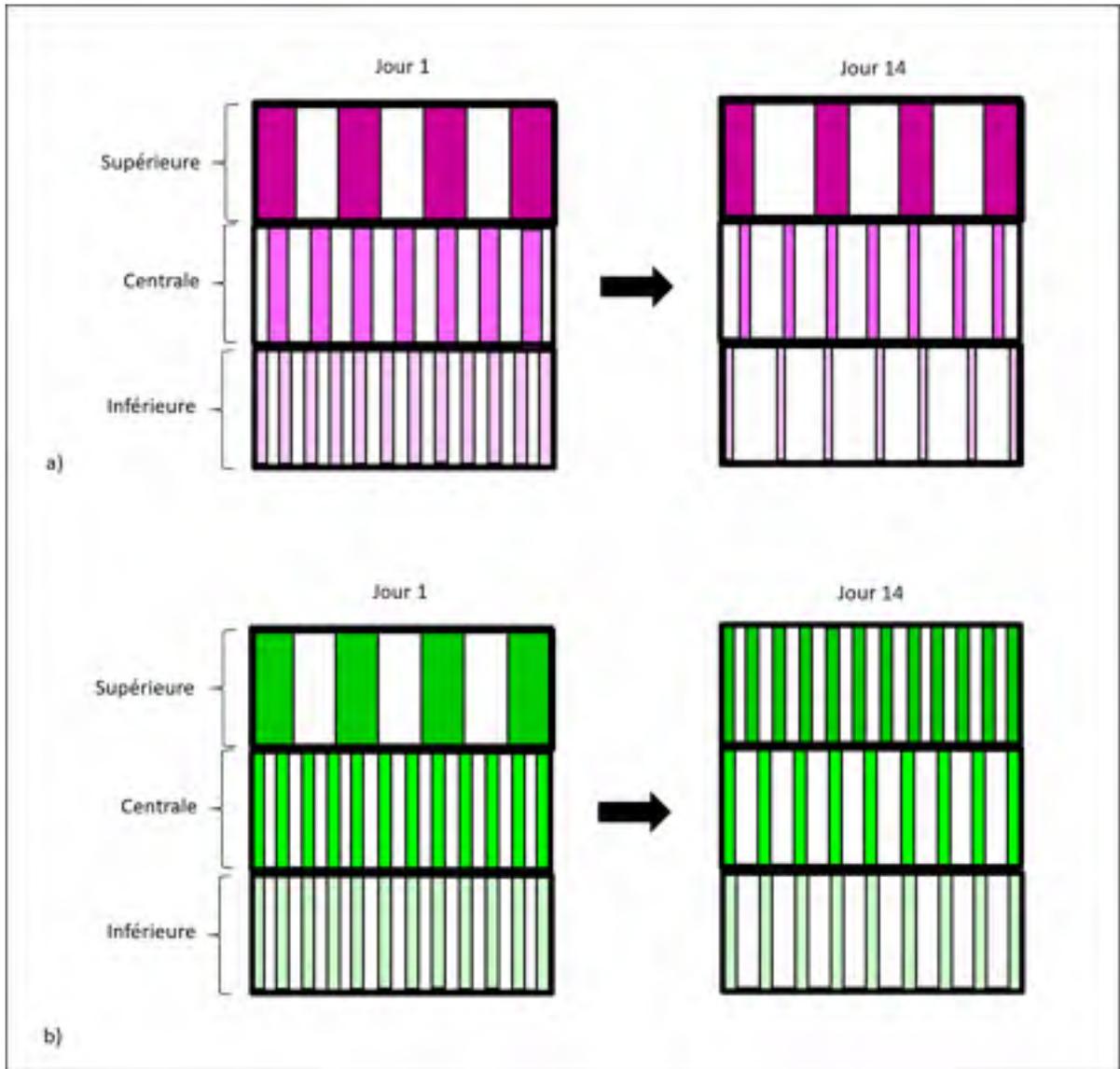


Figure 6-11 Illustration de l'interprétation des adaptations osseuses par région d'intérêt pour a) l'échantillon non-stimulé et b) l'échantillon stimulé mécaniquement. Les barres rectangulaires représentent l'évolution des travées osseuses au cours de la période de culture

Cette étude a permis dans un deuxième temps de caractériser les propriétés mécaniques des échantillons par la réalisation de tests mécaniques en compression. La mesure de la raideur par l'intermédiaire de l'appareil de test mécanique donne un aperçu global du comportement des échantillons et ne tient pas compte de l'hétérogénéité de la structure osseuse. L'ajout de l'utilisation de la corrélation d'images à la caractérisation du comportement mécanique a permis de quantifier à la fois les changements globaux et locaux du comportement des

échantillons. Pour l'échantillon stimulé, l'analyse des déformations par région d'intérêt suggère que la diminution de raideur rapportée entre le 6^{ième} et le 14^{ième} jour de culture est liée à l'augmentation des déformations rapportées dans la portion supérieure de l'échantillon. Ces observations soutiennent la restructuration de la structure osseuse suggérée par l'analyse locale des images micro-CT qui est également localisée dans la portion supérieure de l'échantillon. Quant à l'échantillon non-stimulé, l'analyse par région d'intérêt des champs de déformations permet également de supposer que l'augmentation de raideur rapportée entre le 6^{ième} et le 14^{ième} jour de culture est lié à la diminution des déformations rapportée dans la portion supérieure de l'échantillon. Bien que les changements structuraux détectés par micro-tomographie à rayons X soient considérés comme étant des adaptations issues de la culture, l'implication de ces changements sur l'augmentation de la raideur est plus difficile à établir car les variations se sont avérées être uniformes dans l'ensemble de l'échantillon. L'augmentation de raideur reste par conséquent inexplicée. Les résultats obtenus sont néanmoins en accord avec les travaux d'Endres et al. (2009), qui ont montré une augmentation de la rigidité d'échantillons osseux malgré l'absence de stimulation mécanique durant la période de culture.

CHAPITRE 7

DISCUSSION

La culture *ex-vivo* est une méthode expérimentale utilisée pour étudier le comportement du tissu osseux selon différentes situations. La possibilité de contrôler l'environnement dans lequel évolue le tissu fait en sorte que cette méthode expérimentale peut être privilégiée à la réalisation d'expérimentations sur des sujets vivants. La revue des connaissances a révélé que la caractérisation des changements du tissu osseux lors de la période de culture est un aspect défaillant dans la mise en place de ce type de méthodologie. La combinaison de multiples méthodes de mesure pour documenter et quantifier les changements subis par les échantillons durant la période de culture est une approche rarement utilisée, malgré le fait qu'il soit suggéré de considérer la densité osseuse, la microstructure et les propriétés mécaniques pour évaluer la qualité osseuse (Guda et al., 2014; Huiskes & van Rietbergen, 2005; McDonnell et al., 2007). L'objectif de ce projet doctoral était d'améliorer le suivi des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo*. Il fut émis comme hypothèse que le suivi pouvait notamment être amélioré par la combinaison de multiples modalités de mesure dont la corrélation d'images et la microtomographie à rayons X. Pour ce faire, des échantillons d'os trabéculaire bovins ont été mis en culture pour générer des adaptations osseuses par l'application d'un chargement mécanique et les adaptations osseuses ont été mesurées par l'utilisation de la corrélation d'images et la microtomographie à rayons X.

