



HAL
open science

Caractérisation multimodale des propriétés de l'os cortical en croissance

Emmanuelle Lefevre

► **To cite this version:**

Emmanuelle Lefevre. Caractérisation multimodale des propriétés de l'os cortical en croissance. Biomécanique [physics.med-ph]. Ecole doctorale Sciences du Mouvement Humain, 2015. Français. NNT : . tel-01304113

HAL Id: tel-01304113

<https://theses.hal.science/tel-01304113v1>

Submitted on 19 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
Ecole Doctorale des Sciences du Mouvement Humain
ISM UMR 7287 CNRS

THÈSE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Discipline : Science du Mouvement Humain
Spécialité : Biomécanique

présentée par :
Emmanuelle LEFÈVRE

Caractérisation multimodale des propriétés de l'os
cortical en croissance

Pour une soutenance prévue le 11 décembre 2015

Devant un jury composé de :

H. Follet	Chargée de Recherches (INSERM, Lyon)	Directrice de thèse
Q. Grimal	Professeur (UPMC, Paris)	Rapporteur
P. Lasaygues	Ingénieur de Recherche (CNRS, Marseille)	Examinateur
F. Launay	Docteur en Médecine (AP-HM, Marseille)	Examinateur
L. Malaval	Chargé de Recherche (INSERM, Saint Etienne)	Examinateur
D. Mitton	Directeur de Recherche (IFSTTAR, Lyon)	Rapporteur
M. Pithioux	Chargée de Recherche (CNRS, Marseille)	Directrice de thèse

Table des matières

Table des matières	iv
Nomenclature	v
Introduction	1
I Contexte de l'étude	3
1 L'os humain : état de l'art	3
1.1 Introduction	3
1.2 Anatomie-Typologie	3
1.3 Histologie	4
1.3.1 Organisation du tissu osseux	4
1.3.2 Composition de la matrice osseuse	7
1.3.3 Cellules osseuses	9
1.4 Processus de développement : l'ostéogénèse	9
1.4.1 Formation initiale des os dans l'embryon et le fœtus	10
1.4.2 Croissance des os en longueur et en épaisseur	12
1.4.3 Remodelage osseux	13
1.4.4 Fractures	13
1.5 Conclusion	14
2 Caractérisation tissulaire de l'os cortical	15
2.1 Introduction	15
2.2 La densité minérale osseuse	15
2.2.1 L'Absorptiométrie	15
2.2.2 La Tomodensitométrie	16
2.2.3 Les données chez l'humain	16
2.3 La densité minérale du tissu osseux	17
2.3.1 La Microtomographie	17
2.3.2 La Microradiographie	17
2.3.3 Le Backscattered Electron Imaging	19
2.4 Autres paramètres tissulaires	19
2.4.1 La Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier	19
2.4.2 Dosage du collagène et des molécules de pontage par HPLC	19
2.5 Conclusion	20
3 Caractérisation mécanique de l'os cortical	21
3.1 Introduction	21
3.2 Préparation d'échantillons osseux pour un essai mécanique	21
3.2.1 Conservation	21
3.2.2 Découpe des échantillons osseux	22

3.3	Conditions d'essai	22
3.3.1	Hydratation des échantillons	23
3.3.2	Influence de la température	23
3.4	Caractérisation mécanique de l'os multi-échelle, de la macrostructure à la nanostructure	23
3.4.1	Test mécanique : la compression	23
3.4.2	Tests ultrasonores	26
3.4.3	Techniques d'indentation	27
3.4.4	Les données sur l'os humain chez l'adulte	28
3.5	Conclusion	29
4	Les propriétés de l'os chez l'enfant	29
4.1	Introduction	29
4.2	Constitution de l'os en croissance	30
4.2.1	Structure	30
4.2.2	Minéral	30
4.2.3	Collagène	31
4.3	Comportement de l'os en croissance	31
4.3.1	Fractures chez l'enfant	31
4.3.2	Propriétés mécaniques	31
4.3.3	Anisotropie	33
4.4	Conclusion	33
5	Résumé du chapitre I	34

Les échantillons d'os cortical récoltés pour l'étude **35**

II Caractérisation tissulaire de l'os cortical pédiatrique **39**

1	Introduction	39
2	Matériel et Méthodes	40
2.1	Préparation des échantillons	40
2.2	Microtomographie	42
2.2.1	Acquisition des images	42
2.2.2	Analyse morphométrique	43
2.2.3	Analyse de la densité minérale du tissu osseux	43
2.3	Microradiographie	43
2.4	Dosage des molécules de pontage par HPLC	44
2.4.1	Principe du dosage par HPLC	44
2.4.2	Méthodologie d'extraction du collagène : préparation d'une poudre d'os déminéralisé et déshydraté	45
2.4.3	Dosage de la quantité d'hydroxyproline et des molécules de pontage par HPLC	45
2.4.4	Evaluation de la quantité de collagène dénaturé selon l'âge, méthode de digestion par alphachymotrypsine	47
2.5	Microscopie InfraRouge par Transformée de Fourier	49
2.5.1	Principe	49
2.5.2	Application au tissu osseux	49
2.5.3	FTIRM sur l'os cortical	51
2.6	Analyses statistiques	51
3	Résultats	51
3.1	Différentes architectures du réseau poreux chez l'enfant et l'adulte	51

3.2	Variation de la densité minérale du tissu osseux avec l'âge	56
3.3	Variation du degré de minéralisation osseuse avec l'âge	57
3.4	Propriétés chimiques du tissu déterminées par dosage HPLC	58
3.5	Propriétés chimiques du tissu déterminées par FTIRM	60
4	Discussion	61
4.1	Minéral	62
4.2	Collagène	62
4.3	Architecture du réseau poreux	63
5	Résumé du chapitre II	64
III Comportement mécanique de l'os cortical en croissance		65
1	Introduction	65
2	Matériel et Méthodes	66
2.1	Préparation des échantillons	66
2.2	Caractérisation mécanique par méthode ultrasonore	67
2.2.1	Approche théorique	67
2.2.2	Mesures ultrasonores	68
2.3	Caractérisation mécanique par essai de compression	70
2.4	Caractérisation mécanique par nanoindentation instrumentée	72
2.4.1	Principe	72
2.4.2	Essais de nanoindentation sur l'os cortical	74
2.5	Analyses statistiques	74
3	Résultats	75
3.1	Propriétés mécaniques à l'échelle mésoscopique	75
3.1.1	Caractérisation ultrasonore	75
3.1.2	Essais de compression	77
3.2	Propriétés mécaniques à l'échelle microscopique	78
3.2.1	Nanoindentation instrumentée	78
4	Discussion	80
4.1	Propriétés mécaniques à l'échelle mésoscopique	81
4.1.1	Caractérisation ultrasonore	81
4.1.2	Essai de compression	82
4.2	Propriétés mécaniques à l'échelle microscopique	82
4.2.1	Nanoindentation	82
4.3	Limites et perspectives de l'étude	83
5	Résumé du chapitre III	85
IV Effet de la composition du tissu osseux et de son organisation sur le comportement mécanique de l'os cortical		87
1	Introduction	87
2	Effet de la microarchitecture du réseau de pores sur l'élasticité du tissu osseux cortical à l'échelle mésoscopique	88
2.1	Introduction	88
2.2	Résultats	88
2.3	Discussion	89
3	Effet du contenu minéral et collagénique sur l'élasticité du tissu osseux cortical à l'échelle mésoscopique	90
3.1	Introduction	90
3.2	Résultats	91

3.3	Discussion	92
4	Effet des propriétés physico-chimiques sur les propriétés mécaniques du tissu osseux à l'échelle microscopique	93
4.1	Introduction	93
4.2	Résultats	94
4.2.1	Evolution des paramètres mécaniques et microstructuraux avec l'âge	94
4.2.2	Corrélation entre les variables mécaniques et microstructurales	94
4.3	Discussion	95
5	Résumé du chapitre IV	96
Conclusions et Perspectives		97
Bibliographie		111
A	Synthèse des données obtenues pour la caractérisation tissulaire de l'os cortical	113
B	Synthèse des données obtenues pour la caractérisation mécanique de l'os cortical	123

Nomenclature

Propriétés des échantillons

l	longueur de l'échantillon (mm)
L	largeur de l'échantillon (mm)
e	épaisseur de l'échantillon (mm)
S	surface de la section de l'échantillon (mm ²)
l_0	longueur de l'échantillon avant essai mécanique (mm)
Δl	variation de la longueur de l'échantillon pendant l'essai mécanique (mm)
ρ	masse volumique (g cm ⁻³)
ρ_{app}	masse volumique apparente (g cm ⁻³)

Propriétés mécaniques

ε	déformation (-)
$\dot{\varepsilon}$	vitesse de déformation (s ⁻¹)
ε_e	déformation élastique (-)
ε_{max}	déformation maximale (-)
ε_{rupt}	déformation à rupture (-)
ε_{app}	déformation apparente (-)
σ	contrainte mécanique (MPa)
σ_e	contrainte élastique (MPa)
σ_{max}	contrainte maximale (MPa)
σ_{rupt}	contrainte à rupture (MPa)
σ_{app}	contrainte apparente (MPa)
ν	coefficient de Poisson (-)
d	déplacement (mm)
v	vitesse de l'essai mécanique (m s ⁻¹)
E	module de Young ou module élastique (GPa)
E_{app}	module de Young apparent (GPa)
E_a	module d'élasticité acoustique (GPa)
F	effort de compression (N)
G	module de cisaillement (GPa)
H_c	dureté de contact (GPa)
H	dureté vraie (GPa)
λ, μ	coefficients de Lamé (-)

Propriétés biologiques

BMD	Bone Mineral Density, densité minérale osseuse (g cm^{-2} ou g cm^{-3})
aBMD	areal Bone Mineral Density, densité minérale osseuse surfacique (g cm^{-2})
vBMD	volumetric Bone Mineral Density, densité minérale osseuse volumique (g cm^{-3})
TMD	Tissue Mineral Density, densité minérale du tissu osseux (g cm^{-3})
DHLNL	DiHydroxyLysinoNorLeucine
DPD	DéoxyPyriDinoline
HLNL	HydroxyLysinoNorLeucine
OHP	Hydroxyproline
PYD	PYriDinoline

Propriétés architecturales

BV	Bone Volume, volume osseux (mm^3)
BS	Bone Surface, surface osseuse (mm^2)
TV	Tissue Volume, volume apparent de l'échantillon (mm^3)
Po.N	Pore Number, nombre de pores (mm^{-1})
Po.V	Pore Volume, densité volumique de pores (mm^3)
Po.S	Pore Surface, densité surfacique de pores (mm^2)
Po.Dm	Pore Diameter, diamètre des pores (μm)
Po.Sp	Pore Separation, distance séparant les pores (μm)
ConnD	Connectivity, connectivité (mm^{-3})
DA	Degré d'anisotropy (-)

Divers

AFM	Atomic Force Microscopy, Microscopie de force atomique
BEI	Backscattered Electron Imaging, Imagerie par électrons rétrodiffusés
CT	Computed Tomography, Tomographie assistée par ordinateur
DXA	Dual X-ray Absorptiometry, Absorptiometrie à double énergie de rayon X
FTIRM	Fourier Transform InfraRed Microscopy, Microscopie InfraRouge par Transformée de Fourier
HFBA	HeptaFluoroButyric Acid, Acide heptafluorobutyrique
HU	Unités Hounsfield
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Chromatographie liquide à haute performance
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MMA	Méthacrylate de méthyle
PBS	Phosphate Buffered Saline, solution tampon
QCT	Quantitative Computed Tomography, Tomographie quantitative
ROI	Region Of Interest, région d'intérêt
RUS	Resonant Ultrasound Spectroscopy, Spectroscopie de résonance ultrasonore
SAM	Scanning Acoustic Microscopy, Microscopie acoustique à balayage
VOI	Volume Of Interest, volume d'intérêt

Introduction

L'os est un tissu biologique qui évolue tout au long de la vie en fonction des contraintes environnementales. Cette adaptation aux sollicitations extérieures s'exprime 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 par étapes successives de l'état *in utero* à l'état mature.

Aujourd'hui, l'outil diagnostique privilégié en clinique pour étudier la qualité de l'os est l'imagerie. Les techniques de référence demeurent les modalités de rayons X classiques, DXA (Dual energy X-ray Absorptiometry - absorptiométrie bi-photonique à rayon X) ou tomographie, ou l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Chez l'adulte, ces modalités d'imagerie du système osseux permettent d'obtenir une bonne représentation de la qualité osseuse. De nombreuses études ont fait le lien entre des paramètres telle que la densité minérale osseuse (BMD - bone mineral density) et les propriétés mécaniques de l'os. Par ailleurs, des études ont montré que la qualité de l'os pendant l'enfance est un facteur de la qualité de l'os au cours de la vie. Plus particulièrement, la BMD acquise pendant la croissance est un déterminant majeur de l'ostéoporose et du risque de fracture chez les personnes âgées. Il est donc nécessaire d'obtenir des informations sur la qualité de l'os pendant la croissance.

Malheureusement, l'utilisation des techniques d'imagerie cliniques chez les enfants est problématique : nocivité des radiations, anesthésie ou sédation nécessaire pour effectuer l'examen, etc. Aujourd'hui tous les acteurs (pédiatres, chirurgiens, radiologues) s'accordent pour déplorer le peu de méthodes prédictives permettant d'apprécier l'état du squelette au cours de la croissance (état structural ou morphologique). Le développement d'un outil clinique adapté nécessite une connaissance approfondie des propriétés du tissu osseux pédiatrique.

Chez l'adulte, de nombreuses études ont été menées pour caractériser les propriétés mécaniques et biologiques de l'os cortical. Des relations entre la composition et le comportement mécanique de l'os ont été établies. La densité minérale osseuse s'est avérée jouer un rôle majeur dans les propriétés mécaniques de l'os. Néanmoins, de nombreux paramètres décrivant la qualité osseuse (composition de l'os et agencement de ces composants) restent à étudier.

L'os pédiatrique présente des propriétés différentes : en clinique, certaines fractures typiquement pédiatriques mettent en avant une différence de comportement entre l'os adulte et l'os enfant. Peu d'études ont analysé les propriétés mécaniques et biologiques du tissu osseux de l'enfant et leur évolution au cours de la croissance. La pénurie de données de référence pour l'os en croissance s'explique par la faible quantité d'échantillons disponible 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.

Les objectifs de ce travail de thèse s’inscrivent dans une logique de compréhension et de caractérisations tissulaire et mécanique de l’os en croissance. L’intérêt majeur de ce travail est donc d’apporter de nouvelles connaissances sur l’os cortical pédiatrique. Par ailleurs, les données obtenues pendant ce travail sur l’os pédiatrique seront comparées avec celles d’échantillons d’os adultes testés dans les mêmes conditions. Il s’agira, d’une part, de les comparer en termes de propriétés mécaniques, structurales et chimiques afin d’identifier les possibles différences entre les deux tissus, et d’autre part, d’expliquer les différences de comportement mécanique par ces propriétés structurales et chimiques.

Dans un premier temps, après un chapitre bibliographique, l’intégralité du protocole d’étude de la thèse sera présenté. Cette partie détaillera comment ont été prélevés et préparés tous les échantillons osseux de ce travail, et les différents essais expérimentaux effectués.

Dans le premier chapitre d’étude (Chapitre II), les comparaisons faites d’un point de vue tissulaire entre l’os adulte et l’os enfant seront détaillées. En particulier, la densité minérale du tissu osseux et l’architecture du réseau poreux seront étudiées à partir d’imagerie tomographique. Ensuite, les liaisons collagéniques seront analysées en dosant les molécules présentes dans ce tissu via une analyse biochimique. Enfin, différentes propriétés du minéral et du collagène à l’échelle du tissu (échelle où l’on est capable de distinguer les ostéons ($\sim 100 \mu\text{m}$) et l’os interstitiel) seront étudiées par microscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIRM).

Dans le chapitre suivant (Chapitre III), nous nous intéresserons à la différence de comportement mécanique entre l’os adulte et l’os enfant. Ainsi, à l’échelle mésoscopique, des tests mécaniques seront effectués afin d’étudier la rigidité et l’anisotropie via une caractérisation par méthode ultrasonore dans les 3 axes principaux de l’os. L’élasticité et la résistance à la rupture seront évaluées par des tests de compression dans la direction axiale. A l’échelle microscopique, l’élasticité, la plasticité et la dureté seront estimées par des essais de nanoindentation instrumentée.

Enfin, dans un dernier chapitre (Chapitre IV), les propriétés structurales et biologiques décrites au Chapitre II et les paramètres mécaniques étudiées au Chapitre III seront étudiées conjointement pour établir des liens entre ces différents paramètres.

Cette thèse s’inscrit dans un projet financé par l’Agence Nationale de la Recherche (ANR), le projet MALICE (Multiscale AnaLysIs of Children’s bonE growth), porté par quatre laboratoires : le Laboratoire de Mécanique et d’Acoustique (LMA, CNRS Marseille), l’Institut des Sciences du Mouvement (ISM, CNRS Marseille), le LYOS (INSERM, Lyon), et le Laboratoire Vibrations Acoustique (LVA, INSA Lyon).

Cette thèse a également été l’occasion de collaborer avec deux autres laboratoires : le Laboratoire de Mécanique des Solides (LMS, Ecole Polytechnique Paris-Saclay) et l’Institut de Technologie Chirurgicale et de Biomécanique (ISTB, Berne).

Les responsables de ces laboratoires m’ont permis d’effectuer les différents essais expérimentaux de cette thèse en m’accueillant au sein de leurs équipes et en me formant sur leurs méthodes et outils.

Chapitre I

Contexte de l'étude

1 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).

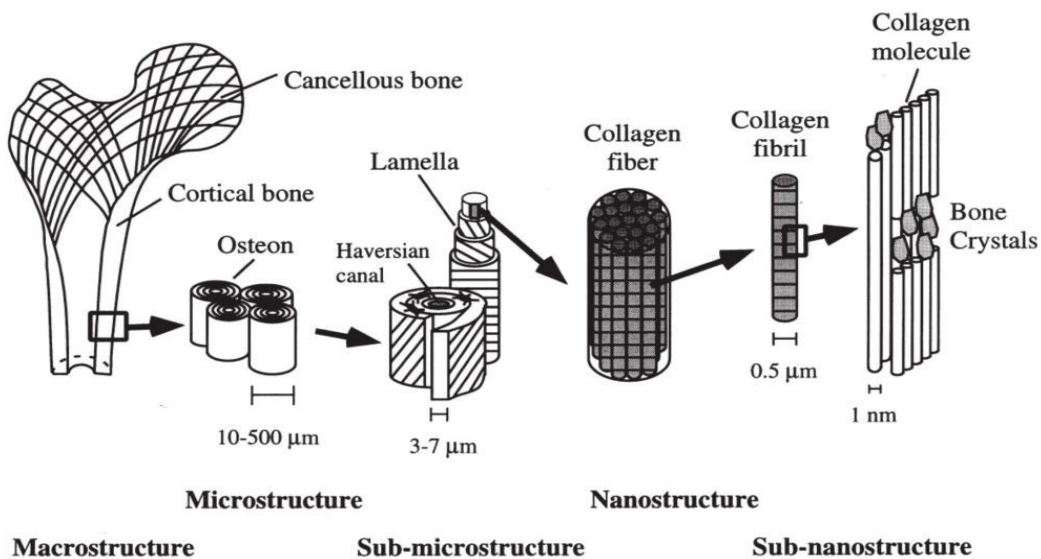


FIGURE I.1 – Représentation multi-échelle de l'os cortical [113].

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 $500 \mu\text{m}$ 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.

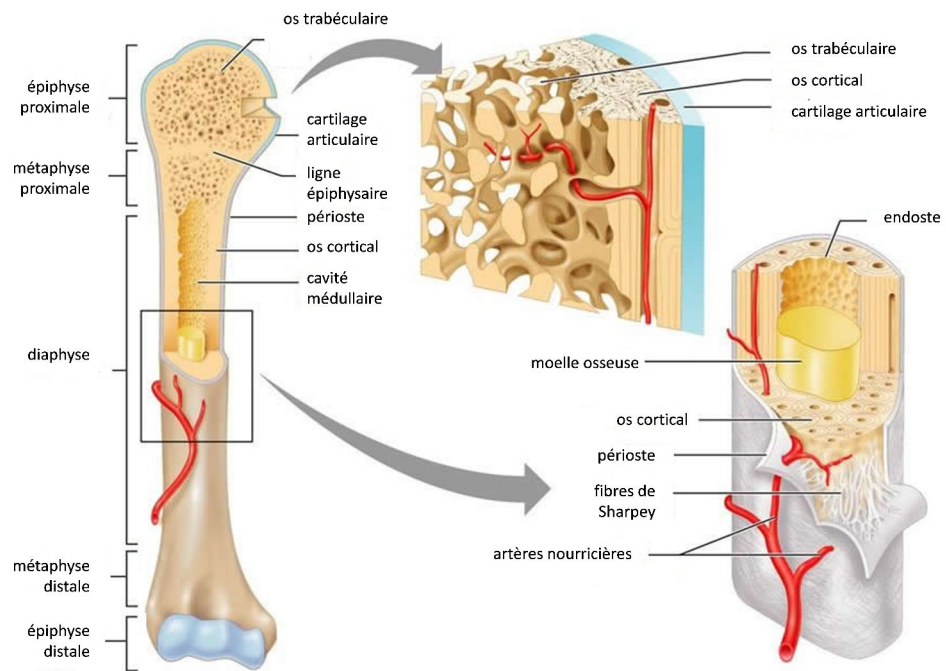


FIGURE I.2 – Organisation anatomique d'un os long.

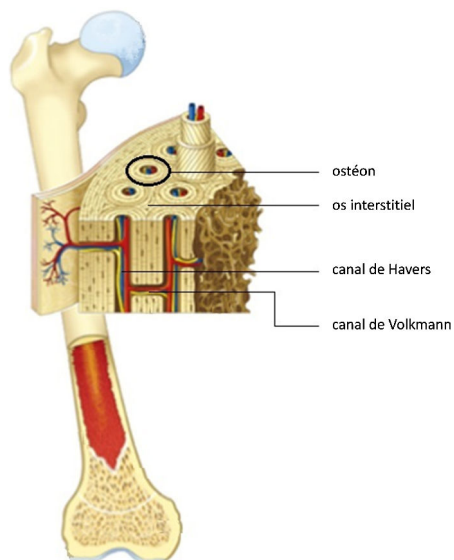


FIGURE I.3 – Représentation d'une coupe d'un os long : structure de l'os cortical.

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).

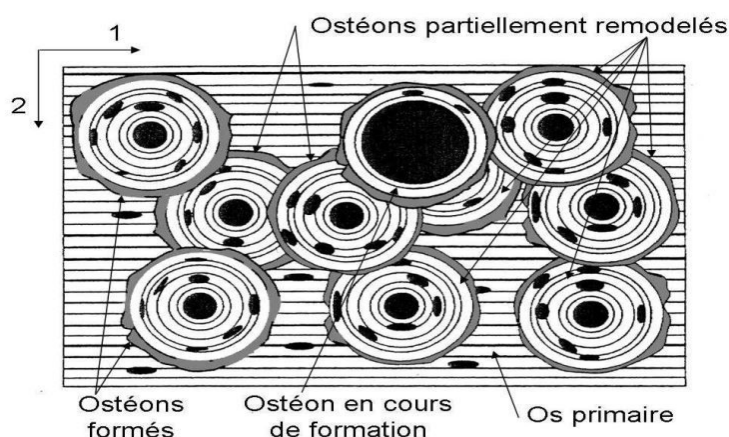


FIGURE I.4 – Schéma de l'os cortical constitué d'os primaire et d'ostéons à plusieurs stades de renouvellement. Extrait de [66].

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.

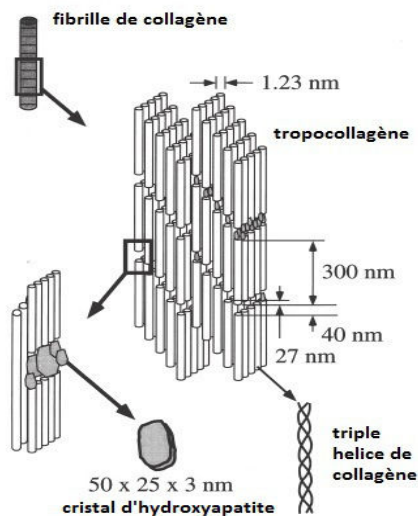


FIGURE I.5 – Représentation de la structure du collagène, arrangement des cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces vides d'après [113].

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).

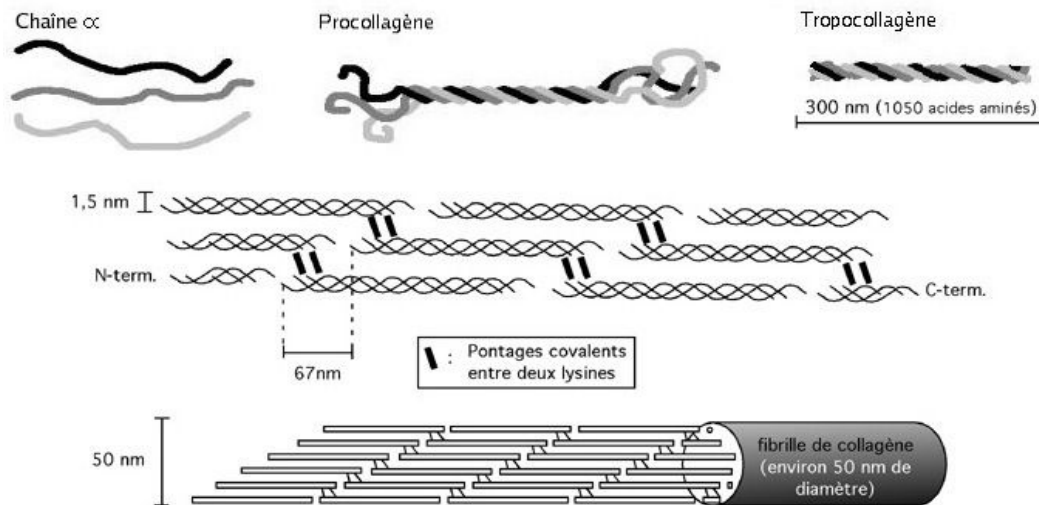


FIGURE I.6 – Représentation de la formation d'une fibrille de collagène.

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 télépeptides 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

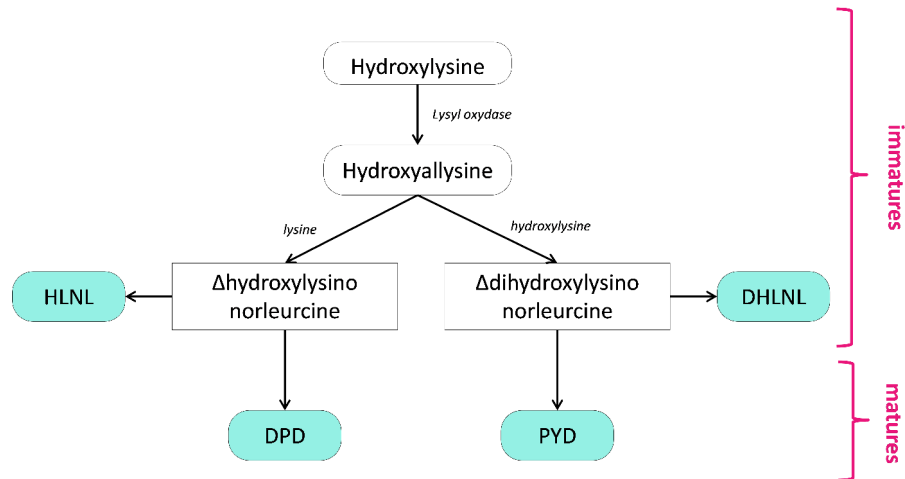


FIGURE I.7 – Les différentes molécules de pontage.

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) :

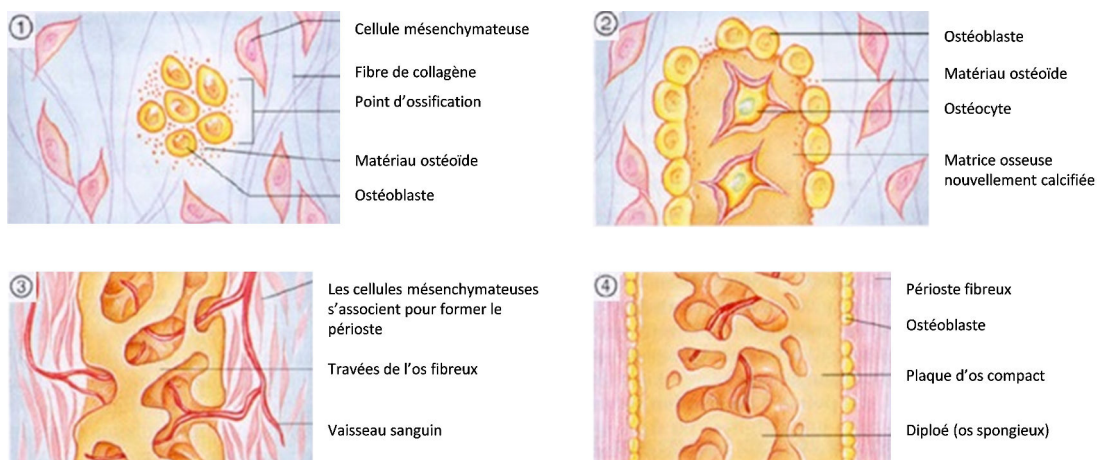


FIGURE I.8 – Représentation des étapes de l'ossification endomembraneuse.

