

L'os humain état de l'art

1.1 Introduction

Ce premier chapitre est destiné à présenter brièvement l'ossature humaine et les mécanismes qui lui sont associés. Les os, éléments durs et/ou résistants, constituent la charpente du corps humain en servant de soutien aux parties molles. La composition de ces différents os sera présentée ainsi que leur physiologie.

1.2 Anatomie-Typologie

Les os, au nombre de 206 chez l'adulte et 270 chez le nourrisson, remplissent différentes fonctions dans le corps humain. Ils donnent au corps sa forme extérieure, soutiennent et protègent les parties molles, et renferment la moelle qui produit les cellules sanguines. D'un point de vue statique, les os assurent le soutien du corps et la protection des organes. D'un point de vue dynamique, ils représentent les éléments bras de levier de transmission des forces musculaires au cours du mouvement. Les os contiennent en outre les réservoirs de calcium (et autres minéraux) que l'organisme peut mobiliser par résorption, selon ses besoins.

Deux méthodes fondamentales de classification servent à différencier les os du corps. Le premier système de classification est basé sur l'emplacement anatomique de l'os (axial ou appendiculaire), le second sur sa forme (long, court, plat, ou irrégulier).

Les os axiaux sont les quatre-vingt os qui se répartissent le long de l'axe central, vertical du corps. Ils soutiennent et protègent la tête et le thorax et comprennent le crâne et la colonne vertébrale (rachis). Les os appendiculaires, au nombre de cent vingt-six, sont ceux qui forment les membres, c'est-à-dire les épaules et les hanches, les bras et les jambes, les mains et les pieds, les doigts et les orteils.

On distingue trois grands types d'os selon leur géométrie : les os longs (fémur, tibia, fibula, ulna, ...), les os plats (scapula, côtes, os iliaque, ...) et les os courts (ceux du carpe et du tarse). On peut y ajouter deux autres types : les sésamoïdes (petits os trouvés près des articulations ou dans l'épaisseur des tendons) et les os dits irréguliers, comme le coxal et certains os du crâne.

Chaque os est composé d'une partie périphérique dense appelée **os cortical** (ou os compact) et d'une partie centrale plus poreuse, appelée **os trabéculaire** (ou os spongieux).

- Structure des os longs :** géométriquement, les os longs sont composés comme suit :
- le corps de l'os ou la diaphyse qui est formé par un cylindre de tissu compact. Ce cylindre entoure une cavité dite cavité ou canal médullaire remplie de moelle grasseuse ;
 - les extrémités ou épiphyses qui sont formées de tissu spongieux recouvert d'une fine couche de tissu cortical et de cartilage au niveau des surfaces articulaires ;
 - les deux métaphyses, zones de jonctions entre la diaphyse et les épiphyses.

Structure des os courts et plats : ils sont essentiellement composés de tissu spongieux entouré d'une membrane de tissu compact.

1.3 Histologie

L'os un matériau qui peut s'identifier à plusieurs échelles : de la macrostructure à la subnanostructure (Figure I.1).

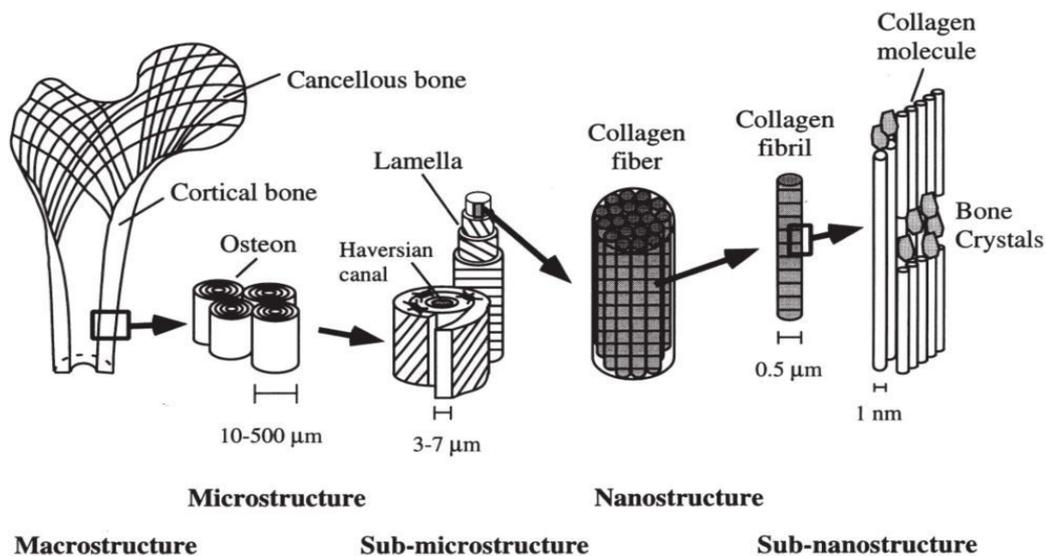


FIGURE I.1 – Représentation multi-échelle de l'os cortical [113].

1.3.1 Organisation du tissu osseux

On distingue pour tout os deux parties dans le tissu osseux proprement dit : l'**os cortical** et l'**os trabéculaire**. Ces deux parties sont recouvertes sur leur surface externe par une membrane appelée le **périoste**, et sur la surface interne par l'**endoste** (Figure I.2).

L'os cortical (ou os compact)

Il est composé d'unités cylindriques de 100 à 500 μm de diamètre orientées parallèlement à l'axe de l'os et appelées **ostéons** ou système de Havers (Figure I.3). Chaque unité est formée de plusieurs couches de lamelles concentriques formées de matrice osseuse. Cette matrice osseuse constitue 80% du volume total de l'os cortical.

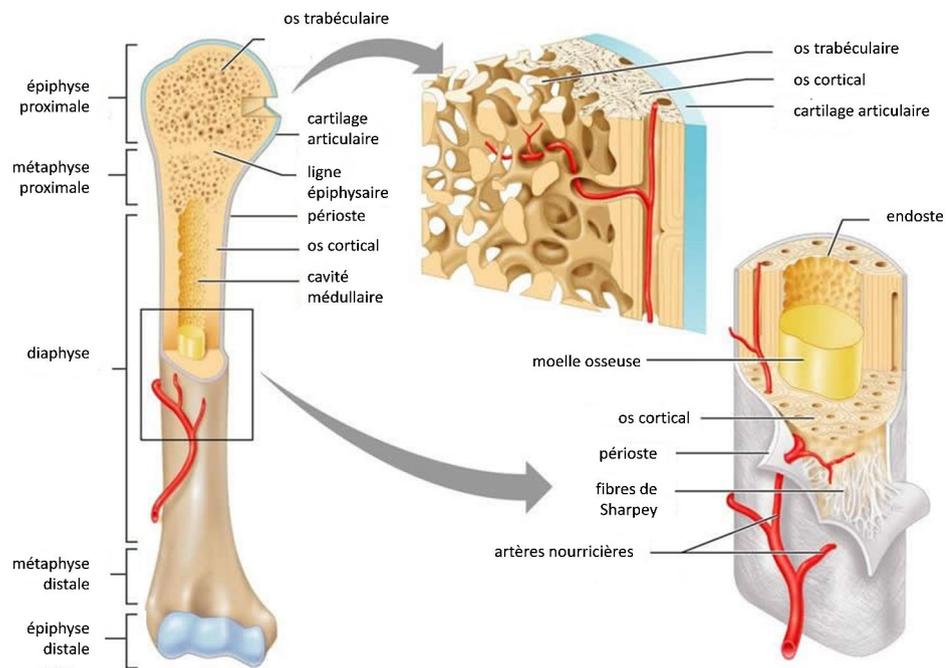


FIGURE I.2 – Organisation anatomique d'un os long.

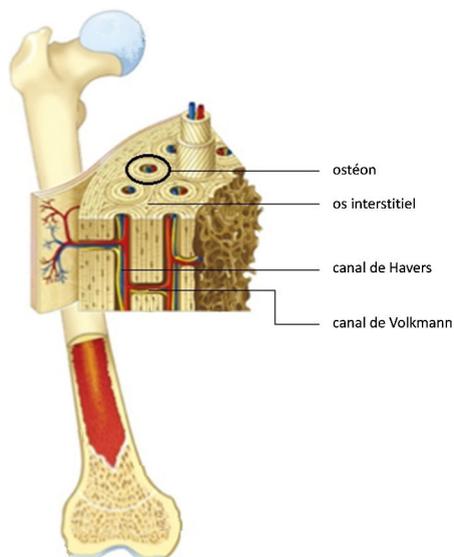


FIGURE I.3 – Représentation d'une coupe d'un os long : structure de l'os cortical.

Un canal central ou **canal de Havers** est présent au centre de l'ostéon. Les canaux de Havers sont reliés perpendiculairement par les **canaux de Volkmann**. Ces différents canaux contiennent des nerfs et des vaisseaux sanguins qui permettent l'apport en nutriments des cellules osseuses.

Autour de ces canaux de Havers, l'os est organisé en lamelles (jusqu'à 30 par ostéon [35] de quelques micromètres de large, dans lesquelles les fibres de collagène ont une orientation particulière qui varie d'une lamelle à l'autre. Entre ces structures ostéonales se trouve le tissu interstitiel composé de morceaux d'ostéons laissés par le remodelage secondaire (Partie 1.4.3, page 13) et l'os primaire non encore renouvelé (Figure I.4). Les canaux de Havers, ainsi que les canaux de Volkmann, vont constituer la majorité de la porosité intracorticale de l'os, les pores « mineurs » étant constitués des lacunes ostéocytaires (Partie 1.3.3, page 9).

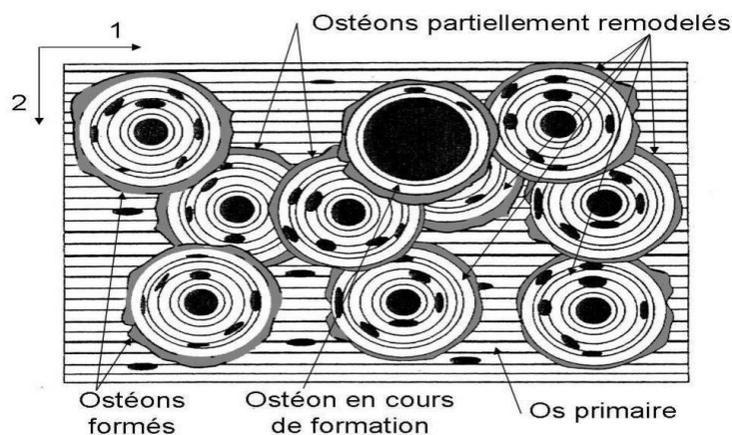


FIGURE I.4 – Schéma de l'os cortical constitué d'os primaire et d'ostéons à plusieurs stades de renouvellement. Extrait de [66].

L'os trabéculaire (ou os spongieux)

Il est composé de travées osseuses et on le trouve plutôt dans les épiphyses et les métaphyses des os longs ou dans les os plats, non porteurs (Figure I.2). Son rôle est principalement homéostatique (maintien de l'équilibre physiologique) mais il permet aussi de diriger les contraintes vers l'os cortical.

Les travées limitent entre elles des cavités qui contiennent de la moelle osseuse. Dans les travées épaisses, on trouve quelques fois des ostéons, mais plus souvent des « paquets » osseux trabéculaire, appelés BSU pour Bone Structural Units, et du tissu interstitiel. Dans les travées moins épaisses, on trouve simplement des lamelles irrégulières, des lacunes et des canalicules contenant des ostéocytes.

Le périoste

Cette membrane externe à l'os est formée de :

- une couche fibreuse externe composée de tissu conjonctif dense¹ ;
- une couche interne ostéogène qui contient des cellules ostéoprogénitrices et des fibres de collagène.

1. Le tissu conjonctif dense est un tissu dont les cellules sont séparées par une matrice extracellulaire. Il est composé de cellules, de substances fondamentales (fibroblastes, protéoglycanes, etc...) et de fibres

Le périoste contribue à l'innervation, à la croissance et à la cicatrisation de l'os.

L'endoste

Il est formé d'une seule membrane qui tapisse la cavité interne de l'os. Il contient des ostéoclastes et des cellules ostéoprogénitrices capables de se transformer en ostéoblastes.

1.3.2 Composition de la matrice osseuse

Le tissu osseux est formé de **cellules osseuses** et d'une **matrice extracellulaire** composée de constituants organiques et inorganiques.

La matrice extracellulaire est composée de (Figure I.5) :

- 60 à 70% d'une phase minérale inorganique composée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite ;
- 20 à 30% d'une phase organique essentiellement constituée de collagène de type I (95%) ;
- 5 à 10% d'eau.

