

Caractérisation mécanique par nano indentation AFM de l'os animal en croissance

Stage de fin d'étude

Michaël CHAGNAUD
Elève-ingénieur Matériaux 2012

*En collaboration avec l'Institut des Sciences du Mouvement et le Cinam
Campus de luminy
13288 MARSEILLE Cedex 09
Du 6 février au 6 août 2012*

Tutrices ISM :
Mme Martine PITHIOUX
Mlle Cécile BARON
Tutrice Cinam :
Mme Anne CHARIER
Mme Nadine Candoni
Tutrice école :
Mme Lisa MICHEZ

Avant-propos

Ce rapport présente le travail effectué au cours d'un stage de fin d'études. Le cursus de formation d'ingénieur ESIL / Matériaux, demande aux élèves-ingénieurs de 3^{ème} année, d'effectuer un stage de six mois. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'Institut des Sciences du Mouvement et le Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille du 6 février au 6 août 2012.

Le stage, objet du présent rapport se situe dans une démarche de l'Institut des Sciences du Mouvement de caractérisation mécanique de l'os en croissance. Pour ce projet la caractérisation est appliquée au cas particulier du callotasis, qui est une technique chirurgicale d'allongement des membres destinée à traiter les inégalités de membres, les petites tailles ou encore les fractures compliqués avec perte de substance osseuse de l'enfant très jeune au jeune adulte. Son principe est de réaliser une distraction progressive d'un cal osseux, consécutif à une ostéotomie, à l'aide d'un fixateur externe.

Pour ce qui est de la technique de caractérisation utilisée dans ce stage, L'ISM a souhaité développé un protocole utilisant la nano indentation AFM (Microscope à Force Atomique), qui permet d'obtenir des données mécaniques du matériau à une échelle nanométrique. Le Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille possédant au sein de sa plateforme technique un AFM, les deux laboratoires ont décidé d'une collaboration afin de mettre ce projet en œuvre.

Résumé

Le callotasis est une technique chirurgicale d'allongement des membres chez l'enfant ou le jeune adulte, destinée à traiter les inégalités de membres, les petites tailles ou encore les fractures compliquées avec perte de substance osseuse. Son principe est de réaliser une distraction progressive d'un cal osseux, consécutif à une ostéotomie, à l'aide d'un fixateur externe. Quand l'allongement souhaité est atteint, le fixateur externe est maintenu en place durant le laps de temps nécessaire à la consolidation osseuse. Bien qu'ayant fait la preuve de son efficacité, le callotasis est à l'heure actuelle un traitement long et onéreux du fait de l'occurrence très fréquente de complications, en particulier des fractures itératives et des déformations après le retrait du fixateur externe dues à un défaut de consolidation osseuse. Dans la perspective d'améliorer la qualité de vie des jeunes patients, l'objectif du projet est d'optimiser la technique du callotasis afin de minimiser la durée de port du fixateur externe et le risque de fracture.

L'objectif de ce stage était, après une étude bibliographique, de se familiariser avec les techniques de caractérisation par microscopie à force atomique (AFM) et d'établir un protocole expérimental spécialement dédié au tissu osseux sain et néoformé (tissu du cal osseux). En effet l'AFM permet de faire de l'imagerie, mais permet également par la technique de nanoindentation d'obtenir des informations sur la rigidité du tissu et notamment le Module d'Young. Le stage s'inscrit dans un projet qui consiste à développer et exploiter un modèle expérimental d'allongement osseux du fémur de l'os animal en croissance.

En s'aidant de la littérature et des études déjà réalisées sur la nanoindentation de l'os, nous avons sélectionné deux techniques de préparation des échantillons osseux fréquemment utilisées, à savoir la congélation de l'échantillon et la fixation sous résine. Nous avons donc testé ces deux méthodes pour voir laquelle est la plus reproductible et donne les meilleurs résultats (image et mesure de force). Nous nous sommes rapidement rendu compte que l'os congelé est très délicat à imager et cause la casse de nombreuses pointes de l'AFM, nous avons donc opté pour la fixation sous résine. Sur ces échantillons nous avons donc grâce à l'AFM réalisé des images et des mesures de force. Nous avons ensuite élaboré une technique pour traiter les valeurs des mesures de force et ainsi obtenir des valeurs de module d'Young pour les échantillons.

Enfin nous avons analysé les images et les valeurs de modules d'Young obtenues. Pour les images, nous nous sommes demandé si elles correspondaient bien à l'os et non à la résine. Après comparaison avec les clichés trouvés dans la littérature et en observant des différences avec des images de résine seule, il semble que nous imageons bel et bien l'os. Pour ce qui est des modules d'Young, le traitement des données étant très long, nous avons obtenu peu de valeurs, ce qui a rendu toute comparaison ou analyse délicate. Néanmoins les valeurs sont cohérentes avec la littérature ce qui nous conforte dans nos choix de protocole et de traitement des données.

Confidentialité

Les informations contenues dans ce rapport ne présentent pas de caractère confidentiel

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce stage.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes maîtres de stage Mme Martine PITHIOUX, Mlle Cécile BARON de l'ISM et Mme Anne CHARIER du Cinam pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes et pour m'avoir encadré et orienté durant tout mon stage.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel de l'ISM et du Cinam pour leur accueil et le soutien qu'ils m'ont accordé tout au long de ces six mois.

Enfin, je remercie également ma tutrice ESIL, Mme Lisa MICHEZ qui a encadré ce projet.

Table des matières

I. Présentation des laboratoires.....	8
1. L’Institut des Sciences et du Mouvement et l’équipe GIBoc.....	8
2. CiNaM - Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille	9
II. Etat des connaissances actuelles	11
1. L’ostéogénèse en distraction.....	11
2. Biologie du tissu osseux – complexité et niveaux structurels	13
3. La nanoindentation AFM de l’os animal dans la littérature	13
a. Congélation de l’os ou fixation dans de la résine.....	14
b. Images AFM de l’os.....	14
III. Matériels et méthodes	16
1. Microscope à force atomique	16
a. Principe et fonctionnement	16
b. Les différents modes d’utilisation de la microscopie à force atomique	17
c. Description du matériel.....	18
d. Réglages et calibration de l’AFM	19
f. La spectroscopie de force	21
g. Description de la technique et traitement des données.....	22
h. Module d’Young et modèles de contact.....	24
2. Préparation des échantillons.....	26
a. Echantillons conservés au congélateur	27
b. Echantillons mis sous résine	27
IV. Résultats	29
1. Choix du protocole expérimental	29
2. Mesures de force et détermination du module de Young	29
V. Discussion	34
1. Image-t-on vraiment l’os ?	34
2. Analyse des valeurs de module d’Young	36

