

# Caractérisation tissulaire de l'os cortical pédiatrique

## 1 Introduction

Comme nous venons de le voir dans le Chapitre I, l'os cortical humain est composé d'une phase minérale (cristaux d'apatite), d'une phase organique (collagène), d'eau et de vide. Ces composants s'organisent en une architecture multi-échelles poreuse qui permet à l'os de combiner légèreté et résistance. Durant la croissance, le squelette doit adapter sa taille, sa forme et ses propriétés matérielles aux sollicitations subies.

Chez l'adulte, de nombreuses études ont été réalisées pour étudier la qualité du tissu osseux. Des études ont porté sur la densité et la qualité du minéral [9, 22, 56, 94, 137], la forme, la taille et la composition des cristaux [8, 53, 139], la maturité du collagène [51, 59, 120] et sur la porosité intracorticale [7, 11, 91, 93, 121].

Pour l'os en croissance, quelques études ont eu pour but d'établir des données de références pour le contenu minéral osseux (BMC) et la densité minérale osseuse (BMD) via la méthode DXA [78, 143]. Ces données sont d'importance car il a été mis en évidence que la densité minérale osseuse acquise pendant la croissance était un déterminant majeur de l'ostéoporose et du risque de fracture chez les personnes âgées [67, 88].

Des études ont montré que le collagène et les molécules de pontage semblent être liés au comportement plastique (ductilité et ténacité) de l'os [40, 133, 135, 138, 149]. Doser ses molécules de pontage par biochimie pourrait apporter une première explication au comportement plastique de l'os en croissance que l'on suspecte via les fractures pédiatriques typiques (fracture en bois vert) [19].

La porosité corticale est elle-aussi apparue comme un prédictif de la résistance osseuse [91, 93, 121] et du risque de fracture [7, 11]. Elle provient majoritairement des canaux de Havers et des canaux de Volkmann. Bien que ces canaux soient reconnus comme étant des pores dans les images en coupes [31, 127], ils forment un réseau tridimensionnel de canaux inter-connectés [31, 34].

Des études récentes suggèrent que la porosité atteinte pendant la croissance pourrait influencer le remodelage intracortical et la perte de structure plus tard dans la vie [11, 21, 26]. Des études histomorphométriques ont mis en évidence la diminution de la porosité intracorticale pendant la croissance [108, 122–124]. Mais la variation de la porosité n'est pas

suffisante pour évaluer l'importance de la microstructure sur les propriétés de l'os. Il existe une contribution évidente des changements structurels dans le réseau de pores : la taille des pores, leur forme et leur distribution [34]. Cependant, ces paramètres, en particulier pour l'os en croissance, sont encore peu connus.

Le but de cette étude est donc d'explorer la qualité du tissu osseux pédiatrique et de le comparer aux propriétés obtenues pour de l'os mature. La composition du tissu, sa qualité et son organisation spatiale ont été évaluées par microtomographie RX, microradiographie, FTIRM et analyse biochimique.

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons d'os cortical pédiatrique proviennent de chirurgies correctrices effectuées par le Pr Launay dans le service de chirurgie orthopédique de l'hôpital de La Timone (Marseille, France). Tous les patients étaient mobiles avant l'opération et n'ont reçu aucun traitement connu pour affecter le remodelage osseux.

Pour cette étude, 29 échantillons de fibula et 7 échantillons de fémur ont été recueillis chez 33 enfants âgés de 1 à 18 ans. Du fait de la rareté et de la taille des échantillons prélevés, tous les échantillons n'ont pas pu être testés sur l'ensemble du protocole détaillé à la Figure I.16 (page 36). La répartition des échantillons pour chaque essai est détaillée sur la Figure II.1. Avant les essais, les échantillons ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , enveloppés dans une gaze imbibée de PBS (Phosphate Buffer Saline).

Les échantillons d'os cortical adulte proviennent de 17 fibulae de donneurs âgés de 50 à 95 ans et servent de référence (Figure II.1).

Les échantillons ont été décongelés à température ambiante. Pour la microCT (puis par la suite pour les tests mécaniques : compression et caractérisation ultrasonore), 1 à 2 éprouvettes cubiques d'environ  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  ont été découpées dans l'échantillon d'os cortical avec une scie diamantée à vitesse lente (Buehler Isomet 4000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). La découpe a été effectuée de façon à conserver les faces dans les axes de sollicitations principaux : axial, radial et tangentiel (Figure II.2).

A la fin de chaque découpe, les dimensions des éprouvettes sont mesurées grâce à un pied à coulisse digital (Absolute Digimatic solaire, Mitutoyo, incertitude élargie  $U = 0,03 \text{ mm}$ ) et la masse volumique grâce à une balance de précision (Ohaus Voyager Pro) équipé d'un kit de détermination de la densité.

La découpe a été un grand défi du fait de la taille initiale des échantillons d'os récupérés : déchets chirurgicaux de moins de 1 cm selon l'axe longitudinal, et 2 à 3 mm selon l'axe radial (épaisseur de la corticale). Afin de réaliser des éprouvettes cubiques, ayant des faces parallèles 2 à 2, nous avons développé un nouveau support d'échantillon adaptable à la scie diamantée (Figure II.3).

Pour le dosage des molécules de pontage par analyse biochimique, il est nécessaire d'avoir environ 1 g d'os cortical. Les chutes des coupes des cubes ont donc été récupérées pour cette analyse. Le protocole de préparation est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes de ce chapitre 2.4 (page 44).

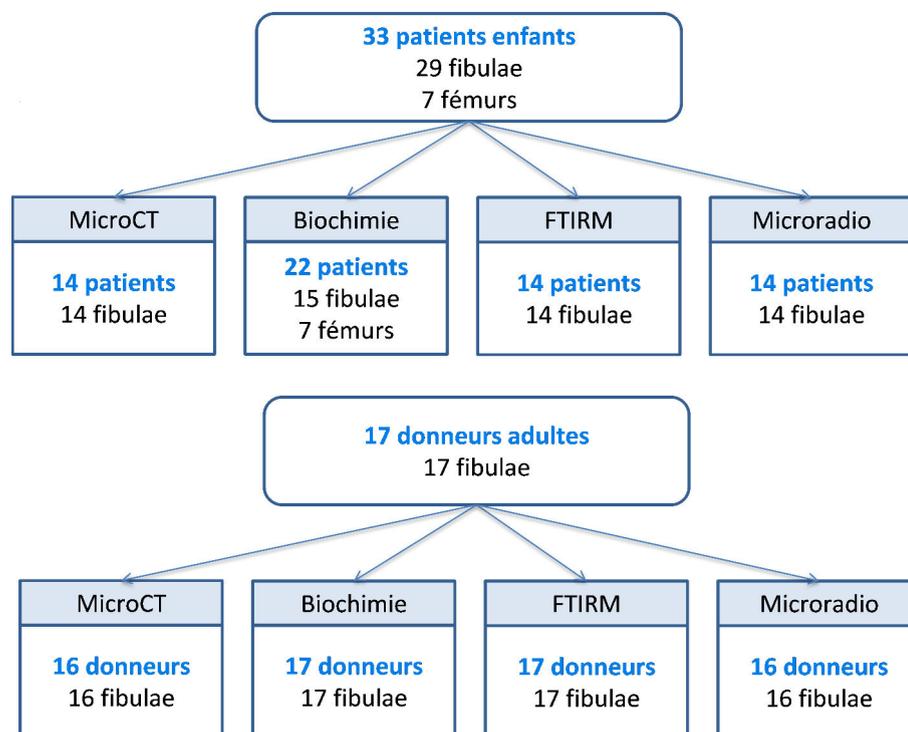


FIGURE II.1 – Répartition des échantillons suivant les essais.

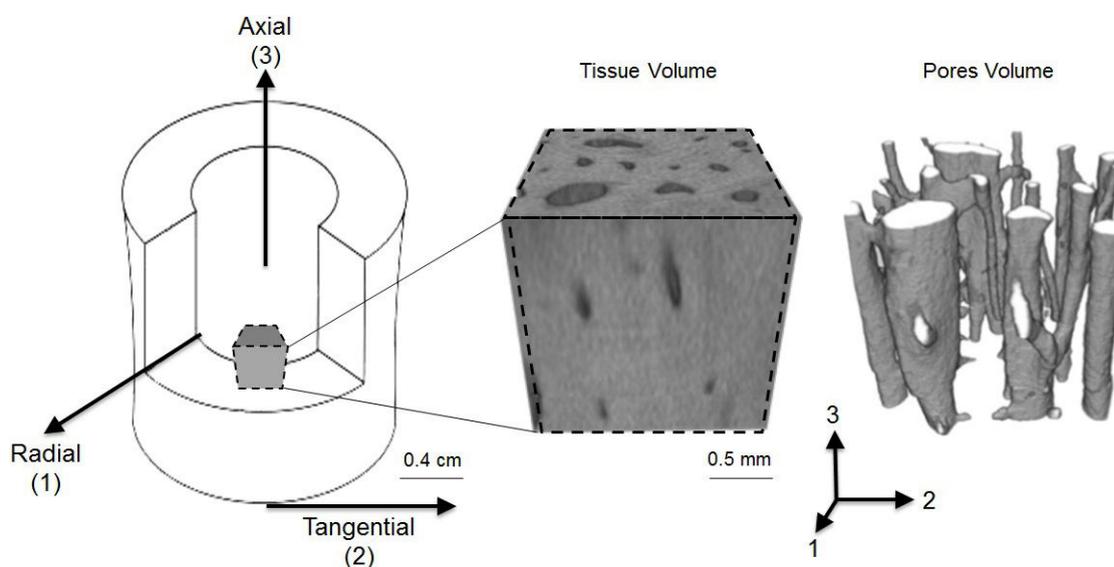


FIGURE II.2 – Découpe d'échantillon d'os en vue de l'évaluation de l'architecture du réseau poreux. Les axes principaux de l'os ont été conservés : radial (1), tangential (2) et axial (3).