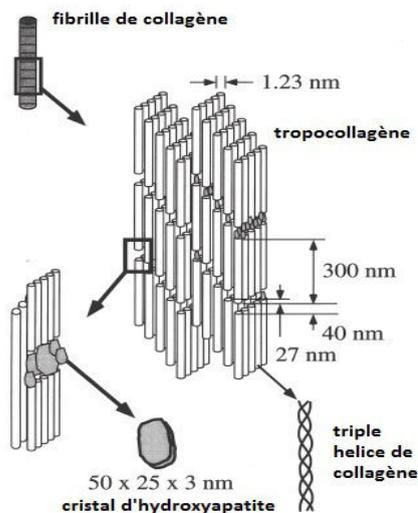


FIGURE I.5 – Représentation de la structure du collagène, arrangement des cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces vides d'après [113].

Phase organique : le collagène de type I

La synthèse du collagène débute par une transcription des gènes et une traduction des ARNm (Acide RiboNucléique messenger) en procollagène. Par la suite, l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques α en procollagène, puis la maturation du procollagène en collagène et l'organisation en fibres va former la matrice organique de l'os cortical.

Ce processus d'assemblage peut se détailler comme suit :

- Etape 1 : Après la transcription, la molécule de procollagène présente trois chaînes polypeptidiques (deux chaînes $\alpha 1$ identiques et une chaîne $\alpha 2$) ;
- Etape 2 : Stabilisation de la structure en une triple hélice stabilisée par des pontages disulfures ;

- Etape 3 : Clivage des extrémités (N-term et C-term) ; le procollagène se transforme en tropocollagène (ou molécule de collagène) ;
- Etape 4 : Les tropocollagènes vont s'assembler pour former une fibrille (50 nm de diamètre, 300 nm de long) ;
- Etape 5 : Les fibrilles de tropocollagène s'agrègent et s'associent entre-elles (par des molécules de pontage) pour former une fibre de collagène (1 à 10 μm de diamètre).

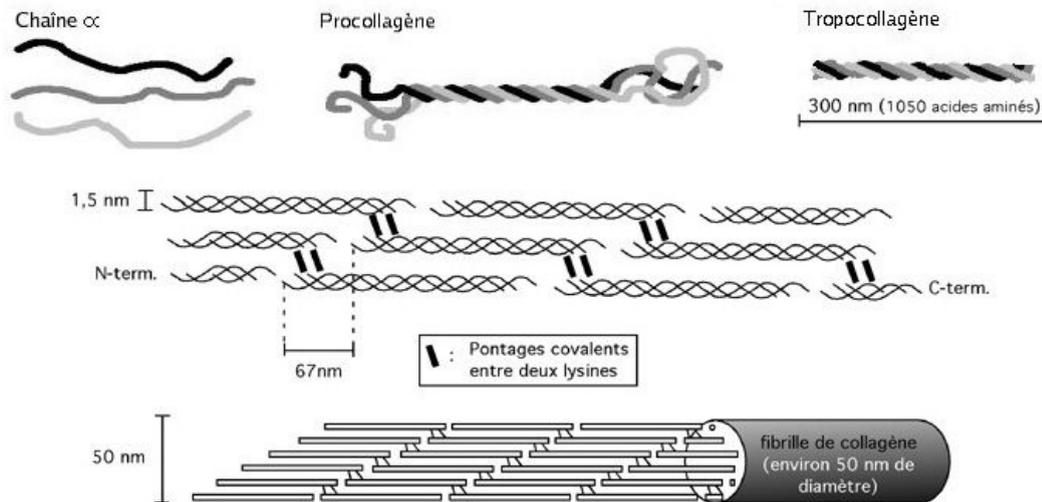


FIGURE I.6 – Représentation de la formation d'une fibrille de collagène.

La fibrille et les molécules de pontage

A l'échelle de la nanostructure et en dessous, les fibrilles sont composées de molécules de collagène en triple hélice avec une périodicité de 67 nm. Elles sont reliées entre-elles par des molécules de pontages (crosslinks) afin de stabiliser les fibres. Les pontages entre les molécules de collagène se font sous l'action d'une enzyme, la lysyl oxydase, entre des résidus lysyl ou hydroxylsyl présents dans les télopeptides N et C terminaux (Figure I.6). On distingue deux types de pontages covalents différents pour la création d'une fibrille : les pontages enzymatiques divalents réductibles immatures et les pontages enzymatiques trivalents matures.

Les molécules intervenant dans les pontages enzymatiques divalents immatures sont la dehydro-dihydroxy-lysino-norleucine, la dehydro-hydroxy-lysino-norleucine et la dehydro-lysino-norleucine. Elles peuvent être quantifiées sous leurs formes réduites respectives dihydroxy-lysino-norleucine (DHLNL), hydroxy-lysino-norleucine (HLNL) et lysino-norleucine. Ces pontages enzymatiques divalents immatures se transforment spontanément en pontages enzymatiques trivalents plus stables que sont la pyridinoline (PYD), le deoxypyridinoline (DPD) et le pyrrole (Figure I.7).

Phase inorganique : substance minérale

La fraction minérale se présente sous la forme de cristaux, de structure semblable à celle de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ces cristaux sont plats et de tailles variables (50x25x3 nm en moyenne, Figure I.5) et remplissent l'espace qui sépare les fibrilles (Figure

Molécules de pontage

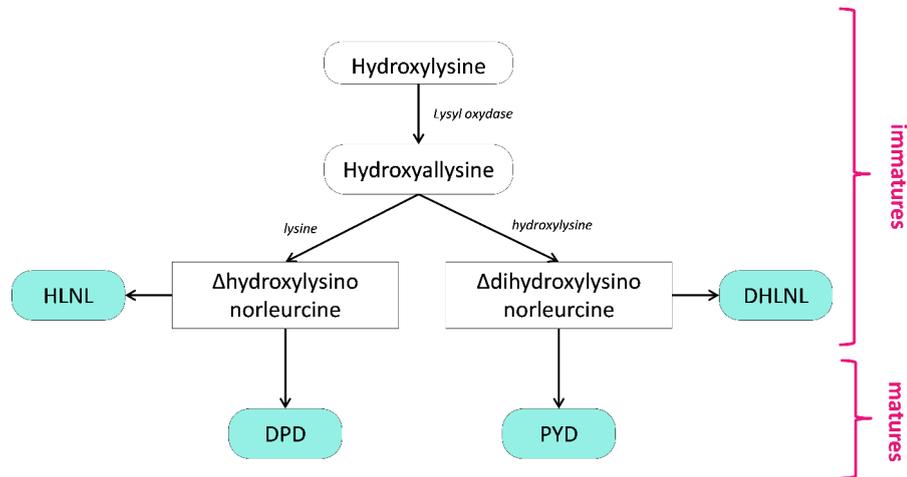


FIGURE I.7 – Les différentes molécules de pontage.

I.5). Ces cristaux s'élargissent au cours du temps : la maturité de ces cristaux implique que leur taille augmente à cause des substitutions en ions, par exemple un ion carbonate (CO_3^{2-}) peut prendre la place d'un ion phosphate (PO_4^{3-}), ce qui rend le réseau moins stable puisque les apatites carbonatés se dissolvent plus facilement [119]. Ainsi ces changements auront des effets sur les propriétés mécaniques du tissu osseux.

1.3.3 Cellules osseuses

On distingue quatre catégories de cellules osseuses : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les cellules ostéoprogénitrices.

Les **ostéoblastes** sécrètent la matrice extracellulaire des os (matière ostéoïde). Ils sont responsables de la calcification de cette matrice. Lorsque la matrice osseuse entoure les ostéoblastes, ils se retrouvent emmurés et se transforment en ostéocytes.

Les **ostéoclastes** sont de grosses cellules multinucléées. Ils sécrètent des enzymes et des acides organiques qui dégradent la matière osseuse et créent les surfaces de résorption.

Les **ostéocytes** sont responsables du maintien de la matrice osseuse (équilibre homéostatique du calcium sanguin), et sont considérés comme des cellules mécanosenseurs (ie, répondant à un stimulus mécanique).

Les **cellules ostéoprogénitrices** sont des cellules souches dérivées du mésenchyme². Elles peuvent se différencier pour former des ostéoblastes.

1.4 Processus de développement : l'ostéogénèse

Le processus par lequel les os se forment est appelé **ossification**. La formation de l'os se produit dans quatre situations principales :

- la formation initiale des os dans l'embryon et le fœtus ;

2. Le mésenchyme désigne un tissu de soutien embryonnaire à l'origine de diverses formes de ces tissus chez l'adulte.

- la croissance des os pendant l'enfance et l'adolescence jusqu'à ce qu'ils atteignent leur taille adulte ;
- le remaniement osseux (renouvellement du tissu osseux tout au long de la vie) ;
- la consolidation des fractures.

1.4.1 Formation initiale des os dans l'embryon et le fœtus

Le « squelette » de l'embryon est d'abord composé de mésenchyme dont la forme ressemble à celle des os et dans lequel a lieu l'ossification. Ces « os » servent de base à l'ossification, qui commence au cours de la sixième semaine du développement foetal et peut se dérouler de deux façons.

Les deux modes d'ossification *in utero*, qui visent tous deux le remplacement du tissu conjonctif existant par de l'os, produisent la même structure dans les os adultes ; seul le processus de formation est différent. Dans un premier mode, appelé **ossification endomembraneuse**, la formation des os s'effectue directement à l'intérieur du mésenchyme disposé en minces couches ressemblant à des membranes fibreuses. Dans le second mode, appelé **ossification endochondrale** (*khondros* : cartilage), la formation des os s'effectue à l'intérieur du cartilage hyalin formé à partir du mésenchyme.

L'ossification endomembraneuse

C'est le plus simple des deux processus. Elle assure le remplacement direct du mésenchyme par de l'**os compact**. Les quatre stades du processus sont les suivants (Figure I.8) :

1. **La formation du centre d'ossification.** Au siège de formation de l'os, appelé *centre d'ossification* ou *point d'ossification*, et sous l'influence de messagers chimiques précis, les cellules mésenchymateuses se regroupent et se différencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent une matrice extracellulaire organique non minéralisée appelée *tissu ostéoïde*.
2. **La calcification.** Ensuite, la sécrétion de matière ostéoïde cesse. Du calcium et des sels minéraux se déposent, la matière ostéoïde durcit et se minéralise.
3. **La formation des trabécules osseuses.** A mesure que la matrice extracellulaire se forme, les centres d'ossification adjacents fusionnent et finissent par constituer des trabécules osseuses, puis du tissu spongieux. Des vaisseaux sanguins se forment dans les espaces séparant les trabécules. Le tissu conjonctif associé aux vaisseaux sanguins se différencie en moelle osseuse rouge.
4. **La formation du périoste.** Sur la face externe de l'os, le mésenchyme se condense et se différencie en périoste. Les couches superficielles de tissu spongieux sont remplacées par une mince couche de tissu compact. Le tissu spongieux reste présent au centre. La majeure partie de l'os nouvellement formé est remaniée au cours d'une transformation qui donnera un os de forme et de taille adultes.

L'ossification endochondrale

Elle assure le remplacement du cartilage en **tissu osseux spongieux**. C'est l'ossification de tous les os longs (diaphyse et épiphyse), des vertèbres et d'une grande partie de la base du crâne. Les six étapes d'ossification sont les suivantes (Figure I.9) :

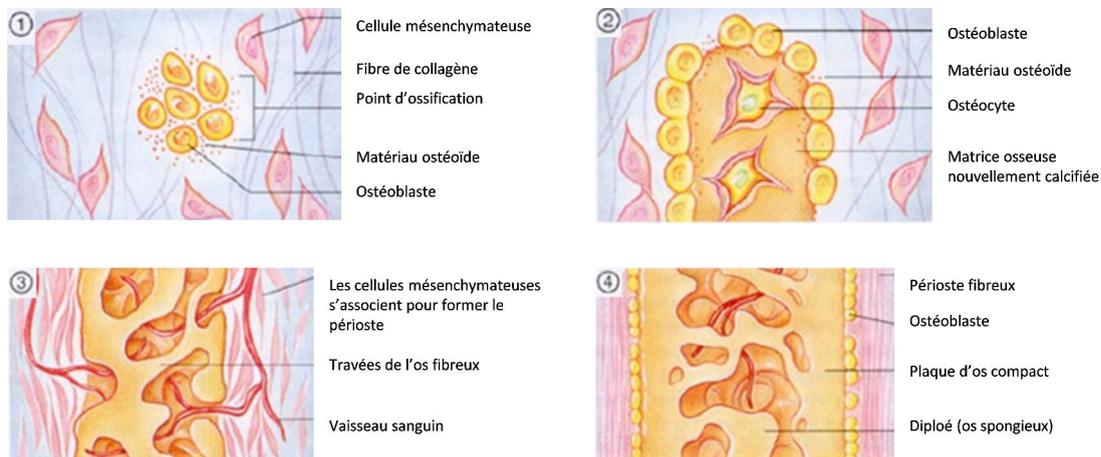


FIGURE I.8 – Représentation des étapes de l'ossification endomembraneuse.