Table des illustrations

Figure 1. Le campus de Luminy à Marseille.....	10
Figure 2. Dessin d'une distraction osseuse	11
Figure 3. a) Représentation schématique des étapes d'une distraction osseuse et b) radios montrant l'évolution du cal osseux au cours de ces étapes	12
Figure 4. Organisation structurale de l'os	13
Figure 5. Images AFM de la matrice osseuse de fémur de rat saine 20×20µm (a) et avec ostéoporose de 10×10µm(b).....	14
Figure 6. image AFM de la surface de fracture d'un os trabéculaire de bœuf	15
Figure 7. Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique	16
Figure 8. Les 3 modes de L'AFM selon la distance entre la pointe et l'échantillon.....	17
Figure 9. a) Représentation de la pointe en mode contact et b) en mode Tapping	17
Figure 10. Photo de l'AFM NTEGRA.....	18
Figure 11. a) Image SEM des trois microleviers et b) Image SEM de la pointe utilisée	18
Figure 12. Photo du réglage du laser sur l'AFM	19
Figure 13. Exemple d'image AFM de 20×20µm.....	20
Figure 14. Principe d'une courbe de force	21
Figure 15. Image AFM de 1×1µm avec les lieux d'indentations	22
Figure 16. Courbe de la force appliquée à la pointe en fonction de la profondeur d'indentation	23
Figure 17. Cas de contact pour une indentation inférieure ou égale à R	24
Figure 18. Cas de contact pour une indentation supérieure à R.....	25
Figure 19. Photographie de distracteurs externe sur un rat (a) et sur un lapin (b)	26
Figure 20. Echantillon osseux congelé collé sur une lame de microscope	27
Figure 21. Morceau de fémur incorporé dans un bloc de résine PMMA	27
Figure 23. Photos de l'échantillon osseux fixé dans la résine sous deux angles différents : face 1 (a) et face 2 (b)	28
Figure 22. Scie BUEHLER ISOMET 4000	28
Figure 24. Débris d'os congelés	29
Figure 25. Images AFM échantillon os sain rat a) 20×20µm b) Zoom 5×5µm et c) Zoom 1×1µm.....	30
Figure 26. Image AFM de 1×1µm avec les lieux d'indentations	30
Figure 27. Courbe de force (N) en fonction de la profondeur d'indentation (m) avec les curseurs et les grandeurs mesurées	31
Figure 28. Exemples d'allures de courbes (force en N en fonction de la profondeur d'indentation en m) différentes avec le positionnement des quatre curseurs.....	32
Figure 29. Tableau de valeurs sous Igor	33
Figure 30. Valeurs de module d'Young obtenues pour les différents échantillons	33
Figure 31. . Images AFM échantillon os sain rat a) 10×10µm b) 2, 5×2,5µm et c) 1×1µm	34
Figure 32. Images AFM a) résine 10×10µm b) résine 2,5×2,5µm et c) interface résine os sain de rat 1×1µm.....	35
Figure 33. Histogramme de répartition des valeurs de Module d'Young (Pa) d'une image avec un lissage de type Gaussienne	36
Figure 34. Histogramme de répartition des valeurs d'épaisseurs d'indentation (m) d'une image avec un lissage de type Gaussienne	37
Figure 35. Variation du module d'Young en fonction du coefficient de Poisson	37

Introduction

Les procédures d'allongement moderne par callotasis sont basées sur une distraction osseuse progressive par fixateur externe. Une fois la longueur souhaitée acquise, une phase de consolidation est nécessaire pour que l'os cicatrise. Ilizarov avait remarqué que : « laisser le dispositif en place plus que nécessaire était aussi délétère que de l'enlever trop tôt ».

Cependant, les critères décisionnels pour l'ablation du dispositif sont souvent subjectifs et le plus souvent basés sur l'analyse radiographique. L'expérience du chirurgien joue un rôle important dans cette décision. De nombreuses tentatives ont été faites pour tenter de quantifier la consolidation car la radiographie montre la quantité mais pas la qualité du cal osseux d'allongement.

C'est dans cette démarche de caractérisation de la qualité du cal osseux en croissance que se situe notre projet de nanoindentation AFM.

Précisons que la nanoindentation est une technique d'indentation instrumentée permettant la détermination des propriétés mécaniques locales des matériaux. Elle consiste à mesurer la profondeur d'enfoncement d'un indenteur de géométrie connue dans un matériau soumis à une force contrôlée dans le but d'obtenir ses propriétés élastoplastiques.

Dans ce rapport nous reviendrons tout d'abord sur le contexte du projet avec la présentation des deux laboratoires, puis nous exposerons le travail de bibliographie sur la callotasis et la nanoindentation de l'os. Ensuite nous présenterons l'AFM et son fonctionnement. Nous expliquerons alors comment obtenir une image, comment faire une mesure de force et comment traiter les données pour obtenir le module d'Young. Après, nous présenterons les deux méthodes de préparation des échantillons que nous avons testées. Enfin nous présenterons les résultats (images et modules d'Young) obtenus et nous les analyseront.

I. Présentation des laboratoires

Avant toute chose, je vais présenter les deux laboratoires qui m'ont proposé ce stage et au sein desquels j'ai travaillé durant ces six mois, à savoir l'Institut des Sciences du Mouvement, et plus particulièrement l'équipe GIBoc avec laquelle j'ai collaboré, ainsi que le Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (Cinam).

1. L'Institut des Sciences et du Mouvement et l'équipe GIBoc

Le **Groupe Interdisciplinaire en Biomécanique Ostéoarticulaire et Cardiovasculaire** (GIBoc, Annexe) dont le responsable est Patrick CHABRAND est rattaché à l'**Institut des Sciences du Mouvement – Etienne Jules Marey** (ISM).

L'ISM est une Unité Mixte de Recherche (UMR), qui associe l'Université de la Méditerranée aux instituts scientifiques : Institut des Sciences Biologiques (INSB), l'Institut de Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes (INSIS) ainsi que le CNRS. L'effectif du laboratoire est d'environ 100 personnes (chercheurs, enseignants-chercheurs, ITA/IATOS et doctorants).

Les thèmes de recherche de l'Institut portent sur les déterminants mécaniques, physiologiques, neurologiques, psychologiques et sociologiques de la motricité des êtres vivants et de l'Homme en particulier.

L'institut est composé de **sept équipes scientifiques** :

- Plasticité du système nerveux et musculaire,
- Comportements perceptivo-moteurs,
- Fondements théoriques pour la dynamique des coordinations
- Immersions,
- Performance motrice et modélisation
- Biorobotique,
- Modélisation du système ostéoarticulaire et cardiovasculaire

□ **Equipe GIBoc**

L'équipe GIBoc contient 19 statutaires (12 étant HDR) dont 8 Praticiens hospitaliers et 11 Scientifiques, ainsi que 5 doctorants. L'équipe est composée de biomécaniciens, mécaniciens des matériaux, biologistes, et cliniciens autour d'un thème unique de recherche, la **Biomécanique : de la cellule au tissu et à l'organe – Systèmes sains, pathologiques et réparés.**

Le groupe possède :

- Une approche intégrée multidisciplinaire, multiphasique, et multi-échelle : caractérisation expérimentale, approches théoriques et numériques
- Des compétences variées : biomécanique, biomatériaux, biologie cellulaire, histologie, structures, biofluidique
- Des couplages fluides /structures, biologie, imagerie clinique...

Des applications dans le domaine de la santé : orthopédie, rhumatologie, odontologie, cardiovasculaire

Les **différents thèmes de recherche** de l'équipe sont:

- L'os en croissance, organes de croissances de l'os (cartilage et périoste), régénération tissulaire en présence ou non d'un biomatériau.
- L'évaluation de la qualité osseuse, du micro au macro remodelage osseux – couplage mécanique / biologie / physico-chimie.
- Les dispositifs médicaux implantables – durée de vie, conception/fabrication, métrologie, incertitude.

Les **types d'applications** sont :

- Les prothèses,
- La reconstruction osseuse,
- L'ingénierie tissulaire
- L'ostéoporose et le risque de fracture.

Les **moyens expérimentaux** dont dispose l'équipe sont :

- Numérique,
- Plateforme d'expérimentation mécanique,
- Imagerie,
- Biologie,
- Biochimie,
- Cardiovasculaire.

2. CiNaM - Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille

Le CINAM (UMR 7325) est né en janvier 2008 de la fusion d'un laboratoire de physique et d'un laboratoire de chimie situés sur le campus de Luminy :

- le CRM CN, Centre de Recherche en Matière Condensée et Nanoscience (UPR 7251) dirigé par Viatcheslav Safarov (2004-2006) puis par Claude Henry (2007)
- le GCOMM, Groupe de Chimie Organique et Matériaux Moléculaires (UMR 6114 : CNRS/Université d'Aix-Marseille 2) dirigé par André Samat

Le CRM CN a été créé en janvier 2004 suite à la fusion de deux laboratoires de physique de la matière condensée :

- le CRM C2, Centre de Recherche sur les Mécanismes de la Croissance Cristalline (UPR 7251) qui a été fondé et dirigé par Raymond Kern (1975-1987). D'abord situé sur le campus de Saint Jérôme dans des locaux universitaires il a déménagé sur le campus de Luminy suite à la construction de nouveaux locaux par le CNRS. Les directeurs suivants ont été Michel Bienfait (1988-1995) et Jacques Derrien (1996-2003)
- le GPEC, Groupe de Physique des Etats Condensés (UMR 6631 : CNRS/Université d'Aix-Marseille 2) qui a été créé par Jean Hanus (1971-1987) auquel ont succédé Jean Marie Debever (1988-1995), Frank Salvan (1996-1999) et Viatcheslav Safarov (2000-2003)

Cette première fusion a permis de combiner les savoir-faire dans l'élaboration des matériaux (métaux semi-conducteurs et oxydes isolants), leur caractérisation structurale, l'étude de leurs propriétés électroniques et chimiques. Une orientation marquée vers les nanosciences et l'interdisciplinarité a été affichée. Celle-ci a bénéficié de la reconnaissance des deux laboratoires, d'une part dans le domaine des systèmes de dimensions réduites (surfaces, agrégats, couches adsorbées....) tant du point de vue expérimental que théorique et, d'autre part du savoir-faire dans différentes techniques de caractérisation à l'échelle atomique (microscopies électroniques, microscopies à champ proche....). L'interdisciplinarité s'est traduite par le développement de nouvelles thématiques à l'interface physique-biologie.