Enfin, pour la microradiographie et l'analyse par FTIRM, les échantillons ont été imprégnés dans une résine MMA et découpés en section de 100  $\mu\text{m}$  (microradiographie) et 2  $\mu\text{m}$  (FTIRM) selon le protocole décrit page 37.

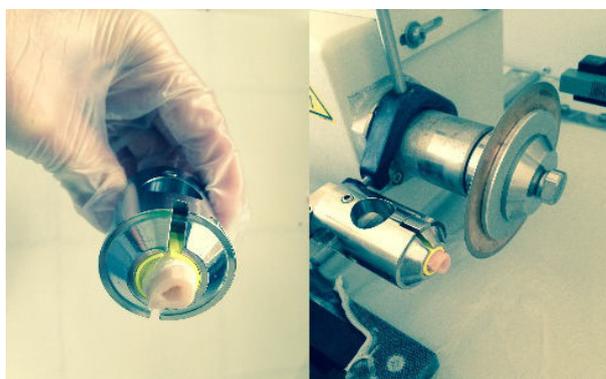


FIGURE II.3 – Schéma du nouveau support d'échantillon pour la découpe.

## 2.2 Microtomographie

Les acquisitions tomographiques et microradiographiques ont été réalisées avec l'aide du Dr Yohann Bala et Dr Hélène Follet au sein de l'unité Inserm 1033   Lyon. Les analyses morphométriques ont été réalisées selon des protocoles de l'unité Inserm de Lyon mis en place par le Dr Yohann Bala.

Pour ces essais, nous avons test e (Figure II.1, page 41) :

- 14 fibulae de 14 patients enfants. Age moyen :  $13 \pm 4$  ans (6-18 ans) ;
- 16 fibulae de 16 patients adultes. Age moyen :  $75 \pm 13$  ans (50-95 ans).

Les tests sont effectu es sur des os bruts d ecoup es en cubes de 2 mm de côté (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

### 2.2.1 Acquisition des images

Pour chaque échantillon cubique, les acquisitions des coupes sont réalisées avec un microtomographe (Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium) sur des échantillons immerg es dans de l'eau distillée dans un tube en plastique de diamètre intérieur de 6 mm et maintenu en place grâce à une gaze. L'axe longitudinal a été align e à l'axe de rotation du porte-échantillon.

Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

- Taille des voxels : 8,1  $\mu\text{m}$  isotrope
- Champ de vue : 1024 x 1024 pixels
- Source des rayons X : 50 kV - 800  $\mu\text{A}$
- Temps d'exposition : 4 s
- Rotation de 360  avec un pas de 0,6 
- Moyenne de 2 images
- Filtre aluminium de 0,5 mm

Chaque coupe est une image 2D enregistrée en format TIFF, initialement en 16 bits ( $2^{16}$  niveau de gris) rapport e à 8 bits (255 niveaux de gris) et dont les niveaux de gris s'échelonnent de 0 (noir)   255 (blanc). Pour chaque cube, une pile de 210 coupes a été reconstruite avec le logiciel 3D d'analyse d'image Nrecon (NRecon Software, V 1.6.9, Skyscan NV, Kontich, Belgium).

### 2.2.2 Analyse morphométrique

De cette pile d'images reconstruites, les volumes d'intérêt ont été sélectionnés en utilisant une méthode semi-automatique (CTAnalyser Software V 1.14.4, Skyscan NV, Kontich, Belgium). Pour chaque échantillon, les frontières extérieures ont été délimitées par l'opérateur, puis interpolées automatiquement sur l'axe longitudinal définissant le volume d'intérêt (VOI).

Dans le volume de tissu (TV, en  $\text{mm}^3$ ), la porosité (volume de vide) a été segmenté sous forme de solide et l'os minéralisé comme un arrière-plan en utilisant le seuillage global. Les variables morphométriques suivantes ont été calculées :

- la fraction volumique de pores ou porosité ( $\text{Po.V}/\text{TV}$ , %);
- le rapport entre la surface et le volume de pores ( $\text{Po.S}/\text{Po.V}$ ,  $\text{mm}^{-1}$ );
- le diamètre de pore ( $\text{Po.Dm}$ ,  $\mu\text{m}$ ), correspondant au diamètre moyen des pores;
- la séparation des pores ( $\text{Po.Sp}$ ,  $\mu\text{m}$ ), correspondant à la séparation moyenne entre les pores;
- le nombre de pores ( $\text{Po.N}$ ,  $\text{mm}^{-1}$ ), calculé comme  $\text{Po.N} = \frac{1}{\text{Po.Sp} + \text{Po.Dm}}$ ;
- la connectivité ( $\text{ConnD}$ ,  $\text{mm}^{-3}$ ), évaluée par la caractéristique d'Euler selon la méthode décrite par Odgaard and Linde [99] et normalisée par le TV;
- le degré d'anisotropie (DA, sans unité), calculé pour évaluer le motif d'alignement des pores à un axe préférentiel, 0 correspondant à l'isotropie totale et une valeur supérieure à 1 décrivant une augmentation de l'anisotropie de la structure;

La séparation et le diamètre des pores ont été calculés à l'aide d'un algorithme d'ajustement sphérique (sphere fitting algorithm) [69, 131]. Comme un indice d'hétérogénéité dans la distribution intra-échantillon du diamètre et de la séparation des pores, l'écart type de ces deux paramètres ( $\text{Po.Dm}$  et  $\text{Po.Sp}$ ) sont reportées comme  $\text{Po.Dm.SD}$  et  $\text{Po.Sp.SD}$ , toutes deux exprimés en  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.3 Analyse de la densité minérale du tissu osseux

Deux fantômes de concentration 0,25 et 0,75  $\text{gHA}/\text{cm}^3$  ont été imagés en même temps que les échantillons. Une relation linéaire entre le niveau de gris et la densité minérale a été déduite de l'analyse des deux fantômes. La densité minérale du tissu ou TMD (en  $\text{g cm}^{-3}$ ) et la distribution de cette densité ou TMD.SD (en  $\text{g cm}^{-3}$ ) de chaque échantillon a été calculée à partir de son niveau de gris et de la relation linéaire trouvée précédemment.

## 2.3 Microradiographie

Pour ces essais, nous avons testé (Figure II.1, page 41) :

- 14 fibulae de 14 patients enfants. Age moyen :  $11 \pm 5$  ans (4-18 ans);
- 16 fibulae de 16 patients adultes. Age moyen :  $75 \pm 13$  ans (50-95 ans).

Les tests sont effectués sur des sections d'os inclus en résine (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

Les échantillons d'os ont été inclus dans une résine de dureté équivalente à celle de l'os, puis coupés en section de  $150 \mu\text{m}$  d'épaisseur en utilisant une scie à fil diamanté (Escil, Chassieu, France). Ces coupes ont été amincies à  $100 \pm 1 \mu\text{m}$  d'épaisseur, puis polies grâce à une suspension d'alumine à  $1 \mu\text{m}$ . L'épaisseur des coupes est mesurée avec un comparateur d'épaisseur micrométrique (Compac, Genève, Suisse;  $1 \mu\text{m}$  de précision).

La microradiographie a été effectuée grâce à une source de rayons X L9421-02 (Microfocus Hammamatsu X-ray system) et un détecteur digital numérique (Photonic science CCD camera FDI VHR 11 M; Zone active : 36 x 24 mm; Scintillateur : Gd2O2S :Tb; Filtre en aluminium de 12  $\mu\text{m}$ ), suivant le protocole validé par Montagner et al. [97].

L'aluminium a été choisi comme étalon pour son faible numéro atomique, proche de celui de l'apatite osseuse. L'étalon est constitué de 8 marches dont l'épaisseur varie de 12 à 96  $\mu\text{m}$  par pas de 12  $\mu\text{m}$  (Strems Chemical Ltd, Strasbourg, France).

Les valeurs d'absorption de l'étalon d'aluminium sont ajustées pour obtenir une courbe de calibration de type logarithmique reliant les niveaux de gris à la valeur correspondante du DMB de la forme :

$$DMB = a \ln(NG) + b$$

équation dans laquelle NG est le niveau de gris correspondant au coefficient d'absorption du tissu osseux dans l'image microradiographique considérée, a et b sont dans des constantes adimensionnelles.

L'étalon et l'échantillon sont microradiographiés avec un temps d'exposition de 7 sec par image et chaque image est une moyenne de 5 images : le temps d'exposition total pour une image est donc de 35 sec. Nous utilisons un fort grossissement, plusieurs zones sont donc nécessaires pour reconstruire l'échantillon complet. Le calcul de la DMB se fait grâce à un programme MatLab développé au sein de l'unité Inserm 1033 à Lyon. Pour chaque échantillon, 20 régions d'intérêts (ROI) ont été choisies pour faire les mesures : 10 dans les ostéons et 10 dans l'os interstitiel.

## 2.4 Dosage des molécules de pontage par HPLC

Le dosage du collagène et des molécules de pontage enzymatiques ont été effectués par technique HPLC selon des protocoles de l'unité Inserm 1033 de Lyon [59]. Les dosages présentés ont été réalisés dans cette unité sous la direction du Dr Evelyne Gineyts.