1. **La formation du modèle du cartilage.** Au siège de la formation de l'os, les cellules mésenchymateuses s'assemblent et se différencient en chondroblastes, qui sécrètent une matrice extracellulaire composée de cartilage hyalin solide. Cette matrice adopte la forme de l'os à constituer (une diaphyse et deux épiphyses) en produisant un *modèle de cartilage*. Dans le même temps, une membrane appelée périchondre croît et recouvre le modèle de cartilage.
2. **La croissance du modèle du cartilage.** Lorsque les chondroblastes sont profondément enfouis dans la matrice extracellulaire, ils deviennent des chondrocytes. À mesure que le modèle de cartilage croît, les chondrocytes de la région médiane s'hypertrophient et sécrètent de la phosphatase alcaline qui calcifie la matrice cartilagineuse voisine. Celle-ci devient imperméable à la diffusion de nutriments. Les chondrocytes meurent, et la matrice qu'ils entretenaient commence à se désintégrer. Des lacunes se forment et se fusionnent pour former des cavités.
3. **La formation du centre d'ossification primaire.** Une artère nourricière pénètre dans la région médiane du modèle, traversant le périchondre et s'introduisant dans le cartilage en voie de calcification.
 Dans la diaphyse, les cellules ostéoprogénitrices se différencient en ostéoblastes. Le périchondre produit de la matière osseuse ; il est alors appelé *périoste*. Une fine couche de tissu osseux se forme à la surface de la diaphyse, ce qui forme un *collet osseux*.
 Des vaisseaux sanguins s'étendent à l'intérieur du cartilage calcifié, et des cellules mésenchymateuses colonisent les cavités laissées libres par les chondrocytes morts (étape précédente). Il apparaît alors un *centre d'ossification primaire*, dans lequel le tissu osseux remplacera presque tout le cartilage d'origine.
 Près du centre du modèle de cartilage, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et en cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les ostéoblastes commencent à déposer la matrice extracellulaire osseuse sur les vestiges de cartilage calcifié pour former des trabécules de tissu osseux spongieux.
4. **La formation de la cavité médullaire.** À mesure que le centre d'ossification primaire grossit en direction des extrémités de l'os, des ostéoclastes dégradent les trabécules de tissu osseux spongieux nouvellement formées. À la fin du processus, il ne reste qu'une cavité, appelée *cavité médullaire*, dans la diaphyse. La plus grande

partie de la paroi de la diaphyse est remplacée par le tissu osseux compact.

5. **La formation des centres d'ossification secondaires.** Lorsque des vaisseaux sanguins pénètrent dans les épiphyses, des centres d'ossification secondaires y apparaissent. La formation des os s'effectue ici de la même façon que dans le centre d'ossification primaire, sauf que le tissu osseux spongieux demeure à l'intérieur des épiphyses.
6. **La formation du cartilage articulaire et de la plaque épiphysaire.** Le cartilage hyalin qui recouvre les épiphyses se transforme en cartilage articulaire. avant l'âge adulte, il reste une portion du cartilage hyalin original du modèle de cartilage entre la diaphyse et chacune des épiphyses. Ce cartilage constitue la *plaque épiphysaire* à partir de laquelle la croissance en longueur des os est possible.

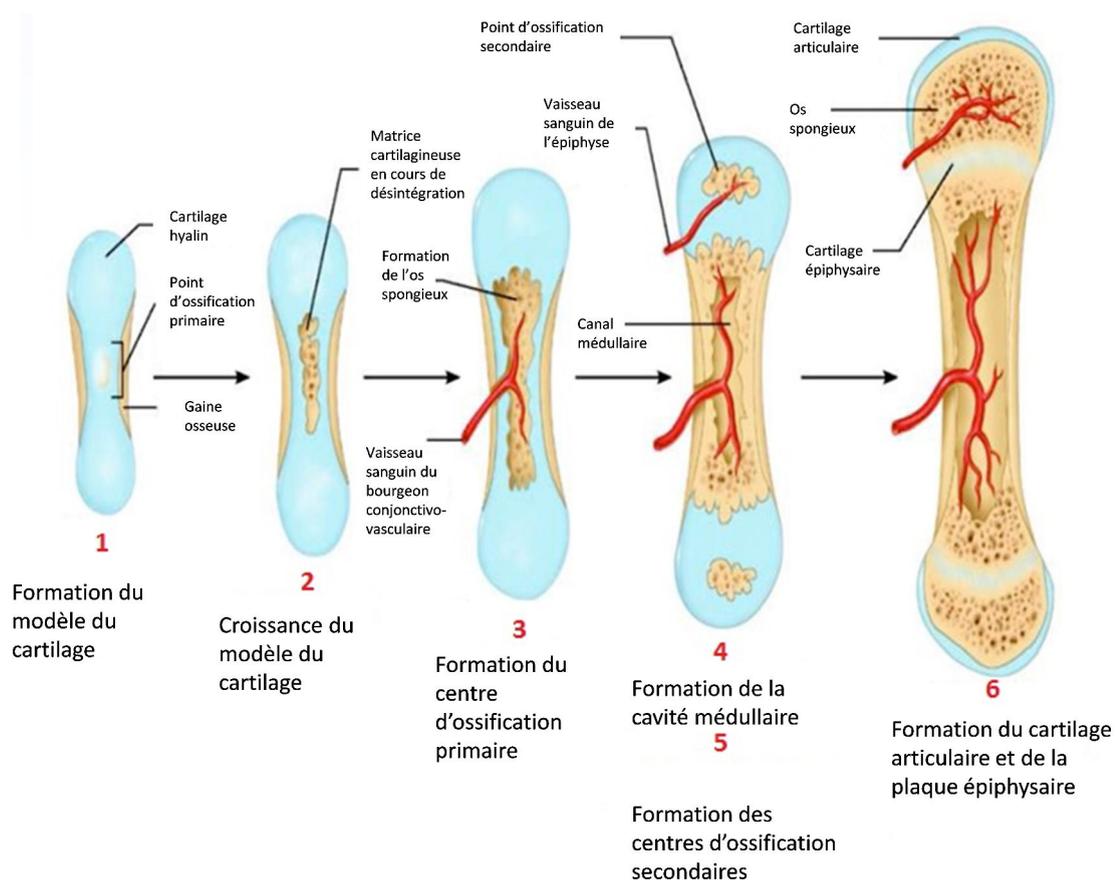


FIGURE I.9 – Représentation des étapes de l'ossification endochondrale.

1.4.2 Croissance des os en longueur et en épaisseur

Durant l'enfance et l'adolescence, les os s'allongent et s'épaississent.

La croissance des os en longueur

Elle est liée à l'activité de la plaque épiphysaire. En effet, celle-ci contient un groupe de jeunes chondrocytes qui se divisent constamment. A mesure que l'os croît, de nouveaux chondrocytes se forment du côté épiphysaire de la plaque, et de la matière osseuse recouvre

les anciens chondrocytes du côté diaphysaire. L'épaisseur de la plaque reste ainsi relativement constante, même si l'os du côté diaphysaire s'allonge.

A la fin de l'adolescence, la formation de nouvelles cellules et de matrice cellulaire diminue. Elle finit par cesser entièrement entre 18 et 25 ans. A ce stade, le tissu osseux remplace tout le cartilage pour faire place à un nouveau tissu osseux appelé *ligne épiphysaire*. L'apparition de la ligne épiphysaire marque l'arrêt de la croissance en longueur de l'os.

Lorsqu'une fracture endommage la plaque épiphysaire, l'os fracturé risque d'être plus court que la normale lorsqu'il atteindra sa taille adulte. En effet, la lésion du cartilage, qui est avasculaire, dans la plaque épiphysaire précipite la fermeture de cette dernière et inhibe la croissance en longueur de l'os.

La croissance en épaisseur des os

Elle débute par une différenciation des cellules du périchondre en ostéoblastes à la surface des os, lesquels sécrètent la matrice extracellulaire osseuse. Les ostéoblastes se transforment ensuite en ostéocytes, des lamelles circonférentielles s'ajoutent à la surface de l'os et de nouveaux ostéons de tissu osseux compact se forment. Au même moment, les ostéoclastes de l'endoste détruisent le tissu osseux de la cavité médullaire. La cavité s'agrandit donc à mesure que le diamètre de l'os augmente. La destruction osseuse à l'intérieur de l'os par les ostéoclastes se produit un peu plus lentement que la formation.

1.4.3 Remodelage osseux

Les os commencent à se former avant la naissance et continuent de se renouveler par la suite. Le remaniement osseux, ou remodelage osseux, est un processus continu par lequel du nouveau tissu remplace l'ancien. Ce processus comprend d'une part la **résorption osseuse** (soit la destruction par les ostéoclastes des fibres de collagène de l'os et la libération des minéraux qui s'y trouvent), et d'autre part le **dépôt de matière osseuse** (ajout par les ostéoblastes de minéraux et de fibres de collagène). La résorption mène à la destruction de la matrice extracellulaire osseuse, tandis que le dépôt permet de la reconstruire. Même lorsque les os ont atteint leur taille et leur forme adultes, l'ancienne matière osseuse continue d'être remplacée par de la nouvelle.

Le remaniement osseux permet également d'éliminer les parties lésées d'un os. Il peut être déclenché par divers facteurs tels que l'exercice physique, la sédentarité ou un changement dans l'alimentation.

Pour que l'homéostasie osseuse soit maintenue, les activités de résorption des ostéoclastes et les activités de reconstitution des ostéoblastes doivent s'équilibrer.

1.4.4 Fractures

Une fracture est une rupture de la continuité d'un os. Une fracture peut être partielle ou complète et ouverte ou fermée.

- La fracture partielle : l'os est fracturé de manière incomplète comme dans le cas d'un fêlure ;
- La fracture complète : l'os est complètement fractionné en deux ou plusieurs morceaux ;
- La fracture fermée : l'os fracturé ne déchire pas la peau ;
- La fracture ouverte : les bouts d'os cassés percent la peau.

La consolidation d'une fracture se fait en plusieurs étapes. Il y a tout d'abord la formation d'un hématome (6 à 8 heures suivant la cassure). Puis les phagocytes issus de la circulation sanguine migrent vers l'hématome et, avec des ostéoclastes, commencent à retirer le tissu mort ou endommagé (J1 à J20). Ensuite, des cellules issues du périoste se transforment en chondroblastes et commencent à produire du cartilage fibreux à l'emplacement de la fracture. Ces étapes mènent donc à la formation d'un **cal fibrocartilagineux** (J20 à J30).

Ce cartilage fibreux est ensuite transformé en tissu osseux spongieux ; il est alors appelé **cal osseux** (J30 à J40).

L'étape finale de la consolidation d'une fracture est le remaniement du cal. Les sections mortes des fragments d'os fracturés sont graduellement résorbées par les ostéoclastes. Le tissu osseux compact remplace le tissu spongieux à la périphérie de la fracture.

1.5 Conclusion

Cette partie descriptive a permis de mettre en avant la composition très hiérarchisée de l'os :

- Ce matériau composite peut être décrit à l'échelle de la macrostructure pour différencier l'os cortical de l'os trabéculaire ; mais aussi, à l'échelle de la subnanostructure pour différencier la fraction organique de la fraction minérale.
- Au niveau de la subnanostructure, la stabilisation des molécules de collagène se fait par des pontages enzymatiques immatures (DHLNL et HLNL) ou matures (PYD et DPD).
- La minéralisation de cette fraction organique collagénique correspond au dépôt de cristaux d'hydroxyapatite constituant ainsi la fraction minérale de la matrice osseuse.

On constate que l'os est un matériau complexe qui, de part cette organisation multi-échelles, a des propriétés anisotropes et hétérogènes qui dépendront donc de l'orientation et du site anatomique. Cette hétérogénéité est renforcée par le fait que l'os est un matériau vivant en perpétuels adaptation et renouvellement. Cette adaptation/régénération osseuse se fait par l'intermédiaire de processus appelés modelage/remodelage osseux. L'os se renouvelle périodiquement (*bone turnover*), on estime en moyenne que la totalité de notre squelette est renouvelée tous les 10 ans, l'os cortical aurait une durée de vie de 20 ans contre 1 à 4 ans seulement pour l'os trabéculaire [35].