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.

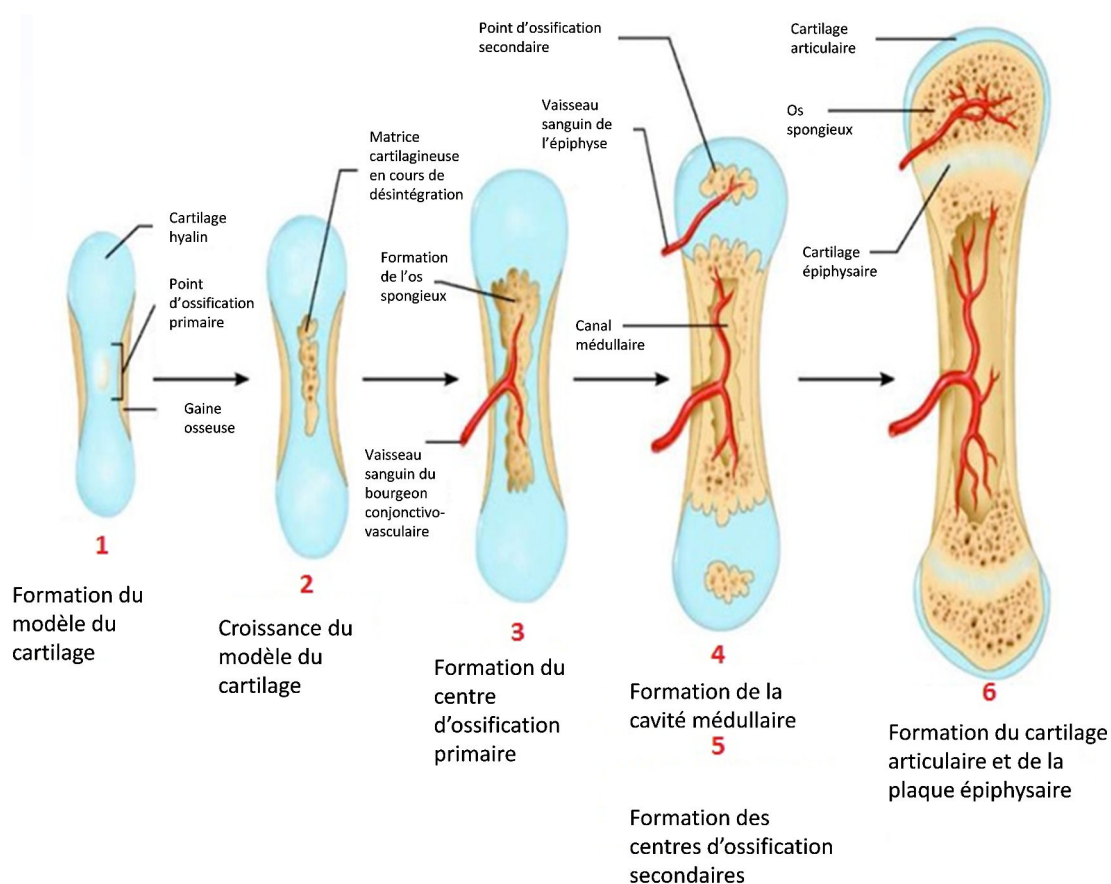


FIGURE I.9 – Représentation des étapes de l'ossification endochondrale.

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.

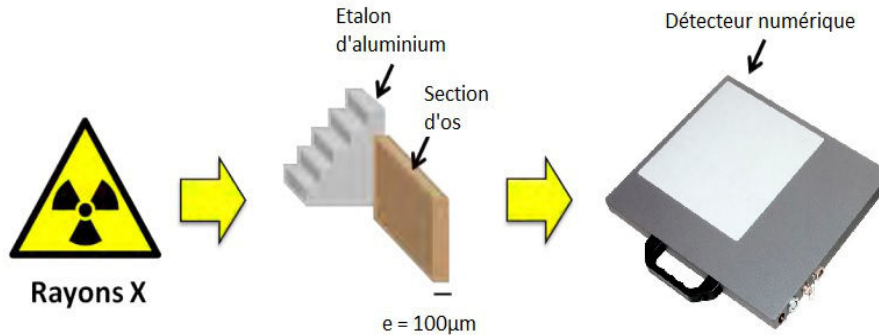


FIGURE I.10 – Illustration du principe de la microradiographie quantitative. Les rayons X traversent la section de tissu osseux à mesurer.

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).

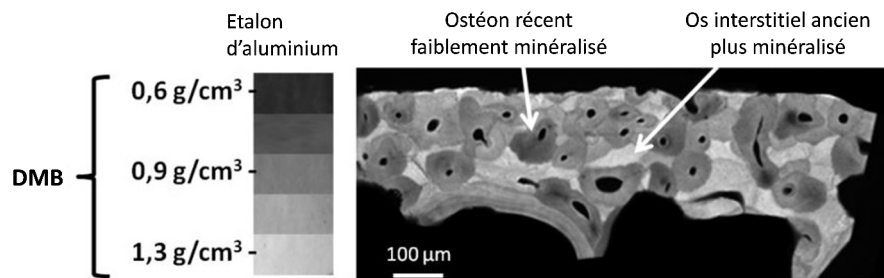


FIGURE I.11 – Exemple d'acquisition obtenue par microradiographie quantitative. L'étalon d'aluminium permet d'établir une relation entre le niveau de gris de l'image et le degré de minéralisation, ou DMB (en g cm⁻³), les zones les plus sombres de la microradiographie sont les moins minéralisées, les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

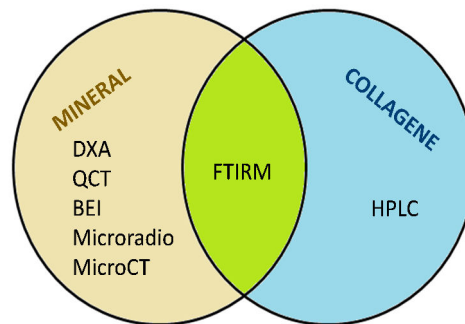


FIGURE I.12 – Différentes méthodes de caractérisation de la composition du tissu osseux.

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).

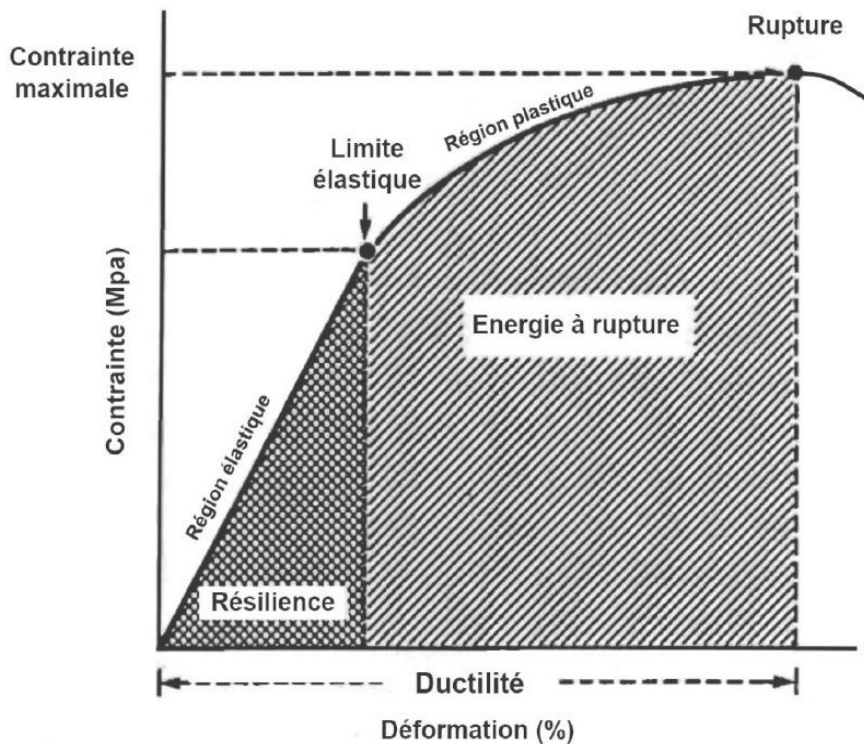


FIGURE I.13 – Courbe contrainte/déformation caractéristique d'un essai de compression.

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].

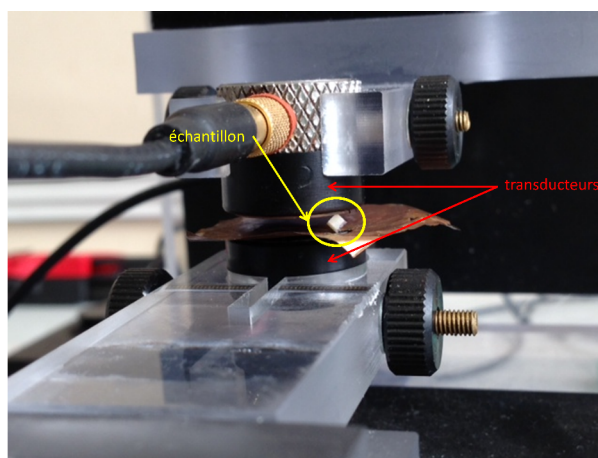


FIGURE I.14 – Dispositif expérimental de RUS, Laboratoire d’Imagerie Biomédicale, UPMC Paris 6

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.

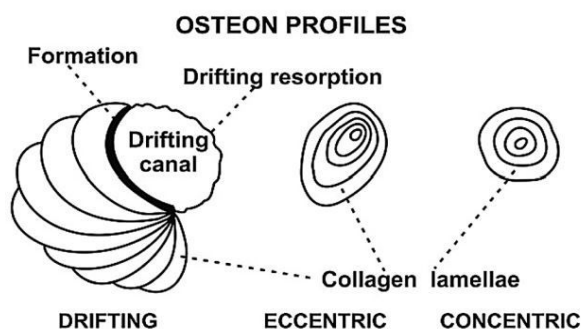


FIGURE I.15 – Représentation schématique des trois types d'ostéons secondaires présents dans l'os cortical en croissance, d'après Schnitzler and Mesquita [122].

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
				H	226 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 structurelle 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

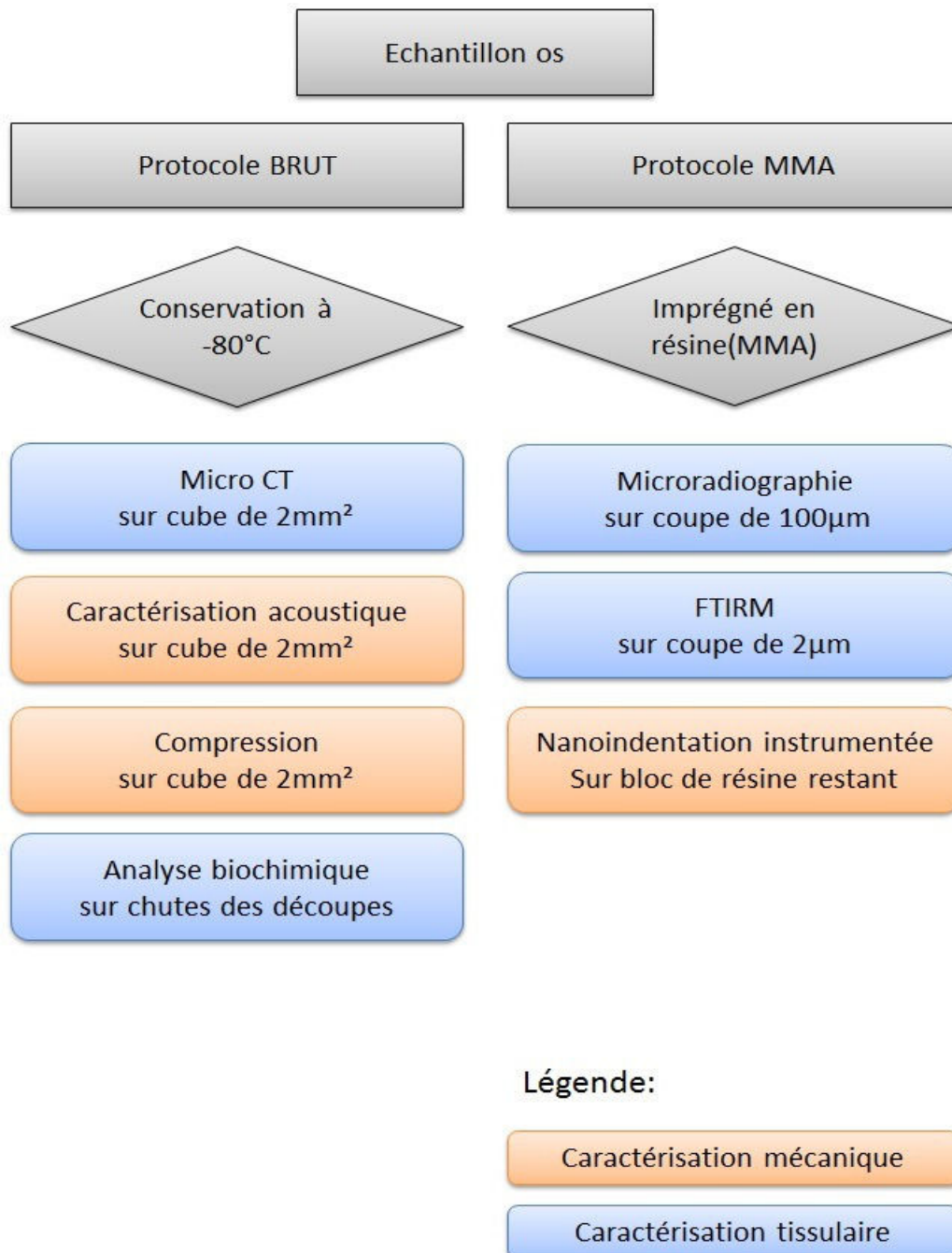


FIGURE I.16 – Description du protocole expérimental.

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).

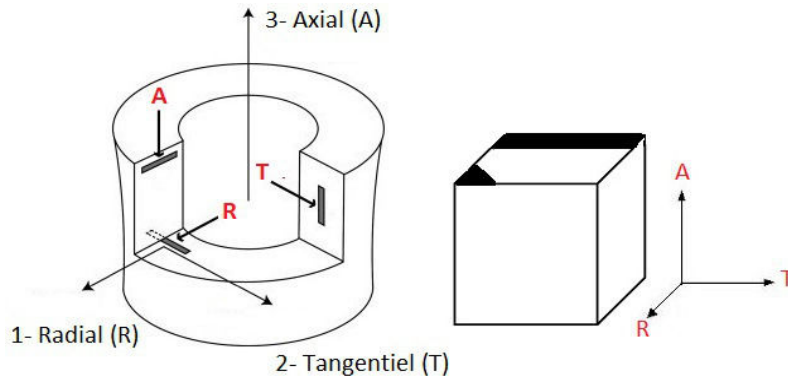


FIGURE I.17 – Découpe des échantillons pour le protocole BRUT. Les axes principaux de l'os ont été conservés : radial (1), tangentiel (2) et axial (3).

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).

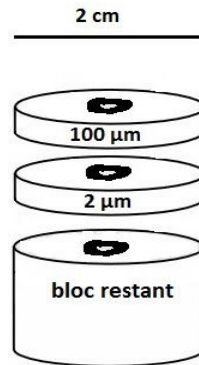


FIGURE I.18 – Découpe des échantillons pour le protocole MMA.

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[®]).

Chapitre II

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°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 découpes 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).

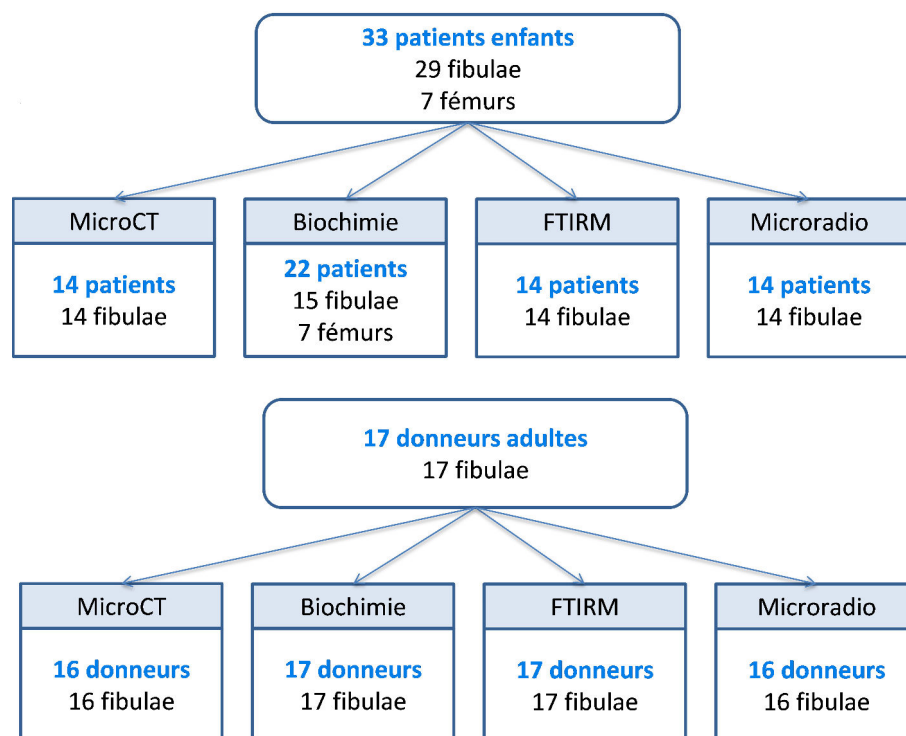


FIGURE II.1 – Répartition des échantillons suivant les essais.

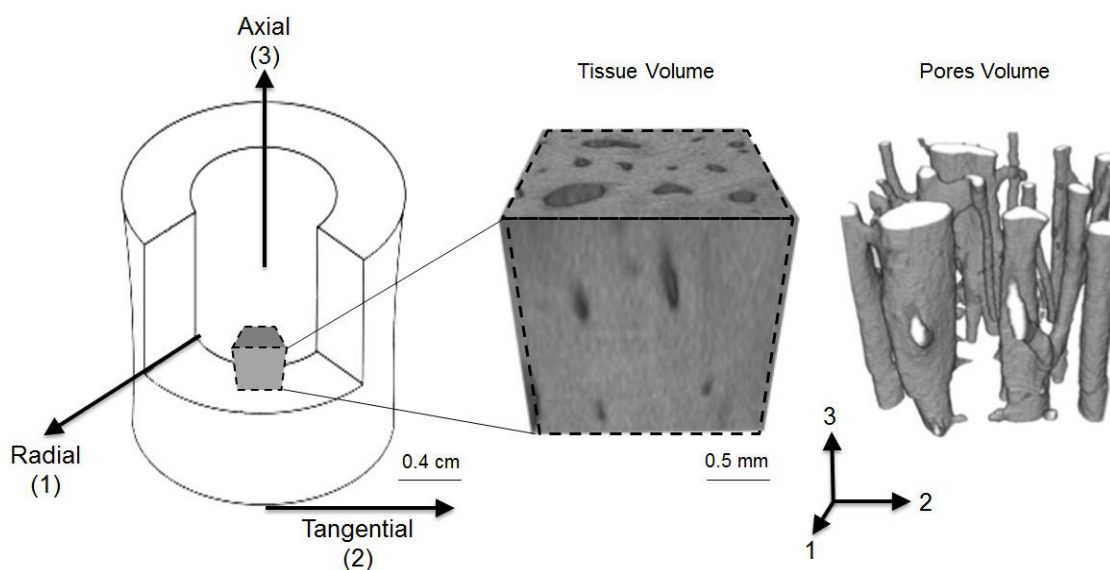


FIGURE II.2 – Découpe d'échantillon d'os en vue de l'évaluation de l'architecture du réseau poreux. Les axes principaux de l'os ont été conservés : radial (1), tangential (2) et axial (3).

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

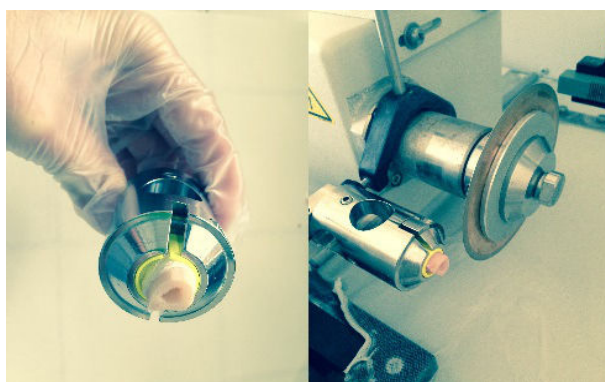


FIGURE II.3 – Schéma du nouveau support d'échantillon pour la découpe.

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 ± 4 ans (6-18 ans) ;
- 16 fibulae de 16 patients adultes. Age moyen : 75 ± 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 μm isotrope
- Champ de vue : 1024 x 1024 pixels
- Source des rayons X : 50 kV - 800 μA
- 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 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 ($\text{Po.S}/\text{Po.V}$, mm^{-1});
- le diamètre de pore (Po.Dm , μm), correspondant au diamètre moyen des pores;
- la séparation des pores (Po.Sp , μm), correspondant à la séparation moyenne entre les pores;
- le nombre de pores (Po.N , mm^{-1}), calculé comme $\text{Po.N} = \frac{1}{\text{Po.Sp} + \text{Po.Dm}}$;
- la connectivité (ConnD , 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 (Po.Dm et Po.Sp) sont reportées comme Po.Dm.SD et Po.Sp.SD , toutes deux exprimés en μm .

2.2.3 Analyse de la densité minérale du tissu osseux

Deux fantômes de concentration 0,25 et 0,75 gHA/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 g cm^{-3}) et la distribution de cette densité ou TMD.SD (en 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 ± 5 ans (4-18 ans);
- 16 fibulae de 16 patients adultes. Age moyen : 75 ± 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 µm), 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 µm par pas de 12 µm (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 ± 6 ans (1-18 ans) ;
- 17 fibulae de 17 patients adultes. Age moyen : 76 ± 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'analyte¹ 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[®]) + pepstatine (Sigma[®]). 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].

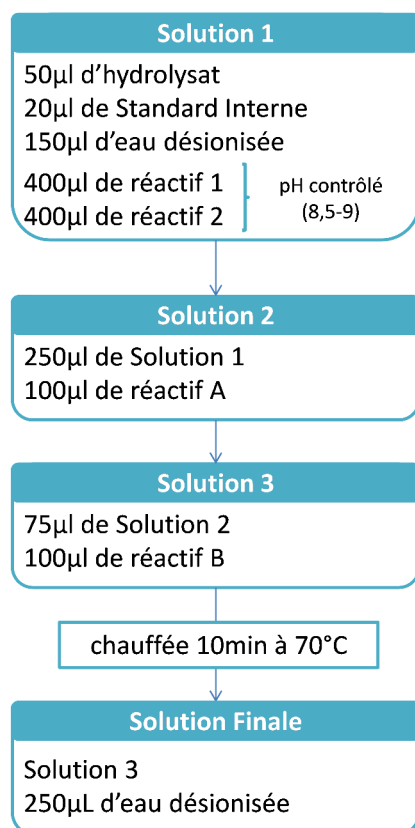


FIGURE II.4 – Protocole de préparation avant dosage par HPLC.

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[®] 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[®] 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

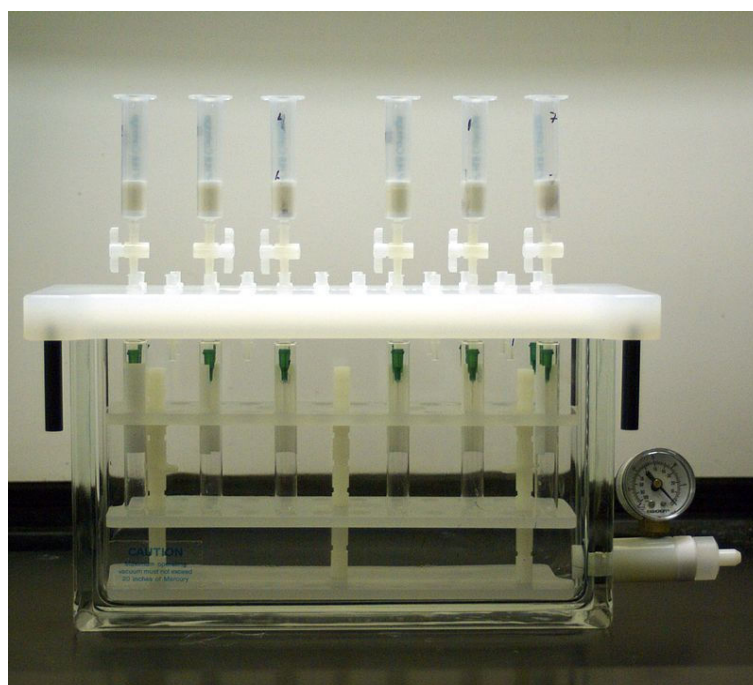


FIGURE II.5 – Un manifold d'extraction : les cartouches sont branchées sur une chambre à vide, les différents liquides y circulent par aspiration à l'aide d'une pompe à vide avant d'être recueillis [59].

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 μ 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 μ L de surnageant et 200 μ 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.

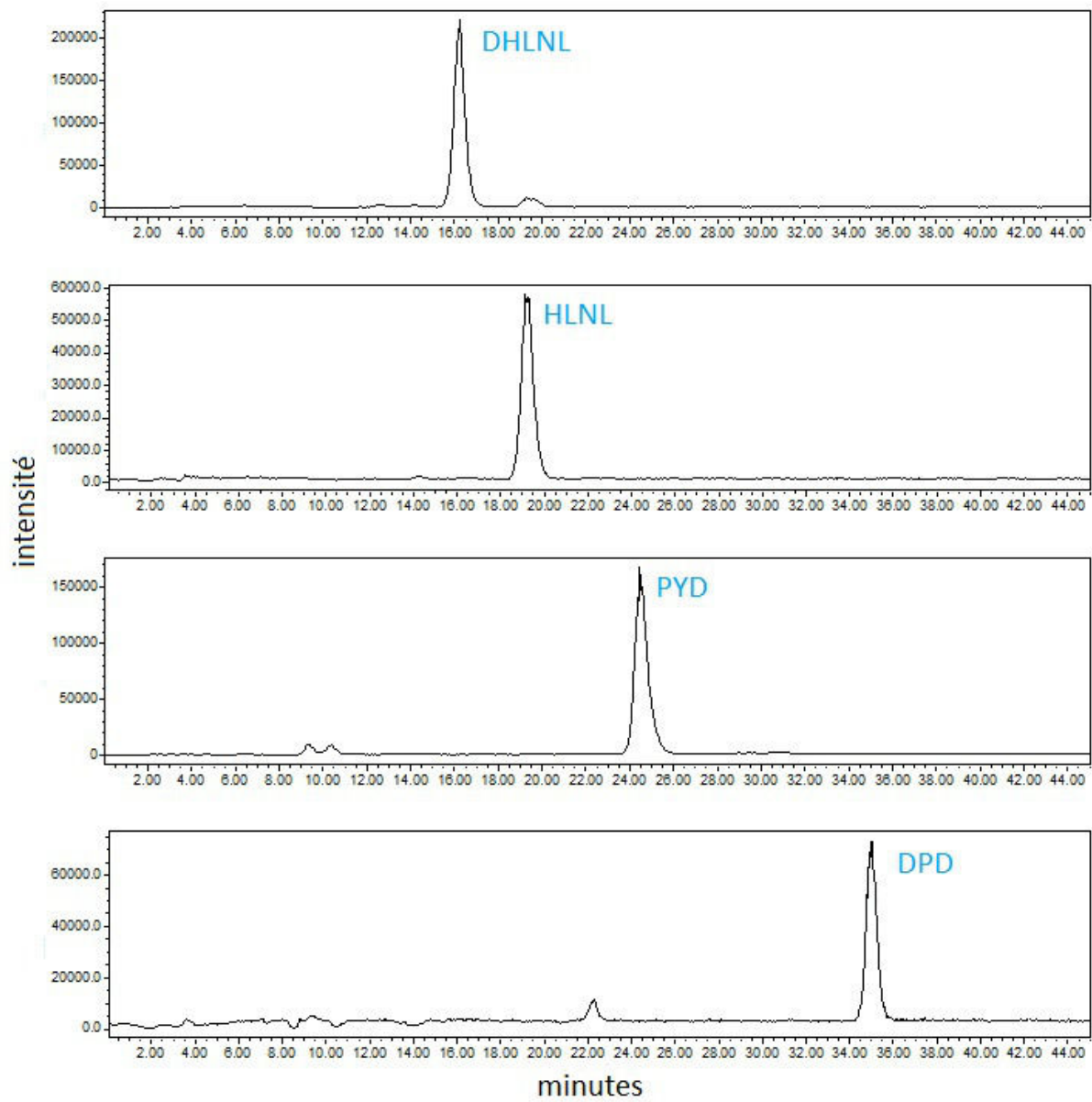


FIGURE II.6 – Chromatogrammes pour le dosage de DHLNL, HLNL, PYD et DPD.

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 ± 5 ans (4-18 ans) ;
- 17 fibulae de 17 patients adultes. Age moyen : 76 ± 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 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 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 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 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 cm^{-1} ;

— un mode de déformation antisymétrique (noté $\nu 4CO_3$), présent vers 1450 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.