Pour ces essais, nous avons testé (Figure II.1, page 41) :

- 15 fibulae et 7 fémurs de 22 patients enfants. Age moyen :  $10 \pm 6$  ans (1-18 ans) ;
- 17 fibulae de 17 patients adultes. Age moyen :  $76 \pm 13$  ans (50-95 ans).

Les tests sont effectués sur des os bruts (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

### 2.4.1 Principe du dosage par HPLC

La chromatographie liquide haute performance est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Les constituants du mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile. Par exemple, si un composé B a une grande affinité pour la phase stationnaire et un composé A une grande affinité pour la phase mobile, le composé A aura tendance à être élué plus rapidement. Son temps de rétention sera plus petit que le temps de rétention de B.

La phase stationnaire est une phase apolaire composée de petites particules de silice greffées avec des chaînes alkyles à 18 atomes de carbone.

La phase mobile est un couple phase aqueuse/phase organique composée d'eau et d'acétonitrile. Cette phase se déplace à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte<sup>1</sup> avec elle.

---

1. Analyte : Composé que l'on souhaite analyser

L'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

Le chromatogramme est le graphique d'une fonction de la concentration de l'analyte en fonction du temps d'élution (ou temps de rétention).

#### 2.4.2 Méthodologie d'extraction du collagène : préparation d'une poudre d'os déminéralisé et déshydraté

Les étapes de préparation de la poudre d'os déminéralisé et déshydraté sont les suivantes :

- **Broyage** au cryobroyeur (Spex Industries, Metuchen, USA), appareil utilisant une technique de pilonnage par une pièce métallique dans un milieu refroidi par de l'azote liquide.
- **Dégraissage** du broyat dans une solution de Chloroforme/Méthanol (50 :50)
- **Lavage** à l'eau désionisée suivi d'une centrifugation. Cette étape est répétée trois fois.
- **Déminéralisation** dans une solution contenant : EDTA (0,5M) + Tris (0,005M) + inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostic<sup>®</sup>) + pepstatine (Sigma<sup>®</sup>). Le pH de la solution est contrôlé à 7,5.
- **Agitation** pendant 5 jours à 4°C
- **Rinçage** à l'eau désionisée. Cette étape est répétée trois fois.
- **Lyophilisation**

Pour l'ensemble des dosages, il est nécessaire d'avoir au moins 1 g d'os cortical.

#### 2.4.3 Dosage de la quantité d'hydroxyproline et des molécules de pontage par HPLC

Le contenu en molécules de pontage est rapporté au contenu en collagène d'un même échantillon osseux. La quantité de collagène est estimée à partir de sa quantité d'hydroxyproline (OHP). Les molécules de pontages DHLNL, HLNL, PYD et DPD ainsi que l'OHP sont dosées par HPLC à partir des échantillons d'os préalablement hydrolysés par de l'acide chlorhydrique (HCL).

##### 2.4.3.1 Préparation des hydrolysats d'os

Pour l'ensemble des dosages, nous prélevons 20 mg de poudre d'os. Avant l'hydrolyse, les molécules de pontages immatures sont stabilisées par réduction au borohydrure de sodium ( $NaBH_4$ ) : 1 mg de  $NaBH_4$  dilué dans 2 mL de PBS est ajouté au 20mg de poudre d'os déminéralisé et laissé en contact pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après réaction les échantillons d'os sont rincés à l'eau et hydrolysés dans 3 mL d'*HCL* 6N pendant 20 heures à 110°C.

##### 2.4.3.2 Dosage par HPLC de l'hydroxyproline

Le contenu en collagène des hydrolysats osseux est déterminé par dosage HPLC de l'OHP (BioRad). Ce dosage comprend plusieurs étapes (cf. Figure II.4). L'hydrolysats osseux additionné du standard interne est dans un premier temps mélangé aux réactifs 1 et 2 afin de stabiliser le pH de l'échantillon entre 8,5-9. Puis l'OHP est couplé à un composé coloré (réactifs A et B) pour la rendre détectable par absorbance UV à 471 nm. L'OHP ainsi dérivée est séparée sur une colonne en phase inverse, détectée par spectrophotométrie à 471 nm et quantifiée à l'aide d'un étalon externe d'OHP et du standard interne. Le contenu

en collagène, exprimé en mol, est calculé en assumant que 1 mol de collagène contient 300 nmol d'OHP [134].

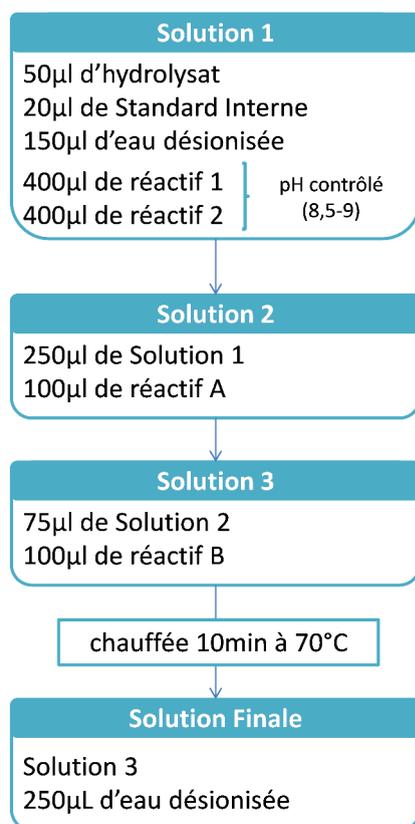


FIGURE II.4 – Protocole de préparation avant dosage par HPLC.

#### 2.4.3.3 Préparation de la solution pour le dosage des molécules de pontage

Un solution est préparée à partir de 500µL d'hydrolysate, de 500 µL de Standard Interne (SI= pyridinoline acétylée dilué à 1 :20 dans 90%  $CH_3COOH$ ) et 4 mL d'acétonitrile. La solution finale a un rapport 8 :1 :1 (acétonitrile / SI / hydrolysate). On procède ensuite à une extraction en phase solide (SPE : *Solid phase extraction*) sur une colonne de cellulose (Chromabond<sup>®</sup> Crosslink). Les colonnes sont équilibrées dans une solution de lavage (Solution diluée 8 :1 :1 acétonitrile/SI/eau). Puis chaque échantillon est passé dans une colonne. Les molécules de pontages se fixent sur la cellulose. L'élimination des contaminants se fait par un lavage des colonnes (solution de lavage précédemment utilisée). On procède enfin à une élution des molécules de pontages avec une solution aqueuse contenant 1% d'acide heptafluorobutyrique (HFBA) (Figure II.5). Les échantillons sont ensuite injectés sur la colonne HPLC en phase inverse.

#### 2.4.3.4 Dosage par HPLC des molécules de pontages enzymatiques

Les molécules de pontage sont séparées sur une colonne HPLC en phase inverse Atlantis Atlantis<sup>®</sup> T3 (3 µm, 4.6x20 mm, Waters Corp., Milford, MA, USA) par un gradient d'acétonitrile et détectées en sortie de colonne par spectrométrie de masse. Un étalon externe contenant des quantités connues de DHLNL, HLNL, PYD et DPD est utilisé pour la

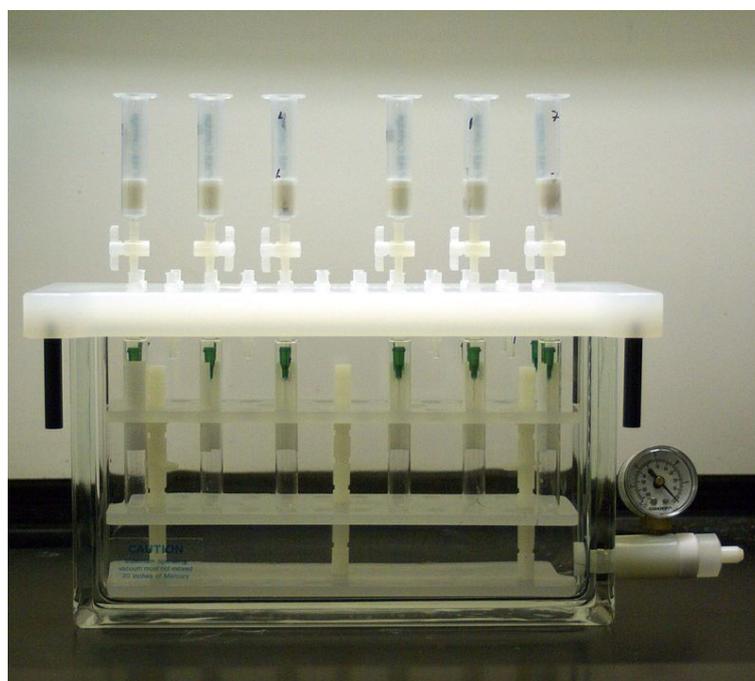


FIGURE II.5 – Un manifold d'extraction : les cartouches sont branchées sur une chambre à vide, les différents liquides y circulent par aspiration à l'aide d'une pompe à vide avant d'être recueillis [59].

calibration du dosage. Les quantités de molécules de pontages sont apportées à la quantité de collagène et exprimées en mmol/mol de collagène.

#### 2.4.4 Evaluation de la quantité de collagène dénaturé selon l'âge, méthode de digestion par alphachymotrypsine

Nous voulons observer s'il existe une différence dans la proportion de collagène dénaturé selon l'âge. Nous avons regardé la susceptibilité du collagène à la digestion par une enzyme : l'alphachymotrypsine. Après digestion des échantillons osseux par l'alphachymotrypsine, l'OHP est mesuré dans le culot insoluble (collagène non dénaturé) et dans le surnageant (collagène dénaturé). Les résultats sont exprimés par le rapport des deux formes de collagène.