Le GCOMM a été créé en 2000 par André Samat sur la base d'une équipe existante orientée vers les photochromes organiques qui s'est renforcée par des recrutements et des accueils à la mutation qui lui ont permis d'étendre ses thématiques vers les matériaux organiques pour l'électronique et les biomatériaux. L'expertise du GCOMM en synthèse organique lui a permis de concevoir des molécules ayant des propriétés optiques ou électroniques particulières. Ces molécules, une fois assemblées, forment des matériaux massifs ou à dimensions réduites (nanomatériaux) ayant des propriétés spécifiques.

Le CiNaM résultant de la fusion du CRMCN et du GCOMM affiche clairement son caractère interdisciplinaire (physique, chimie) et son orientation principale vers les nanosciences et plus spécifiquement les nanomatériaux et leurs propriétés.

Le Cinam et L'Institut des Sciences du mouvement sont tout les deux situés sur le campus de Luminy à Marseille (figure 1).



Figure 1. Le campus de Luminy à Marseille

II. Etat des connaissances actuelles

Afin de mieux comprendre la problématique abordée dans ce rapport, nous allons tout d'abord revenir plus en détails sur la technique de distraction osseuse (ou ostéogénèse en distraction) de l'os en croissance, ainsi que sur les différentes étapes qu'elle comprend. Nous reviendrons également sur la biologie du tissu osseux.

1. L'ostéogénèse en distraction

Lorsque le tissu osseux est distraité progressivement (figure 2), le processus de réparation initié au cours de l'ostéotomie ou d'une fracture peut-être transformé en un os nouveau dénommé « régénérat ». Ce processus d'ostéogénèse en distraction est utilisé avec succès en pratique clinique pour le traitement de nombreuses anomalies musculo-squelettiques de l'enfant très jeune au jeune adulte. Il est possible d'obtenir un allongement de 20 cm d'os néoformé par membre au cours d'une seule procédure, soit un allongement osseux individuel de plus de 100% de sa longueur initiale.

L'indice de consolidation est défini comme le nombre de jours nécessaires pour obtenir un cm d'os néoformé formant un pont suffisamment mature pour permettre l'ablation du dispositif de fixation. Cet indice varie de 20 à 80 jours, en fonction de l'âge, de la localisation, de l'étiologie et des techniques chirurgicales employées.

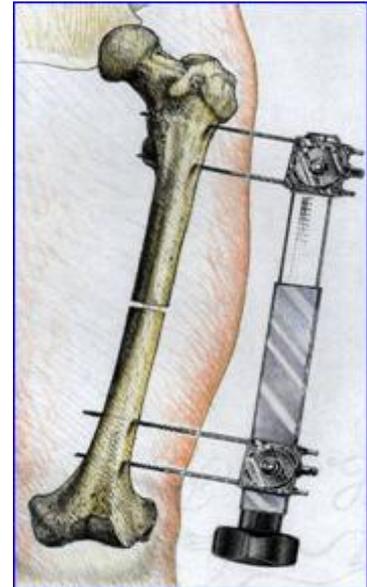


Figure 2. Dessin d'une distraction osseuse

De la même manière que pour la consolidation d'une fracture, l'ostéogénèse en distraction survient au terme de phases distinctes qui peuvent conduire soit à une consolidation avec un os de structure normale, soit à un échec biologique conduisant à une non consolidation (ou pseudarthrose). L'incidence des pseudarthroses après fracture est de 1 à 2%, tandis que les retards de consolidation représentent 5 à 10%. Les échecs de formation osseuse dans l'ostéogénèse en distraction surviennent dans 8 à 40% des cas (diagnostic-dépendants).

La mise en place de moyens d'imagerie non invasifs est essentielle pour prendre les meilleures décisions en pratique clinique ; il peut s'agir de choisir de différer, accélérer ou ralentir la distraction ; de choisir de greffer, de dynamiser ou d'enlever l'appareillage...

Les différentes phases de l'ostéogénèse en distraction (figure 3) :

➤ **Période de latence**

L'espace au niveau du site de section cortical est infiltré par l'hématome et des cellules inflammatoires. L'absence de minéralisation se traduit par un espace radio transparent à ce niveau.

➤ **Phase de distraction précoce (1 à 2 semaines)**

Au cours de la distraction, un pont fibrovasculaire s'organise parallèlement à la direction de la distraction. Des ostéoblastes apparaissent « en grappe » autour des vaisseaux de part et d'autre de la zone centrale dite interzone fibreuse. Les ostéoblastes sont incorporés au sein

de fibrilles de collagène qui sous-tendent de micro colonnes ostéoïdes. A la fin de la seconde semaine, l'ostéoïde commence à se minéraliser en front de minéralisation primaire en miroir en regard de chacune des surfaces de coupe. La formation de micro colonnes de coupe en direction de la zone centrale se fait à la manière de stalactites et de stalagmites, mais n'est pas visible sur les radiographies conventionnelles.

➤ **Phase tardive de distraction (3 à 8 semaines)**

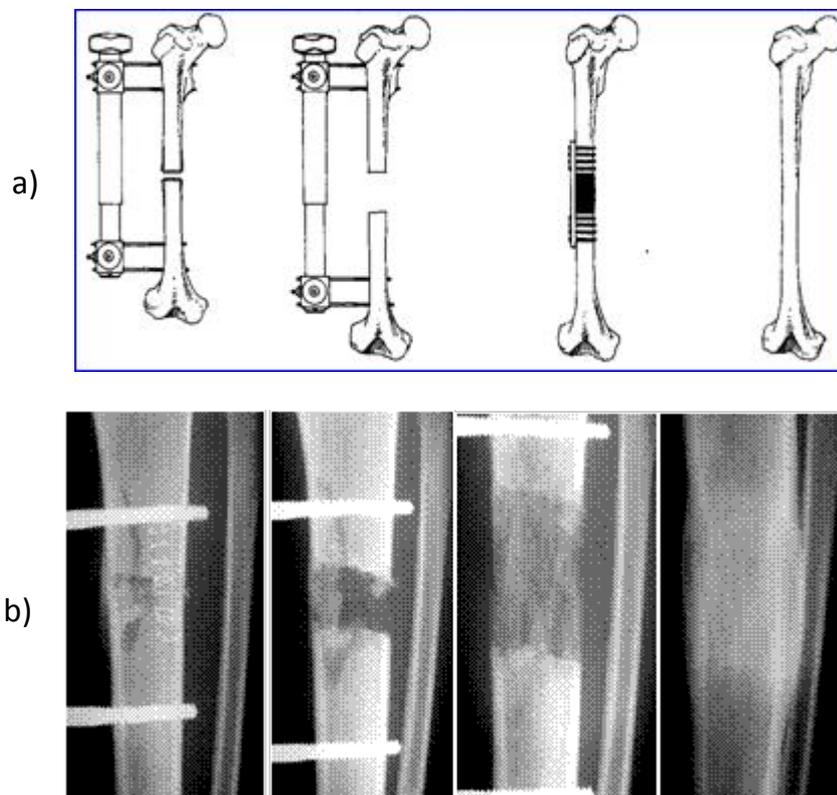
Les micros colonnes distales se rejoignent au centre par des ponts de collagène de 4 à 8 mm. Chaque micro colonne est entourée par des sinusoides grandissant de manière centripète et mesurant $7\mu\text{m}$ en pointe et $150\mu\text{m}$ à leur base sur les surfaces de coupe. Ces colonnes vont apparaitre sous forme de travées denses en radiographie.