La réalisation d'analyses histologiques est la méthode de mesure principalement utilisée pour caractériser les changements du tissu osseux suite à une culture *ex-vivo*. L'utilisation de la microtomographie à rayons X, comme méthode de mesure alternative à l'histologie pour caractériser simultanément les changements structuraux et les variations de densité, est une proposition innovatrice ayant pour avantage de permettre une évaluation non-destructive du tissu osseux pendant la période de culture. Préalablement à l'utilisation de la microtomographie à rayons X dans un contexte de culture *ex-vivo*, une étude a été réalisée pour

évaluer la capacité de cette méthode à détecter des modifications du tissu osseux. Aucune étude visant à évaluer sa variabilité de mesure et à valider son utilisation dans le cadre d'une culture osseuse *ex vivo* n'avait été réalisée à ce jour.

Pour ce faire, la sensibilité de la méthode de mesure a d'abord été déterminée lors de la réalisation de deux acquisitions successives. Ces valeurs ont par la suite été utilisées comme critères de comparaison pour s'assurer que les changements observés suite à une culture sont attribuables à la culture et non à la variabilité de la méthode de mesure. Cette étude a permis de confirmer que la micro-tomographie à rayons X est une méthode de mesure susceptible de détecter et de suivre l'évolution d'adaptations osseuses résultant d'une culture *ex-vivo* car les différences mesurées après une période de culture de 14 jours sont supérieures au seuil de sensibilité de la méthode. Une période de culture insuffisante n'a toutefois pas permis à la micro-tomographie à rayons X de confirmer l'influence de la stimulation mécanique sur la production d'adaptations osseuses. Ces résultats, qui ont mené à la soumission d'un article dans la revue *Annals of biomedical engineering*, ont également permis de souligner l'importance d'évaluer la variabilité de la méthode de mesure avant de procéder à la caractérisation du développement du tissu osseux.

En effet, toute mesure est associée à un certain degré d'incertitude (Njeh & Hans, 2004). Conséquemment, pour que les résultats mesurés soient crédibles, le niveau d'incertitude doit être rapporté et établi (Njeh & Hans, 2004). La validation d'un outil de mesure implique l'évaluation de sa variabilité (précision) et son exactitude (Njeh & Hans, 2004). Dans cette étude, seule la variabilité, qui indique la capacité d'une méthode à mesurer un paramètre de façon constante à plusieurs reprises a été évaluée. La détermination de seuils de sensibilité de la micro-tomographie à rayons X est essentielle à l'interprétation des résultats car ils reflètent le degré d'incertitude inhérent à la méthode de mesure. Le nombre d'échantillons utilisés pour déterminer la sensibilité de mesure aurait néanmoins pu être plus important pour couvrir un plus large éventail de morphologies et de densités osseuses. L'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons extraits d'un plus grand nombre de donneurs aurait également permis de tenir compte de la variabilité inter-échantillons et inter-spécimens.

L'exactitude de la mesure par micro-tomographie à rayons X n'a pas été évaluée dans cette étude en raison d'une méconnaissance des valeurs réelles des paramètres mesurés. De plus, la connaissance de la valeur réelle du paramètre mesuré n'est pas considérée comme étant essentiel pour la réalisation du projet, car chaque échantillon utilisé au cours de la culture est considéré son propre contrôle. C'est donc la différence de mesure entre deux acquisitions qui est plus importante à quantifier pour effectuer le suivi de l'évolution des échantillons mis en culture *ex-vivo*.

Dans un deuxième temps, la corrélation d'images a été proposée pour caractériser *ex-vivo* le comportement mécanique des échantillons, en combinaison de l'application d'un chargement. Étant une méthode de mesure sans contact, la corrélation d'images assure la possibilité d'effectuer un suivi continu des échantillons tout au long de la période de culture, sans nuire à leur survie. Aucune étude n'avait encore proposé l'utilisation de cette méthode de mesure pour suivre l'évolution du comportement mécanique d'échantillons osseux au cours de la culture *ex-vivo*.

Préalablement à l'utilisation de cette méthode, qui nécessite habituellement l'application d'un motif stochastique à base de peinture, une étude a été réalisée pour évaluer la possibilité de s'affranchir de l'utilisation d'un motif exogène potentiellement nuisible à l'intégrité des échantillons dans un contexte de culture *ex-vivo*. Les résultats obtenus ont tout d'abord démontré que l'os trabéculaire bovin possède une structure poreuse hétérogène qui lui confère, de façon naturelle, un motif stochastique susceptible de permettre l'utilisation de la corrélation d'images sans utilisation de peinture. À ce jour, aucune étude n'avait démontré la possibilité d'utiliser la corrélation d'images sans application d'un motif stochastique à base de peinture pour caractériser le comportement mécanique d'échantillons osseux.

Les résultats obtenus ont également démontré que le fait de placer les échantillons osseux dans un environnement similaire à celui rencontré lors de culture n'a aucun impact sur la mesure des déplacements et des déformations. Toujours est-il qu'en réelle situation de culture, le dépôt de corps gras, l'endommagement des vitres et l'adhésion de contaminant fongique sur la

surface des vitres de l'enceinte ont nui à la détection du motif stochastique de l'échantillon et par conséquent, à l'utilisation de la corrélation d'images pour caractériser le comportement mécanique des échantillons. Pour pallier à ce problème, il est recommandé de modifier le type de matériau utilisé pour la fenêtre de visualisation et de changer sa méthode de stérilisation. L'utilisation du verre, dont la température de fusion est plus élevée que le polycarbonate combiné à une stérilisation au gaz dont les températures atteintes sont moins élevées (50°C) plutôt qu'une stérilisation à la vapeur humide (136°C), diminuerait probablement l'altération du matériau de la fenêtre de visualisation et, par le fait même, le risque d'apparition de tâches nuisibles à l'acquisition des mesures par corrélation d'images. Il est également suggéré d'ajouter un antifongique au milieu de culture et dans la solution de lavage des échantillons pour réduire le risque de contamination durant la culture.