##### 2.4.4.1 Préparation de l'hydrolysate pour dosage OHP après digestion à alphachymotrypsine

- Préparation de la solution d'alphachimiotrypsine de concentration 1mg/mL (diluée au PBS) à pH ajusté à 7,7 ;
- Digestion : mélange de 10 mg de poudre d'os déminéralisé et de 500  $\mu$ L de solution d'alphachymotrypsine mis une nuit sous agitation à 37°C ;
- Centrifugation et séparation culot/surnageant ;
- Hydrolyse du surnageant pendant 20 h à 110°C : 200 $\mu$ L de surnageant et 200 $\mu$ L d'HCl 12M (Concentration finale 6M) ;
- Hydrolyse du culot pendant 20 h à 110°C : tout le culot récupéré et on ajoute 1 mL d'HCl 6M.

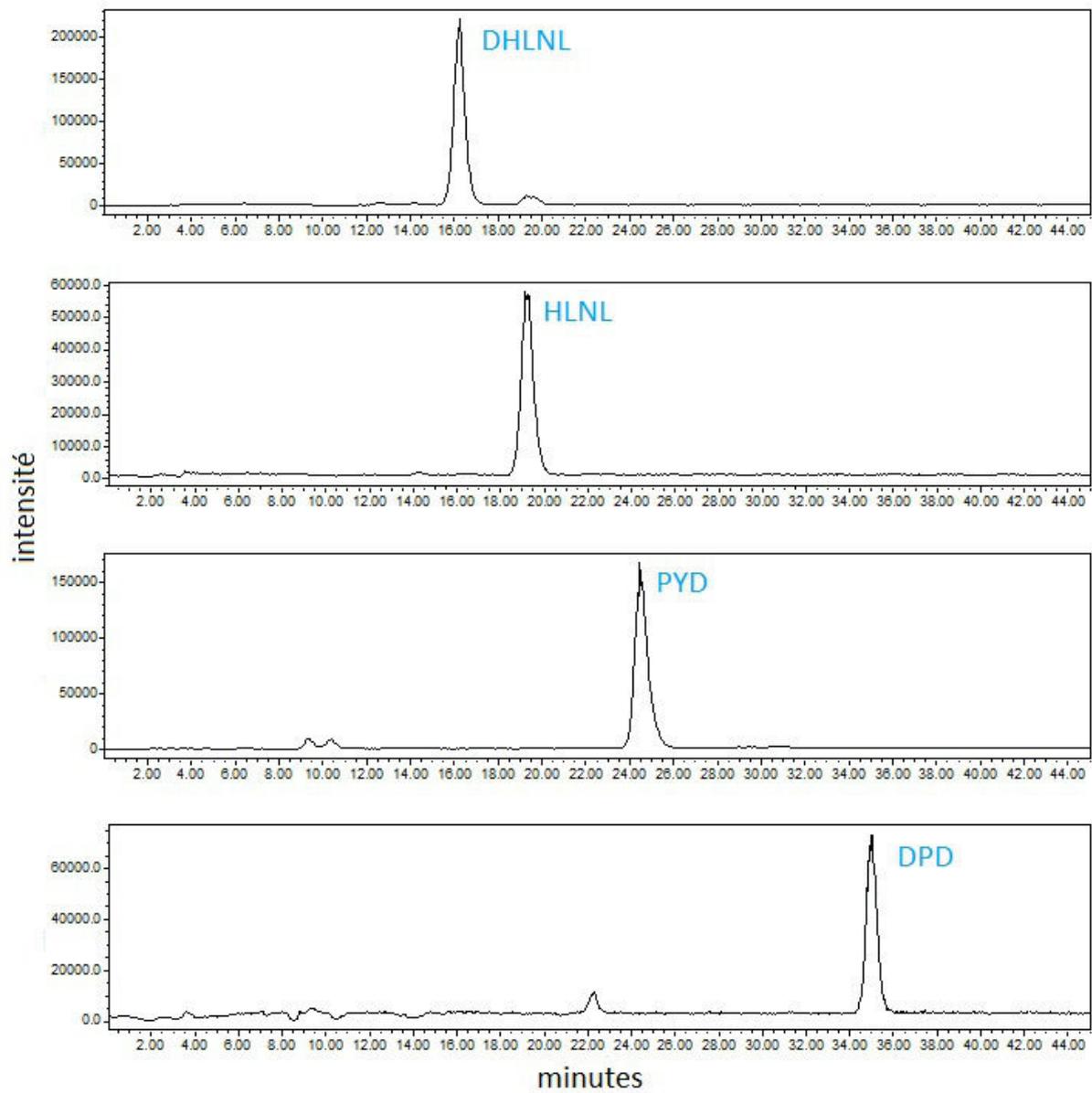


FIGURE II.6 – Chromatogrammes pour le dosage de DHLNL, HLNL, PYD et DPD.

Enfin, on réalise le même protocole que pour le dosage de l'OHP, mais sur les deux hydrolysats préparés (celui contenant le surnageant et celui contenant le culot).

## 2.5 Microscopie InfraRouge par Transformée de Fourier

La FTIRM a été effectuée au sein de l'unité Inserm 1033 de Lyon sous la direction du Dr Delphine Farlay.

Pour ces essais, nous avons testé (Figure II.1, page 41) :

- 14 fibulae de 14 patients enfants. Age moyen :  $11 \pm 5$  ans (4-18 ans);
- 17 fibulae de 17 patients adultes. Age moyen :  $76 \pm 13$  ans (50-95 ans).

Les tests sont effectués sur des sections d'os inclus en résine (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

### 2.5.1 Principe

La FTIRM est une technique de spectroscopie vibrationnelle basée sur l'absorption du rayonnement infrarouge par un matériau. Le rayonnement infrarouge moyen est une radiation de type électromagnétique dont les longueurs d'onde sont comprises entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement infrarouge, les liaisons chimiques des molécules l'absorbent à des longueurs d'onde spécifiques dépendantes de leur nature et de la conformation des molécules (taille, géométrie, symétrie). Ainsi, à un matériau de composition chimique et de structure données va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier ce matériau. L'analyse spectrale du rayonnement infrarouge permet d'identifier les composants d'un échantillon, leur dosage ainsi que les interactions entre ces différents composants. Les vibrations des liaisons chimiques engendrées par le faisceau infrarouge sont divisées en deux groupes :

- les vibrations de valence symétrique ou antisymétrique qui correspondent à des vibrations d'élongation (*stretching* vibrations) et sont notées  $\nu 1$  et  $\nu 3$  respectivement ;
- les vibrations de flexion symétriques ou antisymétriques (*bending* vibrations) notées  $\nu 2$  et  $\nu 4$  respectivement

### 2.5.2 Application au tissu osseux

L'analyse du spectre infrarouge du tissu osseux présente des bandes de vibrations caractéristiques correspondant aux protéines, aux phosphates et aux carbonates. En ce qui concerne les protéines, on observe plusieurs bandes de vibration. La plus utilisée pour étudier la structure secondaire des protéines osseuses correspond au mode de vibration de la bande amide I. Cette bande de vibration, observée à 1650-1660  $\text{cm}^{-1}$ , est principalement attribuable à la vibration d'élongation du groupement  $\text{C} = \text{O}$  des protéines.

Les phosphates présentent deux modes de vibration. Le premier mode est une élongation symétrique et antisymétrique (noté  $\nu 1 \nu 3 \text{PO}_4$ ), situé entre 910-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Le second mode correspond à une vibration de déformation antisymétrique (noté  $\nu 3 \nu 4 \text{PO}_4$ ), il est situé entre 500-650  $\text{cm}^{-1}$ .

Pour les carbonates, deux modes de vibration sont détectés dans le moyen infrarouge :

- un mode de vibration d'élongation symétrique (noté  $\nu 2 \text{CO}_3$ ), présent entre 800-900  $\text{cm}^{-1}$  ;

— un mode de déformation antisymétrique (noté  $\nu 4CO_3$ ), présent vers  $1450\text{ cm}^{-1}$ .

Ce mode présente peu d'intérêt puisqu'il est masqué par les vibrations des amides. Le spectre caractéristique d'un échantillon osseux est présenté Figure II.7.