➤ **Consolidation (après la fin de la distraction)**

L'ossification de l'interzone fibreuse centrale, crée une zone de formation de micro colonne et ponts complètement l'espace en 4 semaines, ce phénomène permet une augmentation significative de la résistance mécanique. Des îlots de cartilage sont formés dans les zones avasculaires et sont éventuellement minéralisés sous forme de nodules denses donnant un aspect moucheté en radiographie.

➤ **Phase de dynamisation (après ablation du distracteur)**

Pendant les 6 semaines qui suivent l'ablation du distracteur, la région du régénéra se remodèle avec un cortex et un canal médullaire. Les colonnes osseuses prennent les caractéristiques d'un os lamellaire mature. Les caractéristiques structurales et mécaniques vont se modifier fondamentalement.



2. Biologie du tissu osseux – complexité et niveaux structurels

Deux types de structures osseuses sont à la base de tous les os : l'os compact (ou os cortical), qui représente, en volume, environ 85 % du squelette, et l'os spongieux (ou os trabéculaire) qui représente les 15 % restant. La résistance mécanique de l'os est assurée principalement par l'os cortical.

D'un point de vue ultrastructural, l'os peut être considéré comme un arrangement de fibrilles de collagène sur lesquelles et entre lesquelles sont déposés des cristaux d'apatite. Ces fibrilles sont regroupées parallèlement entre elles sous la forme de faisceaux formant ainsi des fibres, dont l'accolement constitue des lamelles de collagène. L'empilement compact de ces lamelles forme des unités de construction, appelées ostéons. Ces ostéons sont séparés entre eux par d'autres zones lamellaires désorganisées.

Sur le plan mécanique, l'os est donc un milieu fortement hétérogène à plusieurs niveaux structurels et échelles d'espace distincts (figure 4).

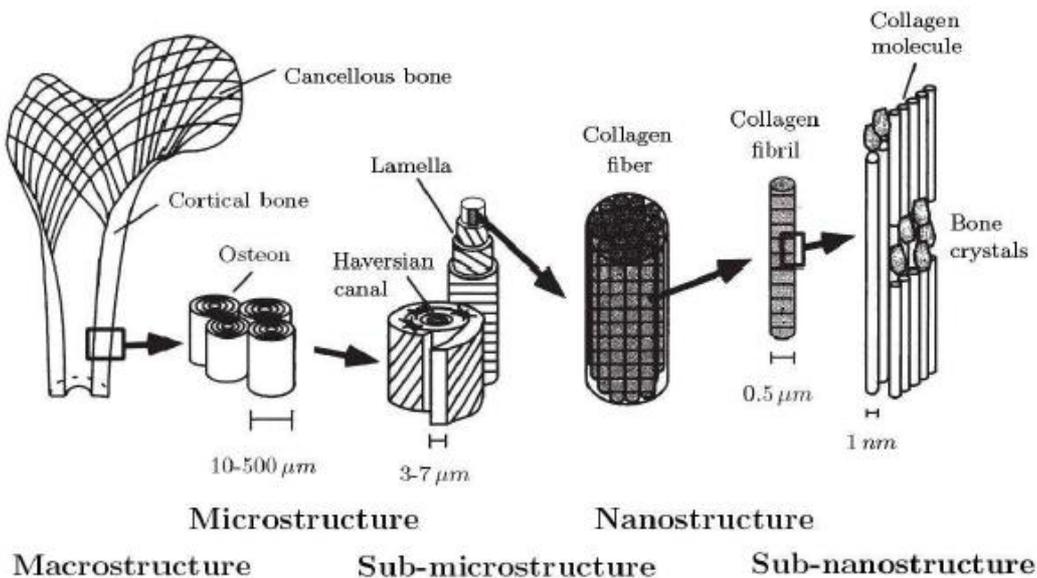


Figure 4. Organisation structurale de l'os

3. La nanoindentation AFM de l'os animal dans la littérature

La première partie de mon travail a consisté à rassembler des informations dans la littérature sur des études incluant de la nanoindentation de l'os. L'objectif principal de cette recherche étant de se renseigner sur les techniques de préparation des échantillons utilisées. En effet, comme la nanoindentation est une technique qui permet d'obtenir des caractéristiques mécaniques à une échelle nanométrique, il est évident que la préparation des échantillons doit être adaptée.

a. Congélation de l'os ou fixation dans de la résine

Dans la littérature, on trouve assez peu de publications où la caractérisation de l'os est réalisée par nanoindentation. Nous avons tout de même trouvé sept études qui utilisent cette technique.

Dans ces publications, on trouve deux techniques distinctes de préparation des échantillons. En effet, dans leurs travaux, Zisset (1999) [1], Wang (2006) [2], Fan (2006), Paietta (2010) [3] et Milovanovic (2011) [4] font des tests de nanoindentation sur des échantillons d'os fixés dans de la résine (PMMA ou époxyde). Leong (2008) [5], a quant à lui congelé les échantillons osseux prélevés et les a testés tels quels collés sur des lames de microscopes. Enfin, Pathak (2011) [6] utilise les deux techniques de préparation dans son étude.

Ainsi, après observation dans la littérature, on se rend compte que c'est la fixation sous résine qui est le plus communément utilisée. Il est unanimement admis que c'est la congélation de l'échantillon osseux qui permet de mieux conserver les propriétés mécaniques de l'os, cependant c'est l'aspect expérimental plus pratique de la fixation sous résine qui est privilégié par les auteurs.

Il est à noter que parmi ces publications portant sur la nanoindentation, seule celle de Milovanovic (2011) utilise un AFM, les autres utilisant principalement des nanoindenteurs ou des triboindenteurs.

b. Images AFM de l'os

Il existe peu d'images AFM de l'os dans la littérature. Nous avons cependant trouvé deux études où l'auteur utilise cette technique pour imager des échantillons osseux.

Ainsi, dans une étude sur l'ostéoporose menée par A. Gaidash (2011) [7], on trouve deux images AFM de la matrice osseuse de fémur de rat sans et avec ostéoporose (figure 5). La barre sur la droite donne l'échelle de hauteur (direction z), les zones claires étant plus hautes que les zones sombres.

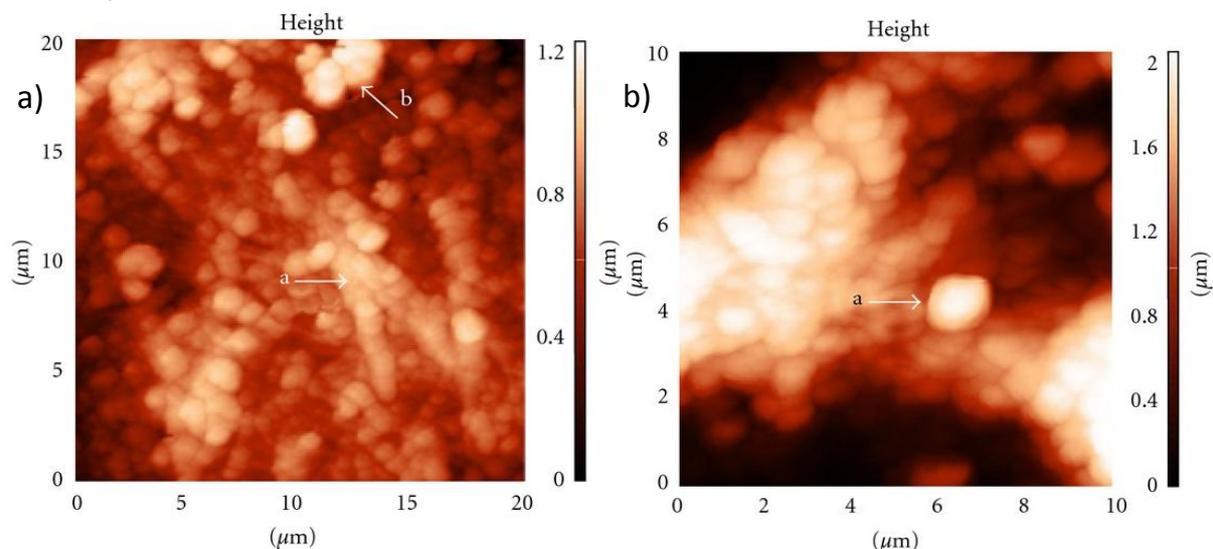


Figure 5. Images AFM de la matrice osseuse de fémur de rat saine $20 \times 20 \mu\text{m}$ (a) et avec ostéoporose de $10 \times 10 \mu\text{m}$ (b)

D'après l'auteur, l'arrangement ordonné en structure granulaire correspond aux fibrilles de collagène.