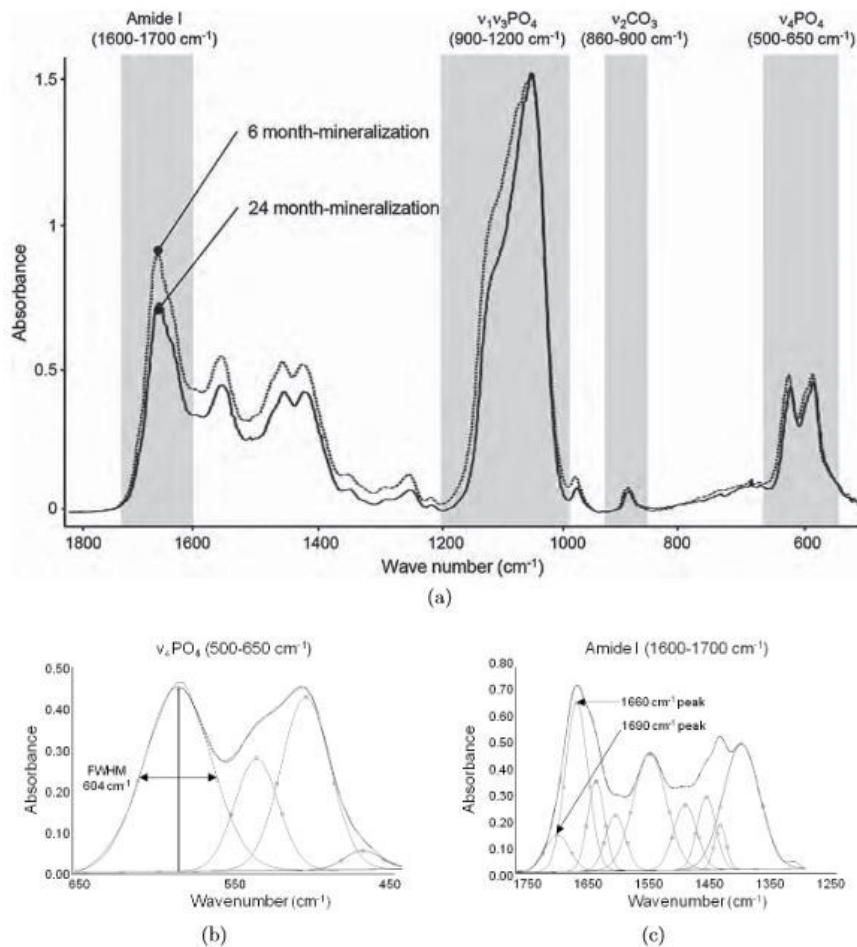


FIGURE II.7 – (a) Spectres infrarouges obtenus par FTIRM sur un échantillon de tissu osseux montrant les domaines de vibration, caractéristiques de l'os, ainsi que leurs variations entre deux ostéons présentant une minéralisation différente [8]; (b) Méthode de déconvolution et de mesure de la largeur à mi-hauteur (FWHM) du pic à 604 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 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 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 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]. Plus les pics sont fins, meilleure est la cristallinité.
- **l'index de minéralisation** est le rapport d'intensité des pics à 1030 et 1660 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 cm^{-1} , sur l'aire sous le pic à 1690 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 ⁻¹)	40,5 (15,9)	37,7 (13,4)	0,628
Po.N (mm ⁻¹)	0,69 (0,28)	0,98 (0,29)	0,033
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)	0,007
Po.Sp.SD (µm)	125 (22)	100 (20)	0,010
ConnD (mm ⁻³)	6,6 (5,5)	20,1 (15)	0,001
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	0,043	0,50	0,047
Po.S / Po.V (mm ⁻¹)	0,51	0,048	-0,19	0,471
Po.N (mm ⁻¹)	-0,57	0,027	0,53	0,035
Po.Dm (µm)	-0,50	0,048	0,17	0,524
Po.Dm.SD (µm)	-0,41	0,083	0,23	0,395
Po.Sp (µm)	0,50	0,049	-0,77	0,001
Po.Sp.SD (µm)	0,58	0,029	-0,78	0,001
ConnD (mm ⁻³)	-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.

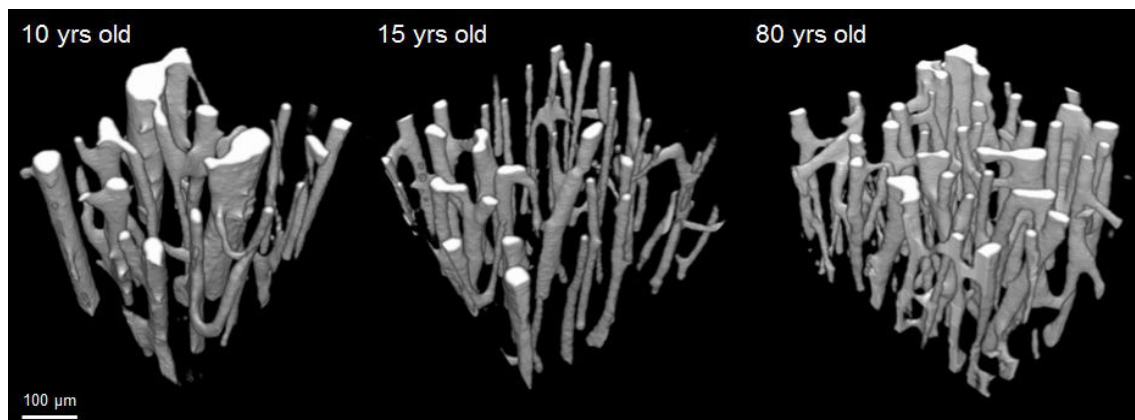


FIGURE II.8 – Reconstructions 3D du réseau poreux imagées dans des cubes d'os cortical de fibula pour des échantillons de 10, 15 et 80 ans.

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 ⁻¹)	Po.N (mm ⁻¹)	Po.Dm (µm)	Po.Dm.SD (µm)	Po.Sp (µm)	Po.Sp.SD (µm)	ConnD (mm ⁻³)	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 ⁻¹)	-0,89***		-0,73*	-0,94***	-0,85***	0,67*	0,01	-0,74*	0,63*
Po.N (mm ⁻¹)	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 ⁻³)	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 (g cm^{-3})	1,029 (0,083)	1,093 (0,026)	0,013
TMD.SD (g cm^{-3})	0,078 (0,009)	0,087 (0,006)	0,009

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.

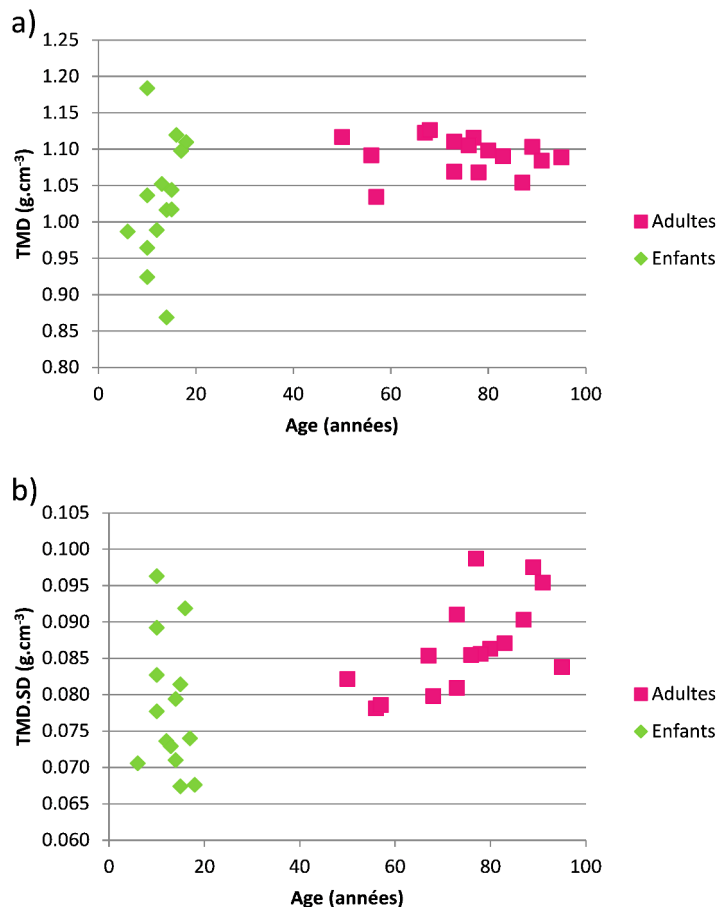


FIGURE II.9 – Evolution de la densité minérale du tissu (a) et de la distribution (b) déterminées par microCT en fonction de l'âge.

	Age (années)	TMD (g cm ⁻³)	TMD.SD (g cm ⁻³)
Age (années)		0,470	-0,245
TMD (g cm ⁻³)	-0,365		0,125
TMD.SD (g cm ⁻³)	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 ⁻³)	1,032 (0,059)	1,079 (0,037)	0,010
	DMB.SD (g cm ⁻³)	0,063 (0,018)	0,063 (0,024)	0,638
Interstitiel	DMB (g cm ⁻³)	1,192 (0,045)	1,260 (0,029)	< 0,0001
	DMB.SD (g cm ⁻³)	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.

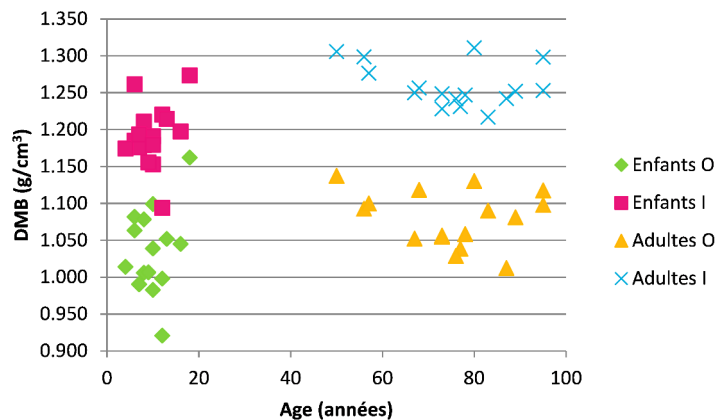


FIGURE II.10 – Evolution du DMB en fonction de l'âge pour chaque compartiment étudié (O :Ostéonal et I :Interstitiel).

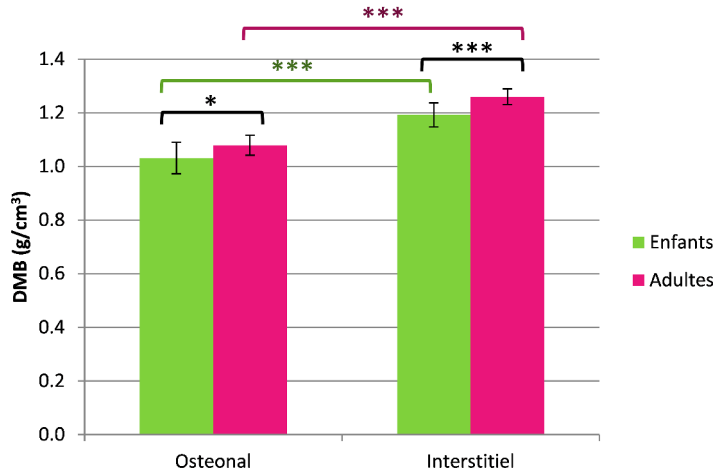


FIGURE II.11 – Valeurs des DMB et DMB.SD obtenues par microradiographie pour chaque groupe (Enfants/Adultes) et pour chaque compartiment étudié (Ostéonal/Interstitiel). Les p-values (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney pour la comparaison entre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

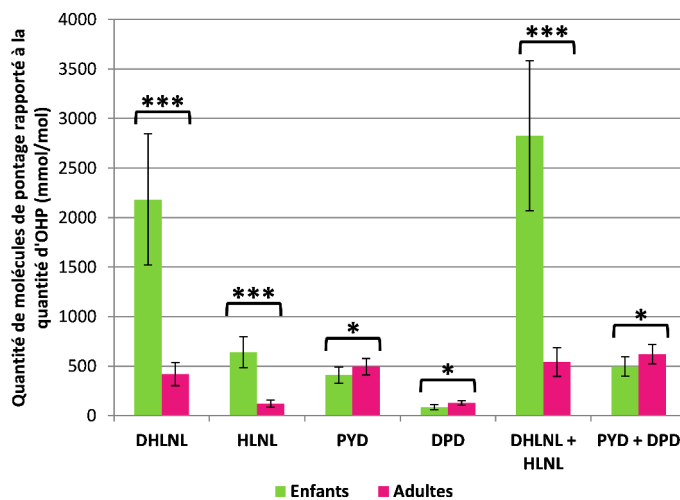


FIGURE II.12 – Valeurs des quantités de molécules de pontage pour chaque groupe. Les p-values (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001) pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

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

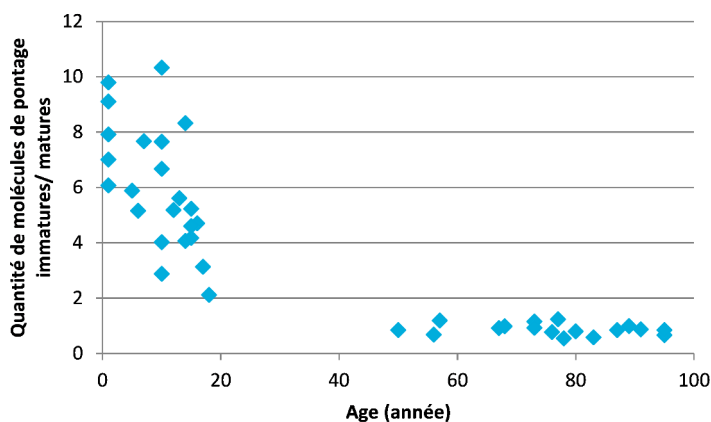


FIGURE II.13 – Evolution du ratio de molécules de pontage immatures sur les molécules de pontage mature (HLNL + DHLNL/DPD + PYD) en fonction de l'âge.

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 ($r'=-0,467$, $p<0,001$).

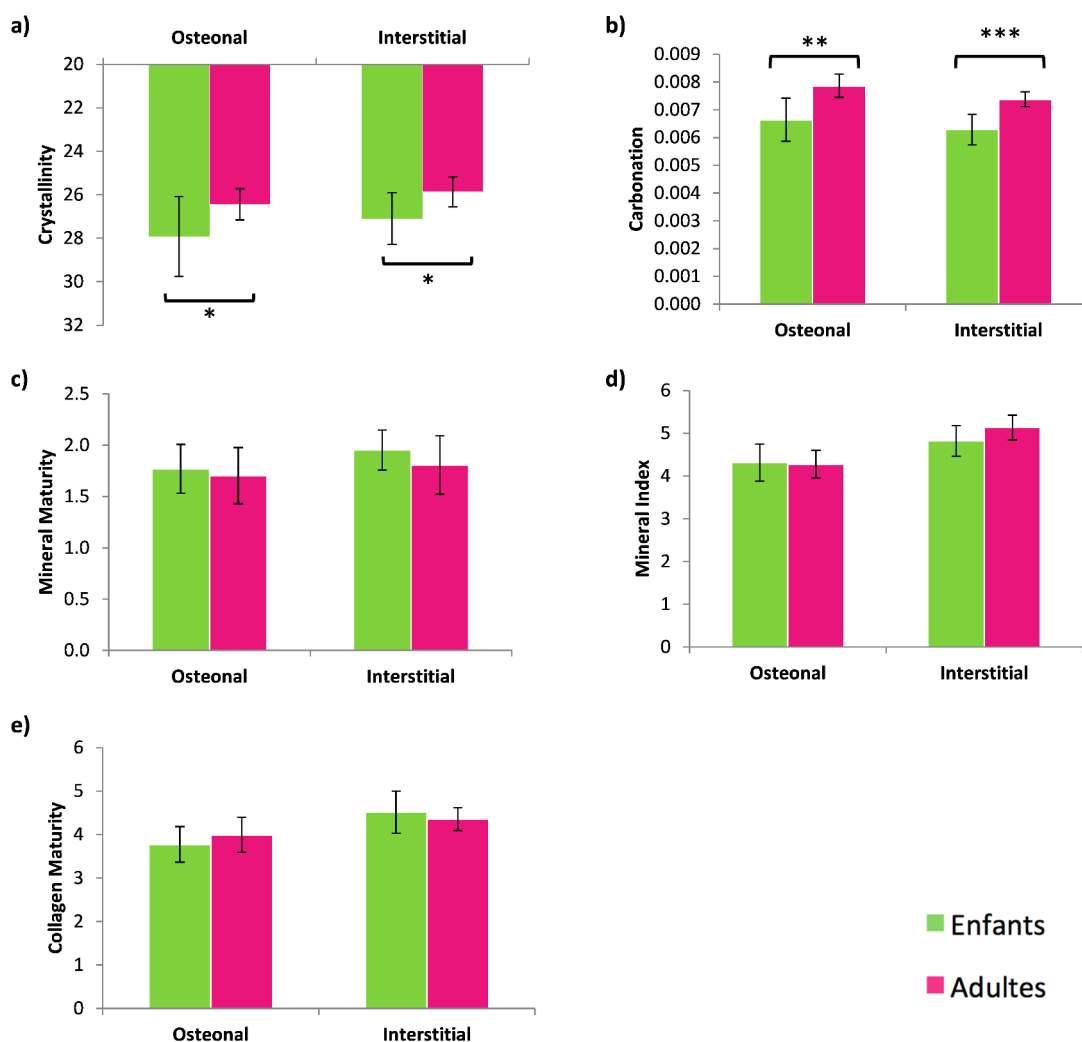


FIGURE II.14 – Moyennes et écarts-types de paramètres obtenus par FTIRM dans chacun des compartiments étudiés (ostéon et interstitiel) et pour chaque groupe. Les p-values (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

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 ± 4.6 ans) et un groupe adulte contenant 3 sujets (âge moyen : 79.0 ± 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 (g cm^{-3})	1,01	0,12	1,09	0,03	+7,9%
DMB (g cm^{-3})	1,11	0,10	1,17	0,10	+5,2%
HI (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 (mm^{-1})	38,1	13,5	37,5	14,1	-1,5%
Po.N (mm^{-1})	0,78	0,37	0,91	0,35	+17,5%
Po.Dm (μm)	149,6	57,3	158,1	79,9	+5,6%
Po.Dm.SD (μm)	71,4	36,3	77,2	50,2	+8,1%
Po.Sp (μm)	380,3	53,4	321,9	59,2	-15,4%
Po.Sp.SD (μm)	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.

Chapitre III

Comportement mécanique de l'os cortical en croissance

1 Introduction

Plusieurs études ont été menées pour déterminer les propriétés mécaniques de l'os cortical chez l'adulte : flexion [32, 36, 63, 80, 126, 126, 148], tension [14, 28, 93, 98, 125], compression [28, 89, 100, 101, 125, 126] et caractérisation ultrasonore [13, 50, 61, 63, 118].

A l'inverse, peu d'études ont été menées sur le comportement mécanique de l'os en croissance (partie I.4, Table I.5). De plus, en raison de la rareté de ces spécimens pour les tests de laboratoire, la plupart de ces études ont été menées sur peu d'échantillons. Par ailleurs, la représentativité de ces échantillons est douteuse, car en grande partie associés à des pathologies de l'enfant.

La difficulté d'obtenir un nombre d'échantillons suffisant et homogène pour une étude significative ne permet pas un consensus sur les données mécaniques de référence de l'os en croissance. Pourtant, ces données sont essentielles dans plusieurs domaines comme le calcul numérique pour implémenter les modèles en données mécaniques ou en imagerie pour l'amélioration des outils diagnostiques (techniques non-irradiantes, images en dynamique).

Dans cette étude, nous proposons une comparaison des propriétés mécaniques de l'os enfant avec de l'os adulte. Les paramètres étudiés par différents essais de caractérisation du matériau sont :

- **la rigidité** et **l'anisotropie** à l'échelle mésoscopique via une caractérisation ultrasonore non-destructive dans les 3 axes principaux de l'os ;
- **l'élasticité** et **la résistance à la rupture** à l'échelle mésoscopique en utilisant un essai de compression dans la direction axiale ;
- **l'élasticité**, **la plasticité** et **la dureté** à l'échelle microscopique en utilisant la nanoindentation instrumentée.

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, 27 échantillons de fibula et 7 échantillons de fémur ont été recueillis chez 31 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 III.1. Avant les essais, les échantillons ont été conservés à -80°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 III.1).

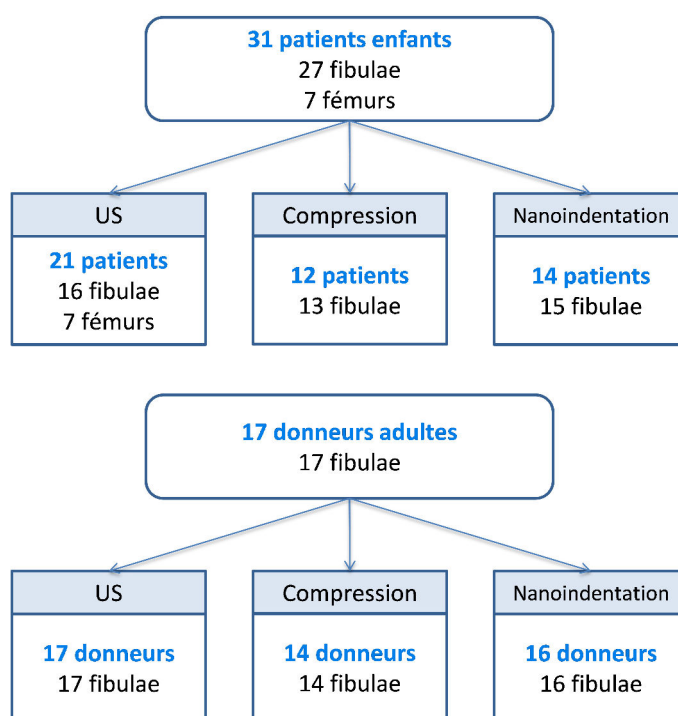


FIGURE III.1 – Répartition des échantillons suivant les essais.

Les échantillons ont été décongelés à température ambiante. Pour la caractérisation par méthode ultrasonore et la compression, nous utilisons les éprouvettes cubiques du chapitre II. Pour la nanoindentation, les échantillons ont été testés sur des blocs de résine. Sur ces blocs, des surfaces plates et parallèles ont été produites grâce à une fraise (Polycut E, Reichert-Jung, Germany).

2.2 Caractérisation mécanique par méthode ultrasonore

Les essais de caractérisation ultrasonore ont été mis en place avec l'aide du Dr Philippe Lasaygues, Dr Cécile Baron et Dr Cédric Payan au sein du Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique (LMA) à Marseille.

Pour ces essais, nous avons testé (Figure III.1, page 66) :

- 16 fibulae et 7 fémurs de 21 patients enfants. Age moyen : 10 ± 6 ans (1-18 ans) ;
- 17 fibulae de 17 patients adultes. Age moyen : 76 ± 13 ans (50-95 ans).

Les tests sont effectués sur des os bruts découpés en cubes de 2 mm de côté (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

2.2.1 Approche théorique

Le comportement élastique du matériau est modélisé par un tenseur d'ordre 4 C_{ijkl} contenant 81 coefficients élastiques. Le nombre de coefficients indépendants est réduit à 21 en tenant compte de la symétrie des tenseurs de contraintes et de déformations, et de la stabilité énergétique du tenseur. On a :

$$\sigma_{ij} = C_{ijkl} \cdot \varepsilon_{kl}$$

σ_{ij} sont les éléments du tenseur des contraintes, et ε_{kl} les éléments du tenseur des déformations. Les 21 coefficients C_{ijkl} caractérisent la matrice de rigidité des constantes élastiques. L'hypothèse d'un comportement orthotrope de l'os nécessite la détermination de neuf coefficients élastiques indépendants du tenseur d'élasticité C_{ijkl} .

Pour simplifier l'écriture, on adopte souvent une notation de 1 à 6, appelée notation de Voigt :

$$C_{IJ} = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & 0 & 0 & 0 \\ C_{21} & C_{22} & C_{23} & 0 & 0 & 0 \\ C_{31} & C_{32} & C_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & C_{66} \end{bmatrix}$$

Les relations entre les coefficients élastiques et les vitesses des ondes ultrasonores sont les suivantes :

$$C_{ii} = \rho V_{ii}^2$$

$$C_{44} = \rho V_{23}^2 = \rho V_{32}^2$$

$$C_{55} = \rho V_{13}^2 = \rho V_{31}^2$$

$$C_{66} = \rho V_{12}^2 = \rho V_{21}^2$$

$$C_{12} = \sqrt{(C_{11} + C_{66} - 2\rho V_{12/12}^2)(C_{22} + C_{66} - 2\rho V_{12/12}^2)} - C_{66}$$

$$C_{13} = \sqrt{(C_{11} + C_{55} - 2\rho V_{13/13}^2)(C_{33} + C_{55} - 2\rho V_{13/13}^2)} - C_{55}$$

$$C_{23} = \sqrt{(C_{22} + C_{44} - 2\rho V_{23/23}^2)(C_{33} + C_{44} - 2\rho V_{23/23}^2)} - C_{44}$$

V_{ii} : vitesse de l'onde de compression se propageant dans la direction x_i avec un mouvement des particules dans la direction x_i ;

V_{ij} : vitesse de l'onde de cisaillement se propageant dans la direction x_i avec un mouvement des particules dans la direction x_j ;

$V_{ij/ij}$: vitesse quasi-longitudinale ou quasi-transverse de l'onde de compression ou de cisaillement se propageant dans la direction $\frac{(x_i+x_j)}{\sqrt{2}}$ avec un mouvement des particules dans le plan i-j.

L'obtention des vitesses quasi-longitudinale et quasi-transverse requiert une découpe à 45° supplémentaire pour les échantillons cubiques (Figure III.2) [5]. La petite taille des échantillons de cette étude (2 mm de côté) a rendu impossible l'usinage de ces découpes supplémentaires. Cette étude se focalise sur la détermination des vitesses de propagation des ondes de compression et de cisaillement et donc sur les éléments diagonaux de la matrice de rigidité.

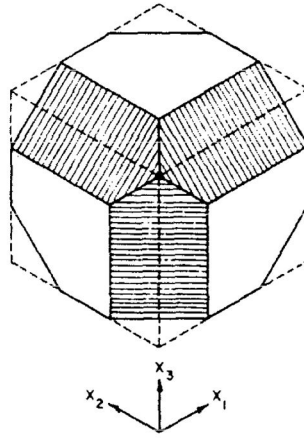


FIGURE III.2 – Découpe des échantillons pour la caractérisation ultrasonore selon Ashman et al. [5].

2.2.2 Mesures ultrasonores

Pour trouver des éléments diagonaux de la matrice de rigidité, nous devons déterminer la vitesse de propagation des ondes de compression et de cisaillement. Deux montages expérimentaux ont été utilisés : le premier permettant le calcul des vitesses des ondes de compression et le second pour le calcul des vitesses des ondes de cisaillement. Pour les deux, nous supposons un milieu non dispersif et nous déterminons la vitesse de l'onde se propageant dans la direction x_i en utilisant une méthode de comparaison. Le temps mis par une onde ultrasonore pour la traversée d'un échantillon entre les deux transducteurs est estimée comme ceci :

$$\begin{aligned} t_{sample} &= t_{ref} - t_{sample} + t_{ref} \\ &= -\Delta t + t_{ref} \\ &= -\Delta t + \frac{l_{ref}}{V_{ref}} \end{aligned}$$

D'où la vitesse de propagation de l'onde :

$$V_{ij} = \frac{l_{sample_i}}{-\Delta t + \frac{l_{ref}}{V_{ref}}}$$

V_{ij} : vitesse de l'onde de compression ($i = j$) ou de cisaillement ($i \neq j$) ;
 V_{ref} : vitesse de l'onde ultrasonore dans le milieu de référence ;
 t_{sample} : temps de vol de l'onde en présence de l'échantillon ;
 t_{ref} : temps de vol de l'onde dans le milieu de référence ;
 $\Delta t = t_{ref} - t_{sample}$;
 l_{sample_i} : épaisseur de l'échantillon dans la direction x_i ;
 l_{ref} : épaisseur du milieu de référence.

2.2.2.1 Mesure des vitesses des ondes de compression

Les essais ont été réalisés sur le banc d'essai ultrasons spécialement développé par le LMA pour des échantillons de petites tailles, et validé par des essais sur os bovin. Le banc d'essai dispose de deux transducteurs fonctionnant en émission-réception (Pinducers, VP1093, fréquence centrale de 5MHz, CTS Valpey Corporation, Hopkinton, MA). L'ensemble est immergé dans une cuve remplie d'eau.

Une première mesure, la mesure de référence, est effectuée sans échantillon entre les deux transducteurs. Le matériau de référence est donc l'eau. Sur un abaque, nous vérifions la célérité d'une onde ultrasonore se propageant dans l'eau en fonction de la température de celle-ci. Les mesures suivantes se font en plaçant l'échantillon entre les deux transducteurs. L'échantillon est maintenu aligné entre les deux transducteurs grâce à un bloc de gélatine (Figure III.3 et III.4). Trois vitesses sont mesurées dans l'échantillon. Elles correspondent aux vitesses de l'onde selon les trois directions de l'échantillon (radiale, tangentielle et axiale) que l'on notera respectivement V_{11} , V_{22} et V_{33} .