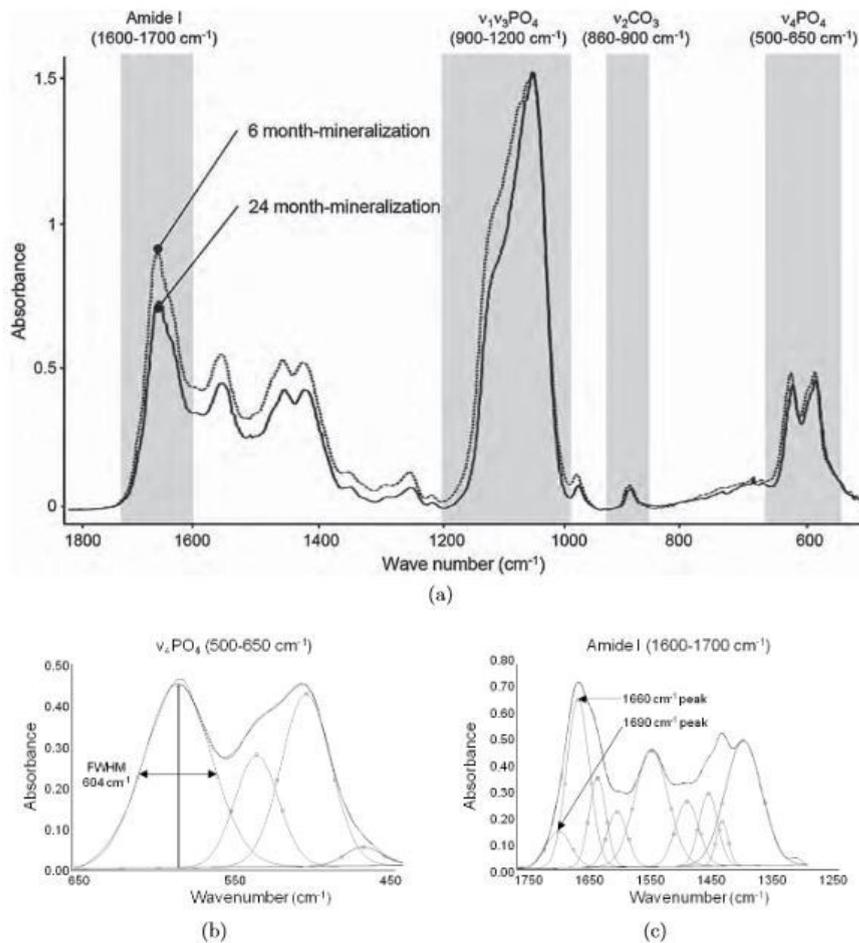


FIGURE II.7 – (a) Spectres infrarouges obtenus par FTIRM sur un échantillon de tissu osseux montrant les domaines de vibration, caractéristiques de l'os, ainsi que leurs variations entre deux ostéons présentant une minéralisation différente [8]; (b) Méthode de déconvolution et de mesure de la largeur à mi-hauteur (FWHM) du pic à  $604\text{ cm}^{-1}$  dans le domaine des phosphates qui correspond à l'index de cristallinité; (c) Méthode de déconvolution et de mesure des pics à  $1660$  et  $1690\text{ cm}^{-1}$  dans le domaine des amides pour le calcul de la maturité du collagène [8].

Ces bandes de vibrations permettent de définir cinq paramètres spécifiques au tissu osseux :

— **la maturité minérale** correspondant au rapport d'intensité des pics à  $1030$  et  $1110\text{ cm}^{-1}$ . Ces deux pics correspondent aux phosphates appartenant au noyau des cristaux d'apatite ( $PO_4$  apatitiques) et ceux appartenant à la couche hydratée de ces derniers ( $PO_4$  non-apatitiques) respectivement [53].

Les phosphates non-apatitiques sont progressivement intégrés dans le noyau apatitique au cours de la maturation des cristaux. Ainsi, le rapport de ces deux bandes

permet d'obtenir un index de la maturité minérale traduisant la transformation du domaine non-apatitique en domaine apatitique.

- **l'index de cristallinité** minérale est défini étant inversement proportionnelle à la largeur à mi-hauteur du pic à  $604\text{ cm}^{-1}$  (Figure II.7b). Ce paramètre traduit le degré d'ordre, l'organisation des ions à l'intérieur du cristal, la perfection du cristal ainsi que la taille du cristal [53].
- **l'index de minéralisation** est le rapport d'intensité des pics à  $1030$  et  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Il correspond au rapport entre le contenu minéral et le contenu protéique. Ce paramètre est comparable au TMD mesuré par microradiographie au niveau tissulaire [105].
- **la carbonatation** est définie par le rapport d'aire sous les courbes entre les bandes  $\nu 2CO_3$  et  $\nu 1\nu 3PO_4$ . Ce paramètre reflète l'incorporation des ions  $CO_3$  dans le cristal. Ces ions peuvent être substitués soit par les ions  $OH^-$ , soit par les ions  $PO_4^{3-}$ , soit être en position labile (c'est à dire dans la couche hydratée). Ce paramètre prend en compte toutes les substitutions des carbonates.
- **la maturité du collagène** traduit la maturité de la composante organique. Elle est calculée comme étant le rapport de l'aire sous le pic à  $1660\text{ cm}^{-1}$ , sur l'aire sous le pic à  $1690\text{ cm}^{-1}$  [106] (Figure II.7c).

### 2.5.3 FTIRM sur l'os cortical

Les mesures de FTIRM ont été réalisées sur des sections d'os de  $2\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les mesures ont été faites en transmission avec un microscope Auto-IMAGE GXII (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) équipé d'un détecteur à large bande (mercure-cadmium-tellure ;  $7800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ). Pour chaque échantillon, 20 mesures ont été faites : 10 dans les ostéons et 10 dans l'os interstitiel. A chaque mesure correspond un spectre qui est une moyenne de 50 scans. Les contributions de l'air et de la résine ont été soustraites à chacun des spectres. Chaque spectre est également corrigé pour la ligne de base et normalisé à 1,5 sur le pic du domaine  $\nu 3PO_4$ . Les spectres ont ensuite été déconvolués avec le logiciel GRAMS/AI (Thermo Galactic, Salem, NH, USA) pour extraire les cinq paramètres précédemment cités.

## 2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA), avec un seuil de 5% pour le risque alpha. Un test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité de chaque distribution. Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les variables des os enfants et adultes. Un test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour détecter des différences significatives entre les variables des compartiments étudiés (ostéon et interstitiel). Les corrélations ont été identifiées comme significatives ou non via le calcul du coefficient de corrélation de Spearman.

## 3 Résultats

Tous les tableaux des résultats par échantillons sont situés dans l'annexe A.

### 3.1 Différentes architectures du réseau poreux chez l'enfant et l'adulte

La fraction volumique des pores (Po.V / TV) entre les enfants en croissance et les adultes n'est pas significativement différente, mais provient de différences dans le modèle

architectural (Table II.1). Par rapport aux enfants, les adultes ont un nombre de pores supérieur (Po.N : + 42%), une connectivité supérieure (ConnD : + 205%), une séparation de pore inférieure (Po.Sp : -18%) et une distribution intra-individuelle de la séparation des pores inférieure (Po.Sp.SD : -20%).

	Enfants (n=14) 6-18 ans (13±4) Moyenne (écart-type)	Adultes (n=16) 50-95 ans (75±13) Moyenne (écart-type)	p-values
Po.V / TV (%)	10,3 (6,5)	15,9 (10,3)	0,151
Po.S / Po.V (mm <sup>-1</sup> )	40,5 (15,9)	37,7 (13,4)	0,628
Po.N (mm <sup>-1</sup> )	0,69 (0,28)	0,98 (0,29)	<b>0,033</b>
Po.Dm (µm)	139 (62)	144 (69)	0,626
Po.Dm.SD (µm)	67 (39)	67 (41)	0,953
Po.Sp (µm)	397 (58)	325 (62)	<b>0,007</b>
Po.Sp.SD (µm)	125 (22)	100 (20)	<b>0,010</b>
ConnD (mm <sup>-3</sup> )	6,6 (5,5)	20,1 (15)	<b>0,001</b>
Degré d'anisotropie	0,74 (0,06)	0,73 (0,08)	0,622

TABLE II.1 – Valeurs des paramètres microstructuraux du réseau poreux. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

La Table II.2 présente les coefficients de corrélation obtenus entre l'âge et les paramètres de l'architecture du réseau de pores. Chez l'enfant en croissance, l'augmentation de l'âge est corrélée négativement avec la Po.V/TV. Cette diminution de la porosité a été associée à une diminution du nombre et du diamètre des pores (Po.N et Po.Dm) et une augmentation de la séparation entre les pores (Po.Sp). Entre 5 et 18 ans, il y avait également une corrélation positive entre l'âge et le rapport entre la surface et le volume de pores (Po.S/Po.V). Chez l'adulte, l'augmentation de l'âge a été corrélée avec une augmentation de la Po.V/TV. Cette augmentation de la fraction volumique de pores a été associée à une augmentation du nombre de pores et une diminution de la séparation entre les pores (Table II.2 et Figure II.8).

	Enfants		Adultes	
	r'	p-values	r'	p-values
Po.V / TV (%)	-0,53	<b>0,043</b>	0,50	<b>0,047</b>
Po.S / Po.V (mm <sup>-1</sup> )	0,51	<b>0,048</b>	-0,19	0,471
Po.N (mm <sup>-1</sup> )	-0,57	<b>0,027</b>	0,53	<b>0,035</b>
Po.Dm (µm)	-0,50	<b>0,048</b>	0,17	0,524
Po.Dm.SD (µm)	-0,41	0,083	0,23	0,395
Po.Sp (µm)	0,50	<b>0,049</b>	-0,77	<b>0,001</b>
Po.Sp.SD (µm)	0,58	<b>0,029</b>	-0,78	<b>0,001</b>
ConnD (mm <sup>-3</sup> )	-0,33	0,232	0,23	0,389
Degré d'anisotropie	0,31	0,269	-0,30	0,271

TABLE II.2 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les variables de l'architecture de réseau de pores et l'âge chez l'enfant et chez l'adulte.