Nous avons également trouvé dans une publication de P.Thurner (2009) [8], une image AFM de la surface de fracture d'un os trabéculaire de bœuf (figure 6).

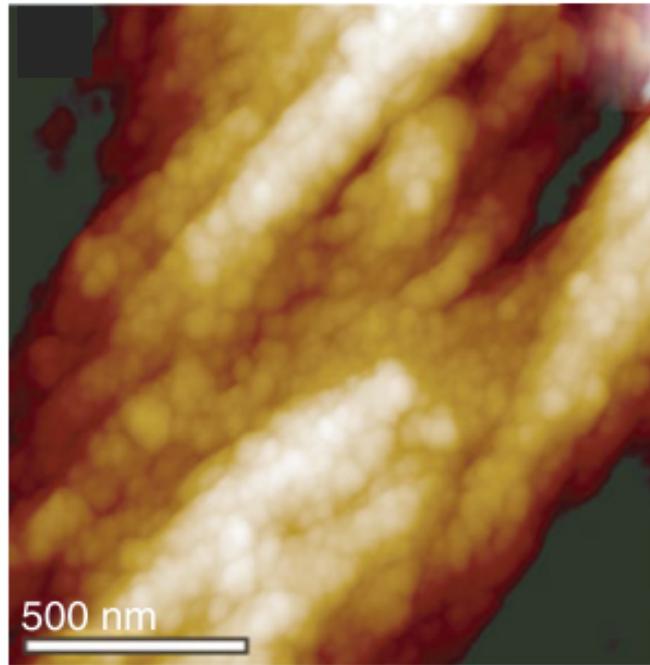


Figure 6. image AFM de la surface de fracture d'un os trabéculaire de bœuf

Sur les trois images AFM on retrouve clairement une structure granulaire, cela va nous permettre d'établir une comparaison avec les images que nous obtiendrons dans notre étude.

III. Matériels et méthodes

1. Microscope à force atomique

a. Principe et fonctionnement

La microscopie à force atomique (AFM) fait partie de la famille des microscopes à champ proche (ou à sonde locale). La microscopie à force atomique repose sur l'interaction (forces de répulsion ionique, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces magnétiques,.....) entre une sonde de taille nanométrique et une surface (figure 7). Cette interaction dépend d'une part de la distance entre la sonde et la surface, et d'autre part de la nature physicochimique des deux protagonistes. La distance sonde-surface est ajustée par une céramique piézoélectrique dont la déformation est contrôlée avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre. Généralement, la sonde utilisée est une pointe pyramidale très fine ou une sphère, fixée à l'extrémité d'une lame-ressort ou microlevier de constante de raideur kC .

Lorsque la pointe est approchée d'une surface, des forces d'interactions provoquent la déflexion du microlevier. Cette déviation est enregistrée sur un système de détection optique grâce au déplacement d'un faisceau laser. Ce faisceau est focalisé à l'extrémité du levier sur sa face supérieure recouverte d'or, puis est réfléchi vers un système de détection optique constitué de photodiodes. Depuis son invention pour l'imagerie des surfaces à l'échelle nanométrique, l'AFM s'est imposé comme un instrument de mesure de forces [9].

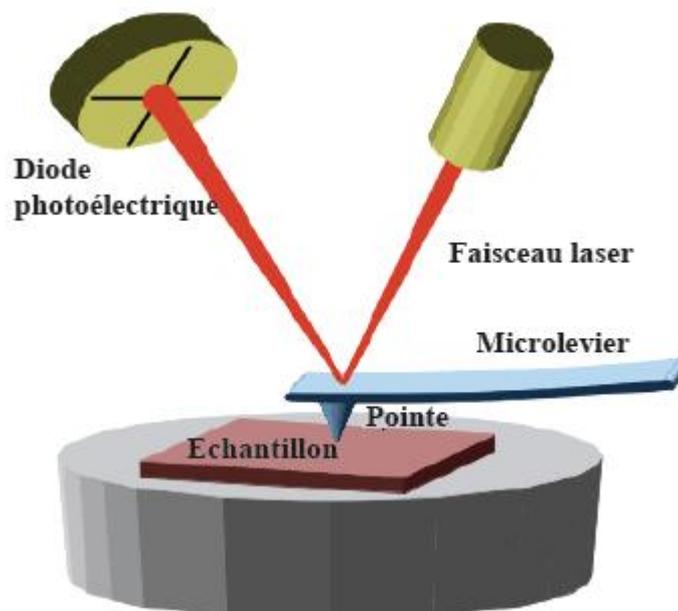


Figure 7. Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique

b. Les différents modes d'utilisation de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique se décline sous trois modes principaux que sont:

- le mode contact
- le mode contact intermittent ou mode Tapping:
- le mode non contact

Les différents types de forces mesurées dépendent de la variation de la distance entre la pointe et la surface analysée (figure 8). C'est la raison pour laquelle, en fonction de ces trois modes découlent différents types de mesures et ainsi différentes applications.

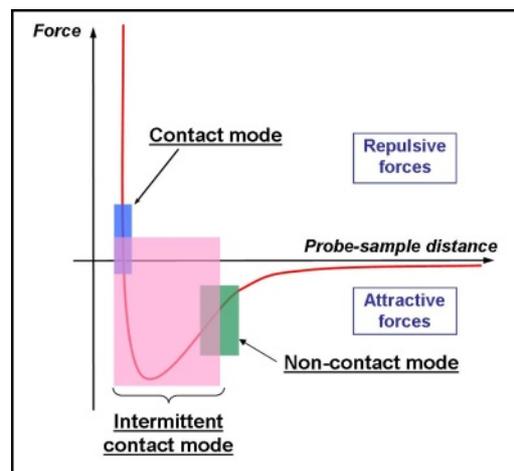


Figure 8. Les 3 modes de L'AFM selon la distance entre la pointe et l'échantillon

Dans notre étude nous utiliserons le mode contact et le mode Tapping.

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, les cortèges électroniques des atomes se repoussent, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation (figure 9a).
- Le mode Tapping, de loin le plus utilisé, consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier (figure 9b).

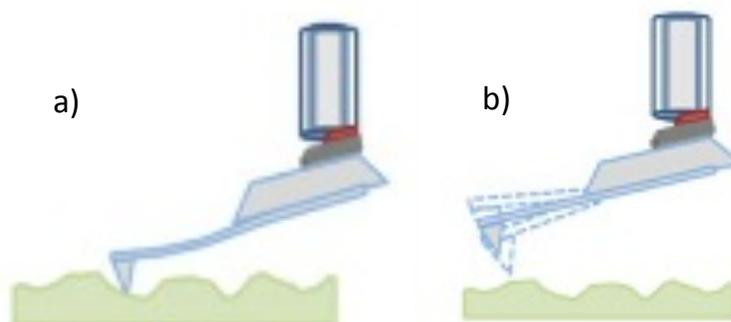


Figure 9. a) Représentation de la pointe en mode contact et b) en mode Tapping

c. Description du matériel

L'AFM utilisé est un **NTEGRA Prima** (figure 10), de la société NT-MDT (Moscou, Russie).



Figure 10. Photo de l'AFM NTEGRA

Les pointes utilisées lors des expérimentations AFM sont les pointes NSC35 / Si₃N₄, fournies par la société MikroMasch. Les microleviers sont en nitrure de silicium, sur la plaque il y en a trois (figure 11a), nous avons utilisé le plus long (130 μm), qui a une fréquence de résonance de 150 kHz (min/max : 120/190 kHz), et une constante de raideur de 4,5 N/m (min/max : 3,5/8,5 N/m).

Les pointes sont pyramidales, possèdent un demi-angle d'ouverture de 20°, présentent un rayon de courbure de 20 nm et ont une hauteur comprise entre 20 et 25 μm (figure 11b).