2 Caractérisation tissulaire de l'os cortical

2.1 Introduction

Les propriétés mécaniques du matériau osseux sont dépendantes des quantités relatives de ses constituants principaux : des matières organiques, du minéral, de l'eau et du vide ; de la qualité de ces composants ; et de la façon dont le matériau résultant est disposé dans l'espace (i.e., architecture) [40]. Lorsque l'on veut caractériser le tissu osseux, il est donc important d'étudier ces paramètres pour chaque composant.

2.2 La densité minérale osseuse

La densité minérale osseuse ou BMD (Bone Mineral Density) est définie comme la densité de minéral (majoritairement d'hydroxyapatite) dans l'os. Ici, l'os est considéré comme un organe et non comme un tissu. Ainsi, lors de la détermination de la densité minérale osseuse, les pores et la cavité médullaire sont pris en compte.

On distingue la densité minérale osseuse surfacique (aBMD, en g cm^{-2}) de la densité minérale osseuse volumique (vBMD, g cm^{-3}) ; la aBMD étant une projection dans le plan d'une densité volumique.

De nombreuses techniques absorptiométriques ont été développées pour la mesure de la densité minérale osseuse. Ces méthodes s'effectuent sur de nombreux sites anatomiques (radius, calcanéums, vertèbres, fémur).

2.2.1 L'Absorptiométrie

Les techniques absorptiométriques sont fondées sur la mesure de l'atténuation d'un rayonnement X ou γ . Un faisceau monochromatique de N_0 photons traversant un matériau homogène d'épaisseur e , subit une atténuation due aux différentes interactions entre les photons et la matière. Cette atténuation est régie par la loi suivante :

$$N = N_0 \exp(-\mu e) = N_0 \exp\left(-\frac{\mu}{\rho} \rho e\right)$$

avec :

- N : le nombre de photons ayant traversé l'épaisseur e de matière sans subir d'interaction,
- $\frac{\mu}{\rho}$: le coefficient massique d'atténuation du milieu pour une énergie donnée.

Absorptiométrie radiographique

L'absorptiométrie radiographique appelée aussi photodensitométrie, est la plus ancienne des techniques utilisées cliniquement pour la mesure de la masse minérale osseuse. Elle est classiquement réalisée sur les phalanges. La masse minérale est calibrée par des clichés de cales d'aluminium et la BMD est mesurée sur une ou plusieurs phalanges à partir d'une radiographie conventionnelle de la main [58].

Absorptiométrie en simple énergie

L'absorptiométrie avec une énergie de photon unique (Single Photon Absorptiometry, SPA) puis l'absorptiométrie avec une énergie de rayons X unique (Single X-ray Absorptiometry, SXA) permettent de mesurer la masse minérale osseuse sur des sites présentant une épaisseur de tissus mous constante et faible, tel que le calcanéum et le radius [58]. Les résultats sont présentés sous la forme de valeurs de contenu minéral osseux (BMC - Bone Minéral

Content, en g), et de densité minérale osseuse surfacique (aBMD - areal Bone Mineral Density, en g cm^{-2}).

Absorptiométrie en double énergie

L'absorptiométrie à double énergie de rayon X (Dual X-ray Absorpsiometry, DXA) permet de mesurer le contenu minéral osseux sur des sites dont l'épaisseur des tissus mous varie, tels la colonne lombaire, le fémur proximal ou bien le corps entier, mais les sites périphériques peuvent aussi être imagés. En effet, la double mesure d'atténuation réalisée par un détecteur haute énergie et un détecteur basse énergie permet d'évaluer l'épaisseur des tissus mous et ainsi de les différencier de l'os [58]. La DXA est la technique la plus répandue pour l'évaluation de la densité minérale osseuse en examen clinique et pour des études épidémiologiques. Cependant, les techniques d'absorptiométrie permettent seulement d'obtenir une projection de la répartition de la densité minérale osseuse globale moyenne sans dissocier l'os cortical de l'os spongieux. Grâce à cette technique, il a été déterminé que la BMD s'accroît pendant l'enfance, connaît un gain important à la puberté, puis atteint le PMO (Pic de Masse Osseuse) entre 18 et 20 ans chez les femmes et entre 18 et 23 ans chez les hommes [17, 25]. Cette BMD est également fortement reliée aux propriétés mécaniques de l'os [12, 45].

2.2.2 La Tomodensitométrie

La tomodensitométrie, ou tomographie quantitative (Quantitative Computed Tomography, QCT), utilise une source de rayons X décrivant une rotation autour du patient (tomographe de type scanner). Pour chaque position du faisceau, l'atténuation du rayonnement est mesurée.

Ceci permet de déterminer, en chaque point de la zone étudiée, le coefficient linéique d'atténuation lié à la densité et au numéro atomique du matériau présent en ce point. En utilisant des étalons présentant une composition identique à celle de l'os, la densité peut donc être estimée point par point. Cette technique permet ainsi de mesurer de façon sélective la densité de l'os spongieux ou de l'os cortical [58].

Après calibration, une analyse des images (coupes) obtenues permet de remonter à la densité minérale osseuse volumique en g cm^{-3} . Néanmoins, la finesse de la mesure (résolution de l'image) va influencer la précision des résultats.

2.2.3 Les données chez l'humain

Les données de densité minérale osseuse varient en fonction du type de patients, de la région osseuse et de la méthode utilisée (Table I.1).

Références	Site	Age	BMD (g cm^{-3})
Wachter et al. [137]	Col du fémur (cortical)	56-88 ans	$1,215 \pm 0,101$
Mayhew et al. [92]	Col du fémur	63-89 ans	$0,597 \pm 0,02$
Revilla et al. [111]	Ulna (cortical)	$32,9 \pm 10,0$ ans	$0,513 \pm 0,098$
	Ulna (spongieux)		$0,154 \pm 0,05$

TABLE I.1 – Valeurs de BMD obtenues par QCT pour l'os cortical chez l'adulte.

2.3 La densité minérale du tissu osseux

La densité minérale du tissu osseux ou TMD (Tissue Mineral Density) est définie comme la quantité de minéral par unité de volume de tissu osseux (en g cm^{-3}) [23]. La TMD est une propriété matérielle qui considère l'os comme un matériau et non comme un organe. Ainsi, contrairement à la BMD, les pores ne sont pas pris en compte lors du calcul de la densité minérale, et la densité osseuse calculée reflète le degré de minéralisation. C'est également une mesure considérée 3D.

La TMD peut avoir différentes appellations dans la littérature et selon les techniques utilisées : DMB (*Degree of Mineralization of Bone* - Degré de minéralisation osseux) pour la microradiographie ou TMDD (*Tissue Mineral Density Distribution* - Distribution de la densité minérale du tissu osseux) pour le BEI.

Selon les modalités d'imagerie, les valeurs de TMD peuvent varier. En effet, la résolution de l'appareil de mesure joue un rôle clé dans la détermination de ce qui sera considéré comme "os" ou "vide".

2.3.1 La Microtomographie

Cette technique utilise le même principe que la tomодensitométrie mais à une résolution plus basse (taille du voxel = 8-19 μm contre $\cong 82 \mu\text{m}$ en HR-pQCT³).

2.3.2 La Microradiographie

La microradiographie est une radiographie réalisée sur des sections d'os inclus de 100 μm d'épaisseur [23]. Les rayons X utilisés sont des rayons mous (longueur d'onde = 1.54 Å), produit par une anode en cuivre et un filtrage nickel, produisant un faisceau quasi-monochromatique. Les microradiographies donnent la répartition des degrés de minéralisation en niveau de gris. Les unités structurales élémentaires (USE) les moins minéralisées, étant radio-translucides, apparaissent en gris foncé ; ce sont les USE les plus récemment formées et dont la minéralisation primaire vient de s'achever. Les unités structurales élémentaires complètement minéralisées apparaissent en blanc. Les niveaux de gris intermédiaires correspondent à des USE dont la minéralisation secondaire est en cours [94]. Pour l'évaluation quantitative des différents degrés de minéralisation, un étalon d'aluminium, d'épaisseur variable en escalier, est imagé simultanément sous le même faisceau de rayons X, permettant de transcrire les niveaux de gris en gramme de minéral par cm^3 .

La microradiographie repose sur le principe d'absorption des rayons X par la matière en fonction du poids atomique et de la quantité d'éléments constituant le matériau traversé par le rayonnement. Les rayons X traversent l'échantillon et forment une image sur un détecteur numérique (Figure I.10). L'image ainsi formée représente le taux d'absorption des différentes régions de l'échantillon. La diminution de l'intensité du faisceau de rayons X, lorsque celui-ci traverse l'échantillon, répond à la loi d'absorption de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp\left(\frac{\mu(E, \rho, Z) \cdot \rho \cdot d}{\rho}\right)$$

Avec :

- I_0 : l'intensité du flux incident ;
- I : l'intensité du flux transmis ;

3. HR-pQCT : High Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography - Tomographie périphérique à haute résolution

- μ : le coefficient d'atténuation linéique ;
- d : l'épaisseur traversée ;
- ρ : la masse volumique.

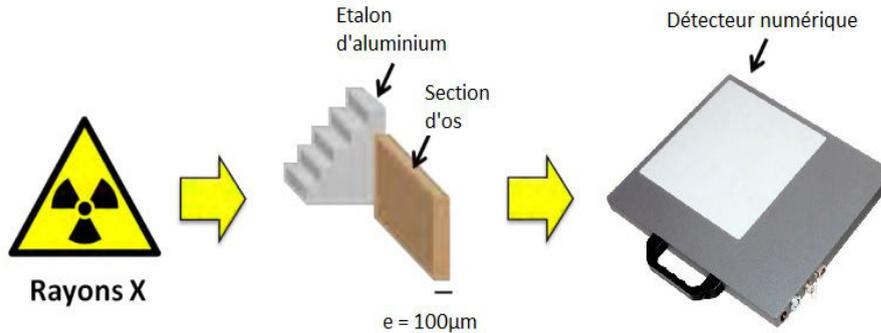


FIGURE I.10 – Illustration du principe de la microradiographie quantitative. Les rayons X traversent la section de tissu osseux à mesurer.

Du fait de sa composition hétérogène, le tissu osseux absorbe différemment les rayons X. Les radiations transmises présentent donc des variations d'intensité qui sont enregistrées par le détecteur. Lorsque la longueur d'onde est comprise entre 0,5 et 3 Å, le coefficient massique de l'apatite est environ 10 fois supérieur à celui de l'eau ou des protéines. Les variations d'absorption observées dans cette gamme de longueur d'onde sont donc essentiellement causées par les composants minéraux du tissu osseux (Figure I.11).

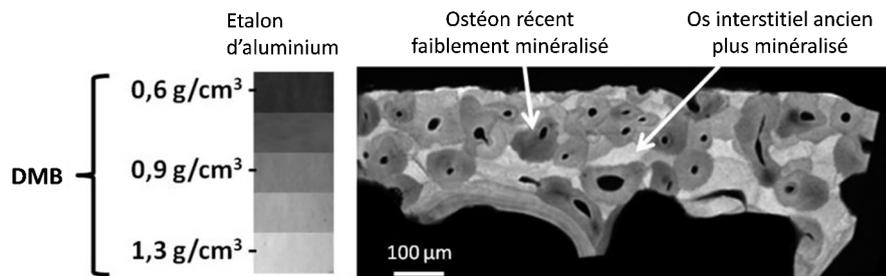


FIGURE I.11 – Exemple d'acquisition obtenue par microradiographie quantitative. L'étalon d'aluminium permet d'établir une relation entre le niveau de gris de l'image et le degré de minéralisation, ou DMB (en g cm⁻³), les zones les plus sombres de la microradiographie sont les moins minéralisées, les plus claires sont les plus minéralisées.

Chez l'Homme adulte, la DMB moyenne se situe entre 0.9 et 1.44 g cm⁻³. Chez les sujets masculins, la DMB moyenne augmente jusqu'à 40 ans et reste stable jusqu'à 60 ans avant de décroître lentement. Chez la femme, l'augmentation de la DMB moyenne existe jusqu'à 40 ans, suivi directement d'une diminution [22, 94].

2.3.3 Le Backscattered Electron Imaging

La technique du Backscattered Electron Imaging, ou BEI, utilisée dans la microscopie à balayage électronique est basée sur la détection des électrons renvoyés par la surface de l'échantillon. La relation entre le signal du BEI, illustré par les niveaux de gris de l'image obtenue, et la concentration en minéraux de l'échantillon est relativement complexe. En théorie, la fraction d'électrons renvoyée est proportionnelle au numéro atomique de l'élément constituant l'échantillon, mais, dans le cas d'un échantillon composite, le niveau de gris est lié à un numéro atomique moyen.

Pour l'os, le calcium ayant le numéro atomique le plus élevé parmi les constituants principaux, son influence sur le signal est dominante. Les unités structurales élémentaires (USE) les moins minéralisées apparaissent ainsi en noir et les plus minéralisées en blanc.