La qualité des mesures de déformation par corrélation d'images dépend fortement de la qualité du motif sur la surface de l'échantillon (Freddi et al., 2015; Palanca et al., 2016). Un motif idéal devrait avoir une taille comprise entre 3 et 5 pixels et avoir une faible dispersion (la plupart des points sont de la taille souhaitée) (Freddi et al., 2015; Palanca et al., 2016). De plus, il est important que la portion de la surface correspondant à la zone pâle soit approximativement la même que celle correspondant à la foncée pour assurer un bon contraste (Freddi et al., 2015; Palanca et al., 2016). Dans le cadre de l'utilisation de la corrélation d'images volumiques, qui est une technique de mesure qui permet de calculer et de cartographier les déplacements et les déformations tridimensionnels d'un matériau à partir d'appareils d'imagerie (micro-tomographiques à rayons-X) plutôt qu'un système de mesure optique, Lui et al. 2007 ont démontré que l'exactitude et la variabilité de la mesure dépendent de la structure de l'os trabéculaire. Des différences dans la taille des travées osseuses et leur espacement peuvent néanmoins affecter la précision de la mesure (Liu & Morgan, 2007). Par conséquent, il est possible que cela soit aussi le cas lorsque la corrélation d'images est utilisée. Dans le cadre de ce projet, il a été démontré que l'os trabéculaire bovin, qui est un animal de grande taille, possède des caractéristiques structurales appropriées pour la réalisation de la corrélation d'images sans application d'un motif exogène. Néanmoins, rien n'assure que cette approche puisse être réalisée sur des échantillons extraits de différents sites et de différentes

espèces animales en raison de la nature et de la structure trabéculaire des échantillons qui peuvent différer.

La mesure de la densité osseuse, de la microstructure et des propriétés mécaniques joue un rôle essentiel dans l'évaluation de la qualité osseuse (Huiskes & van Rietbergen, 2005; McDonnell et al., 2007). Une fois l'utilisation de la micro-tomographie à rayons X et de la corrélation d'images justifiées dans un contexte de culture *ex-vivo*, l'utilisation de ces deux méthodes de mesure a été combinée à la réalisation d'essais mécaniques pour l'étude des adaptations osseuses *ex-vivo* d'échantillons d'os trabéculaire bovins soumis à un chargement mécanique. La réalisation de cette étude a permis dans un premier temps de mettre en évidence que l'amélioration des outils disponibles pour effectuer la culture osseuse *ex-vivo* (bioréacteurs) permet l'utilisation de multiples méthodes de mesure pour quantifier les changements subis par les échantillons. L'utilisation d'une enceinte de culture compatible avec un appareil de test mécanique, un système de mesure optique et un appareil d'imagerie micro-CT a permis de caractériser les propriétés mécaniques, documenter les champs de déformation et de caractériser les changements structuraux du tissu osseux pendant la culture. Aucune étude n'avait encore proposé l'utilisation simultanée de ces trois méthodes de caractérisation pour suivre et documenter l'évolution d'échantillons osseux au cours d'une culture *ex vivo*.

La réalisation de cette étude a permis dans un deuxième temps d'évaluer l'apport de l'utilisation de multiples modalités de mesure sur le suivi d'adaptations osseuses. L'utilisation de la micro-tomographie à rayons X et de la corrélation d'images a démontré que considérer les variations locales et globales contribue à améliorer le suivi de l'évolution des échantillons en ciblant les zones sujettes à des modifications osseuses. Le raffinement des analyses par région d'intérêt a également permis d'améliorer l'interprétation des adaptations osseuses par la prise en considération de l'hétérogénéité du tissu. Cette approche a permis de soutenir l'importance de tenir compte des variations régionales des paramètres architecturaux de l'os comme suggéré par des travaux antérieurs relativement à l'évaluation du risque de fracture (Gong et al., 2006; Hulme et al., 2007; Hussein & Morgan, 2013). Le suivi des adaptations osseuses a également été amélioré par la complémentarité des informations recueillies.

L'utilisation de multiples modalités de mesure a permis entre autres de mettre en relation les changements structuraux mesurés par micro-tomographie à rayons X aux changements mécaniques mesurés par corrélation d'images pour clarifier l'interprétation des changements subis par les échantillons au cours de la culture. Ces résultats tendent vers les conclusions rapportées par des études antérieures qui ont démontré que les propriétés mécaniques de l'os sont grandement liées à la densité (Singer, Edmondston, Day, Breidahl, & Price, 1995) et à la microstructure de l'os trabéculaire (Hulme et al., 2007; Lochmuller et al., 2008; Teo, Si-Hoe, Keh, & Teoh, 2006; Wegrzyn et al., 2010; Yerramshetty, Kim, & Yeni, 2009) et qui prétendent qu'aucune méthode ne peut à elle seule fournir une évaluation de la qualité osseuse (Goulet et al., 1994). L'incapacité d'expliquer l'augmentation de la raideur rapportée sur l'échantillon non-stimulé mécaniquement par la modification des changements structuraux, laisse place à l'identification de nouveaux facteurs ayant une influence sur la qualité du tissu osseux.

La principale limite de cette étude est liée à la faible quantité d'échantillons utilisés. Le nombre d'échantillons utilisés est insuffisant pour confirmer l'interprétation des adaptations ayant été subies. La répétition des expérimentations sur un plus grand nombre d'échantillons extraits d'un plus grand nombre de donneurs aurait permis d'accroître le niveau de confiance dans les résultats obtenus par la réalisation d'analyses statistiques. L'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons aurait également permis d'identifier la contribution relative des différents paramètres structuraux et de la densité osseuse sur le changement du comportement mécanique de l'os. Une contamination fongique du milieu de culture a forcé l'arrêt de la culture après 14 jours d'incubation. L'allongement de la culture sur une plus longue période aurait probablement permis de détecter des changements plus importants et éventuellement, de confirmer l'influence de la stimulation mécanique sur la production d'adaptations osseuses.

À terme, ce projet doctoral a contribué à l'avancement des connaissances relativement à la caractérisation des adaptations osseuses dans le cadre de culture *ex-vivo* par l'utilisation d'une approche multimodale pour effectuer le suivi des échantillons. Plus précisément, la réalisation de ce projet a mené, en collaboration avec Florian GUILLAUME, étudiant au doctorat à l'École de technologie supérieure à la **conception d'un bioréacteur multifonctionnel**

permettant de générer des adaptations osseuses *ex-vivo* à partir d'échantillons d'os trabéculaire bovin. L'originalité du bioréacteur utilisé a mené au dépôt d'une déclaration d'invention au décanat de la recherche de l'École de technologie. Des compagnies spécialisées dans la vente d'appareil de tests mécaniques pourraient être intéressées à intégrer ce type de bioréacteur à leurs appareils de tests pour la caractérisation mécanique de tissus biologiques ou de matrices dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Des compagnies pharmaceutiques et des laboratoires de recherche œuvrant dans le domaine du génie tissulaire, de la biomécanique et de la biologie moléculaire, pourraient également être intéressés à utiliser ce bioréacteur pour la réalisation de leurs travaux de recherche.