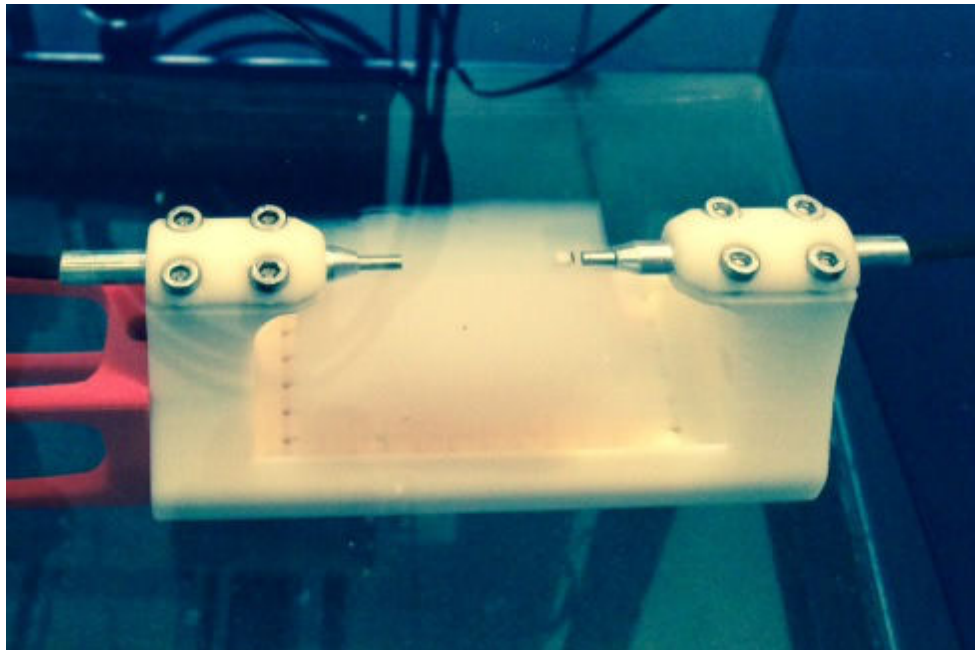


FIGURE III.3 – Photographie du montage des essais US avec pinducers.

2.2.2.2 Mesure des vitesses des ondes de cisaillement

Le banc d'essai dispose de deux transducteurs à ondes de cisaillement (Panametrics V156,

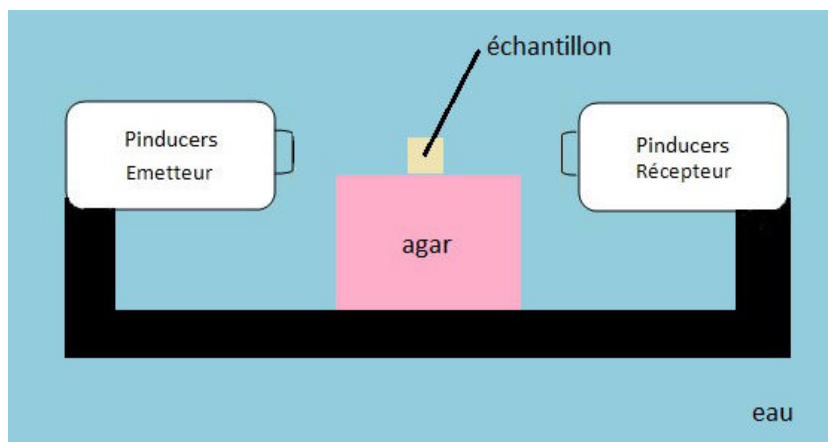


FIGURE III.4 – Schéma du montage des essais US avec pinducers.

5MHz, Inc., Waltham, MA), opérant en émission-réception. Une première mesure de référence est effectuée en plaçant un cube de 5 mm d'aluminium entre les deux transducteurs. De la même façon, nous testons les échantillons osseux en les plaçant en contact entre les deux transducteurs. Pour les deux types de mesure, un couplant a été utilisé pour assurer la transmission des ondes. Six vitesses sont mesurées dans l'échantillon : trois directions de propagation de l'onde et trois directions de propagation des particules (radiale, transverse et axiale). On notera V_{ij} avec i la direction de propagation de l'onde et j la direction de déplacement des particules.

2.3 Caractérisation mécanique par essai de compression

Les essais de compression ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Jean-Marc Allain et le Dr Hakim Gharbi au sein du Laboratoire de Mécanique des solides (LMS) de l'Ecole Polytechnique, Université Paris-Saclay.

Pour ces essais, nous avons testé (Figure III.1, page 66) :

- 13 fibulae de 12 patients enfants. Age moyen : 13 ± 3 ans (6-18 ans) ;
- 14 fibulae de 14 patients adultes. Age moyen : 72 ± 13 ans (50-91 ans).

Les tests sont effectués sur des os bruts découpés en cubes de 2 mm de côté (Voir protocole général à la Figure I.16, page 36).

Du fait des faibles dimensions des éprouvettes, le suivi de la déformation a été réalisé par la méthode de mesures de champs par corrélation d'images. Cette méthode permet de mesurer, pour une résolution fixée, le champ de déplacement élastique d'une face éclairée de l'échantillon soumis à une sollicitation mécanique (dans le cas présent, ce sera une compression). 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). La comparaison d'images repose sur l'utilisation de la technique de corrélation, qui exploite une hypothèse de conservation du contraste local des images dans un voisinage des points dont on recherche le déplacement [68].

Préalablement aux essais de compression, la face observée de l'éprouvette doit être recouverte d'un nuage de point appelé mouchetis. Pour notre étude, nous voulons caracté-

riser les propriétés mécaniques dans la direction axiale de l'os, c'est pourquoi le mouchetis sera effectué sur une face perpendiculaire à l'axe longitudinal de l'os et dont les déformations seront mesurées par le système optique. Il est nécessaire d'avoir un fort contraste sur cette surface pour mettre en œuvre, dans de bonnes conditions, la technique de corrélation d'images (Figure III.5).

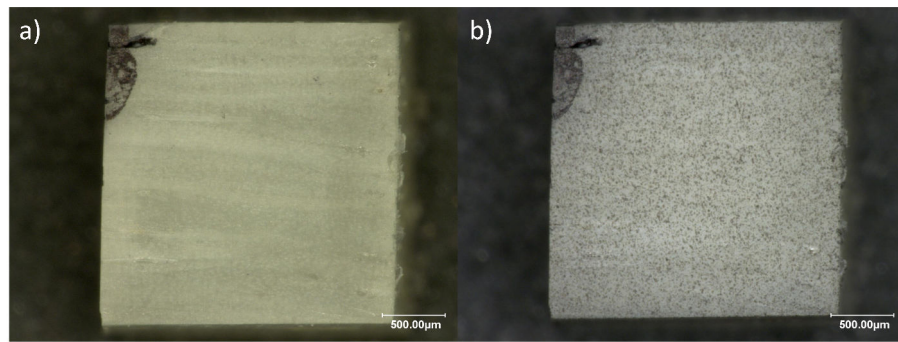


FIGURE III.5 – Préparation de l'échantillon avant compression. a)- Echantillon avant préparation. b)- Echantillon recouvert d'un mouchetis.

L'échantillon préparé est placé dans une presse uniaxiale équipée d'un capteur de charge de 5000 N. La mise en charge de l'échantillon est faite avec une vitesse de déplacement fixée à $1 \mu\text{m s}^{-1}$, pour rester dans le cas d'un essai quasi-statique, et correspondant à une vitesse de déformation de l'ordre de 10^{-5} s^{-1} .

L'acquisition des images de la face observée de l'échantillon est réalisée avec une caméra CCD équipée d'un objectif de microscope (Edmund Optics) de grandissement $\times 5$ qui est placée devant l'échantillon (Figure III.6). La caméra utilisée (type Pike - Allied Vision Technologies) est connectée à un ordinateur dans lequel se trouve un logiciel qui fait l'acquisition des images et leur traitement. La taille d'un pixel de l'image est de $0,6 \times 0,6 \mu\text{m}^2$ et le capteur fait 2452×2054 pixels.

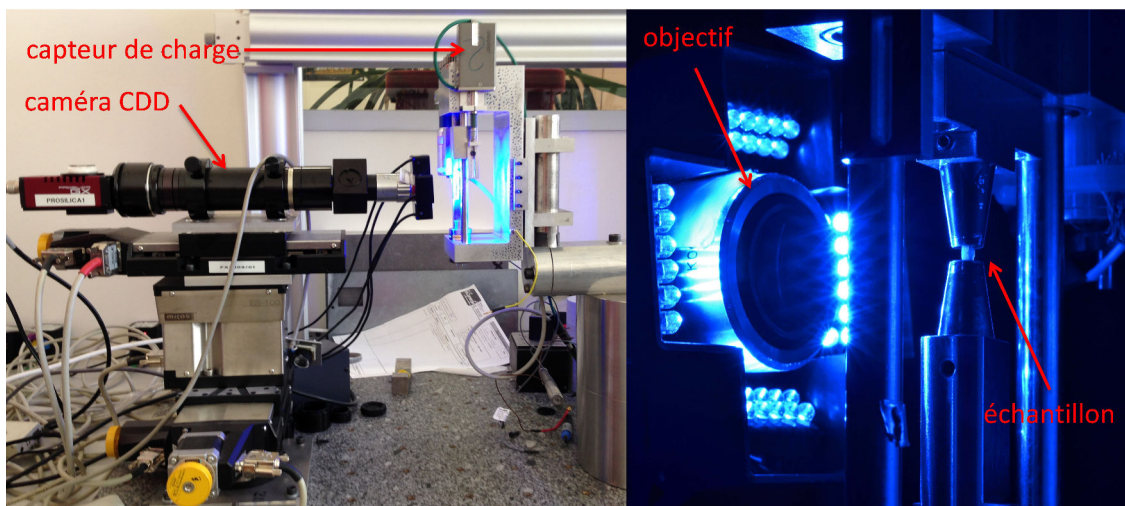


FIGURE III.6 – Photographie du montage de compression.

Le module d'Young (E_3) est calculé à partir de la déformation (ε) et de la contrainte (σ) :

$$E_3 = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

E_3 est homogène à une pression. Il sera exprimé en gigapascal (GPa).

2.4 Caractérisation mécanique par nanoindentation instrumentée

Les essais de nanoindentation ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Philippe Zysset et le Dr Uwe Wolfram au sein de l'Institut de technologie chirurgicale et de biomécanique à Berne (Suisse).

Pour ces essais, nous avons testé (Figure III.1, page 66) :

- 15 fibulae de 14 patients enfants. Age moyen : 10 ± 4 ans (4-18 ans) ;
- 16 fibulae de 16 patients adultes. Age moyen : 76 ± 13 ans (50-95 ans).

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

2.4.1 Principe

L'essai d'indentation consiste à faire pénétrer une pointe, appelée indenteur ou pénétrateur, de géométrie et propriétés mécaniques connues, dans un matériau (si possible plan) pour en déduire ses propriétés mécaniques : une mesure effort-déplacement permet de déterminer la dureté et le module élastique d'un matériau.

L'indenteur est constitué d'une pointe fabriquée dans un matériau très dur (diamant) pour limiter la complaisance du système d'indentation. Il s'agit généralement de pointes en diamant dont les propriétés mécaniques sont bien connues (module d'Young : $E_d = 1141$ GPa et coefficient de Poisson : $\nu_d = 0,07$). Cette pointe, appelée indenteur, est imprimée dans l'échantillon dont les propriétés sont à déterminer. La charge appliquée sur l'indenteur est augmentée jusqu'à ce que la profondeur de pénétration de l'indenteur dans l'échantillon atteigne une valeur prédéfinie. La charge est alors soit maintenue constante, soit supprimée. En micro- et nanoindentation, de faibles charges et de petites tailles d'indents sont utilisées. L'aire résiduelle dont les dimensions ne sont que de quelques micromètres pour la microindentation et de quelques nanomètres pour la nanoindentation est généralement trop petite pour être mesurée de manière fiable. Elle est donc assimilée à l'aire de contact au chargement maximum. L'aire de contact (A_c) est déduite de la profondeur de pénétration de l'indenteur à charge maximale. La dureté du matériau est définie comme :

$$H = \frac{P_{max}}{A_c}$$

Avec :

- H , la dureté de contact du matériau (en MPa). C'est un paramètre hybride entre un comportement élastique et plastique ;
- P_{max} , l'effort de chargement maximal (en N) ;
- A_c , l'aire de contact au chargement maximal (en mm^2).

Pendant l'essai d'indentation, la profondeur de pénétration et le chargement sont enregistrés permettant de tracer la courbe effort-déplacement ($P - h$). C'est à partir de cette courbe que sont déterminées les propriétés mécaniques du matériau dont notamment le

module d'Young (E) ou le module d'indentation E^* (aussi appelé module de déformation plan).

$$E^* = \frac{E}{1 - \nu^2}$$

Dans la méthode développée par Oliver and Pharr [102], la courbe $P - h$ de déchargement est ajustée par une courbe de régression en puissance de la forme :

$$P = \alpha(h - h_f)^m$$

Avec α , h_f et m , des paramètres d'ajustement. La raideur de contact est définie par la pente de la tangente à cette courbe au chargement maximal ($S = \frac{dP}{dh}|_{P_{max}}$).

La profondeur de contact h_c est définie à partir de la raideur par la relation suivante :

$$h_c = h_{max} - \epsilon \frac{P_{max}}{S}$$

Avec ϵ , coefficient adimensionnel caractéristique de la géométrie de l'indenteur (=0,75 pour un indenteur de type Berkovich). L'aire de contact est déduite de la profondeur de contact. En pratique, les indents n'ayant pas une géométrie parfaite, un étalonnage permet de déterminer une fonction d'aire qui relie la profondeur à l'aire de contact.

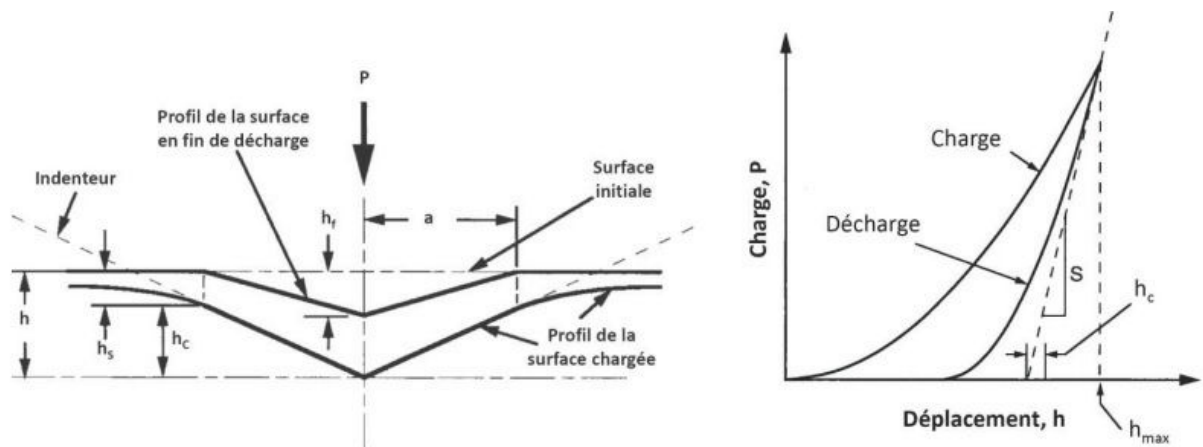


FIGURE III.7 – Principe de l'indentation instrumentée (gauche) et exemple de courbe charge-déplacement (droite), adapté de [102].

L'aire de contact permet d'évaluer le module d'Young réduit E_r donné par la somme des modules de déformation plane du matériau et de l'indenteur :

$$S = 2\beta \sqrt{\frac{A_c}{\pi}} E_r$$

Avec :

- S , la raideur de contact de l'échantillon, calculée comme étant la pente de la tangente initiale du segment de déchargement sur la courbe charge/profondeur d'indentation ;
- β , un coefficient de correction géométrique pour l'indenteur Berkovich ($\beta = 1,034$).

Le module E_r est relié au module d'Young E de l'échantillon par la relation de la mécanique des contacts suivante :

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

Avec :

- ν_i , le coefficient de Poisson du matériau de l'indenteur ;
- E_i , le module de Young du matériau de l'indenteur ;
- ν , le coefficient de Poisson du matériau testé ;
- E , le module de Young de l'échantillon testé.

Les travaux élastique, plastique et total sont définis comme :

$$W_{tot} = \int_0^{h_m} P dh, \quad W_{elast} = \int_{h_m}^{h_p} P dh, \quad W_{plast} = W_{tot} - W_{elast}$$

avec h_m la profondeur maximale et h_p la profondeur résiduelle.

2.4.2 Essais de nanoindentation sur l'os cortical

Nous utilisons pour ces essais une machine de nanoindentation instrumentée Ultra Nano Hardness Tester (UNHT, CSM Instruments, Switzerland) équipée d'un indenteur de type berkovich. Les essais sont effectués selon l'axe longitudinal. Pour chaque échantillon, nous choisissons 10 régions d'intérêt (ROI). Dans chaque ROI, nous effectuons 5 indentations dans l'ostéon et 5 indentations dans l'os interstitiel. La profondeur maximale d'indentation est fixée à 1 μm avec un taux de chargement de 100 mN min^{-1} , un maintien à la force maximale de 30 s et un taux de déchargement de 400 mN min^{-1} . Ce paramétrage a été choisi afin de minimiser les effets de fluage sur la mesure [141]. Le module d'indentation E^* , la dureté H , le travail élastique W_{elast} et le travail total W_{tot} ont été extraits en utilisant des méthodes standards [102, 110, 142].

2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (IBM, Amonk, 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 (r') ou de Pearson (R^2).

3 Résultats

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

3.1 Propriétés mécaniques à l'échelle mésoscopique

3.1.1 Caractérisation ultrasonore

Les moyennes et écart-types des mesures des coefficients de rigidité (C_{IJ} , en g cm^{-3}) sont répertoriées dans la Table III.1. Les coefficients de rigidité entre les groupes adultes/enfants sont tous significativement différents (Table III.1) ; avec une diminution des coefficients de rigidité de -19%, -19%, -23%, -17%, -22% et -18% (de C_{11} à C_{66} respectivement) de l'adulte à l'enfant.

	Enfants (n=21)	Adultes (n=17)	p-values
	1-18 ans (10±6)	50-95 ans (76±13)	
	Moyenne (écart-type)	Moyenne (écart-type)	
C_{11}	15,1 (3,2)	17,7 (2,89)	0,007
C_{22}	14,8 (3,4)	17,7 (5,27)	0,0233
C_{33}	22,4 (5,7)	28,0 (3,71)	0,044
C_{44}	3,97 (0,843)	4,77 (0,62)	0,0119
C_{55}	3,81 (0,863)	4,64 (0,56)	0,0118
C_{66}	3,01 (0,499)	3,60 (0,69)	0,024

TABLE III.1 – Valeurs des coefficients de rigidité. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenus en utilisant le test de Mann-Whitney.

La Figure III.8 présente l'évolution des coefficients de rigidité avec l'âge et la Table III.2 présente les corrélations obtenues entre l'âge et les coefficients de rigidité. Chez l'enfant en croissance, tous les coefficients sont fortement corrélés avec l'âge, alors que chez les adultes, seulement C_{33} et C_{55} sont liés à l'âge.

	Enfants		Adultes	
	r'	p-values	r'	p-values
C_{11}	0,602	0,005	-0,447	0,084
C_{22}	0,761	<0,0001	-0,406	0,120
C_{33}	0,703	0,001	-0,634	0,010
C_{44}	0,579	0,007	-0,400	0,126
C_{55}	0,644	0,002	-0,555	0,028
C_{66}	0,639	0,002	-0,412	0,114

TABLE III.2 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les coefficients de rigidité et l'âge chez l'enfant et chez l'adulte.

La Table III.3 regroupe les résultats du test apparié de Wilcoxon pour la comparaison des C_{ij} . Les résultats pour les adultes et les enfants sont similaires : aucune différence significative n'a été trouvée entre C_{11} et C_{22} et entre C_{44} et C_{55} . Ceci confirme une isotropie transverse avec $C_{33} > C_{11} = C_{22} > C_{44} = C_{55} > C_{66}$ pour chacun des groupes. Les résultats montre donc un plan d'isotropie correspondant avec le plan perpendiculaire à l'axe de l'os.

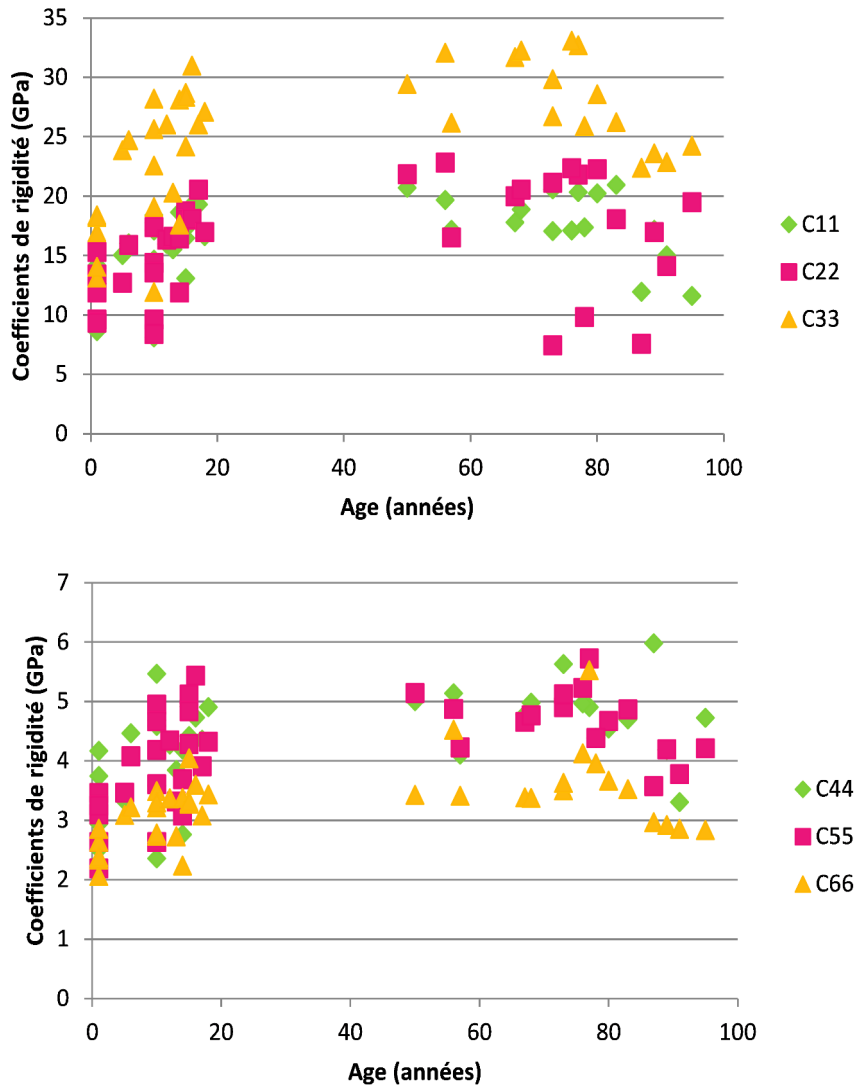


FIGURE III.8 – Evolution des coefficients de rigidité en fonction de l'âge.

p-values	C_{11}	C_{22}	C_{33}	C_{44}	C_{55}	C_{66}
C_{11}	1					
C_{22}	0,6791	1				
C_{33}	0,0004	0,0004	1			
C_{44}	0,0004	0,0004	0,0004	1		
C_{55}	0,0004	0,0004	0,0004	>0,999	1	
C_{66}	0,0004	0,0004	0,0004	0,0006	0,0005	1

TABLE III.3 – Comparaison des C_{ij} via le test apparié de Wilcoxon chez l'enfant et chez l'adulte.

3.1.2 Essais de compression

Sur la Figure III.9, on peut voir les 13 courbes brutes contrainte/déformation obtenues pour la compression des échantillons d'os enfant.

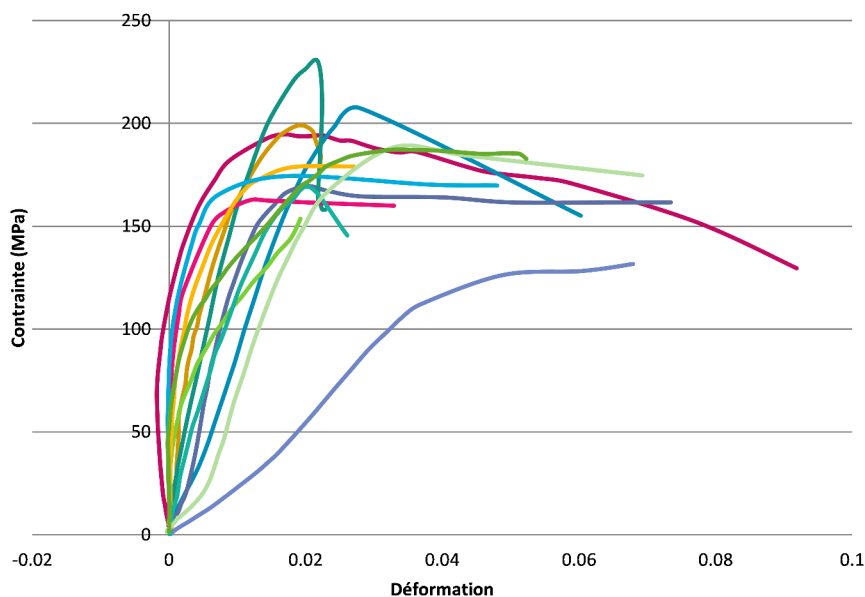


FIGURE III.9 – Courbes contrainte/déformation obtenues pour la compression des échantillons d'os enfant.

Les moyennes et écart-types des paramètres mécaniques obtenus par compression sont répertoriées dans la Table III.4. On observe une différence significative entre les groupes adultes/enfants pour la déformation maximale ($p=0,0002$) et pour la contrainte maximale ($p=0,029$). Pour le module d'Young, il n'y a pas de différence entre les deux groupes.

	Enfants (n=12) 6-18 ans (13±3) Moyenne (écart-type)	Adultes (n=14) 50-91 ans (72±13) Moyenne (écart-type)	p-values
ε_{max} (%)	3,51 (3,04)	1,15 (0,60)	0,0002
σ_{max} (MPa)	207,44 (114,07)	148,21 (37,00)	0,029
E_3 (GPa)	12,90 (5,50)	13,44 (4,52)	0,689

TABLE III.4 – Valeurs des paramètres mécaniques obtenus par compression. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

Aucune corrélation n'a été trouvée avec l'âge lorsque le test statistique est effectué sur les deux groupes séparément. Sur la Figure III.10, on peut voir l'évolution en fonction de l'âge de E_3 , ε_{max} et σ_{max} .

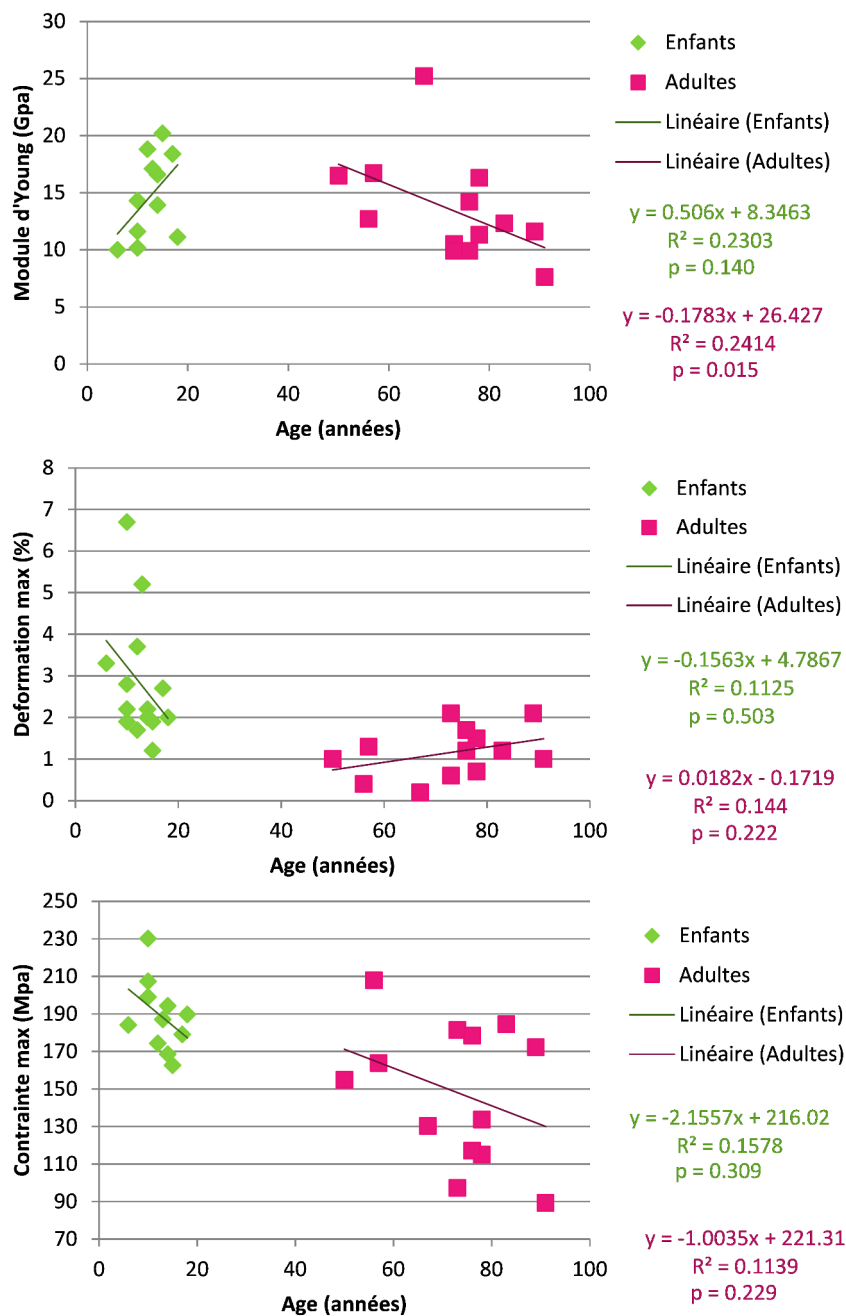


FIGURE III.10 – Evolution en fonction de l'âge de E_3 , ε_{max} et σ_{max} déterminés par essais de compression.