L'évaluation quantitative de la concentration en minéraux par BEI reste difficile. C'est pourquoi cette technique est essentiellement qualitative et permet de visualiser l'hétérogénéité des degrés de minéralisation de l'os, mettant ainsi en évidence les différentes zones de formation osseuse.

2.4 Autres paramètres tissulaires

2.4.1 La Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIRM) repose sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Le spectre infrarouge obtenu représente l'intensité de l'absorption (ou absorbance) en fonction de l'énergie ou nombre d'onde (cm^{-1}).

Les paramètres mesurés sur chaque spectre sont :

- la maturité minérale ;
- l'index de cristallinité minérale ;
- l'index de minéralisation ;
- la carbonatation ;
- la maturité du collagène.

Cette technique est détaillée dans le Chapitre II.

2.4.2 Dosage du collagène et des molécules de pontage par HPLC

Le dosage des molécules de pontage peut être effectué par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* - Chromatographie liquide à haute performance). Cette technique permet de doser le collagène par quantification de l'hydroxyproline (OHP), un de ses acides aminés majeurs. Elle permet également l'évaluation des principales molécules de pontages enzymatiques (DHLNL, HLNL, PYD et DPD) présents dans le collagène [59, 120].

La concentration des molécules de pontage enzymatiques a été étudiée sur des échantillons osseux de donneurs humains âgés de 1 mois à 80 ans [51]. Il a été montré que la concentration des molécules de pontages immatures diminuait de manière régulière jusqu'à l'âge adulte puis se stabilisait et qu'à l'inverse, la concentration des molécules de pontages enzymatiques matures augmentait durant le jeune âge avant de se stabiliser également à l'âge adulte [51, 120].

2.5 Conclusion

Lorsque l'on veut caractériser le tissu osseux, il est nécessaire de s'intéresser à ses deux constituants principaux : le minéral (cristaux d'apatite) et la matière organique (principalement collagène de type I). Ces composés peuvent être analysés grâce à divers outils et méthodes (Figure I.12).

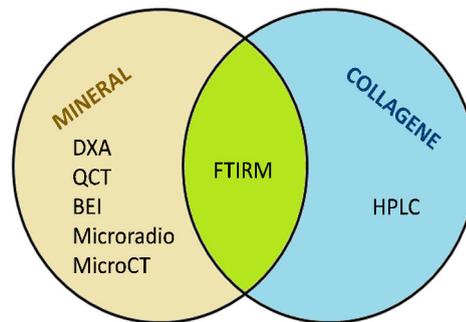


FIGURE I.12 – Différentes méthodes de caractérisation de la composition du tissu osseux.

Les relations entre la densité minérale osseuse et le comportement mécanique de l'os ont largement été étudiées [6, 56]. Chez l'adulte, la qualité de l'os est couramment évaluée par des mesures de densités minérales osseuses qui reflètent à la fois la quantité de minéral dans l'os (BMD), mais aussi son degré de minéralisation (TMD ou DMB).

De même, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'influence du collagène [6, 138, 149] et des molécules de pontages [103, 120] dans les propriétés mécaniques de l'os. Dans l'étude de Bala [6], l'analyse a montré des corrélations entre l'âge de la matrice collagénique (maturité du collagène) et des paramètres mécaniques (module d'élasticité et dureté).

3 Caractérisation mécanique de l'os cortical

3.1 Introduction

L'évaluation du comportement mécanique de l'os apparait essentielle pour l'améliorer la connaissance de ses propriétés dans plusieurs domaines cliniques comme l'orthopédie pour l'évaluation de la cicatrisation osseuse ou la radiologie pour la détection de fracture. De plus, le développement de méthodes numériques servant à modéliser et à simuler le comportement mécanique nécessite de bien connaître les propriétés des matériaux.

A la vue des connaissances actuelles, l'os cortical apparait comme un matériau complexe : sa structure composite (phase minérale et phase organique) et multi-échelle lui confère des propriétés élasto-plastiques et un comportement anisotrope. Il existe de nombreuses techniques de détermination des lois de comportement d'un matériau dont chacune dépend de l'échelle et des paramètres étudiés mais également de la préparation des échantillons osseux et des conditions d'essais.

Ainsi, pour les travaux de cette thèse, plusieurs méthodes de caractérisation mécanique ont été utilisées. Nous avons choisi d'effectuer :

- des essais de compression jusqu'à rupture. Ceci permet l'obtention du module d'élasticité et de la contrainte à rupture. Cet essai donne des informations sur les propriétés élasto-plastique de l'os à l'échelle macroscopique.
- des essais via les ondes ultrasonores. Ce test non-destructif permet l'obtention des coefficients d'élasticité dans les trois axes principaux de l'os et donc d'étudier le comportement anisotrope de l'os.
- des essais de nanoindentation instrumentée. Ceci permet l'obtention du module d'élasticité, de la dureté et du travail plastique. Cet essai donne des informations sur les propriétés élasto-plastiques de l'os à l'échelle du tissu.

Dans cette partie, nous nous intéresserons tout d'abord aux précautions à prendre quant à la préparation des échantillons osseux et aux conditions dans lesquelles les essais mécaniques doivent être conduits. Dans un second temps, nous détaillerons les méthodes de caractérisation mécanique énoncées ci-dessus. Enfin, nous donnerons un résumé de valeurs de la littérature sur l'os humain pour chacun de ces essais.

3.2 Préparation d'échantillons osseux pour un essai mécanique

L'os est un matériau biologique complexe. Ses propriétés dépendent du milieu physiologique dans lequel il se trouve. Pour recréer les conditions de fonctionnement *in vivo*, certaines précautions sont à prendre pendant la préparation et lors de la conservation des échantillons d'os.

3.2.1 Conservation

Il est important qu'entre le moment du prélèvement et celui des mesures, les propriétés mécaniques de l'os soient préservées au mieux afin que les résultats obtenus *in vitro* soient aussi fidèles que possible à la réalité *in vivo*. Pour cela, plusieurs méthodes de conservation ont été testées dans la littérature sur le tissu osseux : la conservation dans l'éthanol, la fixation, l'inclusion et la congélation.

Fixation et inclusion

D'après Linde and Sorensen [87], la conservation d'un échantillon d'os spongieux dans de

l'éthanol n'entraîne pas de modifications significatives des propriétés mécaniques apparentes de l'os spongieux mesurées par chargement quasi-statique, et ceci jusqu'à une durée de 100 jours. De même, Currey et al. [42] ont montré que la fixation d'échantillons au formaldéhyde n'affectait que très peu les propriétés mécaniques quasi-statiques apparentes de l'os de bovin mais qu'elle conduisait à une diminution de ses propriétés dans le cas d'essais dynamiques.

D'autres études ont montré que la fixation n'était pas appropriée avant essai mécanique puisque celle-ci entraîne une dégradation dans la structure de la matrice organique (cross-linkage) ce qui conduit à une altération des propriétés mécaniques [42, 103, 140].

A l'échelle tissulaire, la déshydratation dans l'alcool augmente significativement les propriétés mécaniques (augmentation de 10 % de la dureté de contact et de 15 à 20% du module élastique mesuré par nanoindentation [29, 44, 48]).

De même, l'inclusion en résine augmente les propriétés mécaniques mesurées par indentation [29, 44]. Malheureusement, il n'est parfois pas possible de s'affranchir de ce procédé d'inclusion pour mesurer les propriétés mécaniques du tissu osseux, notamment sur des échantillons de petites tailles. Ainsi, il existe des interactions entre la fixation et l'inclusion des échantillons avec leurs propriétés mécaniques et il convient d'être prudent quant à l'analyse des propriétés mécaniques mesurées sur des tissus osseux fixés.

Congélation

Selon Turner and Burr [129] la meilleure méthode de préservation sur le long terme avant de procéder à des tests mécaniques est la congélation à -20°C des échantillons emballés dans une gaze imprégnée de solution PBS (Phosphate Buffered Saline, solution tampon). Une étude de Linde and Sorensen [87] montre qu'il n'y a aucune différence sur la raideur d'échantillons d'os spongieux conservés congelés à -20°C pendant 100 jours, ni pour des échantillons décongelés puis recongelés cinq fois successivement. Une étude similaire [79] a montré que, après cinq cycles de congélation-décongélation, il n'y avait aucune différence de raideur et de charge maximale mesurées par indentation sur des échantillons hydratés en solution saline. Plusieurs études ont montré que le tissu osseux pouvait être conservé jusqu'à 8 mois sans dégradation majeure de ses propriétés mécaniques [104, 117].

3.2.2 Découpe des échantillons osseux

Les propriétés mécaniques de l'os peuvent être récupérées lors d'essais mécaniques sur des pièces anatomiques entières ou sur des échantillons de celles-ci. Le bon déroulement de certains essais nécessite souvent que l'échantillon ait une géométrie adaptée à cet essai pour pouvoir appliquer les lois théoriques déterminants les paramètres : dimension de l'échantillon, parallélisme, perpendicularité...

Pendant la découpe, il est également nécessaire de prendre des précautions et d'utiliser des appareils de découpe de précision qui limite l'échauffement et les contraintes exercées sur les échantillons.

3.3 Conditions d'essai

Les propriétés mécaniques de l'os dépendent fortement de l'environnement auquel il est soumis. Ainsi, pour obtenir le comportement de l'os le plus proche possible de celui rencontré *in vivo*, il est nécessaire de prendre quelques précautions pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques.

3.3.1 Hydratation des échantillons

D'après Turner and Burr [129], tester mécaniquement l'os hydraté permet de se rapprocher des conditions réelles *in vivo*. Même si les échantillons sont réhydratés avant essai mécanique, il pourrait y avoir des différences significatives avec des échantillons non dégraissés. Des essais de nanoindentation effectués sur tissu osseux déshydraté donnent un module élastique et une microdureté significativement plus élevés (22,6% et 56,9% respectivement) [54, 72, 114].

3.3.2 Influence de la température

Comme pour la plupart des matériaux biologiques, les propriétés mécaniques de l'os sont dépendantes de la température environnante. L'os étant un matériau viscoélastique [82, 83], il est important de prendre en compte la température lors de l'essai mécanique. Pour une mesure exacte des propriétés mécaniques de l'os, les échantillons devraient être testés à 37°C, ce qui n'est pas toujours aisé à réaliser. La variation des caractéristiques mécaniques de l'os compact en fonction de la température est faible pour des tests statiques. Par contre, elle semble être beaucoup plus importante pour des essais dépendants du temps : l'os compact testé à température ambiante (20°C) supporte deux fois plus de cycles de chargement jusqu'à la rupture que l'os testé à 37°C [30].

3.4 Caractérisation mécanique de l'os multi-échelle, de la macrostructure à la nanostructure

3.4.1 Test mécanique : la compression

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

Si on considère la courbe contrainte-déformation d'un essai de compression typique (Figure I.13), on observe une première partie linéaire qui décrit la propriété élastique de l'os. Autrement dit, la déformation est proportionnelle à la contrainte et si la contrainte n'est pas maintenue, l'os retrouve son état initial. La pente de la partie linéaire de la courbe est une constante appelée module d'élasticité ou module de Young (E , en MPa), caractéristique de la raideur du matériau et en théorie indépendante de la géométrie du matériau.

A partir d'une certaine valeur de contrainte, la pente de la courbe va décroître, le matériau évolue dans sa région plastique. Toute contrainte exercée après ce point théorique appelé limite élastique (ou contrainte élastique, σ_e) entraîne une déformation qui n'est plus intégralement réversible. L'augmentation de la contrainte dans cette région conduit à la formation de dommages qui vont se propager jusqu'au point de rupture du matériau. La contrainte entraînant la rupture du matériau et appelée contrainte maximale (σ_{max}). La déformation à la rupture est appelée ductilité et caractérise la capacité du matériau à se

déformer jusqu'à la rupture. L'intégration de la courbe contrainte-déformation donne accès à des calculs d'énergie dissipée dans le domaine élastique (ou résilience) ou jusqu'à rupture (énergie à rupture).