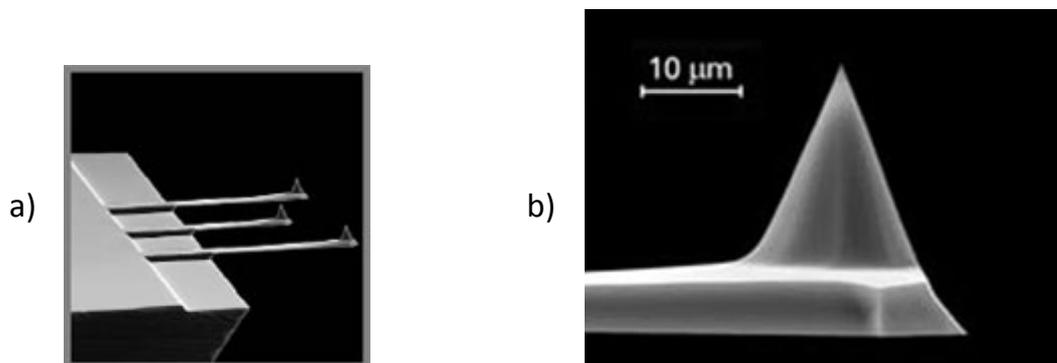


Figure 11. a) Image SEM des trois microleviers et b) Image SEM de la pointe utilisée

d. Réglages et calibration de l'AFM

▪ *Mise en place de la pointe*

La mise en place de la pointe sur un AFM demande énormément de précaution dans la manipulation. Il faut faire très attention d'attraper la céramique à l'aide d'une pince par la largeur sinon on casse les microleviers, puis il faut la positionner précisément sous un petit clapet afin qu'il soit bien fixé. Du bon positionnement de la pointe dépendra la qualité des images et des mesures.

▪ *Réglage du laser*

Une fois que l'on a mis le piézoélectrique en place, il s'agit d'ajuster le laser afin qu'il vienne frapper correctement le microlevier et la diode photoélectrique (figure 12). Pour un réglage optimal, il faut placer le laser au bout de la pointe pour optimiser la sensibilité. On déplace ensuite les cadrans de la photodiode afin que la réflexion du laser sur la pointe aille frapper au milieu des quatre cadrans. Il faut fréquemment vérifier ce réglage afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.

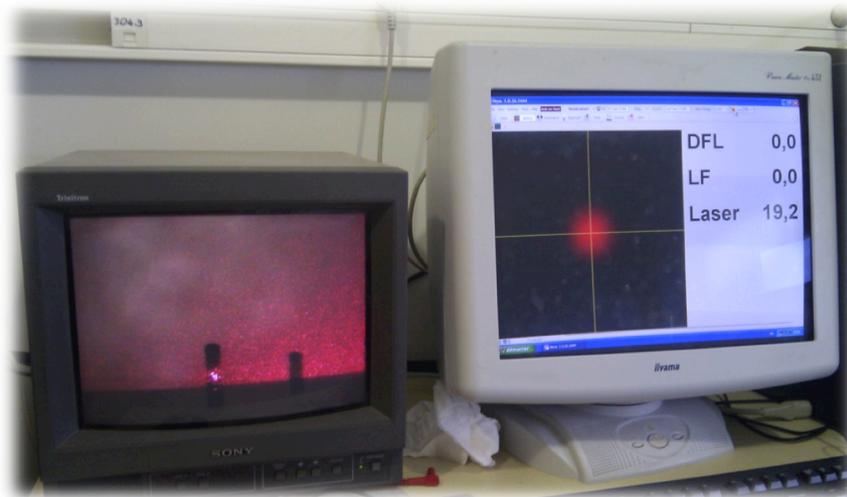


Figure 12. Photo du réglage du laser sur l'AFM

▪ *Calibration de la céramique piézoélectrique*

Avant chaque expérimentation, la sensibilité de la céramique piézo-électrique est évaluée. Le but de cette calibration est de savoir précisément de combien se déplace l'échantillon pour une tension donnée. Pour cela, une courbe de force sur un échantillon de référence présentant une surface dure est enregistrée. Sur cette AFM, c'est un échantillon de silicium qui est utilisé pour faire cette calibration. L'utilisation du logiciel Igor permet la détermination de la sensibilité à partir des courbes réalisées sur le silicium. Les pointes sont changées régulièrement, et il faut refaire cette calibration à chaque nouvelle pointe.

▪ *Calibration du microlevier*

A la suite de cette calibration est déterminée la constante de raideur du microlevier par la méthode des « fluctuations thermiques » qui consiste à mesurer les fluctuations de la déflection du microlevier au repos. L'amplitude des fluctuations d'origine thermique est directement reliée à la constante de raideur du microlevier par la relation :

$$K\langle Z^2 \rangle = k_b T$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, $\langle Z^2 \rangle$ la moyenne des carrés des positions du microlevier par rapport à sa position moyenne prise comme référence ($\langle Z \rangle = 0$), et K une constante proportionnelle à la constante de raideur du ressort. Le logiciel Igor permet alors la détermination de la constante de raideur du microlevier.

e. Imagerie AFM

L'observation des surfaces des échantillons utilisés est réalisée en mode contact intermittent, ou mode Tapping. La pointe oscille à fréquence et amplitude données, elle ne touche la surface que par intermittence. Afin de maintenir l'amplitude d'oscillation constante une boucle de régulation permet d'avancer et reculer la pointe afin de maintenir une distance pointe/surface constante. Le signal enregistré est la variation du déplacement de la pointe dans la direction z perpendiculaire au plan de l'échantillon. Cette variation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en z , pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de surface. L'image résultante correspond à la cartographie en fausses couleurs des déplacements de la pointe en z .

Les images sont réalisées avec une définition de 512×512 et avec une vitesse de balayage réglé manuellement entre 0.5 et 1 Hz. Pour notre étude nous avons réalisé des images allant de $20 \times 20 \mu\text{m}$ (figure 13) jusqu'à $1 \times 1 \mu\text{m}$.