La réalisation de ce projet doctoral a également mené à la **proposition de nouvelles approches**, dont la micro-tomographie à rayons X et la corrélation d'images **pour caractériser les adaptations osseuses produites lors de culture *ex-vivo***. Ces méthodes de mesures, qui se sont révélées être adaptées aux exigences de la culture *ex-vivo*, seront d'une grande utilité pour améliorer le suivi des adaptations osseuses et faire progresser les connaissances relatives au développement du tissu osseux. L'incorporation de ces deux méthodes de mesure à la réalisation d'expérimentation *ex-vivo* s'avère être d'une grande utilité pour accroître la portée de ce type d'expérimentation. La culture *ex-vivo* pourra entre autres être éventuellement utilisée pour étudier de nombreux phénomènes liés au remodelage osseux dont le remodelage en lui-même, l'ostéoporose, le renforcement osseux dû à l'application de mise en charge, l'incidence de fracture, l'ostéointégration, etc. L'acquisition simultanée d'informations structurelles et mécaniques dans un environnement pour lequel les conditions sont davantage contrôlées permettra également d'alimenter les modèles par éléments finis.

CONCLUSION

La culture *ex-vivo* est une méthode expérimentale qui consiste à maintenir en vie, à l'aide d'un bioréacteur, des tissus biologiques en dehors de leur milieu physiologique d'origine. La possibilité de contrôler l'environnement dans lequel évolue le tissu fait en sorte que cette méthode expérimentale peut être privilégiée à la réalisation d'expérimentations sur des sujets vivants pour caractériser le comportement du tissu selon différentes situations.

La caractérisation des changements du tissu osseux subis lors de la culture a été identifiée comme étant un aspect à améliorer dans la mise en place de ce type d'expérimentation. La combinaison de multiples méthodes de mesure pour documenter les changements subis par les échantillons est une approche rarement utilisée, malgré le fait qu'il soit suggéré dans la littérature de considérer plusieurs facteurs pour évaluer la qualité osseuse.

Ce projet doctoral a donc abordé la difficulté de documenter l'évolution d'échantillons osseux au cours d'une culture *ex-vivo*. Il visait notamment à démontrer qu'une approche multimodale peut améliorer le suivi des changements durant la culture. Pour ce faire, un modèle de culture *ex-vivo* a été utilisé pour générer des adaptations osseuses par l'application d'un chargement mécanique. Les adaptations osseuses issues de la culture ont été mesurées par l'utilisation de la corrélation d'images et par l'utilisation de la micro-tomographie à rayons X. Préalablement à l'utilisation de ces méthodes de mesure, la capacité de la micro-tomographie à rayons X à détecter des modifications du tissu, et la possibilité de s'affranchir de l'utilisation d'un motif exogène pour la réalisation de corrélation d'images a été évaluée.

Sur la base d'analyses qualitatives et quantitatives, il a été confirmé que la corrélation d'images et la micro-tomographie à rayons X sont deux méthodes de mesure adaptées aux exigences de la culture *ex-vivo* et qu'elles peuvent être utilisées dans ce contexte. Les résultats obtenus ont démontré que la corrélation d'images est en mesure de quantifier adéquatement le chargement appliqué aux échantillons sans application d'un motif exogène à base de peinture, en raison de la porosité de l'os qui crée des jeux d'ombres perceptibles par le système de mesure. Les

résultats obtenus ont également permis de confirmer la capacité de la micro-tomographie à rayons X à détecter, suite à 14 jours de culture, des adaptations supérieures aux seuils de sensibilité de mesure de la méthode. De plus, l'utilisation de ces deux méthodes de mesure combiné à la réalisation de tests mécaniques lors d'une culture *ex-vivo* a démontré que la complémentarité des méthodes de mesure, et la prise en considération des adaptations locales et globales améliorent l'interprétation des adaptations issues de la culture.

En conclusion, la réalisation de ce projet doctoral a permis **d'appuyer l'hypothèse soutenant que le suivi des adaptations osseuses issues de culture *ex-vivo* peut être amélioré par la combinaison de multiples modalités de mesure**, en raison de la prise en considération simultanée de différents facteurs contribuant à la qualité osseuse. L'utilisation d'une approche multimodale aura pour répercussion d'étendre les champs d'application de l'utilisation de la culture *ex-vivo* et ainsi de faire progresser les connaissances relativement au comportement du tissu osseux. L'utilisation d'une approche multimodale pourrait entre autres être utilisée pour améliorer la compréhension des relations entre les adaptations locales et le comportement global du tissu osseux. La culture *ex-vivo* pourra être utilisée pour étudier de nombreux phénomènes liés au processus de remodelage osseux dont la croissance, la résorption, et l'adaptation du tissu. L'acquisition de nouvelles connaissances pourra éventuellement être transposée au domaine médical pour faciliter la recherche préclinique et le développement de traitements relativement aux maladies osseuses telle que l'ostéoporose et l'ostéointégration d'implants.

RECOMMANDATIONS

Bien que les outils et méthodes proposés aient fait preuve d'un potentiel innovant pour améliorer le suivi des adaptations osseuses, une série de recommandations est proposée pour palier à certaines difficultés et lacunes recensées lors de la réalisation de projet.

Dans un premier, il est suggéré **d'apporter des modifications au prototype du bioréacteur** utilisé afin de faciliter les manipulations lors de la mise en culture, de réduire le risque de contamination, et ainsi de prolonger la période de culture, qui est rapportée comme étant une des principales limites associées à la réalisation de ce projet. Tout d'abord, il est suggéré de modifier le type de réservoir et d'embouts utilisés pour la perfusion du milieu de culture à l'intérieur de l'enceinte de culture. En raison d'un manque d'étanchéité, il est conseillé de remplacer les tubes stériles, utilisés pour contenir le milieu de culture, par des contenants en verre avec bouchons hermétiques (Figure 7-1). L'utilisation de bouchons VapLock[®], qui contiennent des orifices filetés spécifiques pour le raccordement d'embouts et l'ajout de filtre réduirait considérablement le risque de contamination induit par un contact avec l'air ambiant lors du déplacement du matériel à l'extérieur de l'incubateur.



Figure 7-1 Contenant hermétique avec bouchon

Il est également proposé, dans un deuxième temps, de modifier la conception du capot et de son système de fixation pour permettre un meilleur coulisement lors de la stimulation mécanique des échantillons. Tout d'abord, il est suggéré de réduire le nombre de tiges de coulisement à deux au lieu de quatre. L'utilisation de deux tiges positionnées à l'opposée l'une de l'autre s'avèrerait être suffisant pour diriger le déplacement du capot lors de la stimulation mécanique et éviter que l'assemblage soit hyperstatique. Il est également proposé de réduire l'épaisseur du capot et d'éliminer les saillies identifiées à la Figure 7-2. Il est émis comme hypothèse que la dimension actuelle des saillies augmente le risque de contact du capot avec les tiges de coulisement ce qui nuit à son libre coulisement lors de l'application d'un chargement à l'échantillon. L'ajout de paliers lisses à l'intérieur des trous de passage du capot est également proposé pour assurer un meilleur glissement entre les deux composantes.