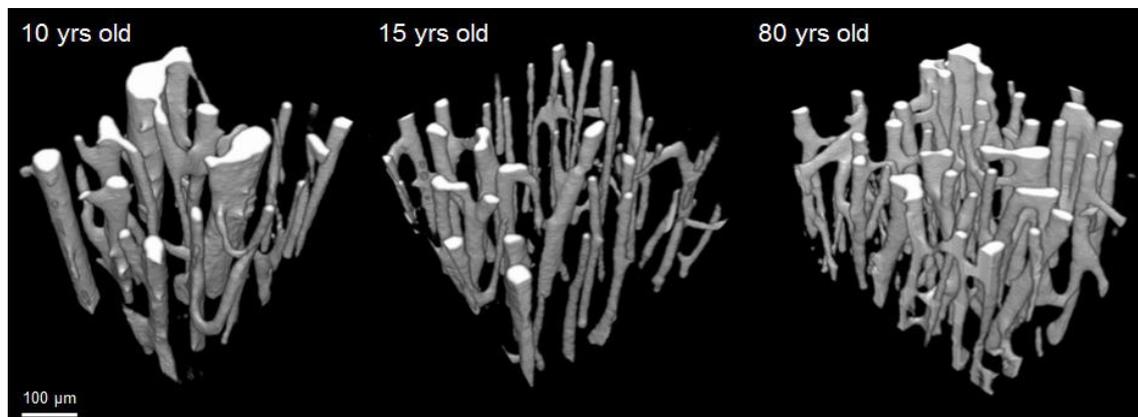


FIGURE II.8 – Reconstructions 3D du réseau poreux imagées dans des cubes d'os cortical de fibula pour des échantillons de 10, 15 et 80 ans.

La Table II.3 présente les corrélations entre la fraction de volume de pores et les différents paramètres décrivant l'architecture du réseau de pores chez l'adulte et l'enfant.

	Po.V / TV (%)	Po.S / Po.V (mm <sup>-1</sup> )	Po.N (mm <sup>-1</sup> )	Po.Dm (µm)	Po.Dm.SD (µm)	Po.Sp (µm)	Po.Sp.SD (µm)	ConnD (mm <sup>-3</sup> )	DA
Po.V / TV (%)		-0,96***	0,84***	0,88***	0,75**	-0,77**	-0,15	0,79**	-0,59*
Po.S / Po.V (mm <sup>-1</sup> )	-0,89***		-0,73*	-0,94***	-0,85***	0,67*	0,01	-0,74*	0,63*
Po.N (mm <sup>-1</sup> )	0,77***	-0,54*		0,54*	0,37	-0,79***	-0,34	0,77**	-0,46
Po.Dm (µm)	0,86**	-0,99***	0,52*		0,95***	-0,59*	-0,05	0,64*	-0,56*
Po.Dm.SD (µm)	0,87**	-0,97***	0,55*	0,98***		0,46	-0,08	0,46	0,51*
Po.Sp (µm)	-0,78***	0,45	-0,76**	-0,43	-0,48		0,62*	-0,74*	0,15
Po.Sp.SD (µm)	-0,64*	0,32	-0,74*	-0,29	-0,34	0,91***		-0,03	-0,38
ConnD (mm <sup>-3</sup> )	0,08	0,07	-0,10	-0,03	0,04	-0,16	-0,22		-0,57*
DA	-0,38	0,44	0,06	-0,45	-0,44	0,23	0,01	-0,42	

TABLE II.3 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenu entre les différents paramètres décrivant l'architecture du réseau de pores. Au-dessus de la diagonale, la zone grisée présente les valeurs obtenues dans le groupe enfant (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 3.2 Variation de la densité minérale du tissu osseux avec l'âge

La TMD et sa répartition sont significativement différentes entre les enfants en croissance et les adultes (Table II.4). La Figure II.9 montre la répartition des valeurs en fonction de l'âge. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la TMD et l'âge, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant, seule la variation de TMD est liée à l'âge dans le groupe adulte. (Table II.5).

	Enfants (n=14) 6-18 ans (13±4) Moyenne (écart-type)	Adultes (n=16) 50-95 ans (75±13) Moyenne (écart-type)	p-values
TMD ( $\text{g cm}^{-3}$ )	1,029 (0,083)	1,093 (0,026)	<b>0,013</b>
TMD.SD ( $\text{g cm}^{-3}$ )	0,078 (0,009)	0,087 (0,006)	<b>0,009</b>

TABLE II.4 – Valeurs des paramètres reflétant la densité minérale du tissu osseux et sa distribution. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

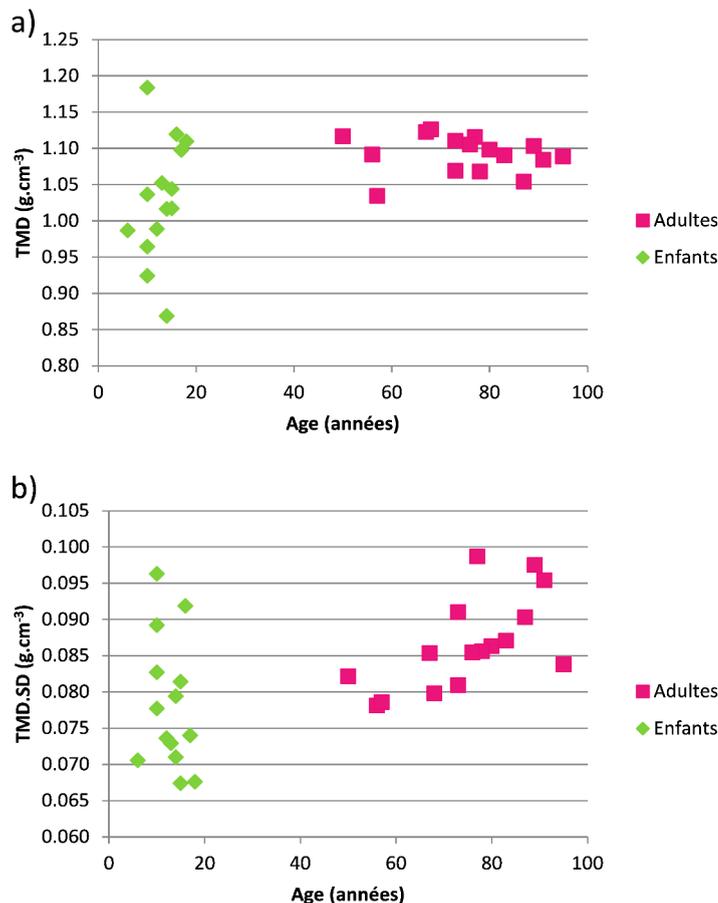


FIGURE II.9 – Evolution de la densité minérale du tissu (a) et de la distribution (b) déterminées par microCT en fonction de l'âge.

	Age (années)	TMD (g cm <sup>-3</sup> )	TMD.SD (g cm <sup>-3</sup> )
Age (années)		0,470	-0,245
TMD (g cm <sup>-3</sup> )	-0,365		0,125
TMD.SD (g cm <sup>-3</sup> )	0,655*	-0,156	

TABLE II.5 – Coefficients de corrélation de Spearman ( $r'$ ) obtenus entre l'âge et les paramètres de densités obtenus par microCT. Les corrélations ont été effectuées sur les deux groupes séparément. Au-dessus de la diagonale, la zone grisée présente les valeurs mesurées dans le groupe enfant (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3 Variation du degré de minéralisation osseuse avec l'âge

Le DMB dans les deux compartiments étudiés est significativement différentes entre les enfants en croissance et les adultes (Figure II.6). On trouve également que le tissu interstitiel est significativement plus minéralisé que le tissu ostéonal pour les deux groupes étudiés (Figures II.11 et II.10). Aucune corrélation n'a été trouvée entre le DMB et l'âge, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant.

		Enfants (n=13) 4-18 ans (11±5)	Adultes (n=16) 50-95 ans (75±13)	p-values
		Moyenne (écart-type)		
Ostéon	DMB (g cm <sup>-3</sup> )	1,032 (0,059)	1,079 (0,037)	<b>0,010</b>
	DMB.SD (g cm <sup>-3</sup> )	0,063 (0,018)	0,063 (0,024)	0,638
Interstitiel	DMB (g cm <sup>-3</sup> )	1,192 (0,045)	1,260 (0,029)	<b>&lt; 0,0001</b>
	DMB.SD (g cm <sup>-3</sup> )	0,041 (0,014)	0,037 (0,019)	0,147

TABLE II.6 – Valeurs des degrés de minéralisation osseuse et leurs distributions obtenues via microradiographie. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

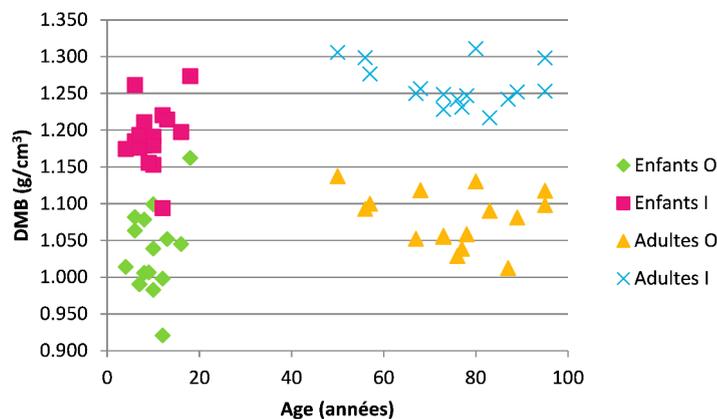


FIGURE II.10 – Evolution du DMB en fonction de l'âge pour chaque compartiment étudié (O :Ostéonal et I :Interstitiel).