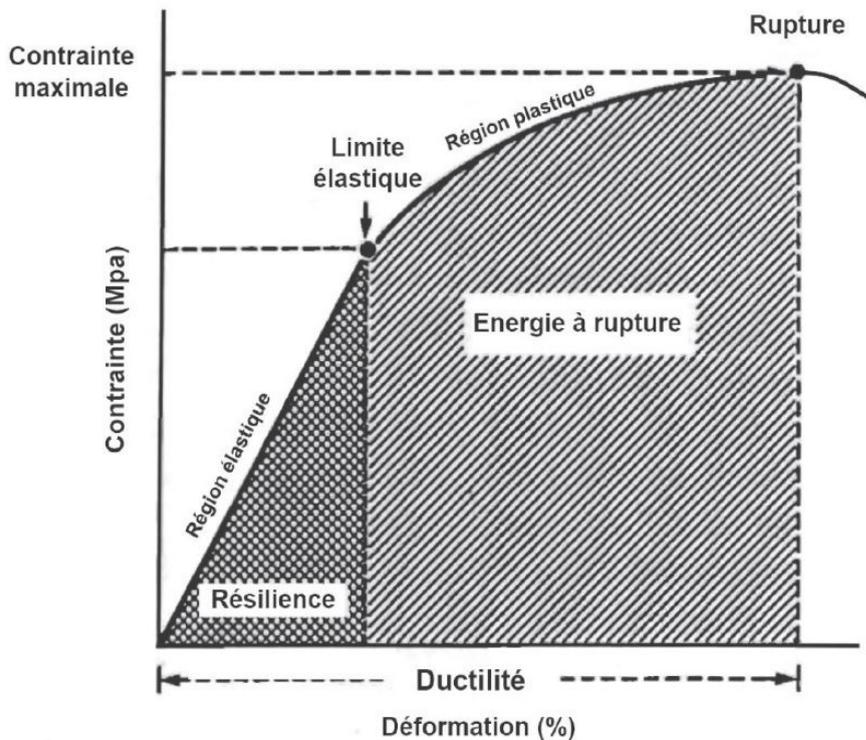


FIGURE I.13 – Courbe contrainte/déformation caractéristique d'un essai de compression.

Essai élastique

L'os cortical est formé d'ostéons orientés dans la direction axiale. De ce fait, ses propriétés mécaniques diffèrent en fonction de la direction considérée : l'os compact est donc un matériau anisotrope. Pour quantifier son caractère anisotrope d'un point de vue mécanique, il faut tester mécaniquement l'os dans ses trois directions principales (axiale, radiale et tangentielle). Pour cela, il est possible d'effectuer des essais de compression limités au domaine élastique qui permettent d'évaluer le module d'élasticité dans la direction de compression. L'avantage de l'essai réalisé dans le domaine élastique est qu'il est non-destructif, ce qui permet de réaliser différentes analyses sur un même échantillon. Malheureusement, ce type d'essai ne permet pas de déterminer les propriétés de rupture dans toutes les directions du matériau. Pour obtenir plus d'informations des tests destructifs deviennent nécessaires.

Essai à rupture

L'essai à rupture permet de déterminer, dans la direction de sollicitation, non seulement le module d'élasticité E , mais également la contrainte élastique σ_e , la déformation élastique ε_e , la contrainte maximale σ_{max} , la déformation à la contrainte maximale ε_{max} et l'énergie à rupture (Figure I.13). Comme son nom l'indique, l'essai à rupture est un essai destructif. En général, cet essai est stoppé après l'obtention de l'effort (ou contrainte) maximum.

3.4.1.1 Conditions de liaison

Les erreurs expérimentales associées à l'essai de compression sont dues essentiellement au frottement à l'interface échantillon-plateau, à la découpe des échantillons ainsi qu'à la raideur du montage utilisé [129].

Le Frottement

Expérimentalement, la zone centrale des échantillons est moins déformée que les parties extrêmes à cause des frottements à l'interface plateau-échantillon. Selon Linde and Sorensen [87], une telle inhomogénéité de la déformation axiale est une cause d'erreur dans la détermination du module d'Young. Dans la plupart des essais de compression, les échantillons n'ont pas de liaison particulière avec les plateaux de la machine. Quelques auteurs ont utilisé un plateau inférieur rotulé pour éviter les phénomènes de flexion parasite [290, 402].

Linde and Hvid [84] ont étudié l'effet des conditions de liaisons de l'échantillon avec les plateaux de la machine. Le module obtenu avec des plateaux polis est 5% plus faible qu'avec des plateaux non-polis. Si les plateaux de la machine sont polis et recouverts d'un film d'huile, le module est réduit de 7% par rapport à un essai avec des plateaux non lubrifiés. Lorsque l'échantillon est lié par une fine couche de PMMA (Polyméthacrylate de méthyle), le module augmente de 40% et l'énergie de dissipation diminue de 67% par rapport à un échantillon non lié. Ainsi, la différence de module entre un échantillon fixé en ses extrémités et un échantillon ayant un frottement minimal avec les plateaux de la machine est pratiquement de 50%.

Mesure de la déformation de compression de l'échantillon

La déformation axiale est mesurée suivant principalement trois méthodes :

- Méthode globale : Mesure du déplacement de la traverse de la machine d'essais
Cette mesure, généralement réalisée indirectement par le capteur de déplacement de la machine d'essai, enregistre la déformation de l'échantillon mais aussi celle des différentes pièces constitutives du montage utilisé, induisant une raideur parasite. Suivant la raideur du montage et des échantillons testés, l'erreur réalisée sur la mesure de la déformation est plus ou moins importante. Utilisant une machine Instron type 4302, équipée d'un capteur d'effort de 1 kN et de colonnes de 10 mm de diamètre, Linde and Hvid [85] ont mis en évidence une erreur de 30% sur le calcul de la déformation de l'échantillon.

- Méthode directe : Extensométrie
Un extensomètre est un dispositif permettant de mesurer le déplacement directement sur la partie utile de l'éprouvette (i.e. où l'état de contrainte est homogène). Cela permet de s'affranchir de la raideur de la machine et des effets de triaxialité, et d'obtenir une mesure plus précise que celle obtenue par la mesure du déplacement de la traverse. Il existe deux types d'extensométrie : avec ou sans contact ; on choisira l'un ou l'autre selon les conditions expérimentales. Il est possible également de mesurer la variation de section d'une éprouvette pour évaluer l'effet Poisson.
Dans une étude, Allard and Ashman [4] ont réalisé simultanément une mesure de la déformation globale et une mesure avec un extensomètre placé au centre de l'échantillon. Le module obtenu par la mesure au centre de l'échantillon est beaucoup plus important que celui déterminé par la déformation globale pour un échantillon cubique de 10 mm de côté. Cette différence n'apparaît plus pour des échantillons dont la plus grande dimension est dans le sens de la sollicitation. L'influence des bords

semble donc moins grande lorsque la taille de l'échantillon est importante.

Cependant, l'échantillon doit être de taille importante pour fixer l'extensomètre directement sur l'os et l'effet de la fixation sur la distribution des contraintes n'est pas connu.

— Méthode directe : Suivi de déplacement par mesures optiques de champs

La méthode de mesures de champs par corrélation d'images permet de mesurer, pour une résolution fixée, le champ de déplacement élastique de la face éclairée de l'échantillon soumis à une sollicitation mécanique. Ce champ de déplacement est obtenu en comparant deux images de la face éclairée : celle de l'échantillon non déformé (dite image de référence) et celle de l'échantillon déformé sous la sollicitation mécanique (dite image déformée). Cette méthode nécessite l'utilisation d'une ou de deux caméras supplémentaires.

3.4.1.2 Vitesse de déformation

La vitesse ($\dot{\epsilon}$) à laquelle est effectuée le test est importante, car le comportement visco-élastique de l'os dépend du temps et donc de la vitesse de déformation ($\dot{\epsilon} = \frac{\partial \epsilon}{\partial t}$). Suivant les études, la vitesse de déformation choisie pour réaliser un essai de compression quasi-statique varie sensiblement entre $\dot{\epsilon} = 6.10^{-5} s^{-1}$ [99] et $\dot{\epsilon} = 1.10^{-2} s^{-1}$ [86]. L'étude de Tufekci et al. [128] montre un effet significatif de la vitesse de déformation sur des échantillons d'os cortical testés en compression. En passant d'un essai quasi-statique ($0.0045 s^{-1}$) à un essai avec une vitesse de déformation élevée ($725 s^{-1}$), ils rapportent une augmentation de 19% du module d'élasticité, de 20% de la résistance à rupture et une diminution de 20% de la contrainte à rupture.

3.4.2 Tests ultrasonores

Dans un solide, les modes de propagation des ultrasons correspondent soit à la propagation d'ondes longitudinales (ou ondes de compression : vibration des particules solides dans une direction parallèle à la direction de propagation de l'onde), soit à la propagation d'ondes transversales (ou ondes de cisaillement : vibration des particules solides dans une direction perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde).

Ces modes de propagation sont utilisés dans l'étude de l'os en plaçant un échantillon osseux entre un émetteur et un récepteur. La mesure de la vitesse de propagation dans le matériau permet alors de remonter aux propriétés élastiques telles que les coefficients de rigidité (C_{ij}), les modules d'élasticité (E_i) ou les modules de cisaillement (G_{ij}) [5, 13, 50, 61, 70, 73, 118].

D'autres techniques basées sur la propagation d'ondes ultrasonores existent :

- La microscopie acoustique à balayage (ou SAM : *Scanning Acoustic Microscopy*) permet d'obtenir une distribution spatiale des propriétés mécaniques locales (à l'échelle du tissu) [74, 109].
- La spectroscopie de résonance ultra-sonore (ou RUS : *Resonant Ultrasound Spectroscopy*) permet d'obtenir les propriétés élastiques anisotropes d'un solide via l'utilisation des fréquences naturelles de vibration du matériau (Figure I.14). Cette technique a l'avantage de permettre la mesure de tous les termes du tenseur d'élasticité à partir d'un seul échantillon [16, 95, 96].

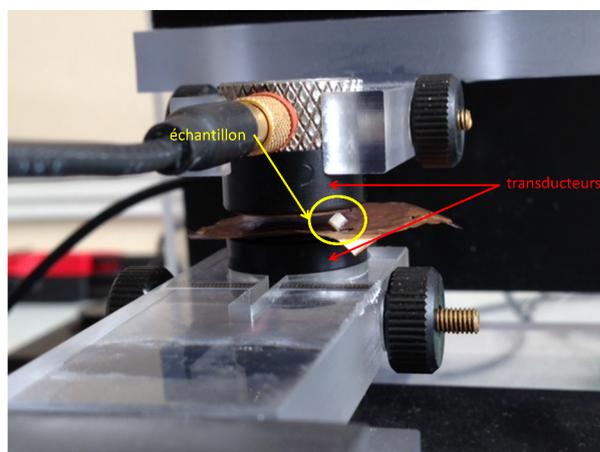


FIGURE I.14 – Dispositif expérimental de RUS, Laboratoire d’Imagerie Biomédicale, UPMC Paris 6

3.4.3 Techniques d’indentation

Les techniques d’indentation consistent à appliquer une pointe dure (typiquement en diamant) avec une force connue et à mesurer directement ou indirectement l’aire de contact entre le matériau et la pointe [150]. Dans les tests classiques de microdurimétrie réalisés à l’échelle macro ou microscopique, l’aire de contact est évaluée de manière optique par la mesure du diamètre ou de la diagonale de l’empreinte (ou indent) laissée à la surface du matériau testé. Les indenteurs les plus communs sont sphériques (Brinell, Rockwell) ou pyramidaux (Vickers, Knoop). La géométrie de l’indenteur définit le champ de contrainte appliqué à la surface de l’échantillon. Un indenteur sphérique par exemple réduira les déformations plastiques, alors qu’un indenteur plus plat tendra à augmenter la concentration de contraintes.

Plus récemment, le développement de capteurs de haute précision a permis la mesure du déplacement au cours de l’essai d’indentation. Il est donc possible d’obtenir une courbe charge-déplacement caractéristique du comportement mécanique du matériau testé [55].

La nanoindentation instrumentée

Dans les années 1990, Oliver et Pharr [102] ont mis au point une technique d’indentation associée à une mesure effort-déplacement permettant de déterminer la dureté et le module élastique d’un matériau. Grâce à un indenteur de taille inférieure à $2\ \mu\text{m}$ et une résolution en déplacement de l’ordre de quelques nanomètres, la courbe déchargement-déplacement permet de calculer le module de Young du matériau, d’après un modèle fondé sur la théorie de Hertz [65]. C’est la charge appliquée qui permet de dissocier la microindentation (charge comprise entre 0,1 et 10 N) de la nanoindentation (charge inférieure au newton). L’énorme avantage de l’indentation est qu’elle permet de quantifier les propriétés du tissu osseux à l’échelle de la microstructure (échelle de l’ostéon, voire de la lamelle).

Autres techniques d’indentation

La microdurimétrie est une technique qui permet d’obtenir un paramètre reflétant la dureté du matériau. Les différents dispositifs de durimétrie permettent une mesure jusqu’au niveau tissulaire.

La microscopie par force atomique (ou AFM : *Atomic Force Microscopy*) est une technique qui permet de mesurer les propriétés mécaniques (module d'élasticité et dureté) à l'échelle de la nanostructure (fibrille de collagène). Les dimensions d'investigation (profondeur d'indentation jusqu'à 500 nm) en font une technique très complexe et limitée.