3.2 Propriétés mécaniques à l'échelle microscopique

3.2.1 Nanoindentation instrumentée

Les moyennes et écart-types des paramètres mécaniques obtenus par nanoindentation sont répertoriés dans la Table III.5. On observe une différence significative du module E^* entre les groupes adultes/enfants aussi bien dans le tissu ostéonal que dans l'interstitiel.

Pour les autres paramètres mesurés (i.e. H , W_{plast} et W_{tot}) on trouve une différence significative entre les deux groupes seulement pour les mesures faites dans le tissu interstitiel. Dans le tissu ostéonal, par rapport aux enfants, les adultes ont un module d'indentation plus élevé (E^* : +6,8%). Dans le tissu interstitiel, les adultes ont des valeurs plus élevées de module d'Young (E^* : +14,7%), de dureté (H : +10,8%), de travail plastique (W_{plast} : +8,8%) et de travail total (W_{tot} : +8,5%).

	Enfants (n=14) 4-18 ans (10±4) Moyenne (écart-type)	Adultes (n=16) 50-95 ans (76±13) Moyenne (écart-type)	p-values
OSTEON			
E^* (GPa)	24,4 (1,93)	26,05 (1,86)	0,037
H (MPa)	1039,83 (70,72)	1065,45 (86,03)	0,443
W_{plast} (pJ)	5462,79 (332,55)	5657,22 (389,14)	0,324
W_{tot} (pJ)	7109,75 (416,42)	7308,59 (497,57)	0,369
INTERSTITIEL			
E^* (GPa)	25,8 (1,93)	29,61 (1,07)	< 0,0001
H (MPa)	1106,37 (79,20)	1225,94 (72,25)	0,0004
W_{plast} (pJ)	5742,02 (271,83)	6246,73 (237,57)	0,0001
W_{tot} (pJ)	7489,82 (347,44)	8124,64 (320,91)	0,0003

TABLE III.5 – Valeurs des paramètres mécaniques obtenus par nanoindentation. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

Pour les deux groupes étudiés, les résultats obtenus pour le tissu ostéonal et interstitiel sont significativement différents (enfants : $0,003 < p < 0,010$; adultes : $p=0,0005$). La Figure III.11 montre l'évolution de E^* et H en fonction de l'âge dans les deux compartiments étudiés. Chez l'enfant, on voit apparaître une forte corrélation avec l'âge de E^* ($r'=0,561$, $p=0,048$; $r'=0,622$, $p=0,026$ pour le tissu ostéonal et interstitiel respectivement) et de H ($r'=0,575$, $p=0,042$; $r'=0,630$, $p=0,024$ pour le tissu ostéonal et interstitiel respectivement).

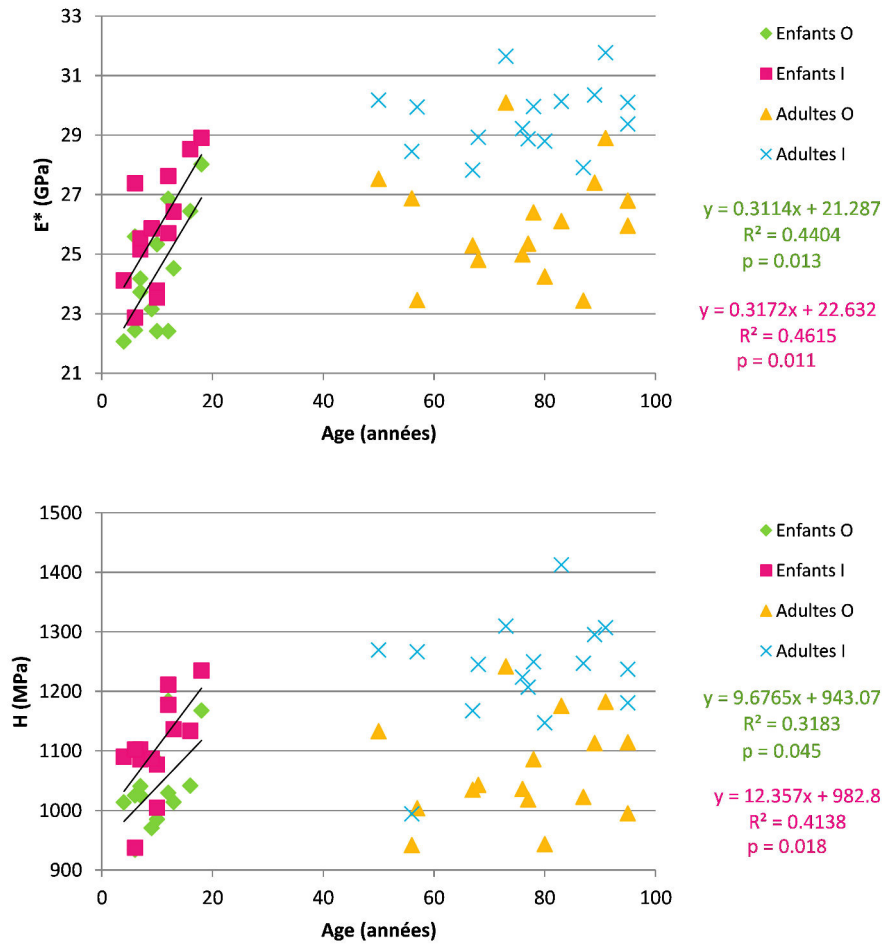


FIGURE III.11 – Evolution de E^* et H obtenus par nanoindentation en fonction de l'âge. O : tissu ostéonal ; I : tissu interstitiel.

4 Discussion

Dans cette étude, les propriétés mécaniques d'échantillons de tissu osseux d'adultes et d'enfants ont été comparées à différentes échelles, via l'utilisation de différentes techniques : caractérisation ultrasonore, compression et nanoindentation. Au vu 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. Les échantillons pour le groupe d'adultes contrôles ont été récupérés sur des fibulae avec un ratio homme/femme équilibré.

Les valeurs de propriétés mécaniques de la littérature sont généralement trouvées sur des fémurs ou des tibias ; à notre connaissance, il existe peu de données sur la fibula. Nos résultats contribuent donc à un nouveau lot de données et nous permettent de comparer les valeurs adultes et enfants sur un même site anatomique.

4.1 Propriétés mécaniques à l'échelle mésoscopique

4.1.1 Caractérisation ultrasonore

La caractérisation ultrasonore a permis de déterminer et de comparer les coefficients de rigidité chez les deux groupes étudiés. La méthode utilisée est basée sur la mesure des vitesses de propagation des ondes de compression et de cisaillement se propageant le long des différentes directions de l'os [13, 50, 61]. Ce procédé a été largement utilisé mais la gamme de fréquence des transducteurs doit être adaptée à la taille et la géométrie de l'échantillon. Dans cette étude, nous utilisons une fréquence de 5MHz pour les transducteurs ce qui permet d'obtenir une longueur d'onde plus grande que la taille typique des hétérogénéités du tissu osseux ($<$ quelques centaines de microns) et plus petite que les dimensions de l'échantillon. Le choix de cette fréquence a permis de travailler sur des ondes de volume et sans phénomène de multi-diffusion. Le milieu est donc perçu comme étant homogène.

La contrainte la plus importante de cette étude a été la taille des spécimens d'os récupérés, et plus particulièrement la contrainte pour la dimension radiale qui est donnée par l'épaisseur corticale de l'os. Cette contrainte a empêché une découpe à 45° supplémentaire qui aurait permis de récupérer tous les coefficients de la matrice de rigidité [5] et ainsi remonter aux paramètres d'ingénierie classique : modules d'Young E_i , modules de cisaillement G_{ij} et coefficients de Poisson ν_{ij} selon les trois directions principales de l'os.

Dans la littérature, les coefficients de rigidité longitudinaux (C_{11} , C_{22} et C_{33}) déterminés par méthode ultrasonore sur des échantillons adultes (fémurs et tibias) se situent entre 16,8 et 31,7 GPa [5, 16, 50, 73]. Nos résultats pour la fibula adulte se situent entre 17,7 et 28,0 GPa, ce qui est en accord avec la littérature.

Nos résultats montrent une augmentation des coefficients de rigidité avec l'âge jusqu'à la puberté, atteignant ainsi les valeurs adultes (Figure III.8). Le coefficient C_{33} , qui décrit le comportement élastique en traction-compression dans la direction axiale, montre une régression linéaire positive chez l'enfant ($R^2=0,44$, $p<0,01$, Pearson) et négative chez l'adulte âgé ($R^2=0,36$, $p<0,015$, Pearson). Cette tendance rappelle celle de l'évolution de la densité minérale osseuse avec l'âge [24, 25]. Une étude *in vivo* de Drozdowska and Pluskiewicz [49] a évalué la vitesse du son (SOS - speed of sound) dans les phalanges de la main, dans une population âgée de 7 à 80 ans. Les auteurs ont conclu que la SOS augmentait linéairement jusqu'à l'âge de 25-30 ans, après quoi les valeurs diminuaient de manière modérée. Ce travail diffère du nôtre par l'approche *in vivo* qui introduit l'effet des tissus mous et de la géométrie de l'os. De plus, cette étude est réalisée sur des phalanges, os qui n'a pas la même sollicitation mécanique que les os des membres inférieurs. Néanmoins, même avec la lacune dans le recouvrement de l'âge de population (enfants de 1-18 et adultes de 50-95), nos résultats présentent une tendance similaire sur les âges étudiés.

En ce qui concerne le comportement anisotrope de l'os cortical, la littérature contient différentes hypothèses. Certains auteurs considèrent l'os cortical comme orthotrope (trois plans de symétrie perpendiculaires, 9 coefficients de rigidité indépendants) [5, 73, 112]. D'autres assument qu'il peut être considéré comme isotrope transverse avec un comportement similaire dans les deux directions transverses mais différent dans la direction axiale (5 coefficients de rigidité indépendants) [112, 146].

Dans notre étude, l'obtention de seulement 6 des 9 coefficients de la matrice de rigidité (les coefficients diagonaux C_{ii}) nous permet de trancher entre les deux hypothèses. Les résultats montrent une isotropie transverse pour les deux groupes.

Plusieurs études soulignent le fait que la mesure de la vitesse d'une onde ultrasonore dépend de la localisation anatomique et de l'emplacement circonférentiel [15, 112]. Rudy et al. [118] ont montré que l'anisotropie dépend de l'emplacement de l'échantillon le long de la diaphyse : leurs échantillons révèlent une isotropie transverse le long de la diaphyse et une orthotropie aux extrémités proximale et distale de la diaphyse. Dans notre étude, les échantillons sont extraits au niveau du tiers inférieur de la diaphyse, selon l'appréciation du chirurgien. Il est donc difficile de comparer nos résultats à ceux de Rudy et al. [118].

4.1.2 Essai de compression

La compression a permis de déterminer et de comparer le module d'Young axial E_3 , la déformation max ε_{max} et la contrainte max σ_{max} chez les deux groupes étudiés. Cette technique est largement utilisée pour décrire les paramètres mécaniques de l'os [28, 89, 100, 101, 125, 126], y compris en utilisant la méthode de mesures de champs par corrélation d'images [62, 132]. La limitation principale de cette étude est encore une fois la taille de l'échantillon qui impacte l'usinage de l'échantillon. La géométrie et le parallélisme des éprouvettes sont un point crucial de la réussite des essais. Les échantillons qui ne répondaient pas parfaitement aux critères stricts de géométrie ont dû malheureusement être exclus de l'étude.

Pour notre étude, nous avons choisi de découpler les résultats par groupe d'âge, afin de ne pas tenir compte de l'écart d'âge existant entre nos deux populations (enfants : 6-18 ans ; adultes : 50-95 ans). En effet, si l'on observe l'évolution du module d'Young axiale (E_3) en fonction de l'âge (Figure III.10), le module d'Young augmente pendant la croissance, puis diminue chez les sujets âgés. Ces tendances expliquent le fait que nous ne retrouvons pas de différence statistique entre le module d'Young d'un os en croissance et celui d'un os adulte, et sont comparables à celles trouvées pour l'évolution du coefficient C_{33} avec l'âge. Ce résultat est contradictoire avec celui de l'étude de Ohman et al. [100] qui montre une différence significative pour le module d'Young entre ses deux groupes d'âge (Enfant/Adultes). Cependant, les échantillons du groupe adulte de ces auteurs sont extraits d'une population plus jeune que celle de notre étude (tranche d'âge : 22-61 ans contre 50-91 ans pour notre étude). Si l'on suit l'hypothèse que le module d'Young augmente avec l'âge, atteint un pic puis diminue, ceci pourrait expliquer l'obtention de modules d'Young plus élevés dans l'étude de Ohman et al. [100].

On observe une différence fortement significative entre les groupes adultes/enfants pour la déformation maximale ($p=0,0002$) avec une valeur moyenne de ε_{max} deux fois plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte. Ce paramètre décroît avec l'âge (Figure III.10). Ceci tend à faire penser que plus l'os vieillit, moins il est apte à se déformer, ce qui reflète bien ce que l'on observe cliniquement. De même, la contrainte maximale à rupture est bien supérieure (et significativement différente) chez l'enfant à celle obtenue dans le groupe adulte, ce qui conforte le fait que la résistance osseuse diminue avec l'âge. Ce caractère déformable de l'os en croissance pourrait expliquer les fractures partielles spécifiques des os longs chez l'enfant (Partie I.4.3.1, page 31).

4.2 Propriétés mécaniques à l'échelle microscopique

4.2.1 Nanoindentation

La nanoindentation a été utilisée dans plusieurs études pour déterminer les propriétés mécaniques de l'os cortical à l'échelle de l'ostéon [65, 115, 151]. Chez l'adulte, cette technique a déjà permis de comparer les propriétés mécaniques dans les compartiments

ostéonal et interstitiel. Chez l'enfant, elle a permis de comparer les propriétés mécaniques du tissu osseux de patients souffrant d'ostéogénèse imparfaite à celui de patients contrôles [2, 52, 75], sans distinction entre le tissu ostéonal et interstitiel. Dans cette étude, nous avons proposé de déterminer et de comparer les propriétés mécaniques à l'échelle du tissu dans les compartiments ostéonal et interstitiel chez l'adulte et l'enfant.

Dans notre étude, les essais ont été effectués sur des échantillons osseux inclus dans résine à base de MMA. Dans un article, Rodriguez Florez et al. [116] ont comparé les résultats de nanoindentation suivant différents protocoles de préparation de l'échantillon (enrobage et inclusion). Ils ont montré que les valeurs de E^* et les valeurs de viscosité du modèle étaient similaires pour des échantillons enrobés ou inclus. Cependant, la dureté était plus élevée pour les échantillons inclus dans le PMMA. Ceci semble provenir de l'infiltration de la résine dans les pores. Dans notre étude, les échantillons des deux groupes ont subi le même protocole de préparation. Cette préparation n'empêchera donc pas la comparaison entre les groupes.

Nos résultats montrent des propriétés mécaniques très différentes entre les deux groupes pour le tissu interstitiel. celles-ci sont, à l'exception de E^* , relativement similaires dans l'ostéon. De plus, nous observons que la comparaison entre les deux compartiments (ostéonal et interstitiel) montre une différence plus significative chez l'adulte ($p < 0,0005$) que chez l'enfant ($p < 0,010$).

Plusieurs types de tissus peuvent être retrouvés dans l'os cortical : les ostéons, l'os interstitiel et l'os primaire. L'ostéon provient du résultat d'un cycle de remodelage, c'est donc par définition de « l'os jeune ». Entre ces structures ostéonales se trouve du tissu interstitiel composé de vestiges d'anciens ostéons laissés par le remodelage secondaire, ainsi que de l'os primaire qui n'a pas encore été renouvelé. Le tissu interstitiel est donc considéré comme de « l'os ancien » alors que l'os primaire est plutôt de « l'os jeune ». De plus, nous savons que « l'os jeune » a un module d'Young plus faible que « l'os ancien » ($E_{ostéon} < E_{interstitiel}$) [115, 151], ce qui laisse penser que $E_{os\ primaire} < E_{interstitiel}$.

Lors des mesures par nanoindentation, la distinction entre os primaire et os interstitiel n'a pas pu être faite. En effet, il n'y a pas de différence visible à cette échelle qui permettrait de trancher entre os interstitiel et os primaire. Par la nature et la définition même de l'os primaire, nous pouvons supposer que le pourcentage d'os primaire est plus important chez l'enfant, et qu'il diminue avec l'âge pour devenir quasiment inexistant chez l'adulte. En tenant compte de ces considérations, il est difficile de comparer les mesures faites supposément dans "l'os interstitiel" entre les deux groupes. La question est donc savoir si il est toujours pertinent de maintenir le terme de "tissu interstitiel" pour les mesures chez l'enfant.

4.3 Limites et perspectives de l'étude

Cette étude a été menée sur deux groupes d'échantillons : un groupe "enfant" âgé de 1 à 18 ans et un groupe "adulte" âgé de 50 à 95 ans, ces tranches d'âge pouvant varier selon les essais. Compte tenu de certains résultats, notamment l'évolution de C_{33} avec l'âge, il aurait été intéressant d'avoir également un groupe "adulte jeune" avec une population âgée de 20 à 45 ans. De même, si le groupe "enfant" avait contenu un plus grand nombre d'échantillons, nous aurions pu faire plusieurs sous-groupes d'âge afin d'étudier par stade l'évolution des propriétés mécaniques de l'os cortical.

Le facteur le plus limitant pour la réalisation de cette étude a été la taille des échan-

tillons. En effet, celle-ci impactait l'usinage des éprouvettes pour la compression et la caractérisation ultrasonore. En tenant compte de l'échelle des échantillons (quelques millimètres) et des outils de découpe à notre disposition (scie diamantée), le moindre défaut de découpe a eu un fort impact sur la géométrie finale désirée de l'éprouvette.

Ces contraintes ont également empêché l'évaluation de certains paramètres d'ingénierie classique (E , G et ν) lors de la caractérisation ultrasonore. Néanmoins, une alternative existe via l'utilisation de la spectroscopie de résonance ultrasonore (ou RUS - *Resonant Ultrasound Spectroscopy*), qui permettrait, sous réserve d'une découpe des échantillons particulièrement rigoureuse, mais de géométrie uniquement parallélépipédique, d'acquérir tous les coefficients de la matrice de rigidité et donc d'obtenir E , G et ν , et ceci dans les trois directions privilégiées de l'os. Ceci est actuellement en cours de développement dans le Laboratoire d'Imagerie Biomédicale (UPMC, Paris 6).

Lors des essais de nanoindentation, il est apparu que la distinction entre l'os interstitiel et l'os primaire ne pouvait être faite. Une étude histomorphométrique effectuée au préalable et utilisant un microscope polarisé permettrait de différencier les deux tissus grâce à leur structure : structure tissé pour l'os primaire et structure lamellaire pour le tissu interstitiel. Il serait également envisageable de quantifier la densité d'os primaire dans chaque échantillon et ainsi d'observer son évolution avec l'âge.

5 Résumé du chapitre III

A l'échelle mésoscopique, la compression dans la direction axiale a mis en avant une déformation maximale et une contrainte maximale plus importante chez l'enfant que chez l'adulte âgé, ceci sans différence significative dans les valeurs de module d'Young.

Cette différence d'élasticité se retrouve dans les trois directions principales de l'os puisque la caractérisation mécanique via l'utilisation des ultrasons a montré des coefficients de rigidité diagonaux (C_{ii}) plus faibles sur les échantillons d'os pédiatrique. Malgré, les différences de propriétés mécaniques entre l'os en croissance et l'os mature, l'os cortical montre une isotropie transverse dans les deux groupes étudiés avec $C_{11} = C_{22}$, $C_{44} = C_{55}$, $C_{axial} > C_{transverse}$ et plan 1-2 = plan d'isotropie.

A l'échelle microscopique, nous observons un comportement mécanique similaire entre l'adulte et l'enfant dans le compartiment ostéonal, avec toutefois un module d'indentation E^* plus faible chez l'enfant. En revanche, dans le compartiment interstitiel, le comportement mécanique entre l'adulte et l'enfant est très différent avec des valeurs d'élasticité, de dureté et de travail plus important chez l'adulte. Chez l'enfant, les différences de propriétés entre les compartiments ostéonal et interstitiel sont moins évidentes. Ces observations peuvent s'expliquer par la présence d'os primaire "jeune" dans le compartiment interstitiel de l'os pédiatrique.

Chapitre IV

Effet de la composition du tissu osseux et de son organisation sur le comportement mécanique de l'os cortical

1 Introduction

L'os cortical est un tissu complexe et multi-échelles dont la fonction principale est de résister aux contraintes mécaniques. La résistance osseuse dépend non seulement de la quantité de tissu osseux, mais aussi de sa qualité, et est caractérisée par la géométrie des os, la micro-architecture, le minéral, et le collagène.

Pendant la croissance, le tissu osseux se développe et ses propriétés mécaniques évoluent. Cependant, peu d'études ont été menées pour expliquer le comportement mécanique de l'os en croissance chez l'humain, en particulier sur l'os cortical [19, 20, 41]. Plusieurs études ont utilisé du tissu osseux animal pour étudier les changements dans le comportement mécanique pendant la croissance [57]. Dans ces études il a été constaté que la résistance, la rigidité et la densité du tissu osseux augmentaient avec l'âge. Bien que les modèles animaux peuvent être une bonne alternative pour comprendre les mécanismes et les tendances pendant la croissance, du tissu osseux humain est nécessaire pour enquêter sur les différences réelles entre les os adultes et enfants.

Plusieurs études sur l'os mature ont été menées pour expliquer le comportement mécanique de l'os. Ainsi, il a été démontré que le contenu minéral avait un rôle dans les propriétés élastiques du tissu osseux (résistance et rigidité) [22, 27, 37, 56, 148], alors que le collagène et les molécules de pontage semblent être liés au comportement plastique (ductilité et plasticité) [40, 133, 135, 138, 149].

Dans ce chapitre, nous proposons de faire le parallèle entre la composition étudiée au Chapitre II et le comportement étudié au Chapitre III.

2 Effet de la microarchitecture du réseau de pores sur l'élasticité du tissu osseux cortical à l'échelle mésoscopique

2.1 Introduction

La porosité intracorticale provient majoritairement des canaux de Havers et des canaux de Volkmann. Elle est un déterminant majeur de la résistance osseuse [91, 93, 121] et du risque de fracture [7, 11]. Aujourd'hui, elle est évaluée uniquement comme une fraction volumique de pores (pourcentage de vide).

Néanmoins, les canaux de Havers et les canaux de Volkmann forment un réseau tridimensionnel de canaux interconnectés [31, 34]. Pendant le remodelage osseux, la morphologie des canaux change et induit un changement architectural du réseau de pores. Ceci implique que, pour une porosité donnée, la façon dont le vide est organisé dans le volume osseux peut être différente (Figure II.8).

Dans ce travail, nous avons supposé que la microarchitecture du réseau poreux (taille des pores, distribution spatiale,...) de l'os cortical influence sa rigidité pendant la croissance.

Dans cette partie, nous proposons donc de mettre en lien l'étude sur l'architecture du réseau poreux faite par microtomographie (Chapitre II) avec l'étude de l'élasticité et de l'anisotropie de l'os cortical faite par essai ultrasonore (Chapitre III). Cette partie contient donc les résultats des échantillons qui ont été analysés par ces deux études, donc les résultats sur les fibulas de 13 enfants (âge moyen : 13 ± 4 ans) et 16 adultes (âge moyen : 75 ± 13 ans).

2.2 Résultats

Malgré les différences trouvées dans l'architecture du réseau poreux entre les enfants et les adultes, l'os cortical présente une isotropie transverse dans les deux groupes étudiés avec $C_{33} > C_{11} = C_{22} > C_{44} = C_{55} > C_{66}$. Cependant, par rapport aux enfants, tous les coefficients de rigidité sont plus élevés chez l'adulte (+ 11%, + 17% et + 22% pour les C_{11} , C_{22} et C_{33} , respectivement, et + 17%, + 23% et + 20% pour les C_{44} , C_{55} et C_{66} , respectivement)(Table IV.1).

	Enfants (n=13) 6-18 ans (13 ± 4) Moyenne (écart-type)	Adultes (n=16) 50-95 ans (75 ± 13) Moyenne (écart-type)	p-values
C_{11}	16,1 (2,5)	17,7 (3,6)	0,021
C_{22}	15,3 (2,5)	17,7 (6,1)	0,045
C_{33}	23,6 (4,4)	28,0 (5,1)	0,011
C_{44}	4,1 (0,8)	4,8 (0,6)	0,017
C_{55}	4,0 (0,9)	4,9 (1,1)	0,019
C_{66}	3,0 (0,4)	3,6 (1,0)	0,017

TABLE IV.1 – Valeurs des coefficients de rigidité obtenues sur les fibulae. Les p-values pour la comparaison entre les groupes sont obtenues en utilisant le test de Mann-Whitney.

La Table IV.2 rapporte les coefficients de corrélation obtenus entre les coefficients de rigidité et les variables décrivant l'architecture du réseau poreux.

Chez les enfants, les coefficients de rigidité en traction-compression (C_{11} , C_{22} et C_{33}) sont corrélés négativement avec Po.V / TV ($-0,80 < r' < -0,52$) et Po.N ($-0,82 < r' < -0,72$)

et positivement avec Po.Sp ($0,48 < r' < 0,62$). Le coefficient élastique C_{33} est également corrélé avec Po.S/ Po.V ($r' = 0,70$).

Chez les adultes, les coefficients de rigidité en traction-compression (C_{11} , C_{22} et C_{33}) sont corrélés négativement avec Po.V / TV ($-0,71 < r' < -0,63$). Les coefficients élastiques C_{11} et C_{22} sont également corrélés avec Po.S/ Po.V ($r' = 0,69$ et $r' = 0,66$), Po.Dm ($r' = -0,67$ et $r' = -0,61$) et Po.Dm.SD ($r' = -0,70$ et $r' = -0,63$). Le coefficient élastique C_{33} est corrélé négativement avec Po.N ($r' = -0,59$) et positivement avec Po.Sp ($r' = 0,71$) et Po.Sp.SD ($r' = 0,72$).

	Coefficients élastiques					
	C_{11}		C_{22}		C_{33}	
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes
Po.V / TV (%)	-0,52*	-0,64*	-0,52*	-0,71**	-0,80***	-0,63*
Po.S / Po.V (mm^{-1})	0,40	0,69*	0,41	0,66*	0,70*	0,38
Po.N (mm^{-1})	-0,80***	-0,21	-0,72**	-0,36	-0,82***	-0,59*
Po.Dm (μm)	-0,23	-0,67*	-0,17	-0,61*	-0,46	-0,30
Po.Dm.SD (μm)	-0,35	-0,70*	-0,11	-0,63*	-0,10	-0,41
Po.Sp (μm)	0,62*	0,32	0,51*	0,50*	0,48*	0,71**
Po.Sp.SD (μm)	0,35	0,24	0,28	0,54*	0,07	0,72**
ConnD (mm^{-3})	-0,05	-0,31	-0,38	-0,59*	-0,39	-0,17
DA	0,14	0,68*	0,30	0,63*	0,42	0,24
	C_{44}		C_{55}		C_{66}	
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes
	Po.V / TV (%)	-0,52*	-0,72**	-0,56*	-0,08	-0,65*
Po.S / Po.V (mm^{-1})	0,52*	0,56*	0,50	0,01	0,64*	0,08
Po.N (mm^{-1})	-0,44	-0,67*	-0,60*	-0,25	-0,61*	-0,12
Po.Dm (μm)	-0,44	-0,64*	-0,30	-0,15	-0,56*	-0,13
Po.Dm.SD (μm)	-0,16	-0,72**	-0,02	-0,13	-0,48*	-0,16
Po.Sp (μm)	-0,05	0,70**	0,09	0,14	0,22	0,24
Po.Sp.SD (μm)	-0,44*	0,76**	-0,32	0,15	0,03	0,41
ConnD (mm^{-3})	-0,06	-0,20	-0,22	0,37	-0,13	-0,07
DA	0,56*	0,31	0,62*	-0,09	0,39	0,06

TABLE IV.2 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les différentes variables décrivant l'architecture du réseau poreux et les coefficients de rigidité (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

2.3 Discussion

Chez l'adulte, il est bien décrit que l'augmentation de la porosité avec l'âge est préjudiciable pour la résistance osseuse [7, 61, 93]. A l'échelle tissulaire, les variations de porosité corticale expliquent 62 à 98% de la variation des coefficients élastiques en tension-compression et en cisaillement [61, 107]. A l'échelle macroscopique, les variations de porosité explique la majorité des propriétés mécaniques des os longs [145]. Cependant, dans ces études, la porosité a été seulement considérée comme une fraction volumique de vide. Aucune information sur le rôle de la microarchitecture du réseau de pores sur le comportement mécanique de l'os n'est fournie.