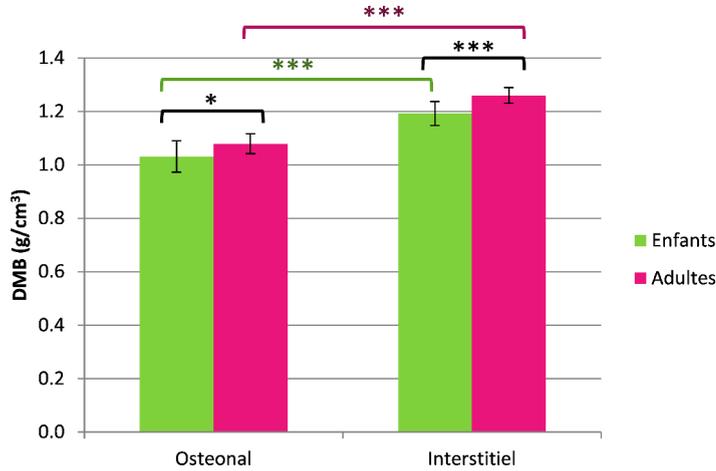


FIGURE II.11 – Valeurs des DMB et DMB.SD obtenues par microradiographie pour chaque groupe (Enfants/Adultes) et pour chaque compartiment étudié (Ostéonal/Interstitiel). Les p-values (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney pour la comparaison entre les groupes, et le test de Wilcoxon pour la comparaison entre les compartiments.

### 3.4 Propriétés chimiques du tissu déterminées par dosage HPLC

La répartition des différents types de molécules de pontage est significativement différentes entre les enfants en croissance et les adultes (Figure II.12). Dans cette étude, les os corticaux de nos sujets enfants contiennent 5 fois plus de molécules de pontage immature (DHLNL et HLNL) que les sujets adultes. Inversement, on observe une quantité plus élevée de molécules de pontage mature (PYD et DPD) chez l'adulte que chez l'enfant.

La Table II.7 présente les coefficients de corrélation obtenus entre l'âge et les différentes quantités de molécules de pontage. Chez l'enfant en croissance, l'augmentation de l'âge est corrélée positivement avec la quantité de DPD et négativement avec la quantité de HLNL. Plus généralement, la Figure II.13 montre l'évolution du ratio immatures sur matures ((DHLNL+HLNL)/(PYD+DPD)). Ce ratio diminue fortement pendant la croissance ( $r' = -0,634$ ,  $p = 0,001$ , Table II.7) du fait d'une forte diminution de la quantité de molécules de pontages immatures (Figure II.12) et reste stable chez l'adulte.

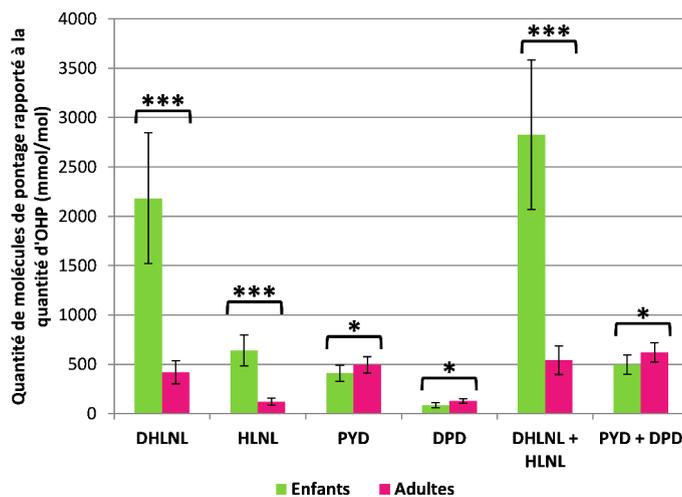


FIGURE II.12 – Valeurs des quantités de molécules de pontage pour chaque groupe. Les p-values (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

Molécules de pontage	Enfants (n=22)		Adultes (n=17)	
	1-18 ans (10 ±6)	p-values	50-95 ans (76±13)	p-values
DHLNL	-0,692	<b>0,0004</b>	-0,506	<b>0,041</b>
HLNL	-0,053	0,809	-0,544	<b>0,026</b>
PYD	0,274	0,205	-0,546	<b>0,025</b>
DPD	0,547	<b>0,008</b>	-0,265	0,303
HLNL+DHLNL	-0,596	<b>0,003</b>	-0,571	<b>0,019</b>
DPD+PYD	0,323	0,133	-0,612	<b>0,010</b>
(DHLNL+HLNL)/(PYD+DPD)	-0,634	<b>0,001</b>	-0,293	0,253

TABLE II.7 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les quantités de molécules de pontage et l'âge chez l'enfant et chez l'adulte.

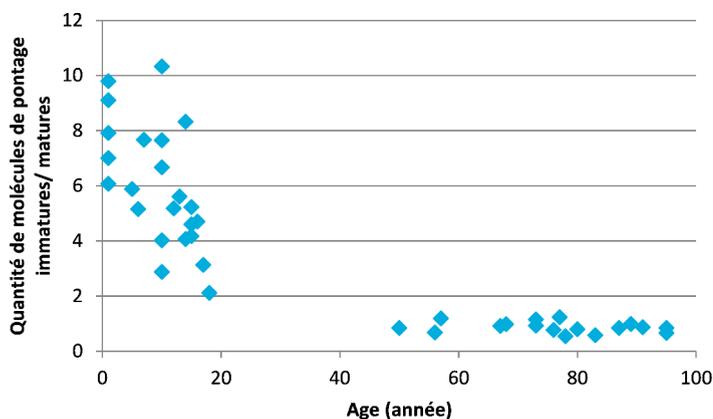


FIGURE II.13 – Evolution du ratio de molécules de pontage immatures sur les molécules de pontage mature (HLNL + DHLNL/DPD + PYD) en fonction de l'âge.

### 3.5 Propriétés chimiques du tissu déterminées par FTIRM

En comparant les paramètres FTIRM chez l'enfant et l'adulte dans les deux compartiments étudiés (i.e. ostéonal et interstitiel), nous remarquons :

- une augmentation significative de l'index de cristallinité (Figure II.14.a) ;
- une augmentation significative de la carbonatation (Figure II.14.b) ;
- aucune différence pour la maturité du minérale (Figure II.14.c), l'index de minéralisation (Figure II.14.d) et la maturité du collagène (Figure II.14.e).

En étudiant l'évolution des paramètres FTIRM chez l'enfant et l'adulte, nous trouvons :

- une corrélation positive avec l'âge de la carbonatation et de l'index de minéralisation chez l'enfant ( $r'=0,386$ ,  $p<0,05$  et  $r'=0,388$ ,  $p<0,05$ , respectivement) ;
- une corrélation négative avec l'âge et la maturité du minéral chez l'adulte ( $r'=-0,467$ ,  $p<0,001$ ).

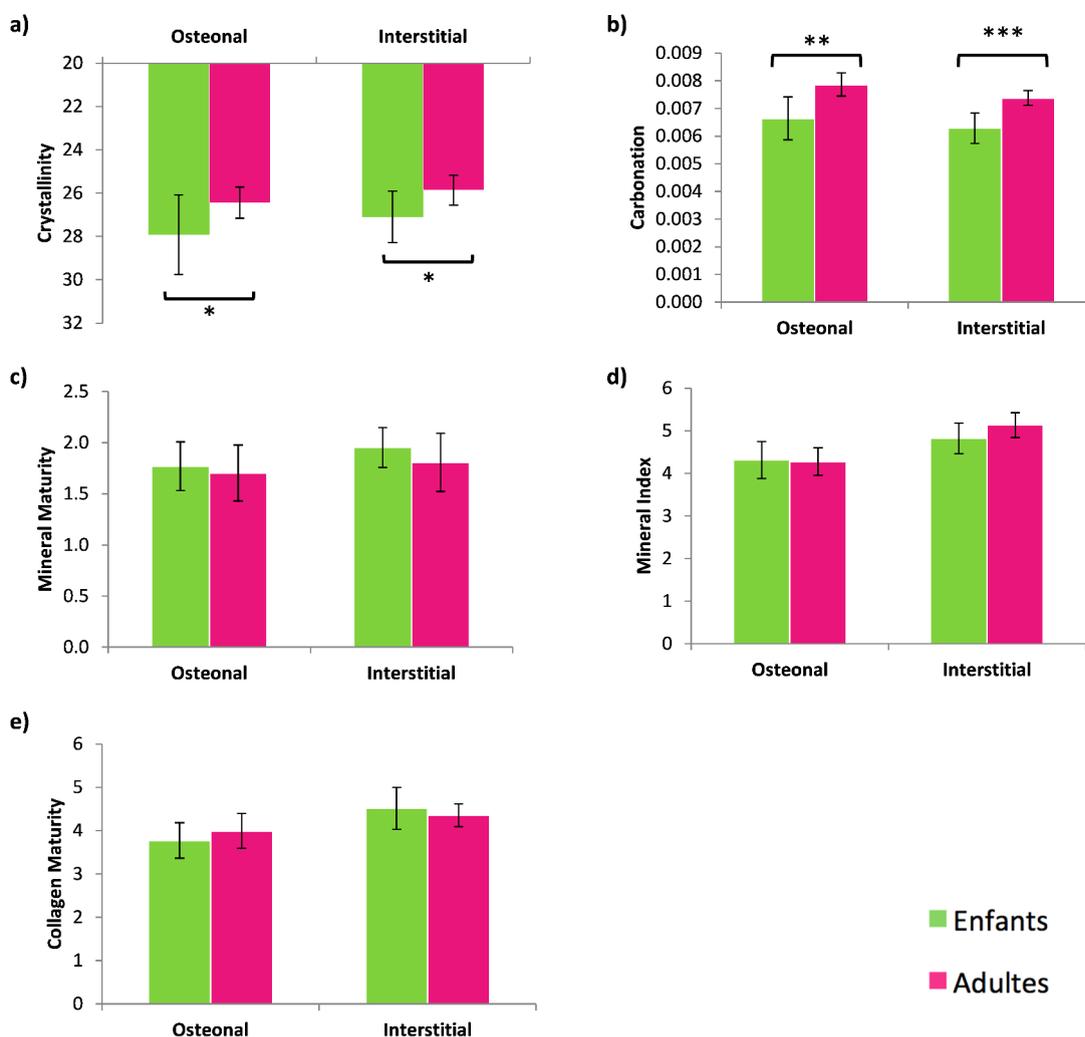


FIGURE II.14 – Moyennes et écarts-types de paramètres obtenus par FTIRM dans chacun des compartiments étudiés (ostéon et interstitiel) et pour chaque groupe. Les p-values (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

## 4 Discussion

Dans cette étude, différentes propriétés tissulaires d'échantillons d'os cortical d'adultes et d'enfants ont été comparées. Ces propriétés ont été évaluées via l'utilisation de différentes techniques : analyse de coupes microtomographiques et microradiographiques, dosage de molécules par HPLC et FTIRM. Du fait de la rareté des spécimens, les échantillons d'os enfant ont été collectés sur des os longs (fibulae et fémurs) sans égard pour le genre, et nous avons un nombre plus élevé d'échantillons provenant de jeunes filles. Les échantillons pour le groupe d'adultes contrôles ont été récupérés sur des fibulae avec un ratio homme/femme équilibré.