3.4.4 Les données sur l'os humain chez l'adulte

3.4.4.1 Par essais mécaniques

Les données sur les propriétés mécaniques de l'os cortical adulte sont nombreuses. Quelques valeurs sont données à la Table I.2.

Références	Site osseux	Essais	E (GPa)
Lotz et al. [89]	fémur	flexion	9,2 - 12,5
Cuppone et al. [36]	fémur	flexion	$18,6 \pm 1,9$
Choi et al. [33]	tibia	flexion	5,45 - 14,92
Ohman et al. [100]	fémur/tibia	compression	10 - 22

TABLE I.2 – Valeurs de module d'Young de l'os cortical adulte caractérisé par essais mécaniques.

3.4.4.2 Par techniques ultrasonores

Le module d'Young d'un fémur humain varie entre 14 et 33 GPa. Ces valeurs sont regroupées dans la Table I.3.

Références	Direction	E (GPa)
Ashman et al. [5]	axiale	20
	transverse	12-13,4
Ho Ba Tho et al. [70]	axiale	$19,9 \pm 2,7$
Turner et al. [130]	axiale	$20,5 \pm 0,2$
	transverse	$14,9 \pm 0,5$
Berteau et al. [18]	transverse	14,1 - 21,0

TABLE I.3 – Valeurs de module d'Young de l'os cortical adulte caractérisé par méthode ultrasonore.

3.4.4.3 Par nanoindentation instrumentée

Les techniques d'indentation instrumentée montrent des valeurs de module d'élasticité comprises entre 7 et 35 GPa à l'échelle de l'ostéon ou de la lamelle osseuse (Table I.4). A l'échelle du tissu, le module dépend majoritairement du degré de minéralisation, et au niveau de la lamelle, de l'orientation des fibres de collagène [8, 147, 150]. Ainsi, l'os interstitiel présente un module élastique plus élevé que celui d'un ostéon. A noter que les paramètres mesurés par indentation sont particulièrement sensibles à la préparation des échantillons. En effet, l'hydratation, la fixation, l'inclusion et la rugosité des échantillons modifient les résultats obtenus [54, 114, 144, 150]. Les essais d'indentation sont aussi sensibles à la charge utilisée, à la distance entre deux essais successifs et à la proximité d'un pore (canal de Havers ou bord d'un échantillon) [77].

Références	Site osseux	USE	Préparation	E (GPa)
Rho et al. [115]	tibia	O	inclus	$24,7 \pm 1,4$
	tibia	I	fixé	$28,4 \pm 0,8$
Turner et al. [130]	fémur	O + I	inclus	$25,8 \pm 0,2$
Zysset et al. [151]	fémur (diaphyse)	O	hydraté	$21,0 \pm 5,9$
	fémur (diaphyse)	I	hydraté	$23,3 \pm 5,8$
	fémur (col)	O	hydraté	$17,4 \pm 5,8$
	fémur (col)	I	hydraté	$19,2 \pm 5,8$
Hoffler et al. [71]	radius	O	hydraté	$17,8 \pm 2,2$
	radius	I	hydraté	$18,3 \pm 2,0$

TABLE I.4 – Modules élastiques obtenus par indentation instrumentée à l'échelle de l'unité structurale élémentaire (USE) chez l'Homme (O : ostéon, I : os interstitiel).

3.5 Conclusion

Pour caractériser mécaniquement l'os, il faut s'intéresser à sa structure et à son organisation tissulaire. L'échelle d'analyse est un déterminant considérable des propriétés étudiées et les techniques utilisées devront prendre en compte cette échelle.

L'ensemble des essais mécaniques présentés donne accès à des informations quantitatives (charge, déformation, célérités et atténuation) et qualitatives (anisotropie si étude multi-axes) et permettent de déterminer les paramètres élastiques des matériaux (module d'Young, contrainte, dureté, coefficient de rigidité, coefficient de Poisson) à différentes échelles.

La littérature sur les propriétés mécaniques de l'os cortical chez l'adulte est riche et variée. Ces références pourront faire office de base de connaissances sur l'os cortical mature et permettront de nous guider sur la mise en place des protocoles de caractérisation de l'os cortical en croissance.

4 Les propriétés de l'os chez l'enfant

4.1 Introduction

L'os est un tissu qui s'adapte à ses contraintes environnementales. Cette adaptation se retrouve au niveau de la géométrie de l'os long (diamètre, épaisseur, longueur) de sa microstructure (porosité) et du matériau (anisotropie, minéralisation). Les propriétés caractéristiques de l'os varient donc au cours de la vie et plus particulièrement pendant la croissance.

Malheureusement, nous disposons de très peu d'informations sur l'os pédiatrique et sur son évolution au cours de la croissance. Cette pénurie de données de référence pour l'os en croissance s'explique par la faible quantité d'échantillons disponibles pour les essais en laboratoire et par la qualité même de ces échantillons pour la plupart « prélevés » et associés à une pathologie de l'enfant.

Cette section présente un résumé des travaux existants effectués sur l'os pédiatrique.

4.2 Constitution de l'os en croissance

4.2.1 Structure

Dans une étude histomorphométrique, Schnitzler and Mesquita [122] ont examiné la structure des ostéons et de leurs canaux (nombre, taille, forme) de 87 échantillons de crête iliaque sur des sujets âgés de 0 à 25 ans. Cette étude décrit le développement des ostéons de l'os cortical et leurs canaux, et a mis en évidence trois types d'ostéons secondaires morphologiquement différents : "drifting ou dérivants", "excentriques" et "concentriques" (voir Figure I.15). Il a été montré que :

- les ostéons dérivants (drifting) présentaient des canaux de Havers géants et asymétriques. Ce type d'ostéons est responsable d'une grande partie de la porosité de l'os chez l'enfant (plus de 70%). Leur densité numérique diminue à partir de l'adolescence.
- les ostéons excentriques (eccentric) étaient plus petits, plus circulaires avec un petit canal excentrique. Leur densité numérique augmente progressivement avec l'âge.
- les ostéons concentriques (concentric) étaient plus petits, plus symétriques, avec un petit canal central. Leur densité numérique augmente nettement à partir de l'adolescence.

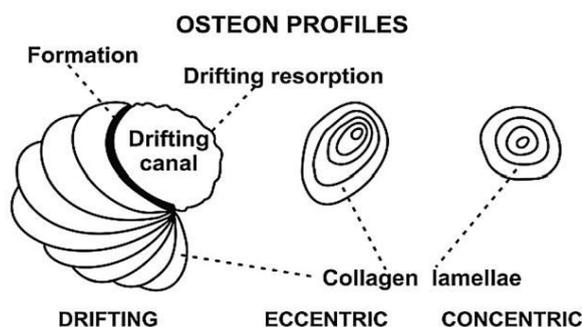


FIGURE I.15 – Représentation schématique des trois types d'ostéons secondaires présents dans l'os cortical en croissance, d'après Schnitzler and Mesquita [122].

Plusieurs études histomorphométriques ont étudié l'évolution de la porosité intracorticale avec l'âge et montré une diminution de cette porosité pendant la croissance [108, 122–124].

4.2.2 Minéral

La densité minérale osseuse est un paramètre de référence dans l'étude du minéral osseux. Chez l'enfant, Kalkwarf et al. [78] ont mené une étude sur 1554 enfants âgés de 6 à 17 ans. Cet article montre une augmentation du BMC (*Bone Mineral Content* - Contenu minéral osseux en g) et de la BMD en fonction de l'âge.

Dans l'étude de Imbert et al. [75], la densité minérale du tissu est évaluée par tomographie haute-résolution (Phoenix nanotom, 4 μm de résolution). Sur les échantillons pédiatriques de contrôle, la TMD moyenne mesurée est de $1,032 \pm 0,015 \text{ gHA/cm}^3$.

4.2.3 Collagène

Il a été montré que la concentration des molécules de pontages immatures diminuait de manière régulière jusqu'à l'âge adulte et qu'à l'inverse, la concentration des molécules de pontages enzymatiques matures augmentait durant le jeune âge [51, 120].

4.3 Comportement de l'os en croissance

4.3.1 Fractures chez l'enfant

Tous les types de fractures décrits chez l'adulte peuvent se rencontrer à l'âge pédiatrique, et peuvent être classés selon le même mode. En revanche, certains profils sont typiquement pédiatriques. C'est notamment le cas des fractures partielles. Ici, nous considérerons seulement le cas de certaines fractures spécifiques aux os longs de l'enfant.

- La *fracture en motte de beurre* (ou torus fracture) est une plicature plastique d'une partie de la paroi corticale métaphysaire qui conserve le périoste. Dans les formes les plus évidentes, la partie de la fraction corticale qui est rompue bombe de chaque côté (déformation transversale). L'origine mécanique observée est un tassement vertical de la diaphyse, au voisinage de la métaphyse, avec trait transversal peu ou pas visible, **c'est donc une plasticité de la fraction corticale qui est mise en évidence par une sollicitation en compression.**
- La *fracture en bois vert* (ou greenstick fracture) est une rupture corticale partielle avec persistance d'une continuité cortico-périostée dans la concavité de l'incurvation induite par le traumatisme. **Cela met en évidence un comportement mixte possible, c'est à dire une couche fragile et une couche ductile.**
- L'*incurvation traumatique* est rare et se traduit par une exagération de la concavité de l'os par de multiples microfractures, sans trait visible. Les localisations préférentielles sont la fibula et l'ulna avec habituellement une fracture complète de l'os adjacent (tibia et radius) dont la réductibilité peut être limitée par l'incurvation. **Cette forme de fracture met en évidence la fragilité d'un os et la ductilité de l'autre pour un même traumatisme (la direction du traumatisme influence également la déformation engendrée).**
- La *fracture en cheveux* est une fracture spiroïde incomplète, avec trait fin, sans déplacement. Elle est difficile à voir. Le site préférentiel est la moitié inférieure du tibia, lors de l'apprentissage de la marche. **On a donc un comportement mécanique en trois dimensions présentant un cisaillement associé à une plasticité.**

4.3.2 Propriétés mécaniques

La Table I.5 récapitule les données de la littérature sur les propriétés mécaniques de l'os enfant.

La plupart des études indique un module d'Young plus faible chez l'enfant comparativement à l'adulte, avec un pic après la puberté et une diminution vers la sénescence. Ceci corrobore l'idée que le module d'Young est lié avec la densité minérale osseuse, puisque jusqu'au pic de masse osseuse, on a une augmentation de la minéralisation de la matrice, suivi d'une période de stabilisation, et enfin une diminution.

Références	Site osseux	Age	Test	Valeurs	Données
Vinz [136]	fémur	nouveau né	traction	E	10,49 GPa
			dureté	σ_{rupt}	54,91 MPa
Ohman et al. [100]	tibia/fémur	4 - 15 ans 22 - 61 ans	compression	E	8 - 15 GPa 15 - 20 GPa
Berteau et al. [20]	côtes	15 et 17 ans	ultrasons	E_a	15,4 ± 2,8 GPa
Berteau et al. [18]	fibula	5 - 16 ans	ultrasons F3P	E_a E	15,5 ± 3,4 GPa 9,1 ± 3,5 GPa
Agnew et al. [1]	côtes	0 - 9 ans	F3P	E	1128 - 9801 MPa
				σ_e	31 - 107 MPa
Kriewall et al. [81]	os parietal os frontal	fœtus 6 ans	F3P	E	5 GPa
				E	7 GPa
Currey and Butler [43]	fémur	2 - 17 ans	F3P	σ_{max}	150 - 240 MPa
Martin and Atkinson [90]	fémur	enfant/adolescent	flexion	σ_e	238 - 246 MPa
Jans et al. [76]	os parietal	7 - 11 mois	F3P	E	1,7 - 3,3 GPa
Albert et al. [3]	fémur	11 ans	F3P	E	3,2 - 7,4 GPa
	humérus	8 ans	F3P	E	3,0 - 5,8 GPa
Davis et al. [46]	crâne	6 ans	F4P	E	9,87 ± 1,24 GPa
				E_{axial}	15,22 ± 1,94 GPa
Fan et al. [52]	tibia/fémur	3,2 - 12,4 ans	nanoindentation	$E_{transverse}$	13,92 ± 2,76 GPa
				H_{axial}	0,42 ± 0,04 GPa
				$H_{transverse}$	0,43 ± 0,05 GPa
Albert et al. [2]	tibia/fémur	7 - 16 ans	nanoindentation	E	13 - 21 GPa
				H	0,45 - 0,75 GPa
Imbert et al. [75]	os long	4 - 16 ans	nanoindentation	E	13,6 - 20,9 GPa
				H	0,54 - 0,72 GPa

TABLE I.5 – Valeurs de la littérature de caractérisation de l’os cortical pédiatrique.