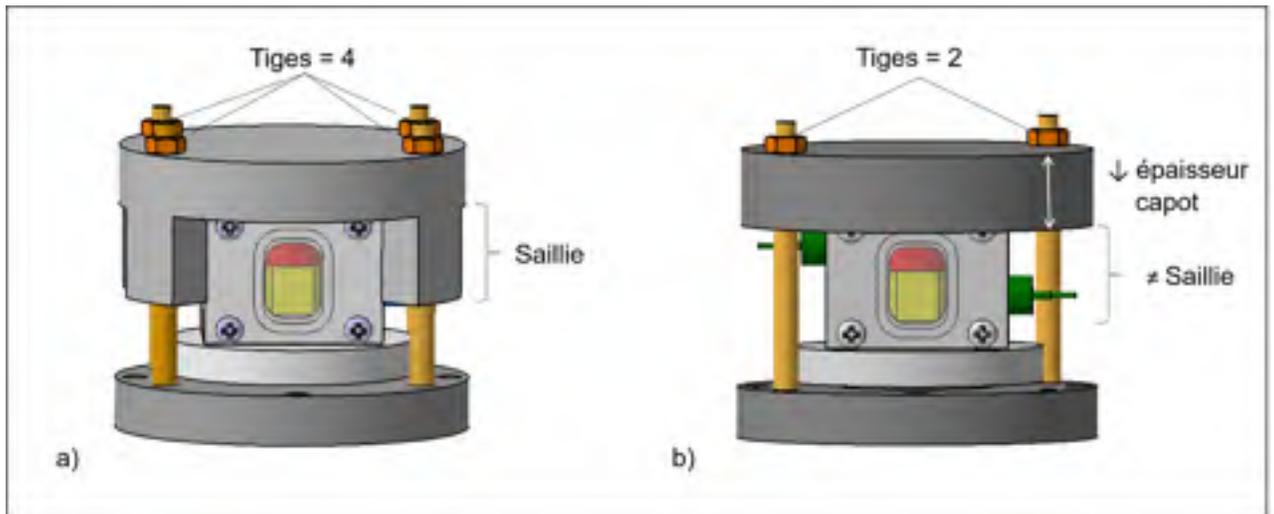


Figure 7-2 Proposition de modification du capot de l'enceinte de culture : a) prototype utilisé dans le cadre de ce projet et b) modifications suggérées

Dans un deuxième temps, il est suggéré **d'apporter des modifications au protocole expérimental de mise en culture des échantillons** afin de prolonger la période de culture au-delà d'une période de 14 jours et d'accroître l'éventualité d'observer des adaptations osseuses issues de l'application d'un chargement mécanique. Tout d'abord, il est suggéré de réduire le nombre de manipulations de l'enceinte de culture durant la période de culture. Le changement de milieu de culture effectué aux trois jours, l'application quotidienne de stimulation mécanique et la caractérisation répétitive des adaptations osseuses sont toutes des étapes du protocole expérimental qui nécessitent la manipulation de l'enceinte de culture et augmentent le risque de contamination. Une diminution de la fréquence du changement du milieu de culture aurait pour conséquence de limiter le risque de contamination par l'intermédiaire de l'opérateur. Le développement d'outils de stimulation intégrés à l'incubateur comme proposé à la Figure 7-3, permettrait de stimuler et de caractériser les adaptations osseuses des échantillons sans avoir à sortir l'enceinte de culture et ainsi limiter le risque de contamination.

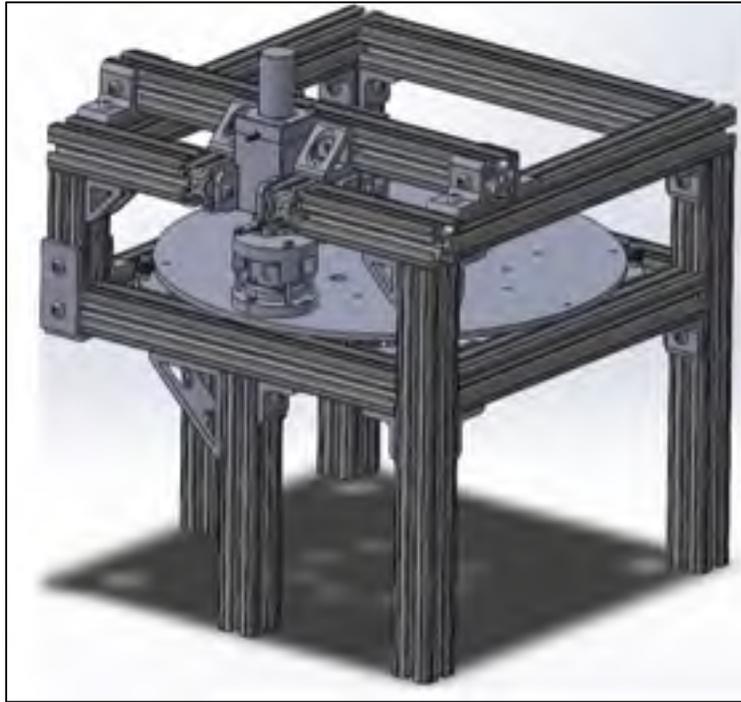


Figure 7-3 Module de stimulation mécanique développé au LIO-HSCM par Nicolas Bibeau, Youcef Hocine et Jeffrey Santiagos pour être utilisé à l'intérieur d'un incubateur

Bien que cette démarche n'ait pas eu à être utilisée dans les études visant à étudier *ex-vivo* l'influence de la stimulation mécanique sur les adaptations osseuses, il est proposé d'enrichir le milieu de culture de cellules osseuses afin d'accroître l'activité cellulaire et l'éventualité d'observer des adaptations osseuses. La culture osseuse *ex vivo* consiste à maintenir en vie du tissu osseux dans un environnement fermé. La période de culture est donc notamment limitée par la durée de vie des cellules osseuses initialement présentes dans le milieu (Marino et al., 2016). Conséquemment, l'apport de cellules osseuses primaires dans le milieu de culture améliorerait le développement d'adaptations sur une période de temps prolongée (Figure 7-4).