## 4.1 Minéral

Dans cette étude, la qualité du minéral a été étudiée de manière très globale en évaluant la densité minérale du tissu osseux via la microtomographie. Si l'on observe l'évolution de la densité tissulaire (TMD) avec l'âge sur la population testée (Figure II.9), la TMD semble augmenter avec l'âge pendant la croissance, et reste plutôt stable chez les adultes âgés. Ceci est le reflet d'une minéralisation qui s'effectue au cours de la croissance.

A l'échelle du tissu, la minéralisation a été étudiée en utilisant des coupes incluses analysées en microradiographie quantitative. Nous avons choisi d'étudier séparément le DMB dans le tissu ostéonal et dans le tissu interstitiel. Pour les deux groupes étudiés, nous observons que le tissu interstitiel est plus minéralisé que le tissu ostéonal. Ceci montre la minéralisation s'effectuant pendant le remodelage osseux. Par ailleurs, nous observons également des valeurs de DMB plus faibles chez l'enfant, pour les deux types de tissu. Il y aurait donc une minéralisation de l'ensemble du tissu osseux qui s'effectuerait pendant la croissance.

Au niveau tissulaire, la FTIRM a permis d'évaluer les paramètres de la matrice avec une plus grande sensibilité et ainsi de déterminer les propriétés physico-chimiques des constituants osseux. Ainsi, nous avons pu étudier des paramètres tels que la composition des cristaux et leur organisation. La cristallinité est inversement proportionnelle à la FWHM qui est déterminée, et plus la cristallinité augmente, plus les cristaux sont gros et parfaits. Les résultats montrent que chez l'enfant, les cristaux sont plus petits et moins parfaits. De plus, on observe une différence significative de la carbonatation, avec une valeur plus élevée de ce paramètre chez l'adulte. Ceci dénote une présence d'ions  $CO_3$  plus importante dans le noyau du cristal d'apatite.

## 4.2 Collagène

Les pontages permettent la réticulation des fibrilles de collagène entre elles et ainsi stabilisent les fibrilles [10]. Ils sont formés par l'action de la lysyl oxydase qui établit des liaisons moléculaires divalentes (DHLNL et HLNL) entre les acides aminés de l'extrémité des deux molécules de collagène [120, 133]. Au fil du temps, ces liaisons immatures réagissent avec des groupes aldéhydes et viennent former des liaisons trivalentes matures (PYD et DPD). Le contenu en molécules de pontages divalents et trivalents est quantifiable par HPLC [59].

A notre connaissance, seules quelques études présentent des résultats de dosage de molécules de pontage sur l'os cortical pédiatrique via HPLC [19, 51, 120]. L'étude de Berteau et al. [19] a été menée avec un groupe enfant contenant 5 sujets (âge moyen :  $10.1 \pm 4.6$  ans) et un groupe adulte contenant 3 sujets (âge moyen :  $79.0 \pm 15.4$  ans). Les résultats indiquent que le taux de collagène ne varie pas entre les groupes adultes et enfants. Par contre, le taux de molécules de pontage immatures (DHLNL + HLNL) ainsi que le ratio immatures/matures (DHLNL+HLNL/PYD+DPD) étaient plus élevés chez les enfants que chez les adultes âgés (3,1 et 3,8 fois, respectivement). Notre étude, avec ses 22 sujets dans le groupe enfant et 17 dans le groupe adulte, confirme cette tendance.

Nos résultats montrent une phase très évolutive vers une maturation des molécules de pontage pendant la croissance, avec une nette diminution des pontages divalents, remplacés par les trivalents. A l'inverse, le ratio de molécules de pontage immatures/matures est très

stable dans notre groupe adulte. Ces résultats indiquent une hiérarchisation de la structure du collagène avec la maturité croissante de collagène, ce qui pourrait refléter le remplacement de l'os primaire (os tissé ou "woven bone") de l'os pédiatrique par de l'os lamellaire retrouvé chez l'os mature.

Dans le chapitre IV, nous étudierons l'effet de ces quantités de collagène et de molécules de pontage sur les propriétés mécaniques de l'os cortical en croissance.

### 4.3 Architecture du réseau poreux

L'utilisation d'un microtomographe ainsi que l'analyse des coupes microtomographiques ont permis de déterminer et de comparer l'architecture du réseau poreux et la densité minérale du tissu osseux chez les deux groupes étudiés. La méthode utilisée est basée sur l'utilisation d'une modalité classique de rayons X, couplée à un traitement d'image.

Les connaissances actuelles sur l'évolution de la porosité corticale avec l'âge sont données par des études histomorphométriques, donc 2D, réalisées sur des échantillons de crête iliaque [60, 122–124], site osseux non-porteur et subissant rarement de fractures. Par conséquent, la comparaison de nos données à celles publiées pour l'os iliaque doit être interprétée avec prudence.

La plupart de ces études ont rapporté une porosité élevée chez les enfants, originaire principalement d'ostéons dérivants (drifting) présentant des canaux de Havers géants et asymétriques. Ces canaux sont responsables de plus de 70% de la porosité corticale chez l'enfant. Leur densité numérique diminue à partir de l'adolescence [122]. Plus tard, quand la croissance ralentit, ces ostéons asymétriques sont remplacés pendant le remodelage par de petits ostéons concentriques symétriques, similaires à ceux observés chez l'adulte [122, 124].

A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer la microarchitecture du réseau poreux en 3D sur de l'os cortical pédiatrique. Elle met en avant que la porosité corticale provient d'architectures du réseau de canaux différentes pendant la croissance et chez l'adulte. La croissance est associée à une diminution de la porosité qui provient d'une diminution du nombre de pores, de leur diamètre et de leur connectivité. À l'inverse, chez l'adulte, le vieillissement est associé à une augmentation de la porosité due à une augmentation du nombre de pores et de leur connectivité. La taille des pores n'a pas été reliée à l'âge chez l'adulte.

## 5 Résumé du chapitre II

Cette caractérisation tissulaire de l'os cortical montre que, pendant la croissance, les différents composants de l'os évoluent pour atteindre un agencement vers une forme mature et plus stable :

- la minéralisation de l'os s'effectue avec l'âge ;
- les ions à l'intérieur du cristal d'apatite s'organisent et s'ordonnent ;
- le taux de molécules de montage immatures diminue ;
- le taux de molécules de pontage matures augmente ;
- la porosité diminue : le nombre et le diamètre des pores diminuent, leur séparation augmente.

	Enfants		Adultes		Comparaison
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Densité minérale					
TMD ( $\text{g cm}^{-3}$ )	1,01	0,12	1,09	0,03	+7,9%
DMB ( $\text{g cm}^{-3}$ )	1,11	0,10	1,17	0,10	+5,2%
HI ( $\text{g cm}^{-3}$ )	0,05	0,02	0,05	0,03	-4,6%
Architecture du réseau poreux					
Po.V/TV (%)	12,6	9,1	15,9	10,1	+26,8%
Po.S / Po.V ( $\text{mm}^{-1}$ )	38,1	13,5	37,5	14,1	-1,5%
Po.N ( $\text{mm}^{-1}$ )	0,78	0,37	0,91	0,35	+17,5%
Po.Dm ( $\mu\text{m}$ )	149,6	57,3	158,1	79,9	+5,6%
Po.Dm.SD ( $\mu\text{m}$ )	71,4	36,3	77,2	50,2	+8,1%
Po.Sp ( $\mu\text{m}$ )	380,3	53,4	321,9	59,2	-15,4%
Po.Sp.SD ( $\mu\text{m}$ )	121,4	19,1	102,8	22,0	-15,3%
Dosage des molécules de pontage					
Immature	2824	863	541	144	-80,9%
Mature	496	127	621	97	+25,3%
Propriétés physico-chimiques					
Cristallinité	27,46	1,52	26,10	0,76	-5,0%
Carbonatation	0,0065	0,0007	0,0076	0,0004	+16,9%
Index de Minéralisation	4,58	0,46	4,73	0,52	+3,2%
Maturité du minéral	1,87	0,23	1,77	0,27	-5,6%
Maturité du collagène	4,14	0,56	4,14	0,39	+0,1%

TABLE II.8 – Tableau récapitulatif des modifications tissulaires observées entre l'os cortical pédiatrique et l'os cortical d'adulte.