Dans notre étude, les résultats montrent que les propriétés élastiques sont influencées

par la microarchitecture du réseau de pores indépendamment de l'évolution globale de la fraction volumique de pores. Les changements dans la séparation des pores et sa distribution ont été corrélés avec l'élasticité axiale en traction-compression. Ce résultat suggère que, pour une porosité donnée, la façon dont le vide est agencé dans le volume osseux affecte de manière significative l'élasticité de l'os.

Chez l'adulte, la séparation entre les pores influe majoritairement sur l'élasticité axiale (C_{33}), alors que l'élasticité transverse (C_{11} et C_{22}) est liée aux diamètres des pores. L'architecture du réseau poreux a donc une influence sur les propriétés d'anisotropie du tissu osseux. Dans une étude, Fan et al. [52] ont effectué des essais de nanoindentation sur du tissu osseux cortical. Ils ont mis en évidence des propriétés mécaniques différentes dans les directions axiale et transverse. Ceci implique que l'isotropie transverse du tissu osseux cortical chez l'adulte serait due à la fois aux propriétés du matériau osseux mais également à l'organisation du réseau de pores de l'os.

Chez l'enfant, la séparation entre les pores impacte l'élasticité de manière équivalente dans les trois directions de l'os et le diamètre des pores n'a montré aucun lien avec l'élasticité. Ces résultats montrent que le réseau poreux influence de manière isotrope les propriétés élastiques du tissu osseux. Les résultats du Chapitre III montrent néanmoins une isotropie transverse chez l'enfant. L'explication de ce comportement chez l'enfant serait donc due uniquement aux propriétés matériaux du tissu osseux.

3 Effet du contenu minéral et collagénique sur l'élasticité du tissu osseux cortical à l'échelle mésoscopique

3.1 Introduction

L'os est un matériau viscoélastique fortement anisotrope qui a la capacité de s'adapter en permanence aux changements de son environnement physiologique ou mécanique. La capacité de l'os à résister aux forces mécaniques dépend non seulement de la quantité de tissu osseux (géométrie de l'os), mais également de la qualité de ce tissu. La matrice osseuse est un système à deux phases dans lequel la phase minérale affecte la rigidité [22, 27, 37, 56, 148] alors que la phase organique (fibres de collagène) assure la ductilité et la capacité à absorber de l'énergie [40, 133, 135, 138, 149]. Des altérations dans les propriétés du collagène peuvent donc affecter les propriétés mécaniques de l'os et augmenter la susceptibilité à la fracture.

En orthopédie pédiatrique, on retrouve plusieurs types de fractures typiquement pédiatriques, comme la fracture en bois-vert (greenstick fracture). Celle-ci a permis de mettre en avant une différence de comportement mécanique entre les os longs de l'enfant et de l'adulte. Cependant, peu d'études ont été menées pour expliquer cette différence de comportement [19, 20, 41].

Dans cette partie, nous proposons de mettre en lien l'étude sur la composition du tissu osseux cortical faite par microtomographe et analyse biochimique (Chapitre II) avec l'évaluation des propriétés mécaniques de l'os cortical faite par essai ultrasonore (Chapitre III). Cette partie contient les résultats des échantillons qui ont été analysés par ces trois études, donc les résultats des essais effectués sur les fémurs et fibulae de 21 enfants (âge moyen : 10 ± 6 ans) et les fibulas de 16 adultes (âge moyen : 75 ± 13 ans).

3.2 Résultats

La Table IV.3 rapporte les coefficients de corrélation obtenus entre les coefficients de rigidité et les variables décrivant la composition du tissu osseux telles que la quantité de molécules de pontage immatures (DHLNL+HLNL) et matures (PYD+DPD), le ratio immatures/ matures (Imm/Mat) (Figure I.7, page 9), la densité minérale du tissu osseux (TMD) et sa distribution (TMD.SD).

Chez l'enfant, les résultats montrent une forte corrélation entre le ratio immatures/matures (Imm/Mat) et les coefficients de rigidité avec un r' compris entre $-0,662^*$ et $-0,788^{***}$. Cette relation est fortement liée à la décroissance de la quantité de molécules de pontage immatures ($-0,716^{***} < r' < -0,471^*$) et plus faiblement à la croissance de la quantité de molécules de pontage matures ($0,451^* < r' < 0,535^*$). On trouve également que la TMD est corrélée positivement avec cinq des six coefficients de rigidité avec un r' compris entre $-0,518^*$ et $-0,779^{**}$.

Chez l'adulte, le seul lien entre la composition chimique du collagène et la rigidité provient de la relation entre C_{11} et la quantité de molécules de pontage matures ($r' = 0,632^*$). Par contre, la TMD est fortement corrélée avec les coefficients élastiques de traction-compression ($r' = 0,559^*$, $r' = 0,668$ et $r' = 0,718^*$ pour C_{11} , C_{22} et C_{33} respectivement).

	Coefficients élastiques					
	C_{11}		C_{22}		C_{33}	
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes
DHLNL+HLNL	$-0,631^*$	0,200	$-0,471^*$	0,085	$-0,657^*$	0,382
PYD+DPD	0,188	0,632*	0,535*	0,118	0,451*	0,309
Imm/Mat	$-0,694^{**}$	-0,006	$-0,662^*$	-0,141	$-0,788^{***}$	0,165
TMD	0,518*	0,559*	0,779**	0,668*	0,732*	0,718*
TMD.SD	0,379	-0,188	-0,061	-0,415	-0,018	-0,347
	C_{44}		C_{55}		C_{66}	
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes
	DHLNL+HLNL	$-0,625^*$	0,291	$-0,627^*$	0,329	$-0,716^{***}$
PYD+DPD	0,460*	0,312	0,470*	0,485	0,251	0,524
Imm/Mat	$-0,783^{***}$	0,035	$-0,762^{***}$	0,132	$-0,734^{**}$	-0,121
TMD	0,714*	0,215	0,707*	0,544*	0,496	0,159
TMD.SD	-0,168	-0,215	0,032	-0,153	0,132	-0,079

TABLE IV.3 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les différentes variables décrivant la composition tissulaire et les coefficients de rigidité (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

La Figure IV.1 montre l'évolution du coefficient de rigidité en traction-compression de la direction axiale (C_{33}) en fonction de Imm/Mat, avec une forte relation linéaire entre les deux paramètres chez l'enfant ($R^2 = 0,62$, Pearson), mais pas de relation chez l'adulte.

La Figure IV.2 montre l'évolution du coefficient de rigidité en traction-compression de la direction axiale (C_{33}) en fonction du TMD.

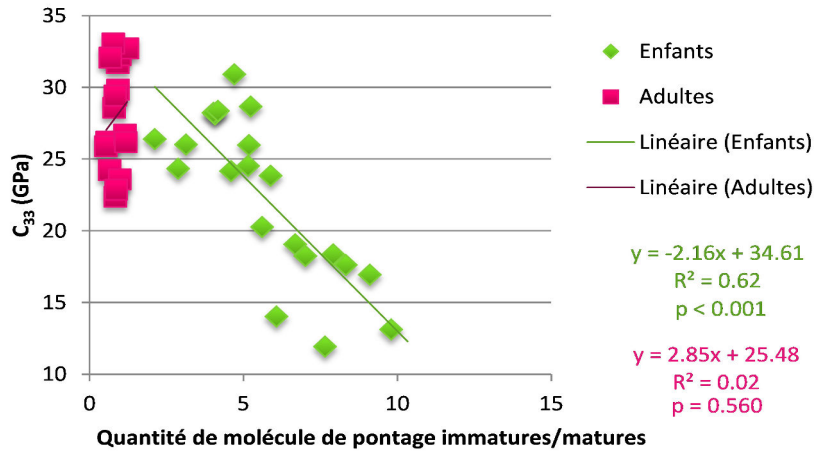


FIGURE IV.1 – Evolution du coefficient de rigidité axial en traction-compression en fonction du ratio entre la quantité de molécules de pontage immatures/matures.

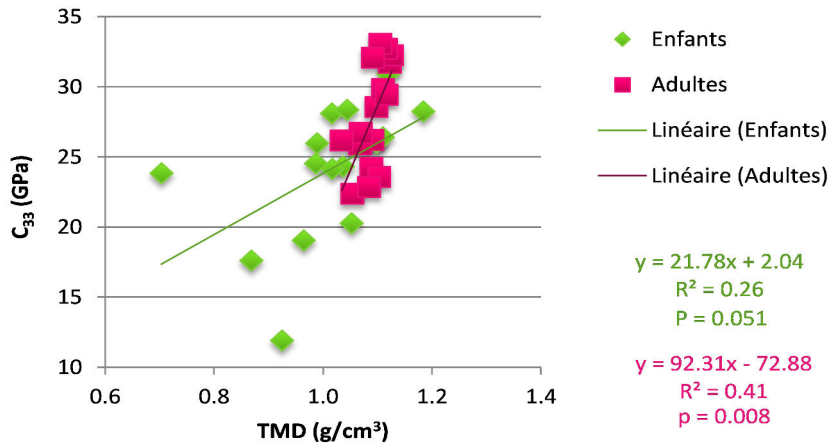


FIGURE IV.2 – Evolution du coefficient de rigidité axial en traction-compression en fonction de la TMD.

3.3 Discussion

Plusieurs études montrent que la résistance osseuse est principalement déterminée par la masse de tissu et la rigidité, qui est déterminée par la phase minérale [38, 39, 41], tandis que la matrice de collagène contribue essentiellement à la dureté de l'os [149] et à sa ductilité [40, 133, 135, 138, 149].

Avec l'âge, les propriétés de la matière minérale et du collagène évoluent ce qui modifie les propriétés du tissu osseux. Notre étude a montré que la minéralisation avait un impact sur la rigidité en traction-compression (C_{11} , C_{22} et C_{33}) de l'os cortical tout au long de la vie. Contrairement à des études qui ont montré que le collagène contribue à la dureté de l'os mais pas à sa rigidité [40, 138], nos résultats montrent que, dans notre groupe enfant, l'organisation des pontages entre les fibrilles de collagène (immatures ou matures) intervient

également sur la rigidité du tissu osseux et en particulier sur ses propriétés de cisaillement. La maturation de ces pontages (Imm/Mat) serait donc un facteur de la rigidification de la structure osseuse pendant la croissance.

L'os est un matériau composite : c'est l'intégration de la phase minérale sur la fibrille de collagène qui lui confère sa rigidité. Les changements dans les propriétés du collagène peuvent modifier le taux et la disposition du minéral dans les fibrilles. Ceci affecte en soi les propriétés mécaniques de l'os [40]. La qualité osseuse est donc déterminée par le minéral et le collagène, qui sont des variables interdépendantes. L'analyse du rôle spécifique de chacune de ses variables dans la solidité des os reste difficile tant les éléments sont interdépendants.

La résistance osseuse est expliquée, non seulement par l'interaction entre la phase minérale et le collagène, mais aussi par l'orientation des fibres de collagène selon la direction de la charge. Par exemple, le fémur est capable de résister à une charge de compression axiale significative sans aucun dommage important. En revanche, la même charge appliquée transversalement peut provoquer des fractures. Ainsi, la résistance de l'os est plus élevée dans la direction de l'orientation des ostéons qui correspond à la direction de la charge physiologique de l'os cortical. La différence dans l'orientation des fibrilles a probablement un rôle dans les propriétés mécaniques de l'os cortical [91].

En conclusion, notre étude montre une interaction conjointe du minéral et du collagène dans la rigidification de l'os en croissance. Cette interaction limite l'analyse de la contribution individuelle du collagène et du minéral. Ces interrelations complexes sont un défi pour enquêter sur le rôle indépendant des propriétés du collagène et du minéral comme un déterminant de la solidité des os pendant la croissance.

4 Effet des propriétés physico-chimiques sur les propriétés mécaniques du tissu osseux à l'échelle microscopique

4.1 Introduction

L'os est un matériau composite multi-échelles composé d'une matrice organique (réseau organisé de fibrilles de collagène de type I) remplie d'un composant minéral (cristaux d'apatite liés aux fibrilles de collagène) [113]. A l'échelle microscopique dans l'os cortical, le remodelage conduit à la formation d'ostéons [35]. Les ostéons sont composés de 5 à 30 lamelles concentriques avec différentes orientations de fibrilles de collagène. Ces lamelles sont disposées autour de canaux de Havers [113]. Les ostéons sont orientés le long de la diaphyse des os longs, et séparés par un tissu osseux interstitiel qui est composé d'anciens ostéons en partie remodelés.

Peu d'études portent sur le rôle des composants organiques et minéraux dans les propriétés mécaniques de l'os à l'échelle du tissu. L'étude de Bala et al. [8] a mis en évidence l'effet du minéral et du collagène sur les propriétés micromécaniques du tissu osseux cortical. Cette étude a été réalisée sur des échantillons d'os iliaque de 5 patientes ménopausées et ostéoporotiques. Les résultats confirment que la phase minérale affecte la déformation élastique de l'os cortical, alors que le collagène intervient dans ses propriétés plastiques [22, 40, 133, 135, 138, 149].

A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a encore été effectuée pour comprendre le rôle des composants organiques et minéraux dans les propriétés mécaniques de l'os à l'échelle du tissu pendant la croissance. Dans cette partie, nous proposons donc de mettre en lien la composition du tissu osseux cortical analysée par FTIRM et microradiographie (Chapitre II) avec l'évaluation des propriétés mécaniques de l'os cortical faite par nanoindentation instrumentée (Chapitre III). Cette partie contient donc les résultats des échantillons qui ont été analysés par ces trois études, donc les résultats des essais effectués sur les fibulae de 13 enfants (âge moyen : 10 ± 4 ans) et 16 adultes (âge moyen : 76 ± 14 ans).

4.2 Résultats

4.2.1 Evolution des paramètres mécaniques et microstructuraux avec l'âge

Chez l'enfant, les résultats ont montré une corrélation positive entre l'âge et les paramètres mécaniques obtenus par nanoindentation : E^* ($r' = 0,560$), H ($r' = 0,494$), W_{plast} ($r' = 0,423$) et W_{tot} ($r' = 0,413$). Ces relations s'accompagnent d'une corrélation modérée entre l'âge et la carbonatation ($r' = 0,386$) et entre l'âge et l'index de minéralisation ($r' = 0,388$). Lorsque l'on ne tient compte que des mesures faites dans l'ostéon, on trouve une corrélation entre l'âge et la maturité du collagène ($r' = 0,565$).

Chez l'adulte, l'âge est relié à la maturité minérale ($r' = -0,467$) sans évolution des paramètres micromécaniques liée à l'âge.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre le DMB et l'âge.

4.2.2 Corrélation entre les variables mécaniques et microstructurales

La Table IV.4 présente les différentes corrélations trouvées entre les variables mécaniques et microstructurales.

Chez l'enfant, les résultats montrent une corrélation modérée entre E^* et la carbonatation ($r' = 0,554$) et entre E^* et la maturité du collagène ($r' = 0,486$). Le DMB est lié à chacun des paramètres mécaniques étudiés : E^* ($r' = 0,567$), H ($r' = 0,509$), W_{plast} ($r' = 0,598$) et W_{tot} ($r' = 0,613$). L'index de minéralisation est lié à H ($r' = 0,418$) et à W_{tot} ($r' = 0,415$). Quand nous étudions séparément les mesures faites dans l'ostéon et dans l'os interstitiel, nous retrouvons une forte corrélation entre E^* et la carbonatation ($r' = 0,632$ et $r' = 0,819$ pour l'ostéon et l'os interstitiel respectivement) et entre H et la carbonatation dans l'os interstitiel seulement ($r' = 0,725$).

Chez l'adulte, E^* est corrélé négativement à la carbonatation ($r' = -0,437$) et positivement à l'index de minéralisation ($r' = 0,538$) et H est corrélé avec la cristallinité, la carbonatation et l'index de minéralisation ($r' = -0,485$, $r' = -0,486$ et $r' = 0,549$ respectivement). L'index de minéralisation est faiblement corrélé avec W_{plast} ($r' = 0,442$) et W_{tot} ($r' = 0,434$). Ici encore, le DMB est lié à chacun des paramètres mécaniques étudiés : E^* ($r' = 0,666$), H ($r' = 0,502$), W_{plast} ($r' = 0,556$) et W_{tot} ($r' = 0,531$).

Chez l'adulte, le DMB est corrélé avec l'index de minéralisation ($r' = 0,561^*$) et plus modérément avec la maturité du collagène ($r' = 0,357^*$). Chez l'enfant, le DMB est lié à l'index de minéralisation ($r' = 0,567^*$), la maturité du minéral ($r' = 0,456^*$) et plus fortement à la maturité du collagène ($r' = 0,685^{***}$).

	E^*	H	W_{plast}	W_{tot}
ENFANTS				
Cristallinité	0,032	0,080	-0,218	-0,249
Carbonatation	0,554*	0,366	0,229	0,183
Index de minéralisation	0,372	0,418*	0,375	0,415*
Maturité du minéral	0,092	-0,050	0,253	0,240
Maturité du collagène	0,486*	0,374	0,361	0,381
DMB	0,567*	0,509*	0,598*	0,613*
ADULTES				
Cristallinité	-0,304	-0,485*	-0,202	-0,246
Carbonatation	-0,437*	-0,486*	-0,274	-0,300
Index de minéralisation	0,538*	0,549*	0,442*	0,434*
Maturité du minéral	0,148	0,214	0,004	0,018
Maturité du collagène	0,288	0,351*	0,33	0,302
DMB	0,666***	0,502*	0,556*	0,531*

TABLE IV.4 – Coefficients de corrélation de Spearman (r') obtenus entre les différentes variables de la composition du tissu osseux et les paramètres mécaniques (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

4.3 Discussion

A l'échelle de l'organe comme à l'échelle du tissu, les différents articles ont mis en évidence le rôle de chaque composant osseux dans le comportement mécanique de l'os cortical : le minéral agit sur la rigidité et l'élasticité alors que le collagène agit sur la ductilité et la plasticité [8, 22, 40, 133, 135, 138, 149]. Dans une étude similaire faite sur des échantillons osseux de femmes atteintes d'ostéoporose, Bala et al. [8] a mis en avant l'effet de la minéralisation sur l'élasticité du tissu osseux à l'échelle microscopique. Nous retrouvons cet effet chez nos sujets âgés. Nous observons également une corrélation positive entre E^* et la carbonatation chez l'enfant ($r' = 0,554$). Cette corrélation est retrouvée négative chez l'adulte ($r' = -0,437$). Ceci met en avant une composante plus précise de l'effet du minéral sur le comportement mécanique du tissu osseux : l'incorporation des ions CO_3 dans le cristal d'apatite.

Contrairement à ce qui est décrit chez l'adulte, le collagène semble avoir un rôle important à jouer dans l'élasticité du tissu osseux pendant la croissance. Comme le montrent les résultats du Chapitre II, les changements dans l'organisation des fibres de collagène sont importants pendant la croissance. L'évolution des pontages divalents en pontages trivalents viennent hiérarchiser la structure osseuse. Les cristaux d'apatite s'intégrant sur les fibrilles de collagène, ceci laisse supposer qu'un changement dans l'organisation du collagène peut provoquer un changement dans le taux et la disposition du minéral [40]. Ce changement semble avoir un impact aussi bien dans les propriétés mécaniques à l'échelle macroscopique (Partie 3) qu'à l'échelle microscopique.

5 Résumé du chapitre IV

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de la composition du tissu osseux et de son organisation sur le comportement mécanique de l'os cortical à différentes échelles.

A l'échelle macroscopique, le comportement élastique de **l'os en croissance** dépend de :

- la porosité et plus particulièrement de **la microarchitecture du réseau de pores**. Les changements dans le nombre de pores, la séparation des pores et sa distribution ont été corrélés avec l'élasticité axiale en traction-compression. Ces résultats suggèrent que, pour une porosité donnée, la façon dont le vide est façonné dans le volume osseux affecte de manière significative l'élasticité de l'os ;
- **la minéralisation du tissu osseux**. La TMD a été corrélée aux coefficients diagonaux de la matrice de rigidité (C_{ii}) ;
- **la maturation des molécules de pontage**. La quantité de molécules de pontage immatures (DHLNL+HLNL) ainsi que le ratio immatures/matures (Imm/Mat) ont été mis en lien avec les coefficients diagonaux de la matrice de rigidité (C_{ii}).

A l'échelle microscopique, l'élasticité de l'os en croissance dépend de **la minéralisation du tissu osseux, la carbonatation et la maturité du collagène**, alors que la dureté de celui-ci dépend plus spécifiquement de la minéralisation.

Conclusions et Perspectives

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les propriétés mécaniques, structurales et tissulaires de l'os cortical en croissance. En clinique, les modalités d'imagerie du système osseux sont aujourd'hui performantes pour diagnostiquer et suivre la plupart des pathologies osseuses chez l'adulte. Or l'utilisation de ces techniques chez l'enfant est problématique : nocivité des radiations, anesthésie ou sédation nécessaire, etc. Pour ce qui est du domaine de la recherche, la simulation numérique permet aujourd'hui de valider et de comprendre de nombreux essais expérimentaux. Néanmoins, ces techniques nécessitent une base de données des propriétés mécaniques pour alimenter les modèles.

Les contraintes liées au manque sévère de données de référence sur l'os pédiatrique sont importantes. Ce travail proposait de comparer un groupe d'échantillons provenant d'enfants avec un retard de croissance à un groupe composé d'échantillons provenant d'adultes âgés. Cette comparaison se faisait en termes de microstructure, de propriétés mécaniques et biochimiques via la mise en place d'un protocole de manipulation complexe.

Un état de l'art sur les connaissances de l'os cortical nous a permis d'appréhender les principales méthodes de caractérisation des propriétés mécaniques, structurales et tissulaires de cet os. Les résultats publiés à ce jour sur l'os cortical pédiatrique montrent cependant une importante dispersion des propriétés mécaniques déterminées pour cet os et la difficulté d'obtenir des valeurs fiables et reproductibles. Le choix de la modalité de caractérisation, les conditions expérimentales, les variabilités intra- et inter-individus apparaissent comme des facteurs importants de cette disparité.

La première partie de nos recherches, abordée au chapitre II, a été focalisée sur l'évaluation des propriétés structurales et tissulaires de l'os cortical. L'objectif principal était d'obtenir de nouvelles données sur l'os cortical pédiatrique. Afin de pouvoir comparer les propriétés de l'os cortical en croissance avec celles de l'os mature, les mêmes essais de caractérisation ont été effectués sur une population d'enfants en croissance (âgés de 1 à 18 ans) et une population d'adultes (âgés de 50 à 95 ans). Cette comparaison a été effectuée sur une analyse par microradiographie quantitative et par tomographie, une analyse biochimique et une analyse par FTIRM. Cette caractérisation tissulaire a permis de montrer que, pendant la croissance, les différents composants de l'os cortical évoluaient pour atteindre un agencement vers une forme mature. Ainsi, nous avons pu observer une diminution du nombre de pores, de leur diamètre et de leur connectivité, une organisation plus ordonnée des ions à l'intérieur du cristal d'apatite, une minéralisation s'effectuant pendant le remodelage et une minéralisation due à l'âge, et enfin, une maturation des liaisons inter-fibrillaires.

La seconde partie de cette thèse a été dédiée à l'évaluation du comportement mécanique de l'os cortical. Ici encore, l'objectif était d'obtenir des données sur l'os cortical pédiatrique

à comparer avec de l'os mature. Cette comparaison a été faite en effectuant différents tests mécaniques : la caractérisation ultrasonore, la compression et la nanoindentation instrumentée. Cette caractérisation mécanique multi-échelles a permis de montrer que, pendant la croissance, l'os cortical devient plus rigide, et ceci dans ses trois directions de sollicitations principales (axiale, radiale et tangentielle), et moins déformable.

A l'échelle microscopique, nous observons un comportement mécanique similaire entre l'adulte et l'enfant dans le compartiment ostéonal, avec toutefois un module d'élasticité plus faible chez l'enfant. En revanche, dans le compartiment interstitiel, le comportement mécanique entre l'adulte et l'enfant est très différent avec des valeurs d'élasticité, de dureté et de travail plus important chez l'adulte. Chez l'enfant, ces différences de propriétés entre les compartiments ostéonal et interstitiel sont moins évidentes. Ces observations peuvent s'expliquer par la présence d'os primaire "jeune" dans le compartiment vu comme "interstitiel" de l'os pédiatrique.

La troisième et dernière partie de cette étude a été consacrée à déterminer l'effet de la composition du tissu osseux et de son organisation sur le comportement mécanique de l'os cortical. Pour cela, nous avons mis en relation les résultats des chapitres II et III. Cette étude a permis de confirmer l'effet de la minéralisation sur les propriétés élastiques de l'os cortical en croissance, comme cela avait été décrit dans plusieurs articles sur de l'os adulte. En revanche, nous avons également montré un effet de la maturité des liaisons collagéniques sur le caractère élastique de l'os cortical pédiatrique. Cet effet s'accompagne également d'une minéralisation de l'os cortical pendant la croissance. Ces résultats mettent en avant un lien entre l'intégration des cristaux d'apatite sur la fibrille de collagène et la structure hiérarchique même de celle-ci. Ainsi, pendant la croissance, la maturation du collagène, de laquelle dépend la minéralisation, a un rôle sur l'élasticité du tissu osseux cortical.

Cette étude a également permis de montrer que les propriétés élastiques sont influencées par la microarchitecture du réseau de pores indépendamment de l'évolution globale de la fraction volumique de pores. Ce résultat suggère que, pour une porosité donnée, la façon dont le réseau de pores est façonné dans le volume osseux affecte de manière significative l'élasticité de l'os.

En conclusion, nous avons pu montrer tout au long de ce travail de thèse que les os corticaux d'enfants présentent de nombreuses différences avec des os d'adultes, tant du point de vue de la qualité du tissu que du point de vue de la microstructure. Nous avons également mis en évidence l'importance de la structure multi-échelles et composite de l'os et de l'hétérogénéité de ses propriétés mécaniques.

Plusieurs développements peuvent être envisagés suite aux travaux de recherche présentés dans ce mémoire.

Un premier axe, très général, serait de poursuivre l'intégralité de cette étude pluridisciplinaire en envisageant une campagne d'essais à plus grande échelle avec un nombre d'échantillons plus élevé et des échantillons provenant de sites osseux différents. Ceci permettrait d'évaluer l'impact du site (porteur ou non) sur l'évolution des propriétés de l'os cortical pendant la croissance. En outre, il serait souhaitable d'obtenir des échantillons provenant d'une population d'adulte "jeune" (entre 20 et 45 ans). Cette étude permettrait également de développer un modèle numérique complet, et prenant en compte la croissance et le vieillissement.

Un deuxième axe serait d'étudier les propriétés de la matrice organique, notamment

son lien avec le comportement plastique de l'os cortical. Dans notre étude, les essais de compression n'ont pas permis de faire ce lien. Nous nous sommes donc focalisés sur le comportement de l'os cortical dans le domaine élastique. Cependant, la phase plastique est également primordiale puisqu'elle correspond aux déformations irréversibles de la structure. Par ailleurs, comme nous l'avons vu lors de notre étude bibliographique, le comportement plastique de l'os serait essentiellement lié aux propriétés de sa matrice organique. Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence des propriétés de la phase collagénique de l'os en croissance sur son comportement dans le domaine plastique, notamment l'effet de l'organisation et l'orientation des fibrilles de collagène.

Un dernier axe à poursuivre concernerait l'étude de l'impact des propriétés microscopiques sur le comportement macroscopique de l'os en croissance. Au cours de ces travaux, nous avons pu identifier des différences significatives de structure et de composition à l'échelle du tissu entre un os en croissance et un os mature. Par ailleurs, nous avons également trouver des différences d'un point de vue comportement macroscopique. Néanmoins, notre protocole n'a pas permis de mettre en relation ces différences de propriétés à différentes échelles. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de l'aspect multi-échelle de l'os cortical.