4.3.3 Anisotropie

Chez l'adulte, la littérature contient différentes hypothèses concernant l'anisotropie de l'os cortical. Certains auteurs [47, 64, 112, 146] supposent que l'os cortical humain peut être considéré comme isotrope transverse (cinq coefficients élastiques indépendants). Ceci signifie que le matériau possède des propriétés élastiques similaires dans les directions transversales (radial et tangentielle) mais sont différentes dans la direction axiale. D'autres auteurs [5, 73, 112] ont fait l'hypothèse plus générale de l'orthotropie (cinq coefficients élastiques indépendants), où l'on retrouve des propriétés élastiques différentes selon trois plans de symétrie perpendiculaires.

A ma connaissance, l'anisotropie de l'os pédiatrique n'a pas encore été étudiée.

4.4 Conclusion

La littérature sur l'os pédiatrique permet de dire qu'il semble être différent de l'os mature de par sa structure (porosité, agencement), sa composition (minéral et collagène) et ses propriétés mécaniques. Ces différences de propriétés mécaniques entre l'os en croissance et l'os mature ont été mises en évidence qualitativement par l'existence de fractures typiquement pédiatriques. Cependant, la littérature reste très pauvre en données. La plupart des études sont effectuées sur peu d'échantillons ou sur des échantillons associés à une pathologie (ostéogenèse imparfaite, ostéosarcome). Cette pénurie ne permet pas un consensus sur les propriétés de référence de l'os en croissance.

Ce travail de thèse, à travers des études expérimentales multimodales, va permettre de constituer une nouvelle base de données, à la fois structurales et comportementales, sur l'os en croissance.

5 Résumé du chapitre I

L'architecture, la composition et les caractéristiques mécaniques de l'os sont de plus en plus documentées chez l'adulte [10, 113]. La matrice osseuse, dont la microarchitecture et la composition (collagène, hydroxyapatite, eau) évoluent au cours du temps (résorption, remodelage, croissance), confère à l'os cortical l'essentiel de ses propriétés mécaniques [37, 148]. La phase minérale apporte résistance et rigidité et la phase organique apporte un intérêt après la limite élastique [27, 134].

Les connaissances sur l'os pédiatrique sont beaucoup plus limitées. A ce jour, il est décrit dans la littérature que :

- les fractures de l'os pédiatrique montrent un comportement de type *ductile* et les fractures de l'os adulte un comportement *quasi fragile* ;
- l'os cortical chez l'enfant semble être plus élastique et moins dur que le tissu osseux chez l'adulte ;
- les études histomorphométriques montrent une différence structurale de l'os cortical chez l'enfant en comparaison à l'os mature ;
- les études biochimiques montrent une évolution des quantités de molécules de pontage matures et immatures avec l'âge ;
- la concentration de molécules de pontages immatures semble être plus élevée dans le tissu osseux de l'enfant que dans celui de l'adulte.

Ces nouvelles connaissances soulèvent des interrogations :

- Quelle sont les différences en terme de composition entre un os adulte et un os pédiatrique ?
- Quelle sont les différences en terme de comportement entre un os adulte et un os pédiatrique ?
- Quel est l'impact de la structure et de la composition de l'os cortical sur ses propriétés mécaniques ? Est-ce que cet impact est le même à différentes échelles ?

Les échantillons d'os cortical récoltés pour l'étude

Collecte des échantillons d'os cortical pédiatrique

Lors d'interventions chirurgicales pratiquées dans le service de chirurgie orthopédique de l'hôpital de la Timone (Marseille, France), des coupes osseuses ou des prélèvements d'autogreffe peuvent être effectués. Dans le but de caractériser le tissu osseux pédiatrique, les déchets osseux générés par ces opérations ont été intégrés au protocole expérimental après avoir obtenu le consentement éclairé des parents et l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP). Des échantillons de plusieurs types d'os ont été récoltés, essentiellement des échantillons provenant de fibulae et de fémurs.

Collecte des échantillons d'os cortical adulte

Les échantillons d'os cortical adultes ont été récoltés sur des fibulae de cadavres autopsiés entre 2010 et 2012 sous la direction de l'INSERM UMR 1033 (Lyon, France) et l'IFSTTAR UMR 9406 (Bron, France), et ont été déclarés au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche sous le numéro de déclaration : DC-2015-2357.

Traçabilité des échantillons

Dès prélèvement, les échantillons sont stockés et conservés dans un congélateur à -80°C . Chaque échantillon est rendu anonyme et reçoit un code d'identification correspondant au numéro de l'échantillon, à l'âge, au sexe (F ou M) et au site de prélèvement (fib pour fibula, et fem pour fémur)(exemple : 11F9_fib1 signifie : 11ème patient, F pour Féminin, 9 ans, fibula n°1). Le préfixe Ad est ajouté lorsqu'il s'agit d'échantillon d'os adulte.

Préparation des échantillons et protocole de l'étude

Selon les différentes contraintes expérimentales (dimension et masse des échantillons essentiellement), les échantillons seront étudiés brut ou inclus dans une résine de méthacrylate de méthyle (MMA). La figure I.16 présente le protocole expérimental dans sa globalité en présentant les essais du protocole BRUT et du protocole MMA.

Préparation des échantillons du protocole BRUT

Pour les essais de caractérisation mécanique (caractérisation acoustique et compression), les échantillons ont été découpés en cube d'environ 2 mm de côté à l'aide d'une scie

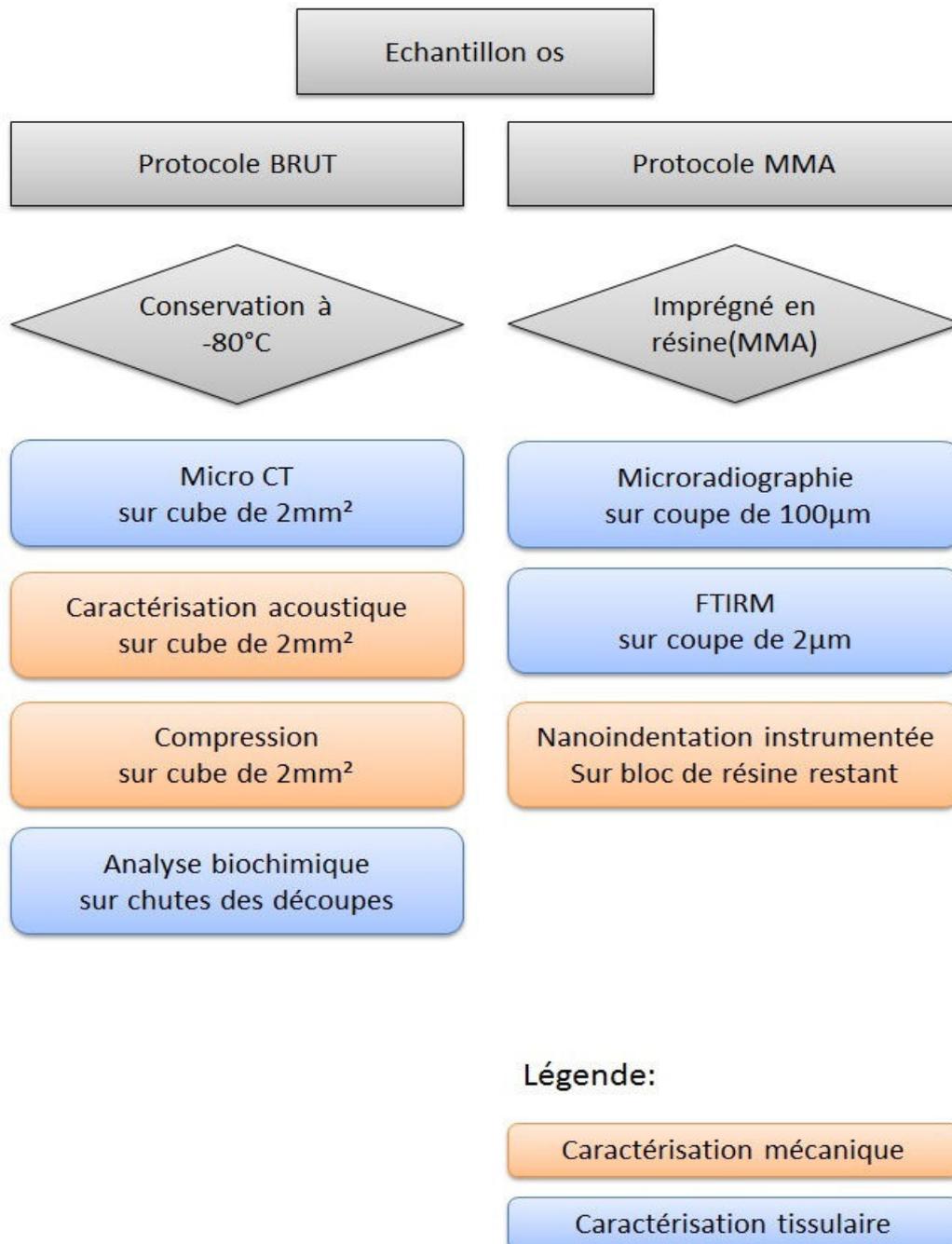


FIGURE I.16 – Description du protocole expérimental.

diamantée à vitesse lente (Buehler Isomet 4000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). La découpe a été faite de façon à conserver les faces dans les axes de sollicitations principaux : axial, radial et transverse (cf. Figure I.17).

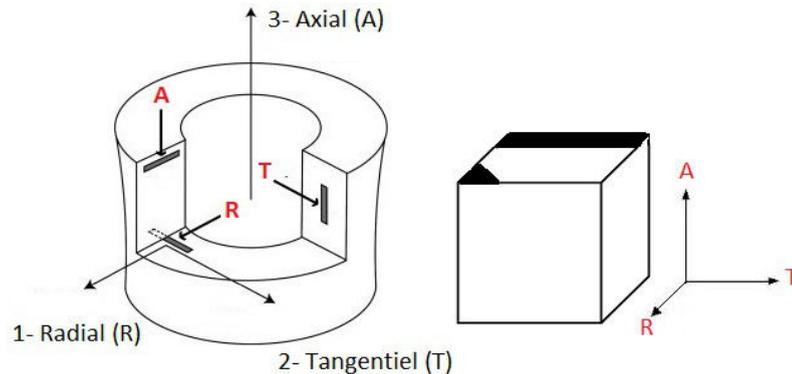


FIGURE I.17 – Découpe des échantillons pour le protocole BRUT. Les axes principaux de l'os ont été conservés : radial (1), tangentiel (2) et axial (3).

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

Préparation des échantillons du protocole MMA

Protocole d'imprégnation

Pour certaines mesures, les échantillons ont du être imprégnés dans une résine spécifique. Dans le cas de l'os cortical, nous avons choisi une technique d'imprégnation dans du MMA (méthacrylate de méthyle) qui permet des colorations de tissu minéralisé et d'obtenir des images à la fois qualitatives (organisation tissulaire, présence de zone de modelage, remodelage) et quantitatives (histomorphométrie, orientation des ostéons et porosité).

Le protocole d'imprégnation ont été établi par l'équipe du Dr Boivin de l'INSERM de Lyon (UMR 1033) et se déroule en plusieurs étapes :

- Fixation dans l'éthanol à 70% (10 jours)
- Déshydratation dans de l'éthanol absolu (48H)
- Substitution par du methyl-cyclohexane (maximum 48H)

L'imprégnation se fait par des phases de MMA dont la concentration en catalyseur est augmentée :

- Imprégnation dans une phase de MMA1 (48h à 4°C)
- Imprégnation dans une phase de MMA2 (48h)
- Inclusion dans une dernière phase dite MMA3 (48H entre 28 et 32°C)

Après ce processus, on obtient des blocs de résine utilisables pour la réalisation de lames histologiques colorables (8 μm), et pour la préparation des coupes fines (2 μm) pour la FTIRM, et épaisse (100 μm) pour la microradiographie.

Protocole de découpe

A la fin de l'imprégnation et de l'inclusion, on obtient un bloc de résine contenant l'échan-

tillon d'os. Le bloc va être tranché en coupes de différentes épaisseurs selon les essais auxquelles elles sont destinées (cf. Figure I.18).

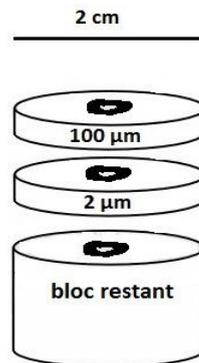


FIGURE I.18 – Découpe des échantillons pour le protocole MMA.

La coupe à 100 µm est effectuée avec une scie à fil diamantée (Well, Escil, Chassieu, France). Les coupes à 2 µm sont effectués à l'aide d'un microtome Polycut E (Reichert-Jung[®]) équipé de couteaux à lame de tungstène (HK2 ou HK3 Reichert[®]).