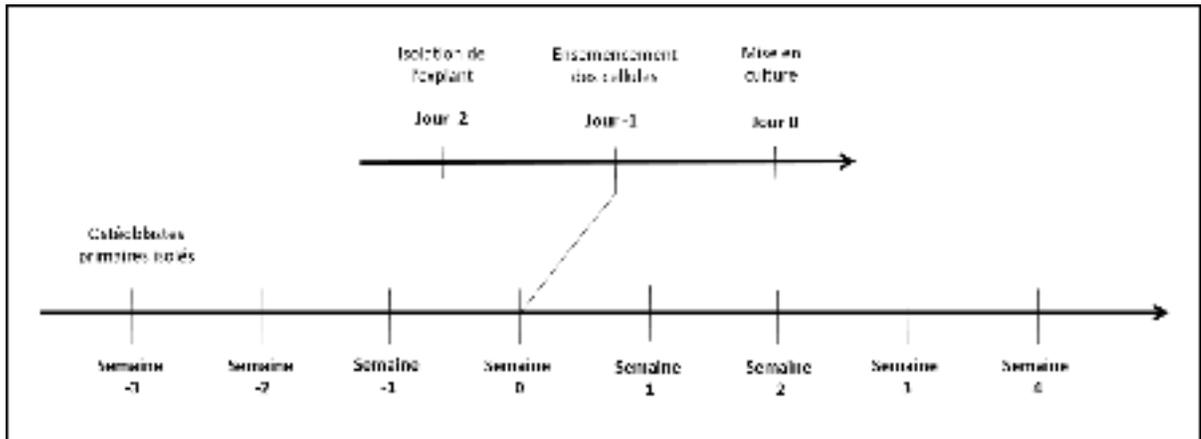


Figure 7-4 Proposition de protocole expérimental visant l'ajout de cellules primaires pour favoriser et améliorer le développement d'adaptations osseuses
Adaptée de Marino et al. (2016)

Enfin, il est suggéré d'ajouter comme modalité de mesure la réalisation d'analyses histologiques qui demeure la méthode de mesure standard pour documenter les changements issus de culture *ex-vivo*. L'analyse du milieu de culture permettrait également la détection de la présence de cellules osseuses et de biomarqueurs impliqués dans le processus de remodelage osseux.

Les dernières recommandations concernent la méthode d'utilisation de la corrélation d'images et la méthode d'analyse de la micro-tomographie à rayons X. Il est suggéré **d'apporter des modifications à l'utilisation ces méthodes de mesure** afin d'améliorer leur capacité à détecter des changements lors de culture *ex-vivo*. Bien qu'il ait été démontré que la micro-tomographie à rayons X possède la capacité de détecter des adaptations osseuses issue de culture *ex-vivo*, il est suggéré, comme proposé par Le Garff et al. (2017), d'éventuellement procéder au recalage des images d'un même échantillon préalablement à l'analyse de son évolution dans le temps. Il a été démontré que la mise en correspondance d'images tend à modifier la mesure des adaptations osseuses et à améliorer la précision des mesures (Lan et al., 2013). L'application de cette méthode aurait pour avantage de localiser les zones où se produisent les adaptations osseuses dues au processus de remodelage osseux et par la même occasion d'établir un lien entre les changements structuraux et le comportement mécanique de l'échantillon déterminé par corrélation d'images.

En ce qui concerne la corrélation d'images, il est suggéré de réaliser une étude visant à évaluer l'influence de la structure de l'os trabéculaire sur la variabilité de la mesure. Bien que la possibilité de s'affranchir de l'utilisation d'un motif exogène pour caractériser le champ de déformations des échantillons d'os trabéculaire bovin ait été démontrée, il se pourrait que l'utilisation de colorant compatible avec la viabilité de l'échantillon soit avantageuse pour rehausser la qualité du patron stochastique à la surface de l'échantillon. Cela permettrait de réduire la variabilité des mesures et de permettre l'utilisation de la corrélation d'images sans motif stochastique exogène sur un plus grand éventail d'échantillons malgré le fait que structure trabéculaire des échantillons puisse différer.

ANNEXE I

QUALITÉ DE SURFACE DES ÉCHANTILLONS

Tableau-A I-1 Tolérance de planéité et angle d'inclinaison des surfaces de coupe d'échantillons d'os trabéculaire bovins

Échantillons	Face	Planéité de surface (μm)	Inclinaison de la surface ($^{\circ}$)
1	1	594	1,13
	2	754	0,91
2	1	670	1,24
	2	636	1,65
3	1	919	3,05
	2	587	1,62
4	1	870	1,98
	2	633	5,18
5	1	831	1,99
	2	749	2,91

ANNEXE II

PREUVE DE SOUMISSION D'ARTICLE

ABME-D-19-00922 - Submission Notification to co-author

Annals of Biomedical Engineering (ABME) em@editorialmanager.com

Lun 2019-09-30 11:23

Dear Ms Levasseur,

We have received the submission entitled: "Detection of Bone Adaptations during Ex Vivo Culture using Micro-Computed Tomography" for possible publication in Annals of Biomedical Engineering, and you are listed as one of the co-authors. The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Yvan Petit who will be able to track the status of the paper through his/her login. If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office Annals of Biomedical Engineering

BIBLIOGRAPHIE

- Abubakar, A. A., Noordin, M. M., Azmi, T. I., Kaka, U., & Loqman, M. Y. (2016). The use of rats and mice as animal models in ex vivo bone growth and development studies. *Bone Joint Res*, 5(12), 610-618. doi: 10.1302/2046-3758.512.bjr-2016-0102.r2
- Adams, J. E. (2009). Quantitative computed tomography. *Eur J Radiol*, 71(3), 415-424. doi: 10.1016/j.ejrad.2009.04.074
- Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., & Mikos, A. G. (2003). Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng*, 9(3), 549-554. doi: 10.1089/107632703322066723
- Birmingham, E., Kreipke, T. C., Dolan, E. B., Coughlin, T. R., Owens, P., McNamara, L. M., . . . McHugh, P. E. (2015). Mechanical stimulation of bone marrow in situ induces bone formation in trabecular explants. *Ann Biomed Eng*, 43(4), 1036-1050. doi: 10.1007/s10439-014-1135-0
- Birmingham, E., Niebur, G. L., McNamara, L. M., & McHugh, P. E. (2016). An Experimental and Computational Investigation of Bone Formation in Mechanically Loaded Trabecular Bone Explants. *Ann Biomed Eng*, 44(4), 1191-1203. doi: 10.1007/s10439-015-1378-4
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Muller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, 25(7), 1468-1486. doi: 10.1002/jbmr.141
- Chan, M. E., Lu, X. L., Huo, B., Baik, A. D., Chiang, V., Guldberg, R. E., . . . Guo, X. E. (2009). A Trabecular Bone Explant Model of Osteocyte-Osteoblast Co-Culture for Bone Mechanobiology. *Cell Mol Bioeng*, 2(3), 405-415. doi: 10.1007/s12195-009-0075-5
- Chappard, C. (2012). [Microarchitecture assessment of human trabecular bone: description of methods]. *Med Sci (Paris)*, 28(12), 1111-1115. doi: 10.1051/medsci/20122812022
- Chen, H., Shoumura, S., Emura, S., & Bunai, Y. (2008). Regional variations of vertebral trabecular bone microstructure with age and gender. *Osteoporos Int*, 19(10), 1473-1483. doi: 10.1007/s00198-008-0593-3
- Cheung, A. M., Adachi, J. D., Hanley, D. A., Kendler, D. L., Davison, K. S., Josse, R., . . . Boyd, S. K. (2013). High-resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of bone strength and structure: a review by the Canadian Bone Strength Working Group. *Curr Osteoporos Rep*, 11(2), 136-146. doi: 10.1007/s11914-013-0140-9

- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-139. doi: 10.2215/cjn.04151206
- Cotterill, P. C., Kostuik, J. P., D'Angelo, G., Fernie, G. R., & Maki, B. E. (1986). An anatomical comparison of the human and bovine thoracolumbar spine. *J Orthop Res*, 4(3), 298-303. doi: 10.1002/jor.1100040306
- Cowin, S. C. (2001). *Bone Mechanics Handbook*. CRC Press LLC.
- Currey, J. D. (2012). The structure and mechanics of bone. *J Mater Sci*, 47, 41-54.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, 61(5), 577-587. doi: 10.1136/jcp.2007.048868
- David, V., Guignandon, A., Martin, A., Malaval, L., Lafage-Proust, M. H., Rattner, A., . . . Vico, L. (2008). Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A*, 14(1), 117-126. doi: 10.1089/ten.a.2007.0051
- Davies, C. M., Jones, D. B., Stoddart, M. J., Koller, K., Smith, E., Archer, C. W., & Richards, R. G. (2006). Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater*, 11, 57-75; discussion 75.
- Donnelly, E. (2011). Methods for assessing bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res*, 469(8), 2128-2138. doi: 10.1007/s11999-010-1702-0
- Dougherty, G. (1996). Quantitative CT in the measurement of bone quantity and bone quality for assessing osteoporosis. *Med Eng Phys*, 18(7), 557-568.
- Endres, S., Kratz, M., Wunsch, S., & Jones, D. B. (2009). Zetos: a culture loading system for trabecular bone. Investigation of different loading signal intensities on bovine bone cylinders. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9(3), 173-183.
- Freddi, A., Olmi, G., & Cristofolini, L. (2015). *Experimental Stress Analysis for Materials and Structure. Stress Analysis Models for Developing Design Methodologies* (Vol. 4). Springer.
- Gong, H., Zhang, M., Qin, L., Lee, K. K., Guo, X., & Shi, S. Q. (2006). Regional variations in microstructural properties of vertebral trabeculae with structural groups. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(1), 24-32.
- Gong, H., Zhang, M., Yeung, H. Y., & Qin, L. (2005). Regional variations in microstructural properties of vertebral trabeculae with aging. *J Bone Miner Metab*, 23(2), 174-180. doi: 10.1007/s00774-004-0557-4

- Goulet, R. W., Goldstein, S. A., Ciarelli, M. J., Kuhn, J. L., Brown, M. B., & Feldkamp, L. A. (1994). The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech*, 27(4), 375-389.
- Guda, T., Labella, C., Chan, R., & Hale, R. (2014). Quality of bone healing: perspectives and assessment techniques. *Wound Repair Regen*, 22 Suppl 1, 39-49. doi: 10.1111/wrr.12167
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, II. (2006). Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 1092, 385-396. doi: 10.1196/annals.1365.035
- Hagenmuller, H., Hitz, M., Merkle, H. P., Meinel, L., & Muller, R. (2010). Design and validation of a novel bioreactor principle to combine online micro-computed tomography monitoring and mechanical loading in bone tissue engineering. *Rev Sci Instrum*, 81(1), 014303. doi: 10.1063/1.3284787
- Huiskes, R., & van Rietbergen, B. (2005). Biomechanics of Bone. Dans L. W. Wilkins (Éd.), *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology* (pp. 720).
- Hulme, P. A., Boyd, S. K., & Ferguson, S. J. (2007). Regional variation in vertebral bone morphology and its contribution to vertebral fracture strength. *Bone*, 41(6), 946-957. doi: 10.1016/j.bone.2007.08.019
- Hussein, A. I., & Morgan, E. F. (2013). The effect of intravertebral heterogeneity in microstructure on vertebral strength and failure patterns. *Osteoporos Int*, 24(3), 979-989. doi: 10.1007/s00198-012-2039-1
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 26(6). doi: 10.1111/ecc.12740
- Keaveny, T. M., Morgan, E. F., Niebur, G. L., & Yeh, O. C. (2001). Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng*, 3, 307-333. doi: 3/1/307 [pii] 10.1146/annurev.bioeng.3.1.307 [doi]
- Lan, S., Luo, S., Huh, B. K., Chandra, A., Altman, A. R., Qin, L., & Liu, X. S. (2013). 3D image registration is critical to ensure accurate detection of longitudinal changes in trabecular bone density, microstructure, and stiffness measurements in rat tibiae by in vivo microcomputed tomography (muCT). *Bone*, 56(1), 83-90. doi: 10.1016/j.bone.2013.05.014
- Langton, C. M., & Njeh, C. F. (2004). *The Physical Measurement of Bone*. Philadelphia: Institute of Physics Publishing.

- Le Garff, E., Mesli, V., Delannoy, Y., Colard, T., De Jonckheere, J., Demondion, X., & Hedouin, V. (2017). The precision of micro-tomography in bone taphonomic experiments and the importance of registration. *Forensic Sci Int*, 273, 161-167. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.02.005
- Levasseur, A., Ploeg, H. L., & Petit, Y. (2012). Comparison of the influences of structural characteristics on bulk mechanical behaviour: experimental study using a bone surrogate. *Med Biol Eng Comput*, 50(1), 61-67. doi: 10.1007/s11517-011-0763-x
- Li, Z. C., Dai, L. Y., Jiang, L. S., & Qiu, S. (2012). Difference in subchondral cancellous bone between postmenopausal women with hip osteoarthritis and osteoporotic fracture: implication for fatigue microdamage, bone microarchitecture, and biomechanical properties. *Arthritis Rheum*, 64(12), 3955-3962. doi: 10.1002/art.34670
- Link, T. M., & Lang, T. F. (2014). Axial QCT: clinical applications and new developments. *J Clin Densitom*, 17(4), 438-448. doi: 10.1016/j.jocd.2014.04.119
- Liu, L., & Morgan, E. F. (2007). Accuracy and precision of digital volume correlation in quantifying displacements and strains in trabecular bone. *J Biomech*, 40(15), 3516-3520. doi: 10.1016/j.jbiomech.2007.04.019
- Lochmuller, E. M., Poschl, K., Wurstlin, L., Matsuura, M., Muller, R., Link, T. M., & Eckstein, F. (2008). Does thoracic or lumbar spine bone architecture predict vertebral failure strength more accurately than density? *Osteoporos Int*, 19(4), 537-545. doi: 10.1007/s00198-007-0478-x
- Marino, S., Staines, K. A., Brown, G., Howard-Jones, R. A., & Adamczyk, M. (2016). Models of ex vivo explant cultures: applications in bone research. *Bonekey Rep*, 5, 818. doi: 10.1038/bonekey.2016.49
- Matsuo, K., & Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), 201-209. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027
- McDonnell, P., McHugh, P. E., & O'Mahoney, D. (2007). Vertebral osteoporosis and trabecular bone quality. *Ann Biomed Eng*, 35(2), 170-189. doi: 10.1007/s10439-006-9239-9
- Meyer, L. A., Johnson, M. G., Cullen, D. M., Vivanco, J. F., Blank, R. D., Ploeg, H. L., & Smith, E. L. (2016). Combined exposure to big endothelin-1 and mechanical loading in bovine sternal cores promotes osteogenesis. *Bone*, 85, 115-122. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.001
- Morgan, E. F., Mason, Z. D., Chien, K. B., Pfeiffer, A. J., Barnes, G. L., Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2009). Micro-computed tomography assessment of fracture healing:

- relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*, 44(2), 335-344. doi: S8756-3282(08)00819-3 [pii]
10.1016/j.bone.2008.10.039 [doi]
- Mow, V. C., Ratcliffe, A., & Woo, S. L.-Y. (1990). *Biomechanics of Diarthrodial Joints* (Vol. II). New York: Springer-Verlag.
- Mulder, L., Koolstra, J. H., & Van Eijden, T. M. (2004). Accuracy of microCT in the quantitative determination of the degree and distribution of mineralization in developing bone. *Acta Radiol*, 45(7), 769-777.
- Nagele, E., Kuhn, V., Vogt, H., Link, T. M., Muller, R., Lochmuller, E. M., & Eckstein, F. (2004). Technical considerations for microstructural analysis of human trabecular bone from specimens excised from various skeletal sites. *Calcif Tissue Int*, 75(1), 15-22. doi: 10.1007/s00223-004-0151-8
- Njeh, C. F., & Hans, D. (2004). *The physical measurement of bone*. Institute of physics publishing.
- O'Neill, T., Lunt, M., Silman, A., Felsenbert, D., Benevolenskaya, L., Bhalla, A., . . . Reeve, J. (2002). The relationship between bone density and incident vertebral fracture in men and women. *J Bone Miner Res*, 17(12), 2214-2221. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.12.2214
- Palanca, M., Tozzi, G., & Cristofolini, L. (2016). The use of digital image correlation in the biomechanical area: a review. *INternatioanl Bimechanics*, 3(1), 1-21.
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., . . . Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2(6), 595-610. doi: 10.1002/jbmr.5650020617
- Pelletti, G., Cecchetto, G., Viero, A., Fais, P., Weber, M., Miotto, D., . . . Giraud, C. (2017). Accuracy, precision and inter-rater reliability of micro-CT analysis of false starts on bones. A preliminary validation study. *Leg Med (Tokyo)*, 29, 38-43. doi: 10.1016/j.legalmed.2017.10.003
- Perilli, E., Baleani, M., Ohman, C., Baruffaldi, F., & Viceconti, M. (2007). Structural parameters and mechanical strength of cancellous bone in the femoral head in osteoarthritis do not depend on age. *Bone*, 41(5), 760-768. doi: 10.1016/j.bone.2007.07.014
- Postnov, A. A., Vinogradov, A. V., Van Dyck, D., Saveliev, S. V., & De Clerck, N. M. (2003). Quantitative analysis of bone mineral content by x-ray microtomography. *Physiol Meas*, 24(1), 165-178.

- Rahman, S., Gulati, K., Kogawa, M., Atkins, G. J., Pivonka, P., Findlay, D. M., & Losic, D. (2016). Drug diffusion, integration, and stability of nanoengineered drug-releasing implants in bone ex-vivo. *J Biomed Mater Res A*, *104*(3), 714-725. doi: 10.1002/jbm.a.35595
- Sheng, S. R., Wang, X. Y., Xu, H. Z., Zhu, G. Q., & Zhou, Y. F. (2010). Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. *Eur Spine J*, *19*(1), 46-56. doi: 10.1007/s00586-009-1192-5
- Singer, K., Edmondston, S., Day, R., Breidahl, P., & Price, R. (1995). Prediction of thoracic and lumbar vertebral body compressive strength: correlations with bone mineral density and vertebral region. *Bone*, *17*(2), 167-174.
- Sommerfeldt, D. W., & Rubin, C. T. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, *10 Suppl 2*, S86-95. doi: 10.1007/s005860100283
- Steiniche, T. (1995). Bone histomorphometry in the pathophysiological evaluation of primary and secondary osteoporosis and various treatment modalities. *APMIS Suppl*, *51*, 1-44.
- Sutton, M. A., Orteu, J.-J., & Schreier, H. W. (2009). *Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measurements. Basic Concepts, Theory and Applications*.
- Tamada, T., Sone, T., Jo, Y., Imai, S., Kajihara, Y., & Fukunaga, M. (2005). Three-dimensional trabecular bone architecture of the lumbar spine in bone metastasis from prostate cancer: comparison with degenerative sclerosis. *Skeletal Radiol*, *34*(3), 149-155. doi: 10.1007/s00256-004-0855-x
- Teo, J. C., Si-Hoe, K. M., Keh, J. E., & Teoh, S. H. (2006). Relationship between CT intensity, micro-architecture and mechanical properties of porcine vertebral cancellous bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, *21*(3), 235-244. doi: 10.1016/j.clinbiomech.2005.11.001
- Turner, P. J. (2009). Atomic force microscopy and indentation force measurement of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, *1*(6), 624-649. doi: 10.1002/wnan.56
- Vivanco, J., Garcia, S., Ploeg, H. L., Alvarez, G., Cullen, D., & Smith, E. L. (2013). Apparent elastic modulus of ex vivo trabecular bovine bone increases with dynamic loading. *Proc Inst Mech Eng H*, *227*(8), 904-912. doi: 10.1177/0954411913486855
- Wegrzyn, J., Roux, J. P., Arlot, M. E., Boutroy, S., Vilayphiou, N., Guyen, O., . . . Bouxsein, M. L. (2010). Role of trabecular microarchitecture and its heterogeneity parameters in the mechanical behavior of ex vivo human L3 vertebrae. *J Bone Miner Res*, *25*(11), 2324-2331. doi: 10.1002/jbmr.164

- Yerramshetty, J., Kim, D. G., & 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*(9), 094501. doi: 10.1115/1.3148473 [doi]
- Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Teo, E. Y., Khoon Chong, M. S., Shin, C. W., Tien, F. T., . . . Chan, J. K. (2010). A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials*, *31*(33), 8684-8695. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.097
- Zong ming, W., Jian yu, L., Rui xin, L., Hao, L., Yong, G., Lu, L., . . . Xi zheng, Z. (2013). Bone formation in rabbit cancellous bone explant culture model is enhanced by mechanical load. *Biomed Eng Online*, *12*, 35. doi: 10.1186/1475-925x-12-35
- Zysset, P. K. (2009). Indentation of bone tissue: a short review. *Osteoporos Int*, *20*(6), 1049-1055. doi: 10.1007/s00198-009-0854-9