Bibliographie

- [1] Agnew, A. M., Moorhouse, K., Kang, Y.-S., Donnelly, B. R., Pfefferle, K., Manning, A. X., Litsky, A. S., Herriott, R., Abdel-Rasoul, M., and Bolte, J. H. (2013). The Response of Pediatric Ribs to Quasi-static Loading : Mechanical Properties and Microstructure. *Annals of Biomedical Engineering*, 41(12) :2501–2514.
- [2] Albert, C., Jameson, J., Toth, J. M., Smith, P., and Harris, G. (2013a). Bone properties by nanoindentation in mild and severe osteogenesis imperfecta. *Clinical Biomechanics*, 28(1) :110–116.
- [3] Albert, C. I., Jameson, J., and Harris, G. (2013b). Design and validation of bending test method for characterization of miniature pediatric cortical bone specimens. *Proc Inst Mech Eng H*, 227(2) :105–113.
- [4] Allard, R. N. and Ashman, R. B. (1991). A comparison between cancellous bone compressive moduli determined from surface strain and total specimen deflection.
- [5] Ashman, R., Cowin, S., Van Buskirk, W., and Rice, J. (1984). A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 17(5) :349–361.
- [6] Bala, Y. (2011). *Etude multi-échelles des effets osseux des bisphosphonates au cours du traitement de l'ostéoporose ménopausique*. PhD thesis, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1.
- [7] Bala, Y., Bui, Q. M., Wang, X.-F., Iuliano, S., Wang, Q., Ghasem-Zadeh, A., Rozental, T. D., Bouxsein, M. L., Zebaze, R. M. D., and Seeman, E. (2015). Trabecular and cortical microstructure and fragility of the distal radius in women. *J. Bone Miner. Res.*, 30(4) :621–629.
- [8] Bala, Y., Depalle, B., Douillard, T., Meille, S., Clément, P., Follet, H., Chevalier, J., and Boivin, G. (2011). Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior : An instrumented indentation study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7) :1473–1482.
- [9] Bala, Y., Farlay, D., and Boivin, G. (2013). Bone mineralization : from tissue to crystal in normal and pathological contexts. *Osteoporosis International*, 24(8) :2153–2166.
- [10] Bala, Y. and Seeman, E. (2015). Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment. *Calcified Tissue International*, 97(3) :308–326.
- [11] Bala, Y., Zebaze, R., Ghasem-Zadeh, A., Atkinson, E. J., Iuliano, S., Peterson, J. M., Amin, S., Bjornerem, A., Melton, L. J., Johansson, H., Kanis, J. A., Khosla, S., and

- Seeman, E. (2014). Cortical porosity identifies women with osteopenia at increased risk for forearm fractures. *J. Bone Miner. Res.*, 29(6) :1356–1362.
- [12] Baum, T., Carballido-Gamio, J., Huber, M. B., Müller, D., Monetti, R., R ath, C., Eckstein, F., Lochm uller, E. M., Majumdar, S., Rummeny, E. J., Link, T. M., and Bauer, J. S. (2010). Automated 3d trabecular bone structure analysis of the proximal femur—prediction of biomechanical strength by CT and DXA. *Osteoporos Int*, 21(9) :1553–1564.
- [13] Baumann, A. P., Deuerling, J. M., Rudy, D. J., Niebur, G. L., and Roeder, R. K. (2012). The relative influence of apatite crystal orientations and intracortical porosity on the elastic anisotropy of human cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 45(16) :2743–2749.
- [14] Bayraktar, H. H., Morgan, E. F., Niebur, G. L., Morris, G. E., Wong, E. K., and Keaveny, T. M. (2004). Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *J Biomech*, 37(1) :27–35.
- [15] Bensamoun, S., Ho Ba Tho, M.-C., Luu, S., Gherbezza, J.-M., and de Belleval, J.-F. (2004). Spatial distribution of acoustic and elastic properties of human femoral cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 37(4) :503–510.
- [16] Bernard, S., Grimal, Q., and Laugier, P. (2013). Accurate measurement of cortical bone elasticity tensor with resonant ultrasound spectroscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.
- [17] Berteau, J.-P. (2013). La biom ecanique de l’os de l’enfant en croissance, une aide à la prise en charge kin esith erapique. *Kin esith erapie, la Revue*.
- [18] Berteau, J.-P., Baron, C., Pithioux, M., Launay, F., Chabrand, P., and Lasaygues, P. (2014). In vitro ultrasonic and mechanic characterization of the modulus of elasticity of children cortical bone. *Ultrasonics*, 54(5) :1270–1276.
- [19] Berteau, J.-P., Gineyts, E., Pithioux, M., Baron, C., Boivin, G., Lasaygues, P., Chabrand, P., and Follet, H. (2015). Ratio between mature and immature enzymatic cross-links correlates with post-yield cortical bone behavior : An insight into greenstick fractures of the child fibula. *Bone*, 79 :190–195.
- [20] Berteau, J.-P., Pithioux, M., Follet, H., Guivier-Curien, C., Lasaygues, P., and Chabrand, P. (2012). Computed tomography, histological and ultrasonic measurements of adolescent scoliotic rib hump geometrical and material properties. *Journal of Biomechanics*, 45(14) :2467–2471.
- [21] Bjornerem, A., Bui, Q. M., Ghasem-Zadeh, A., Hopper, J. L., Zebaze, R., and Seeman, E. (2013). Fracture risk and height : an association partly accounted for by cortical porosity of relatively thinner cortices. *J. Bone Miner. Res.*, 28(9) :2017–2026.
- [22] Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L., Meunier, P., and Delmas, P. (2008). The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*, 43(3) :532–538.
- [23] Boivin, G. and Baud, C. A. (1984). Methods of Calcified Tissue Preparation. In *Microradiographic methods for calcified tissues*, pages 391–411. Dickson GR, Amsterdam, elsevier edition.

- [24] Bonjour, J. P. (1998). Delayed puberty and peak bone mass. *Eur J Endocrinol*, 139(3) :257–259.
- [25] Boot, A. M., de Ridder, M. A. J., van der Sluis, I. M., van Slobbe, I., Krenning, E. P., and Keizer-Schrama, S. M. P. F. d. M. (2010). Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone*, 46(2) :336–341.
- [26] Bui, M., Bjonnerem, A., Ghasem-Zadeh, A., Dite, G. S., Hopper, J. L., and Seeman, E. (2013). Architecture of cortical bone determines in part its remodelling and structural decay. *Bone*, 55(2) :353–358.
- [27] Burr, D. B. (2002). The contribution of the organic matrix to bone’s material properties. *Bone*, 31(1) :8–11.
- [28] Burstein, A. H., Reilly, D. T., and Martens, M. (1976). Aging of bone tissue : mechanical properties. *J Bone Joint Surg Am*, 58(1) :82–86.
- [29] Bushby, A. J., Ferguson, V. L., and Boyde, A. (2004). Nanoindentation of bone : Comparison of specimens tested in liquid and embedded in polymethylmethacrylate. *Journal of Materials Research*, 19(01) :249–259.
- [30] Carter, D. R. and Hayes, W. C. (1976). Bone compressive strength : the influence of density and strain rate. *Science*, 194(4270) :1174–1176.
- [31] Chappard, C., Bensalah, S., Olivier, C., Gouttenoire, P. J., Marchadier, A., Benhamou, C., and Peyrin, F. (2013). 3d characterization of pores in the cortical bone of human femur in the elderly at different locations as determined by synchrotron micro-computed tomography images. *Osteoporos Int*, 24(3) :1023–1033.
- [32] Choi, K. and Goldstein, S. A. (1992). A comparison of the fatigue behavior of human trabecular and cortical bone tissue. *J Biomech*, 25(12) :1371–1381.
- [33] Choi, K., Kuhn, J. L., Ciarelli, M. J., and Goldstein, S. A. (1990). The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *J Biomech*, 23(11) :1103–1113.
- [34] Cooper, D., Turinsky, A., Sensen, C., and Hallgrímsson, B. (2007). Effect of Voxel Size on 3d Micro-CT Analysis of Cortical Bone Porosity. *Calcified Tissue International*, 80(3) :211–219.
- [35] Cowin, S. (2001). *Bone Mechanics Handbook, Second Edition*. Boca raton : Crc press edition.
- [36] Cuppone, M., Seedhom, B. B., Berry, E., and Ostell, A. E. (2004). The longitudinal Young’s modulus of cortical bone in the midshaft of human femur and its correlation with CT scanning data. *Calcif. Tissue Int.*, 74(3) :302–309.
- [37] Currey, J. (1988a). The effect of porosity and mineral content on the Young’s modulus of elasticity of compact bone. *Journal of Biomechanics*, 21(2) :131–139.
- [38] Currey, J. D. (1979). Changes in the impact energy absorption of bone with age. *Journal of biomechanics*, 12(6) :459–469.
- [39] Currey, J. D. (1988b). The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. *J Biomech*, 21(5) :439–441.

- [40] Currey, J. D. (2003). Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporosis International*, 14(0) :29–36.
- [41] Currey, J. D., Brear, K., and Zioupos, P. (1996). The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *Journal of Biomechanics*, 29(2) :257–260.
- [42] Currey, J. D., Brear, K., Zioupos, P., and Reilly, G. C. (1995). Effect of formaldehyde fixation on some mechanical properties of bovine bone. *Biomaterials*, 16(16) :1267–1271.
- [43] Currey, J. D. and Butler, G. (1975). The mechanical properties of bone tissue in children. *J Bone Joint Surg Am*, 57(6) :810–814.
- [44] Dall Ara, E., Ohman, C., Baleani, M., and Viceconti, M. (2007). The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, 40(14) :3267–3270.
- [45] Dall’Ara, E., Luisier, B., Schmidt, R., Pretterklieber, M., Kainberger, F., Zysset, P., and Pahr, D. (2013). DXA predictions of human femoral mechanical properties depend on the load configuration. *Medical Engineering & Physics*, 35(11) :1564–1572.
- [46] Davis, M. T., Loyd, A. M., Shen, H.-y. H., Mulroy, M. H., Nightingale, R. W., Myers, B. S., and Bass, C. D. (2012). The mechanical and morphological properties of 6 year-old cranial bone. *Journal of Biomechanics*, 45(15) :2493–2498.
- [47] Dong, N. H. and Guo, E. (2004). The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. *Journal of Biomechanics*, 37(8) :1281–1287.
- [48] Donnelly, E., Baker, S. P., Boskey, A. L., and van der Meulen, M. C. (2006). Effects of surface roughness and maximum load on the mechanical properties of cancellous bone measured by nanoindentation. *J Biomed Mater Res A*, 77(2) :426–435.
- [49] Drozdowska, B. and Pluskiewicz, W. (2003). Skeletal status in males aged 7-80 years assessed by quantitative ultrasound at the hand phalanges. *Osteoporosis International*, 14(4) :295–300.
- [50] Espinoza Orias, A. A., Deuerling, J. M., Landrigan, M. D., Renaud, J. E., and Roeder, R. K. (2009). Anatomic variation in the elastic anisotropy of cortical bone tissue in the human femur. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2(3) :255–263.
- [51] Eyre, D. R., Dickson, I. R., and Van Ness, K. (1988). Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J*, 252(2) :495–500.
- [52] Fan, Z., Smith, P. A., Eckstein, E. C., and Harris, G. F. (2006). Mechanical properties of OI type III bone tissue measured by nanoindentation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79A(1) :71–77.
- [53] Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P., and Boivin, G. (2010). Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 28(4) :433–445.

- [54] Ferguson, V. (2009). Deformation partitioning provides insight into elastic, plastic, and viscous contributions to bone material behavior. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2(4) :364–374.
- [55] Fischer-Cripps, A. (2005). *Theory of nanoindentation. The IBIS Handbook of Nanoindentation*. Fischer-Cripps Laboratories Pty Ltd, Forestville.
- [56] Follet, H., Boivin, G., Rumelhart, C., and Meunier, P. (2004). The degree of mineralization is a determinant of bone strength : a study on human calcanei. *Bone*, 34(5) :783–9.
- [57] Franklyn, M., Peiris, S., Huber, C., and Yang, K. H. (2007). Pediatric material properties : a review of human child and animal surrogates. *Crit Rev Biomed Eng*, 35(3-4) :197–342.
- [58] Genant, H. K., Engelke, K., Fuerst, T., Gluer, C.-C., Grampp, S., Harris, S. T., Jergas, M., Lang, T., Lu, Y., Majumdar, S., Mathur, A., and Takada, M. (1996). Noninvasive assessment of bone mineral and structure : State of the art. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(6) :707–730.
- [59] Gineyts, E., Borel, O., Chapurlat, R., and Garnero, P. (2010). Quantification of immature and mature collagen crosslinks by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry in connective tissues. *Journal of Chromatography B*, 878(19) :1449–1454.
- [60] Glorieux, F. H., Travers, R., Taylor, A., Bowen, J. R., Rauch, F., Norman, M., and Parfitt, A. M. (2000). Normative data for iliac bone histomorphometry in growing children. *Bone*, 26(2) :103–109.
- [61] Granke, M., Grimal, Q., Saïed, A., Nauleau, P., Peyrin, F., and Laugier, P. (2011). Change in porosity is the major determinant of the variation of cortical bone elasticity at the millimeter scale in aged women. *Bone*, 49(5) :1020–1026.
- [62] Granke, M., Lopez, O., Grimal, Q., Allain, J.-M., Saïed, A., Crépin, J., and Laugier, P. (2012). Contribution of matrix heterogeneity and pores to local strains in human cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 45, Supplement 1 :S474.
- [63] Grimal, Q., Hauptert, S., Mitton, D., Vastel, L., and Laugier, P. (2009). Assessment of cortical bone elasticity and strength : Mechanical testing and ultrasound provide complementary data. *Medical Engineering & Physics*, 31(9) :1140–1147.
- [64] Haïat, G., Naili, S., Grimal, Q., Talmant, M., Desceliers, C., and Soize, C. (2009). Influence of a gradient of material properties on ultrasonic wave propagation in cortical bone : application to axial transmission. *J. Acoust. Soc. Am.*, 125(6) :4043–4052.
- [65] Hengsberger, S., Kulik, A., and Zysset, P. (2002). Nanoindentation discriminates the elastic properties of individual human bone lamellae under dry and physiological conditions. *Bone*, 30(1) :178–184.
- [66] Henry, L. (2006). *Approche micromécanique de l’os cortical : mesures de champs et simulation numérique*. PhD thesis, Ecole centrale Paris, Paris.
- [67] Hightower, L. (2000). Osteoporosis : pediatric disease with geriatric consequences. *Orthop Nurs*, 19(5) :59–62.

- [68] Hild, F. and Roux, S. (2006). Digital Image Correlation : from Displacement Measurement to Identification of Elastic Properties – a Review. *Strain*, 42(2) :69–80.
- [69] Hildebrand, T. and Ruegsegger, P. (1997). A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of Microscopy*, 185(1) :67–75.
- [70] Ho Ba Tho, M.-C., Rho, J. Y., and Ashman, R. B. (1991). *Atlas of mechanical properties of human cortical and cancellous bone*, volume 25.
- [71] Hoffer, C., Moore, K., Kozloff, K., Zysset, P., Brown, M., and Goldstein, S. (2000). Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone*, 26(6) :603–609.
- [72] Hoffer, C. E., Guo, X. E., Zysset, P. K., and Goldstein, S. A. (2005). An application of nanoindentation technique to measure bone tissue Lamellae properties. *J Biomech Eng*, 127(7) :1046–1053.
- [73] Hoffmeister, B. K., Smith, S. R., Handley, S. M., and Rho, J. Y. (2000). Anisotropy of Young’s modulus of human tibial cortical bone. *Med Biol Eng Comput*, 38(3) :333–338.
- [74] Hofmann, T., Heyroth, F., Meinhard, H., Franzel, W., and Raum, K. (2006). Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae. *Journal of Biomechanics*, 39(12) :2282–2294.
- [75] Imbert, L., Aurégan, J.-C., Pernelle, K., and Hoc, T. (2014). Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level. *Bone*, 65 :18–24.
- [76] Jans, G., Van Audekercke, R., Sloten, J., Gobin, R., Van der Perre, G., and Mommaerts, M. (1998). P020 Bending properties of cranial bone segments of new-born children. *Journal of Biomechanics*, 31, Supplement 1 :65.
- [77] Johnson, W. M. and Rapoff, A. J. (2007). Microindentation in bone : Hardness variation with five independent variables. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 18(4) :591–597.
- [78] Kalkwarf, H. J., Zemel, B. S., Gilsanz, V., Lappe, J. M., Horlick, M., Oberfield, S., Mahboubi, S., Fan, B., Frederick, M. M., Winer, K., and Shepherd, J. A. (2007). The Bone Mineral Density in Childhood Study : Bone Mineral Content and Density According to Age, Sex, and Race. *JCEM*, 92(6) :2087–2099.
- [79] Kang, Q., An, Y. H., and Friedman, R. J. (1997). Effects of multiple freezing-thawing cycles on ultimate indentation load and stiffness of bovine cancellous bone. *Am. J. Vet. Res.*, 58(10) :1171–1173.
- [80] Keller, T. S., Mao, Z., and Spengler, D. M. (1990). Young’s modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone. *J. Orthop. Res.*, 8(4) :592–603.
- [81] Kriewall, T. J., McPherson, G. K., and Tsai, A. C. (1981). Bending properties and ash content of fetal cranial bone. *Journal of Biomechanics*, 14(2) :73–79.
- [82] Lakes, R. S. and Katz, J. L. (1974). Interrelationships among the viscoelastic functions for anisotropic solids : Application to calcified tissues and related systems. *Journal of Biomechanics*, 7(3) :259–270.

- [83] Lakes, R. S. and Katz, J. L. (1979). Viscoelastic properties of wet cortical bone—II. Relaxation mechanisms. *Journal of Biomechanics*, 12(9) :679–687.
- [84] Linde, F. and Hvid, I. (1987). Stiffness behaviour of trabecular bone specimens. *Journal of Biomechanics*, 20(1) :83–89.
- [85] Linde, F. and Hvid, I. (1989). The effect of constraint on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens. *Journal of Biomechanics*, 22(5) :485–490.
- [86] Linde, F., Hvid, I., and Jensen, N. C. (1985). Material properties of cancellous bone in repetitive axial loading. *Eng Med*, 14(4) :173–177.
- [87] Linde, F. and Sorensen, H. C. F. (1993). The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, 26(10) :1249–1252.
- [88] Loro, M. L., Sayre, J., Roe, T. F., Goran, M. I., Kaufman, F. R., and Gilsanz, V. (2000). Early identification of children predisposed to low peak bone mass and osteoporosis later in life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(10) :3908–3918.
- [89] Lotz, J. C., Gerhart, T. N., and Hayes, W. C. (1991). Mechanical properties of metaphyseal bone in the proximal femur. *Journal of Biomechanics*, 24(5) :317–329.
- [90] Martin, R. and Atkinson, P. J. (1977). Age and sex-related changes in the structure and strength of the human femoral shaft. *Journal of Biomechanics*, 10(4) :223–231.
- [91] Martin, R. B. and Ishida, J. (1989). The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *J Biomech*, 22(5) :419–426.
- [92] Mayhew, P., Kaptoge, S., Loveridge, N., Power, J., Kroger, H. P. J., Parker, M., and Reeve, J. (2004). Discrimination between cases of hip fracture and controls is improved by hip structural analysis compared to areal bone mineral density. An ex vivo study of the femoral neck. *Bone*, 34(2) :352–361.
- [93] McCalden, R. W., McGeough, J. A., Barker, M. B., and Court-Brown, C. M. (1993). Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am*, 75(8) :1193–1205.
- [94] Meunier, P. J. and Boivin, G. (1997). Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone : Therapeutic implications. *Bone*, 21(5) :373–377.
- [95] Migliori, A. and Maynard, J. D. (2005). Implementation of a modern resonant ultrasound spectroscopy system for the measurement of the elastic moduli of small solid specimens. *Review of Scientific Instruments*, 76(12) :121301.
- [96] Migliori, A., Sarrao, J., Visscher, W. M., Bell, T., Lei, M., Fisk, Z., and Leisure, R. (1992). Resonant ultrasound spectroscopic techniques for measurement of the elastic moduli of solids.
- [97] Montagner, F., Kaftandjian, V., Farlay, D., Brau, D., Boivin, G., and Follet, H. (2015). Validation of a novel microradiography device for characterization of bone mineralization. *J Xray Sci Technol*, 23(2) :201–211.

- [98] Nyman, J. S., Roy, A., Tyler, J. H., Acuna, R. L., Gayle, H. J., and Wang, X. (2007). Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. *J. Orthop. Res.*, 25(5) :646–655.
- [99] Odgaard, A. and Linde, F. (1991). The underestimation of Young’s modulus in compressive testing of cancellous bone specimens. *J Biomech*, 24(8) :691–698.
- [100] Ohman, C., Baleani, M., Pani, C., Taddei, F., Alberghini, M., Viceconti, M., and Manfrini, M. (2011). Compressive behaviour of child and adult cortical bone. *Bone*, 49(4) :769–776.
- [101] Ohman, C., Dall Ara, E., Baleani, M., Jan, S. V. S., and Viceconti, M. (2008). The effects of embalming using a 4% formalin solution on the compressive mechanical properties of human cortical bone. *Clinical Biomechanics*, 23(10) :1294–1298.
- [102] Oliver, W. and Pharr, G. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*, 7(6) :1564–1583.
- [103] Oxlund, H., Barckman, M., Ortoft, G., and Andreassen, T. T. (1995). Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone*, 17(4 Suppl) :365S–371S.
- [104] Panjabi, M. M., Krag, M., Summers, D., and Videman, T. (1985). Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J. Orthop. Res.*, 3(3) :292–300.
- [105] Paschalis, E. P., DiCarlo, E., Betts, F., Sherman, P., Mendelsohn, R., and Boskey, A. L. (1996). FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcified tissue international*, 59(6) :480–487.
- [106] Paschalis, E. P., Verdelis, K., Doty, S. B., Boskey, A. L., Mendelsohn, R., and Yamauchi, M. (2001). Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J. Bone Miner. Res.*, 16(10) :1821–1828.
- [107] Rauch, F. (2012). The dynamics of bone structure development during pubertal growth. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 12(1) :1–6.
- [108] Rauch, F., Travers, R., and Glorieux, F. H. (2007). Intracortical remodeling during human bone development—A histomorphometric study. *Bone*, 40(2) :274–280.
- [109] Raum, K. (2008). Microelastic imaging of bone. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 55(7) :1417–1431.
- [110] Reisinger, A. G., Pahr, D. H., and Zysset, P. K. (2011). Principal stiffness orientation and degree of anisotropy of human osteons based on nanoindentation in three distinct planes. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8) :2113–2127.
- [111] Revilla, M., Cardenas, J. L., Hernandez, E. R., Villa, L. F., and Rico, H. (1995). Correlation of total-body bone mineral content determined by dual-energy X-ray absorptiometry with bone mineral density determined by peripheral quantitative computed tomography. *Academic Radiology*, 2(12) :1062–1066.
- [112] Rho, J.-Y. (1996). An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone. *Ultrasonics*, 34(8) :777–783.

- [113] Rho, J.-Y., Kuhn-Spearing, L., and Zioupos, P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, 20(2) :92–102.
- [114] Rho, J.-Y. and Pharr, G. M. (1999). Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 10(8) :485–488.
- [115] Rho, J. Y., Tsui, T. Y., and Pharr, G. M. (1997). Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*, 18(20) :1325–1330.
- [116] Rodriguez Florez, N., Oyen, M. L., and Shefelbine, S. J. (2013). Insight into differences in nanoindentation properties of bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 18 :90–99.
- [117] Roe, S. C., Pijanowski, G. J., and Johnson, A. L. (1988). Biomechanical properties of canine cortical bone allografts : effects of preparation and storage. *Am. J. Vet. Res.*, 49(6) :873–877.
- [118] Rudy, D. J., Deuerling, J. M., Espinoza Orias, A. A., and Roeder, R. K. (2011). Anatomic variation in the elastic inhomogeneity and anisotropy of human femoral cortical bone tissue is consistent across multiple donors. *Journal of Biomechanics*, 44(9) :1817–1820.
- [119] Ruppel, M. E., Miller, L. M., and Burr, D. B. (2008). The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporosis International*, 19(9) :1251–1265.
- [120] Saito, M. and Marumo, K. (2009). Collagen cross-links as a determinant of bone quality : a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis International*, 21(2) :195–214.
- [121] Schaffler, M. B. and Burr, D. B. (1988). Stiffness of compact bone : effects of porosity and density. *J Biomech*, 21(1) :13–16.
- [122] Schnitzler, C. and Mesquita, J. (2013). Cortical porosity in children is determined by age-dependent osteonal morphology. *Bone*.
- [123] Schnitzler, C., Mesquita, J., and Pettifor, J. (2009). Cortical bone development in black and white South African children : Iliac crest histomorphometry. *Bone*, 44(4) :603–611.
- [124] Schnitzler, C. M. (2015). Childhood Cortical Porosity Is Related to Microstructural Properties of the Bone-Muscle Junction. *J Bone Miner Res*, 30(1) :144–155.
- [125] Smith, C. B. and Smith, D. A. (1976). Relations between age, mineral density and mechanical properties of human femoral compacta. *Acta Orthopaedica*, 47(5) :496–502.
- [126] Snyder, S. M. and Schneider, E. (1991). Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography. *J. Orthop. Res.*, 9(3) :422–431.
- [127] Thomas, C. D. L., Feik, S. A., and Clement, J. G. (2006). Increase in pore area, and not pore density, is the main determinant in the development of porosity in human cortical bone. *J. Anat.*, 209(2) :219–230.

- [128] Tufekci, K., Kayacan, R., and Kurbanoglu, C. (2014). Effects of Gamma Radiation Sterilization and Strain Rate on Compressive Behavior of Equine Cortical Bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.
- [129] Turner, C. and Burr, D. (1993). Basic biomechanical measurements of bone : A tutorial. *Bone*, 14(4) :595–608.
- [130] Turner, C. H., Rho, J., Takano, Y., Tsui, T. Y., and Pharr, G. M. (1999). The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar : results from two microscopic measurement techniques. *Journal of Biomechanics*, 32(4) :437–441.
- [131] Ulrich, D., van Rietbergen, B., Laib, A., and Ruegsegger, P. (1999). The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone*, 25(1) :55–60.
- [132] Vardakastani, V., Saletti, D., Skalli, W., Marry, P., Allain, J. M., and Adam, C. (2014). Increased intra-cortical porosity reduces bone stiffness and strength in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 69 :61–67.
- [133] Viguet-Carrin, S., Garnero, P., and Delmas, P. D. (2005). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3) :319–336.
- [134] Viguet-Carrin, S., Gineyts, E., Bertholon, C., and Delmas, P. (2009). Simple and sensitive method for quantification of fluorescent enzymatic mature and senescent crosslinks of collagen in bone hydrolysate using single-column high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877(1–2) :1–7.
- [135] Viguet-Carrin, S., Roux, J., Arlot, M., Merabet, Z., Leeming, D., Byrjalsen, I., Delmas, P., and Bouxsein, M. (2006). Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone*, 39(5) :1073–1079.
- [136] Vinz, H. (1975). Change in the mechanical properties of human compact bone tissue upon aging. *Polymer Mechanics*, 11(4) :568–571.
- [137] Wachter, N. J., Krischak, G. D., Mentzel, M., Sarkar, M. R., Ebinger, T., Kinzl, L., Claes, L., and Augat, P. (2002). Correlation of bone mineral density with strength and microstructural parameters of cortical bone in vitro. *Bone*, 31(1) :90–95.
- [138] Wang, X., Bank, R. A., TeKoppele, J. M., and Agrawal, C. M. (2001). The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J. Orthop. Res.*, 19(6) :1021–1026.
- [139] Wegrzyn, J., Roux, J.-P., Farlay, D., Follet, H., and Chapurlat, R. (2013). The role of bone intrinsic properties measured by infrared spectroscopy in whole lumbar vertebra mechanics : Organic rather than inorganic bone matrix? *Bone*, 56(2) :229–233.
- [140] Wilke, H. J., Krischak, S., and Claes, L. E. (1996). Formalin fixation strongly influences biomechanical properties of the spine. *J Biomech*, 29(12) :1629–1631.
- [141] Wolfram, U., Wilke, H.-J., and Zysset, P. K. (2009). Rehydration of vertebral trabecular bone : Influences on its anisotropy, its stiffness and the indentation work with a view to age, gender and vertebral level. *Bone*, 46(2) :348–54.

- [142] Wolfram, U., Wilke, H.-J., and Zysset, P. K. (2010). Valid μ finite element models of vertebral trabecular bone can be obtained using tissue properties measured with nanoindentation under wet conditions. *Journal of Biomechanics*, 43(9) :1731–1737.
- [143] Wren, T. A. L., Kalkwarf, H. J., Zemel, B. S., Lappe, J. M., Oberfield, S., Shepherd, J. A., Winer, K. K., and Gilsanz, V. (2014). Longitudinal Tracking of Dual-Energy X-ray Absorptiometry Bone Measures Over 6 Years in Children and Adolescents : Persistence of Low Bone Mass to Maturity. *The Journal of Pediatrics*, 164(6) :1280–1285.e2.
- [144] Xu, J., Rho, J. Y., Mishra, S. R., and Fan, Z. (2003). Atomic force microscopy and nanoindentation characterization of human lamellar bone prepared by microtome sectioning and mechanical polishing technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67A(3) :719–726.
- [145] Yeni, Y. N. and Norman, T. L. (2000). Fracture toughness of human femoral neck : effect of microstructure, composition, and age. *Bone*, 26(5) :499–504.
- [146] Yoon, H. S. and Katz, L. J. (1976). Ultrasonic wave propagation in human cortical bone—II. Measurements of elastic properties and microhardness. *Journal of Biomechanics*, 9(7) :459–464.
- [147] Zebaze, R. M. D., Jones, A. C., Pandy, M. G., Knackstedt, M. A., and Seeman, E. (2011). Differences in the degree of bone tissue mineralization account for little of the differences in tissue elastic properties. *Bone*, 48(6) :1246–1251.
- [148] Zioupos, P. and Currey, J. (1998). Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. *Bone*, 22(1) :57–66.
- [149] Zioupos, P., Currey, J. D., and Hamer, A. J. (1999). The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(2) :108–116.
- [150] Zysset, P. K. (2009). Indentation of bone tissue : a short review. *Osteoporosis International*, 20(6) :1049–1055.
- [151] Zysset, P. K., Guo, X. E., Hoffler, C. E., Moore, K. E., and Goldstein, S. A. (1999). Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech*, 32(10) :1005–1012.