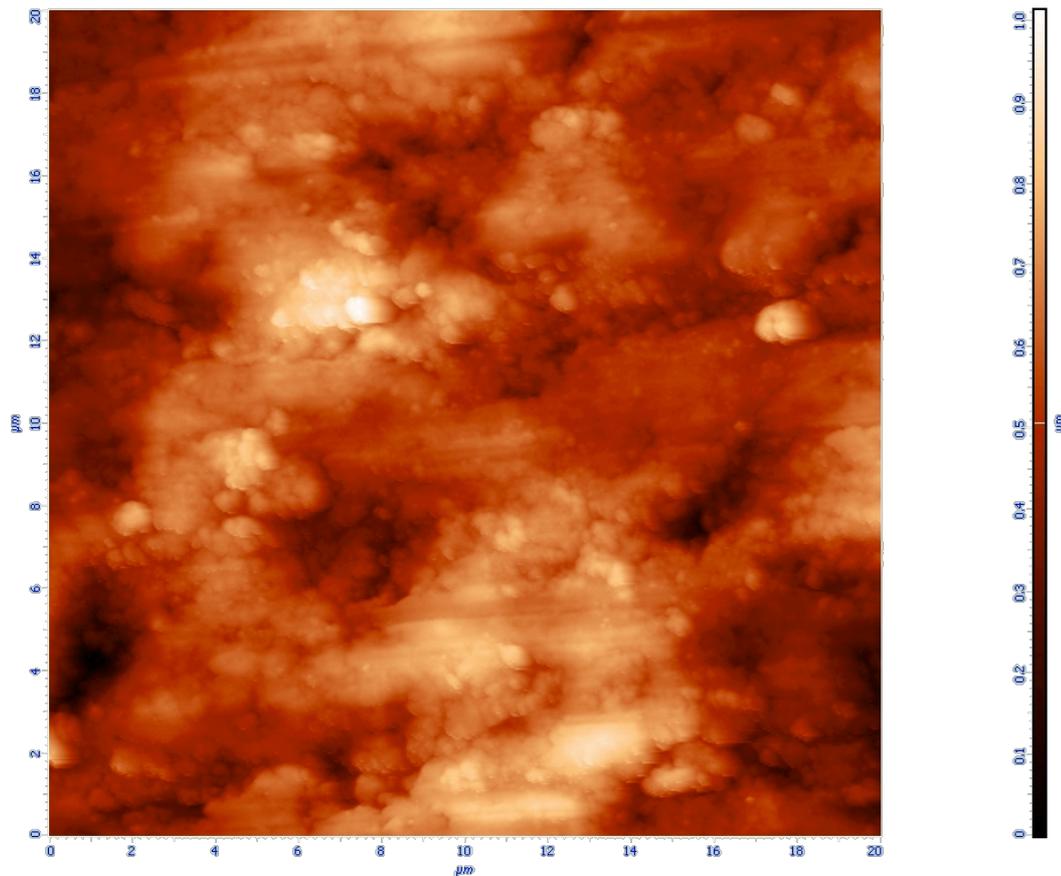


Figure 13. Exemple d'image AFM de $20 \times 20 \mu\text{m}$

f. La spectroscopie de force

En mode contact, l'AFM permet l'obtention de courbes de force. Le principe est de mesurer la déflexion du levier en fonction du déplacement en z de l'échantillon. La pointe ne balaie plus la surface de l'échantillon. Elle sonde la surface en un point (x,y) grâce au déplacement en z de la céramique piézo-électrique (figure 14). La pointe est alors utilisée comme un nanoindenteur. En partant d'une position éloignée de l'échantillon, la surface est progressivement rapprochée de la pointe. Entre les points 1 et 2, aucune déviation du levier n'est observée. Entre les points 2 et 3, la déviation négative observée est due aux forces attractives apparaissant entre la pointe et l'échantillon. La hauteur de cette déviation est proportionnelle à la force attractive. Lorsque la surface entre « en contact avec la pointe, le sens de la déviation du levier s'inverse. L'échantillon continue à se déplacer et la déviation augmente linéairement. A partir du point 5, le mouvement de l'échantillon est inversé. Le point 6 correspond à une distance nulle entre l'échantillon et la pointe, pour laquelle le levier n'est pas dévié. Quand l'échantillon continue à s'éloigner, la pointe reste au contact de la surface de l'échantillon grâce aux forces d'adhésion jusqu'au point 7 où la force élastique du levier l'emporte sur la force d'adhésion. Au point 8, le levier est revenu dans son état initial.

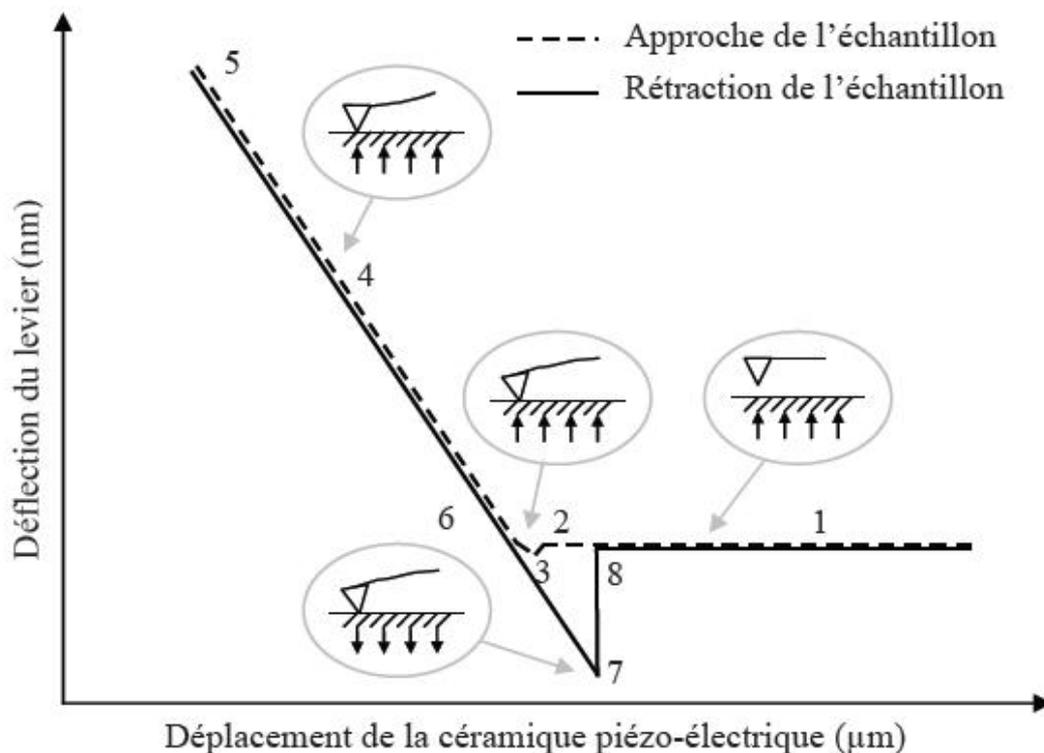


Figure 14. Principe d'une courbe de force

g. Description de la technique et traitement des données

Expérimentalement, obtenir une courbe de force consiste à appliquer une tension variable à la céramique piézoélectrique et à enregistrer une tension proportionnelle à la déflexion du microlevier. Préalablement, la zone de l'échantillon où les indentations seront réalisées doit être imagée. Pour cela, on utilise la méthode décrite au paragraphe III.1.e. Les lieux d'indentation sont définis directement sur l'image. Ils sont représentés par des carrés rouges et blancs (figure 15). Dans notre étude nous avons réalisé les mesures de force sur des images de $1 \times 1 \mu\text{m}$, sur lesquelles on a réalisé 225 indentations (quadrillage de 15 par 15).