Annexe A

Synthèse des données obtenues pour la caractérisation tissulaire de l'os cortical

Reference	Age (années)	Po.N (mm ⁻¹)	Po.Dm (µm)	Po.Dm.SD (µm)	Po.Sp (µm)	Po.Sp.SD (µm)	Po.V/TV (%)	Po.S/Po.V (mm ⁻¹)	Conn.D (mm ⁻³)	DA
2M14_fib_A	14	0,97	167,80	64,98	395,99	134,94	16,22	25,56	16,87	3,17
5F10_fib1_A	10	0,89	94,67	30,24	369,28	113,22	8,41	43,02	5,02	4,19
5F10_fib1_B	10	0,82	83,44	34,27	356,61	117,61	6,83	50,90	9,83	4,18
5F10_fib2_A	10	0,82	156,14	74,57	333,93	96,24	12,78	30,56	5,62	5,10
5F10_fib2_B	10	0,52	120,98	55,05	341,33	111,76	6,23	43,05	7,93	7,05
15M16_fib_A	16	0,42	108,11	66,33	408,68	115,01	4,53	52,11	8,99	4,39
15M16_fib_B	16	0,33	72,83	35,59	446,61	122,51	2,41	67,65	1,82	5,65
20M14_fib_A	14	0,44	115,30	59,27	419,73	139,21	5,04	46,15	8,72	2,48
20M14_fib_B	14	0,34	79,18	43,73	509,53	179,63	2,72	60,51	1,66	4,19
21M10_fib_A	10	0,52	175,42	81,37	389,93	109,23	9,03	29,66	1,16	4,86
21M10_fib_B	10	0,34	176,41	91,38	446,16	124,81	6,07	32,91	3,20	4,42
27F15_fib_A	15	0,43	197,64	110,09	368,86	109,26	8,56	33,26	4,20	4,50
27F15_fib_B	15	0,66	89,40	42,78	367,17	107,22	5,92	53,35	4,68	5,38
28M17_fib_A	17	0,61	100,42	44,02	435,14	157,22	6,13	46,12	7,12	3,71
28M17_fib_B	17	0,34	75,04	35,33	494,42	151,16	2,58	61,43	2,98	4,53
31F12_fib_A	12	0,37	92,81	51,51	472,40	132,21	3,47	53,04	3,28	3,13
31F12_fib_B	12	1,31	171,29	59,25	300,36	132,80	22,48	28,56	22,77	2,83
32M15_fib_A	15	0,63	284,67	168,50	346,08	132,48	18,06	22,98	12,22	3,31
33M10_fib_B	10	0,91	221,38	134,04	360,13	109,36	20,11	23,55	4,20	3,91
35M18_fib_A	18	0,65	80,54	29,16	379,60	110,89	5,22	52,16	4,57	6,02
35M18_fib_B	18	0,45	63,63	26,65	434,79	124,83	2,88	64,93	2,23	8,78
37M6_fib_A	6	1,05	182,51	78,77	307,34	101,50	19,09	25,57	19,98	3,42
37M6_fib_B	6	0,99	92,06	46,56	328,05	85,11	9,10	51,88	49,76	3,49
38F13_fib_A	13	0,9	155,81	64,41	392,27	127,66	13,95	29,18	4,15	3,55

TABLE A.1 – Valeurs des variables morphométriques par éprouvette d'os cortical chez l'enfant.

Reference	Age (années)	Po.N (mm ⁻¹)	Po.Dm (µm)	Po.Dm.SD (µm)	Po.Sp (µm)	Po.Sp.SD (µm)	Po.V/TV (%)	Po.S/Po.V (mm ⁻¹)	Conn.D (mm ⁻³)	DA
Ad1M67_A	67	0,68	116,28	56,10	347,21	104,15	7,88	41,73	15,60	3,93
Ad1M67_B	67	0,7	107,80	41,18	440,18	184,81	7,56	41,63	30,54	3,89
Ad2M80_A	80	0,96	115,60	52,94	332,78	96,25	11,07	40,19	4,66	4,97
Ad2M80_B	80	1,04	99,94	40,28	307,41	85,83	10,43	45,10	9,96	4,34
Ad3F95_A	95	0,1	72,09	29,58	301,54	98,32	7,40	61,72	53,51	3,02
Ad5F68_A	68	0,51	109,03	42,25	418,65	126,35	5,55	43,44	14,39	3,59
Ad6F87_B	87	1,19	232,87	141,88	235,43	76,93	27,76	24,82	39,91	3,30
Ad7M83_A	83	1,48	179,38	90,43	251,66	84,11	26,58	26,54	22,42	3,04
Ad7M83_B	83	0,99	105,82	49,86	313,48	98,05	10,48	43,99	19,53	4,26
Ad8M78_A	78	1,03	146,29	66,85	324,23	104,53	15,00	32,07	7,21	4,38
Ad8M78_B	78	1,24	270,33	133,87	257,44	81,11	33,48	19,96	46,33	2,89
Ad9F73_A	73	0,75	306,06	184,09	327,48	100,90	23,04	20,04	49,81	2,08
Ad10F73_A	73	0,73	99,33	33,34	378,81	116,49	7,26	44,55	12,63	4,25
Ad10F73_B	73	0,78	102,92	36,77	380,66	120,42	8,01	42,84	17,92	4,31
Ad11M77_A	77	1,34	161,76	71,11	278,73	84,26	21,75	29,46	27,22	4,13
Ad12M89_A	89	1,42	81,07	34,26	246,47	75,37	11,55	54,30	32,34	5,39
Ad12M89_B	89	1,39	90,79	37,51	260,24	76,50	12,60	49,46	46,59	5,53
Ad13F50_A	50	0,83	79,58	29,89	324,74	101,81	6,60	54,10	7,81	5,98
Ad13F50_B	50	0,66	61,85	20,82	375,95	115,14	4,08	69,46	6,99	7,43
Ad14M76_A	76	0,85	173,38	95,35	368,11	140,96	14,80	29,37	7,30	3,38
Ad14M76_B	76	0,77	156,34	83,84	377,90	118,17	12,05	31,87	12,81	3,86
Ad15F56_A	56	0,72	92,15	33,46	397,00	129,22	6,60	47,73	8,53	4,04
Ad16F91_A	91	1,38	293,86	141,83	228,78	69,22	40,64	17,44	4,63	3,66
Ad17F57_A	57	0,86	267,81	139,28	318,73	108,10	23,16	21,78	11,22	3,51

TABLE A.2 – Valeurs des variables morphométriques par éprouvette d’os cortical chez l’adultes.

N° Echantillons	Age (années)	TMD (g cm ⁻³)	TMD.SD (g cm ⁻³)
2M14_fib_A	14	0,87	0,071
5F10_fib1_B	10	1,00	0,074
5F10_fib1_A	10	0,96	0,056
5F10_fib2_B	10	1,06	0,070
5F10_fib2_A	10	1,12	0,110
15M16_fib_A	16	1,07	0,080
15M16_fib_B	16	1,17	0,103
19F10_fib_A	10	0,92	0,089
20M14_fib_B	14	1,02	0,090
20M14_fib_A	14	1,01	0,069
21M10_fib_B	10	1,17	0,096
21M10_fib_A	10	1,20	0,097
27F15_fib_B	15	1,06	0,068
27F15_fib_A	15	1,03	0,067
28M17_fib_A	17	1,02	0,061
28M17_fib_B	17	1,18	0,087
31F12_fib_A	12	1,04	0,070
31F12_fib_B	12	0,94	0,077
32M15_fib_A	15	1,02	0,081
33M10_fib_B	10	0,96	0,083
35M18_fib_A	18	1,11	0,067
35M18_fib_A	18	1,11	0,068
37M6_fib_A	6	0,96	0,074
37M6_fib_A	6	1,01	0,067
38F13_fib_A	13	1,05	0,073

TABLE A.3 – Valeurs de TMD chez l'enfant obtenues par microtomographie.

N° Echantillons	Age (années)	TMD (g cm ⁻³)	TMD.SD (g cm ⁻³)
Ad1M67_A	67	1,11	0,082
Ad1M67_B	67	1,13	0,089
Ad2M80_A	80	1,11	0,086
Ad2M80_B	80	1,09	0,086
Ad3F95_A	95	1,09	0,084
Ad5F68_A	68	1,13	0,080
Ad6F87_B	87	1,05	0,090
Ad7M83_A	83	1,06	0,087
Ad7M83_B	83	1,12	0,088
Ad8M78_A	78	1,08	0,083
Ad8M78_B	78	1,06	0,088
Ad9F73_A	73	1,07	0,091
Ad10F73_A	73	1,12	0,085
Ad10F73_B	73	1,10	0,077
Ad11M77_A	77	1,12	0,099
Ad12M89_A	89	1,12	0,097
Ad12M89_B	89	1,09	0,098
Ad13F50_A	50	1,10	0,080
Ad13F50_B	50	1,14	0,085
Ad14M76_A	76	1,11	0,083
Ad14M76_B	76	1,11	0,088
Ad15F56_A	56	1,09	0,078
Ad16F91_A	91	1,08	0,095
Ad17F57_A	57	1,03	0,079

TABLE A.4 – Valeurs de TMD chez l'adulte obtenues par microtomographie.

N° Echantillons	Age (années)	OSTEON		INTERSTITIEL	
		DMB (g cm ⁻³)	DMB.SD (g cm ⁻³)	DMB (g cm ⁻³)	DMB.SD (g cm ⁻³)
3F8_fib1	8	1,006	0,071	1,179	0,088
3F8_fib2	8	1,078	0,067	1,211	0,034
5F10_fib1	10	0,983	0,062	1,153	0,059
5F10_fib2	10	1,099	0,037	1,191	0,039
6M7_fib	7	0,990	0,047	1,176	0,026
7M4_fib	4	1,014	0,063	1,174	0,066
8M12_fib	12	0,998	0,082	1,220	0,028
10M7_fib	7	0,990	0,058	1,193	0,038
11F9_fib	9	1,007	0,068	1,156	0,032
12M10_fib	10	1,039	0,077	1,179	0,045
14F13_fib	13	1,052	0,103	1,215	0,056
15M16_fib	16	1,045	0,047	1,198	0,030
18M12_fib	12	0,921	0,051	1,094	0,020
35M18_fib	18	1,162	0,041	1,273	0,041
37M6_fib	6	1,063	0,071	1,261	0,059

TABLE A.5 – Valeurs de DMB chez l'enfant obtenues par microradiographie.

N° Echantillons	Age (années)	OSTEON		INTERSTITIEL	
		DMB (g cm ⁻³)	DMB.SD (g cm ⁻³)	DMB (g cm ⁻³)	DMB.SD (g cm ⁻³)
Ad1M67	67	1,052	0,070	1,250	0,029
Ad2M80	80	1,130	0,058	1,311	0,054
Ad3F95	95	1,098	0,068	1,253	0,016
Ad4F95	95	1,118	0,033	1,298	0,021
Ad5F68	68	1,118	0,035	1,256	0,024
Ad6F87	87	1,012	0,088	1,242	0,041
Ad7M83	83	1,090	0,060	1,217	0,031
Ad8M78	78	1,058	0,047	1,247	0,029
Ad9F73	73	1,056	0,038	1,249	0,020
Ad10F73	73	1,055	0,097	1,228	0,057
Ad11M77	77	1,038	0,040	1,231	0,042
Ad12M89	89	1,081	0,095	1,252	0,016
Ad13F50	50	1,137	0,056	1,306	0,040
Ad14M76	76	1,029	0,111	1,242	0,086
Ad15F56	56	1,093	0,064	1,299	0,018
Ad17F57	57	1,100	0,051	1,277	0,040

TABLE A.6 – Valeurs de DMB chez l'adulte obtenues par microradiographie.

N° Echantillons	Age (années)	CX Matures		CX Immatures	
		DPD (mmol par mol de collagène)	PYD	DHLNL	HLNL
ENFANTS					
2M14_fib	14	68	311	2347	803
5F10_fib	10	86	401	1086	254
15M16_fib	16	112	543	2281	800
19F10_fib	10	75	353	2456	820
20M14_fib	14	66	101	507	175
21M10_fib	10	140	551	2054	726
22M1_fem	1	44	337	3017	718
23F15_fem	15	60	449	1962	700
24M10_fib	10	53	309	3010	731
25F5_fem	5	66	431	2199	729
27F15_fib	15	119	599	2204	792
28M17_fib	17	111	409	1090	539
29F1_fem	1	54	343	2955	658
30F1_fem	1	55	478	2630	604
31F12_fib	12	98	320	1532	632
32M15_fib	15	98	484	2030	649
33M10_fib	10	78	344	2156	664
34F1_fem	1	83	427	3155	885
35M18_fib	18	130	543	1035	391
36F1_fem	1	69	455	3014	658
37M6_fib	6	109	397	2234	372
38F13_fib	13	128	499	2611	902
ADULTES					
Ad1M67	67	115	478	423	123
Ad2M80	80	145	432	339	125
Ad3F95	95	97	444	277	82
Ad4F95	95	117	437	356	110
Ad5F68	68	122	483	480	114
Ad6F87	87	128	437	355	121
Ad7M83	83	98	511	269	84
Ad8M78	78	140	533	306	58
Ad9F73	73	127	484	546	159
Ad10F73	73	151	757	661	180
Ad11M77	77	129	492	604	162
Ad12M89	89	111	438	467	76
Ad13F50	50	136	497	395	141
Ad14M76	76	106	431	323	92
Ad15F56	56	181	623	394	152
Ad16F91	91	153	427	370	135
Ad17F57	57	116	488	572	145

TABLE A.7 – Valeurs des quantités de molécule de pontage (en mmol par mol de collagène).

N° Echantillons	Age	Cristallinité	Carbonatation	Index de minéralisation	Maturité du minéral	Maturité du collagène
OSTEON						
1M6_fib1	6	24,80	0,0054	4,58	1,96	3,73
5F10_fib	10	26,81	0,0064	4,37	2,05	3,93
6M7_fib	7	27,88	0,0067	4,72	1,64	4,09
7M4_fib	4	30,35	0,0062	3,51	1,55	3,35
8M12_fib	12	28,40	0,0067	4,46	1,60	4,07
10M7_fib	7	30,20	0,0082	3,45	1,34	3,07
11F9_fib	9	29,91	0,0065	4,24	1,60	3,83
12M10_fib	10	25,93	0,0057	4,85	2,06	3,41
14F13_fib	13	26,72	0,0069	4,39	1,73	3,76
15M16_fib	16	27,35	0,0072	4,37	2,05	4,44
18M12_fib	12	27,77	0,0061	4,67	1,66	3,40
35M18_fib	18	26,65	0,0074	4,57	1,79	4,35
37M6_fib	6	30,43	0,0073	3,97	1,87	3,54
INTERSTITIEL						
1M6_fib1	6	25,65	0,0054	4,48	2,30	4,22
5F10_fib	10	26,29	0,0061	4,90	2,11	4,43
6M7_fib	7	27,74	0,0065	5,13	1,83	4,60
7M4_fib	4	28,82	0,0061	4,19	1,77	4,01
8M12_fib	12	26,67	0,0065	5,13	1,91	4,29
10M7_fib	7	27,02	0,0061	4,74	2,06	4,74
11F9_fib	9	28,19	0,0062	5,40	1,77	5,14
12M10_fib	10	25,77	0,0057	5,07	2,07	4,64
14F13_fib	13	25,99	0,0067	4,78	1,83	4,80
15M16_fib	16	26,79	0,0072	5,15	2,12	5,35
18M12_fib	12	27,93	0,0058	4,60	1,70	3,44
35M18_fib	18	26,48	0,0072	4,97	2,07	4,53
37M6_fib	6	29,22	0,0065	4,34	1,75	4,42

TABLE A.8 – Valeurs des paramètres FTIRM chez l'enfant.

N° Echantillons	Age	Cristallinité	Carbonatation	Index de minéralisation	Maturité du minéral	Maturité du collagène
OSTEON						
Ad1M67	67	26,62	0,0075	4,41	1,94	4,22
Ad2M80	80	27,33	0,0088	3,80	1,24	3,79
Ad3F95	95	26,92	0,0083	4,03	1,27	3,79
Ad4F95	95	26,82	0,0078	3,94	1,57	3,45
Ad5F68	68	25,35	0,0074	4,35	1,82	3,79
Ad6F87	87	26,95	0,0080	4,02	1,46	3,42
Ad7M83	83	26,76	0,0078	4,48	1,53	4,19
Ad8M78	78	25,07	0,0076	4,61	2,01	4,23
Ad9F73	73	25,55	0,0067	4,87	1,94	3,80
Ad10F73	73	26,79	0,0084	3,82	1,58	4,14
Ad11M77	77	26,40	0,0072	4,73	2,09	4,39
Ad12M89	89	25,90	0,0078	4,63	1,88	3,60
Ad13F50	50	26,55	0,0079	4,26	1,63	4,03
Ad14M76	76	25,65	0,0077	4,66	1,98	4,12
Ad15F56	56	27,72	0,0081	4,13	1,63	3,59
Ad16F91	91	26,28	0,0081	3,94	1,55	4,20
Ad17F57	57	25,81	0,0075	4,63	2,08	4,98
INTERSTITIEL						
Ad1M67	67	26,62	0,0072	5,12	1,71	4,46
Ad2M80	80	26,75	0,0080	4,64	1,30	4,43
Ad3F95	95	26,65	0,0076	4,72	1,30	4,39
Ad4F95	95	26,01	0,0073	4,60	1,61	4,09
Ad5F68	68	24,45	0,0069	5,04	2,04	4,09
Ad6F87	87	25,55	0,0077	5,14	1,75	4,65
Ad7M83	83	26,60	0,0073	5,30	1,50	4,25
Ad8M78	78	25,08	0,0073	5,44	2,13	4,11
Ad9F73	73	25,03	0,0067	5,24	1,91	3,48
Ad10F73	73	25,79	0,0072	5,03	1,99	4,01
Ad11M77	77	25,82	0,0071	5,37	1,98	4,12
Ad12M89	89	25,64	0,0074	4,96	1,95	4,15
Ad13F50	50	25,88	0,0074	5,30	1,99	4,43
Ad14M76	76	24,90	0,0074	5,61	2,14	4,56
Ad15F56	56	26,76	0,0077	5,41	1,63	4,37
Ad16F91	91	25,84	0,0073	5,23	1,73	4,64
Ad17F57	57	25,53	0,0074	5,23	2,16	4,95

TABLE A.9 – Valeurs des paramètres FTIRM chez l'adulte.

Annexe B

Synthèse des données obtenues pour la caractérisation mécanique de l'os cortical

N° Echantillons	Age (années)	C11 (GPa)	C22 (GPa)	C33 (GPa)	C44 (GPa)	C55 (GPa)	C66 (GPa)
2M14_Fib_A	14	16,3	11,9	17,6	2,8	3,1	2,2
5F10_Fib1_A	10	13,2	13,3	20,6	4,7	4,4	2,9
5F10_Fib1_B	10	16,2	15,5	24,6	4,6	3,9	3,5
5F10_Fib2_A	10	17,2	16,8	19,4	6,0	5,4	3,4
5F10_Fib2_B	10	19,6	4,4	32,7	4,9	4,5	3,5
15M16_Fib_A	16	20,5	18,2	31,7	5,0	5,3	3,6
15M16_Fib_B	16	18,0	17,9	30,1	4,5	5,6	3,6
19F10_fib_A	10	8,1	8,4	11,9	2,4	2,6	2,7
20M14_Fib_A	14	20,3	17,6	28,2	4,5	3,7	3,9
20M14_Fib_B	14	17,1	15,3	28,0	3,9	3,7	2,9
21M10_Fib_A	10	16,4	15,7	26,0	4,6	4,5	3,0
21M10_Fib_B	10	19,2	19,2	30,4	4,6	4,8	3,6
27F15_Fib_A	15	16,7	21,5	27,6	5,1	4,9	3,3
27F15_Fib_B	15	16,2	16,0	29,1	4,7	4,8	3,2
28M17_Fib_A	17	20,5	17,8	26,9	4,2	3,7	3,1
28M17_Fib_B	17	18,2	23,4	25,2	4,4	4,1	3,1
31F12_Fib_A	12	15,2	16,4	24,5	4,1	4,0	3,0
31F12_Fib_B	12	16,6	16,1	27,4	4,4	4,7	3,7
32M15_Fib_A	15	17,3	18,0	24,2	4,4	4,3	3,3
33M10_Fib_B	10	17,1	13,6	19,1	3,6	3,6	2,8
35M18_Fib_A	18	20,5	21,7	32,9	6,3	6,0	4,5
35M18_Fib_B	18	12,1	11,9	19,9	3,4	2,8	2,4
37M6_Fib_A	6	11,2	12,3	20,5	3,5	3,2	2,5
37M6_Fib_B	6	21,7	19,7	28,6	5,5	5,0	4,0
38F13_Fib_A	13	15,5	16,6	20,3	3,8	3,3	2,7

TABLE B.1 – Valeurs des coefficients de rigidité chez l'enfant.

N° Echantillons	Age (années)	C11 (GPa)	C22 (GPa)	C33 (GPa)	C44 (GPa)	C55 (GPa)	C66 (GPa)
Ad1M67_ A	67	14,5	16,9	27,1	4,3	3,8	2,9
Ad1M67_ B	67	21,3	23,2	36,3	5,4	5,5	3,9
Ad2M80_ A	80	21,2	23,9	29,6	5,0	4,9	3,6
Ad2M80_ B	80	19,2	20,6	27,5	4,3	4,3	3,7
Ad3F95_ A	95	11,6	19,5	24,2	4,2	4,7	2,8
Ad5F68_ A	68	18,9	20,6	32,2	4,9	4,8	3,4
Ad6F87_ A	87	12,8	8,5	20,6	5,2	3,7	2,5
Ad6F87_ B	87	11,1	6,7	24,2	3,8	7,3	3,0
Ad7M83_ A	83	17,3	17,5	26,1	4,5	4,4	3,3
Ad7M83_ B	83	24,9	18,6	26,3	5,1	5,2	3,8
Ad8M78_ A	78	17,3	8,1	27,3	4,4	4,2	3,5
Ad8M78_ B	78	17,4	11,8	24,4	3,7	5,2	4,5
Ad9F73_ A	73	17,0	7,4	26,7	5,1	5,4	3,5
Ad10F73_ A	73	19,5	21,5	29,5	4,8	4,4	3,4
Ad10F73_ B	73	21,6	20,6	30,0	5,2	5,9	3,8
Ad11M77_ A	77	25,5	27,4	41,0	6,2	7,2	6,9
Ad12M89_ A	89	14,1	17,3	20,8	4,2	3,9	2,8
Ad12M89_ B	89	20,6	16,4	26,5	4,4	4,2	3,0
Ad13F50_ A	50	20,8	25,7	34,2	5,6	5,5	3,6
Ad13F50_ B	50	20,1	18,3	24,9	4,6	4,5	3,2
Ad14M76_ A	76	14,3	19,5	27,6	4,8	4,3	3,3
Ad14M76_ B	76	20,1	25,2	38,8	6,0	5,3	5,1
Ad15F56_ A	56	18,5	23,1	36,9	5,7	4,7	5,6
Ad15F56_ B	56	20,8	22,5	27,7	5,4	4,3	3,6
Ad16F91_ A	91	15,0	14,1	22,9	3,7	3,3	2,9
Ad17F57_ A	57	17,1	16,5	26,2	4,3	4,0	3,4

TABLE B.2 – Valeurs des coefficients de rigidité chez l'adulte.

N° Echantillons	Age (année)	Déformation max (%)	Contrainte max (MPa)	E (GPa)
ENFANTS				
2M14_fib_A	14	2,2	194,3	13,9
5F10_fib1_A	10	1,9	199,1	11,6
5F10_fib2_A	10	2,8	207,4	10,15
15M16_fib_B	16	13,2	609,4	18,3
20M14_fib_A	14	2	168,5	16,6
21M10_fib_B	10	2,2	230,1	14,3
27F15_fib_A	15	1,2	162,7	20,2
27F15_fib_B	15	1,9	153,6	4,8
28M17_fib_A	17	2,7	179,1	18,4
31F12_fib_A	12	1,7	174,4	18,8
31F12_fib_B	12	3,7	140,4	4,6
33M10_fib_A	10	6,7	131,6	3,6
35M18_fib_B	18	2	189,8	11,1
37M6_fib_A	6	3,3	184,1	10
38F13_fib_A	13	5,2	187,1	17,1
ADULTES				
Ad1M67_A	67	0,2	130,4	25,2
Ad7M83_B	83	1,2	184,6	12,3
Ad8M78_A	78	0,7	133,8	16,3
Ad8M78_B	78	1,5	115,1	11,3
Ad9F73_A	73	0,6	97,3	10,5
Ad10F73_A	73	2,1	181,5	9,9
Ad12M89_A	89	2,1	172,3	11,6
Ad13F50_A	50	1	155	16,5
Ad14M76_A	76	1,7	178,5	14,2
Ad14M76_B	76	1,2	117,2	9,9
Ad15F56_B	56	0,4	207,9	12,7
Ad16F91_A	91	1	89,3	7,6
Ad17F57_A	57	1,3	163,8	16,7

TABLE B.3 – Paramètres mécanique obtenus par compression.

N° Echantillons	Age (Années)	E^* (GPa)	H (MPa)	W_{plast} (pJ)	W_{tot} (pJ)
OSTEON					
1M6_fib1	6	22,45	934,23	5404,94	7001,09
3F8_fib1	8	22,09	778,12	4811,11	6074,44
3F8_fib2	8	21,57	743,07	4819,04	6097,09
5F10_fib1	10	22,48	990,69	5275,30	6866,06
6M7_fib	7	23,73	1025,63	5277,76	6878,19
7M4_fib	4	22,07	1013,86	5116,94	6736,24
8M12_fib	12	26,86	1184,62	6168,45	8071,39
10M7_fib	7	24,18	1040,75	5608,83	7280,63
11F9_fib	9	23,16	970,83	4941,45	6477,93
12M10_fib	10	25,34	1083,71	6028,02	7848,88
14F13_fib	13	24,53	1014,04	5427,22	7004,87
15M16_fib	16	26,45	1041,90	5498,18	7059,38
18M12_fib	12	22,41	1029,59	5041,19	6705,24
35M18_fib	18	28,03	1185,39	6240,97	8135,64
37M6_fib	6	25,60	1025,26	5604,90	7189,27
INTERSTITIEL					
1M6_fib1	6	22,87	937,42	5459,50	7047,83
3F8_fib1	8	22,65	793,44	4919,00	6196,71
3F8_fib2	8	22,13	759,01	4927,38	6219,31
5F10_fib1	10	23,74	1073,63	5545,18	7271,69
6M7_fib	7	25,17	1102,57	5405,06	7094,19
7M4_fib	4	24,12	1090,33	5497,36	7218,53
8M12_fib	12	27,62	1222,16	6389,30	8372,22
10M7_fib	7	25,53	1085,78	5849,79	7577,48
11F9_fib	9	25,87	1086,93	5504,88	7196,54
12M10_fib	10	23,54	1004,88	5776,67	7517,01
14F13_fib	13	26,43	1136,69	5831,19	7620,35
15M16_fib	16	28,53	1133,86	5792,24	7477,16
18M12_fib	12	25,71	1177,56	5648,78	7509,53
35M18_fib	18	28,91	1244,02	6256,97	8217,23
37M6_fib	6	27,39	1102,59	5859,98	7546,25

TABLE B.4 – Valeurs des paramètres de nanoindentation chez l'enfant.

N° Echantillons	Age (Années)	E^* (GPa)	H (MPa)	W_{plast} (pJ)	W_{tot} (pJ)
OSTEON					
Ad1M67	67	25,29	1034,99	5377,57	6924,74
Ad2M80	80	24,25	943,52	5471,58	7027,03
Ad3F95	95	26,80	1114,53	5644,15	7353,92
Ad4F95	95	25,96	995,33	5257,35	6727,31
Ad5F68	68	24,81	1043,14	5374,11	7006,55
Ad6F87	87	23,44	1022,93	5308,95	6964,11
Ad7M83	83	26,11	1176,05	6339,48	8312,40
Ad8M78	78	26,41	1086,03	5878,14	7590,89
Ad10F73	73	30,10	1242,08	6597,26	8558,07
Ad11M77	77	25,35	1018,56	5423,86	6971,90
Ad12M89	89	27,41	1113,44	5876,00	7565,83
Ad13F50	50	27,54	1133,21	5913,39	7679,30
Ad14M76	76	24,99	1036,28	5261,20	6873,15
Ad15F56	56	26,88	941,78	5584,78	7010,88
Ad16F91	91	28,90	1182,68	6426,65	8274,54
Ad17F57	57	23,46	1003,74	5244,30	6844,39
INTERSTITIEL					
Ad1M67	67	27,83	1167,57	5884,52	7632,98
Ad2M80	80	28,80	1147,59	6262,18	8091,82
Ad3F95	95	29,38	1237,42	6219,29	8098,54
Ad4F95	95	30,10	1181,16	6100,28	7840,44
Ad5F68	68	28,93	1245,66	6072,81	7995,84
Ad6F87	87	27,91	1247,53	6103,15	8059,12
Ad7M83	83	30,14	1412,76	7310,61	9667,08
Ad8M78	78	29,96	1250,03	6353,32	8267,12
Ad10F73	73	31,66	1309,70	6740,43	8781,99
Ad11M77	77	28,88	1207,34	6255,44	8106,57
Ad12M89	89	30,36	1295,85	6586,35	8589,06
Ad13F50	50	30,18	1269,91	6594,47	8578,29
Ad14M76	76	29,23	1223,98	5962,67	7801,71
Ad15F56	56	28,45	994,43	5954,96	7536,56
Ad16F91	91	31,77	1307,33	6796,95	8778,48
Ad17F57	57	29,94	1266,97	6360,76	8302,60

TABLE B.5 – Valeurs des paramètres de nanoindentation chez l'adulte.