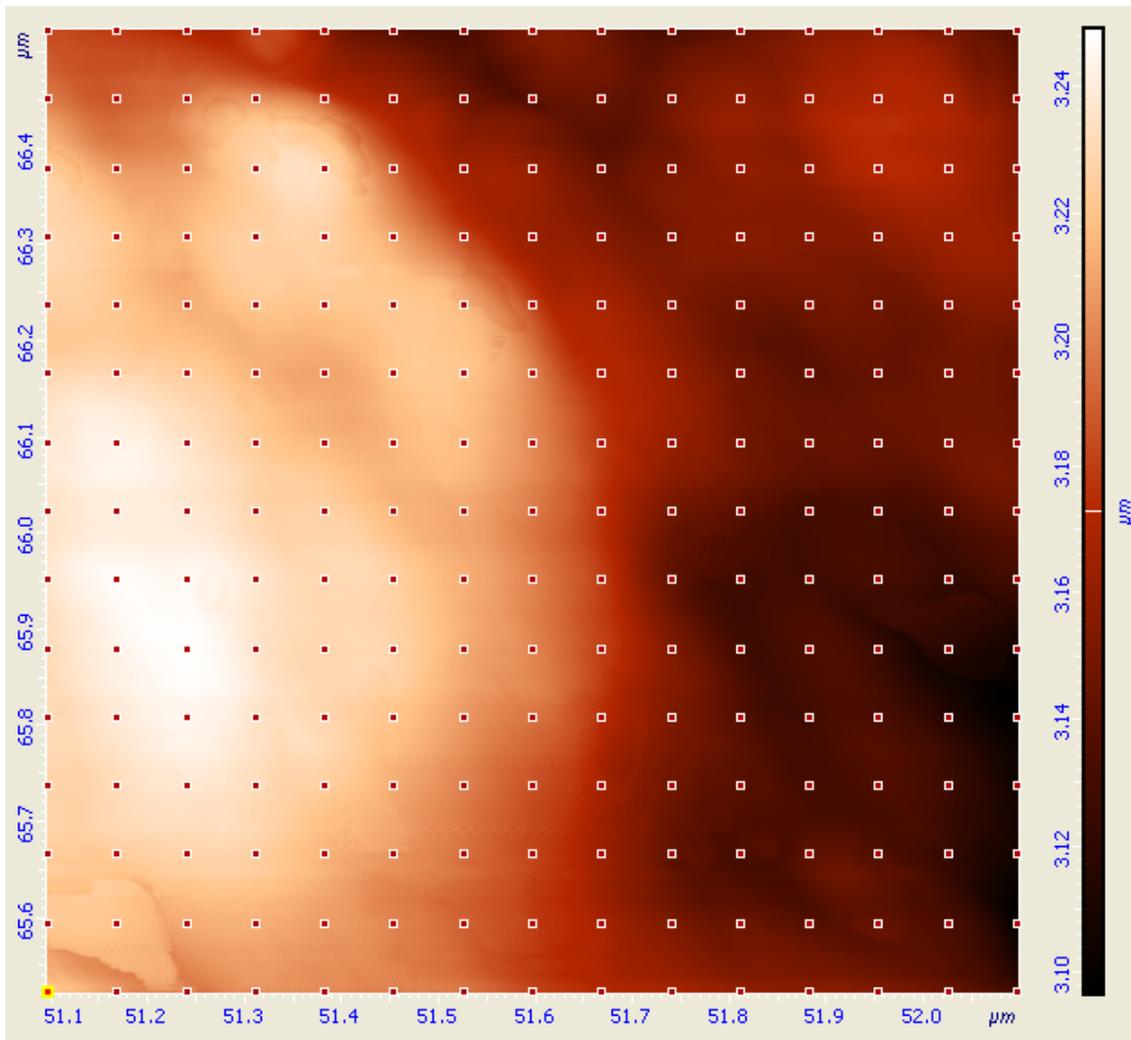


Figure 15. Image AFM de $1 \times 1 \mu\text{m}$ avec les lieux d'indentations

On obtient alors 225 courbes de déflexion du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique (comme décrites au paragraphe III.1.f), une pour chaque lieu d'indentation.

Le traitement de ces courbes de charge permet de déterminer les propriétés mécaniques de la cellule. Pour cela, nous devons obtenir l'évolution de la force d'indentation en fonction de la profondeur d'indentation. En premier lieu la position de la céramique pour laquelle la

pointe entre en contact avec l'échantillon doit être déterminée. On évalue cette position par un changement de pente significatif sur la courbe de force. Avant le contact la force est nulle, après le contact elle augmente rapidement jusqu'à la force de consigne. A partir de cette position, l'indentation débute. Malheureusement, le déplacement de la céramique piézoélectrique à partir de cette position ne représente pas directement l'indentation. En effet, le déplacement après le contact entre l'échantillon et la pointe représente d'une part l'indentation cellulaire mais aussi la déflexion du microlevier. Pour connaître l'indentation, il faut soustraire la déflexion du microlevier du déplacement de la céramique.

La connaissance de la constante de raideur du microlevier calculée au III.1.d permet de calculer la force F en appliquant la loi de Hooke, $F = k \times \text{déflexion}$.

Il est alors possible de tracer l'évolution de la force appliquée à la pointe (force d'indentation) en fonction de la distance pointe-surface (figure 16).

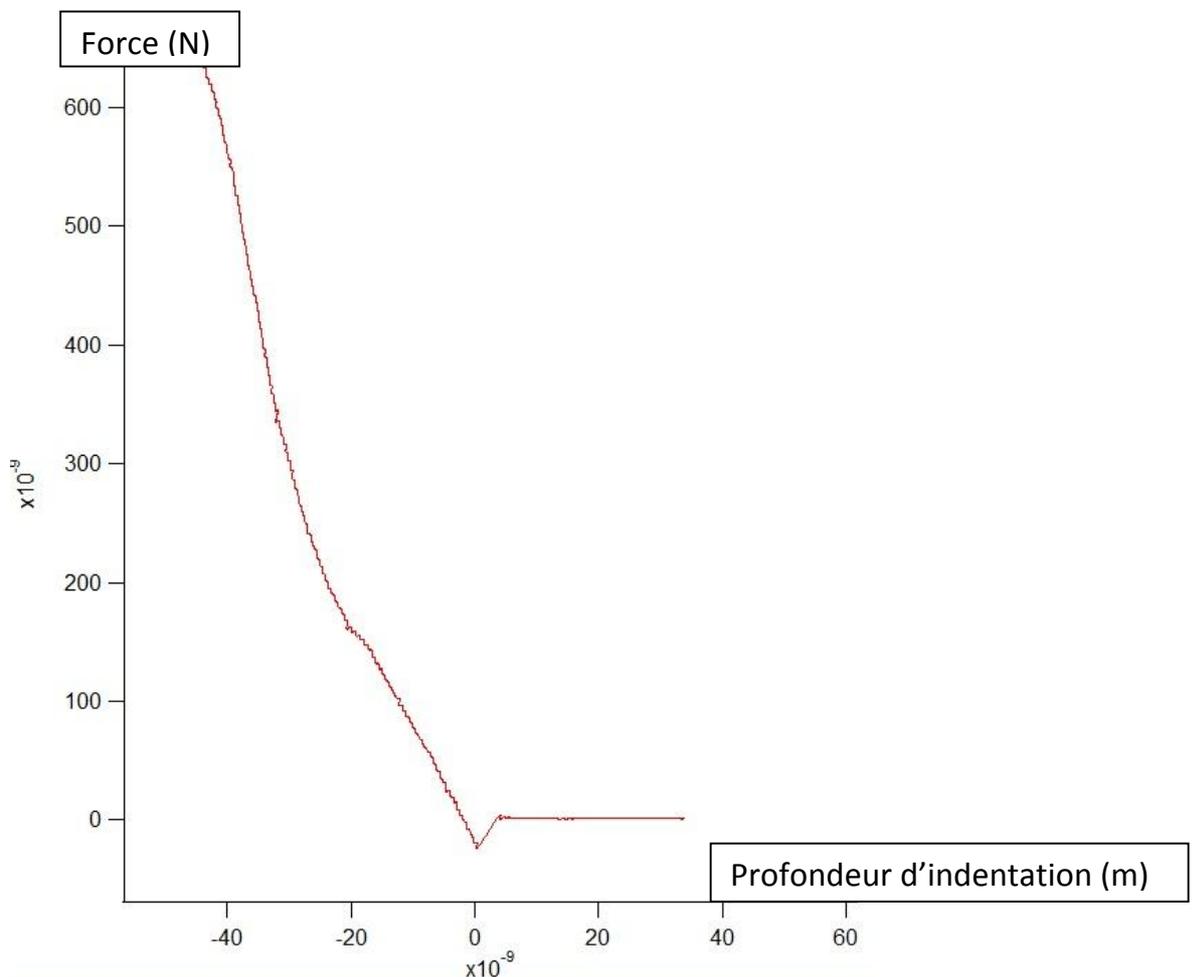


Figure 16. Courbe de la force appliquée à la pointe en fonction de la profondeur d'indentation

Il ne s'agit ici de la transformation de la courbe d'approche présentée dans la figure 14. Cette étape de transformation des courbes est automatisée grâce au logiciel Igor. En effet, en rentrant la sensibilité de la céramique piézo-électrique ainsi que la constante de raideur du microlevier (III.1.d), le logiciel va pouvoir transformer les 225 courbes de déflexion du levier en fonction du déplacement de la céramique, en courbe de force en fonction de la profondeur d'indentation.

h. Module d'Young et modèles de contact

Nous décrivons dans ce paragraphe la formule utilisée pour déterminer le module d'Young ainsi que les modèles utilisés pour exploiter ces courbes et ainsi déterminer les propriétés mécaniques des échantillons.

Pour calculer le module de Young, nous avons utilisé le modèle de hertz dans lequel la pointe est assimilée à une sphère en contact avec une surface plane, l'expression générale est la suivante:

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} (1-\nu^2) \frac{\partial F}{\partial h} \frac{1}{\sqrt{A}} \quad (1)$$

Avec E le module de Young, ν le coefficient de poisson (on prend 0.3, valeur généralement utilisée dans la littérature), F la force, h la profondeur d'indentation de la pointe et A l'aire de contact de la pointe avec la surface.

Dans le cadre de ce modèle, l'indentation de la pointe dans le matériau doit être inférieure au rayon de la pointe. Si ceci est le cas la plupart du temps nous verrons que dans quelques mesures l'indentation considérée lui est supérieure. Afin de déterminer le module de Young dans ce dernier cas, nous avons fait une approximation.

Il y a deux cas distincts pour calculer l'aire de contact A ($A=\pi a^2$):

- 1- L'indentation est inférieure ou égale au rayon R de l'apex de la pointe (figure 17). Dans ce cas là, on assimile la pointe à une sphère en contact avec une surface. Le rayon de l'aire de contact est : $a=\sqrt{Rh}$ (2)

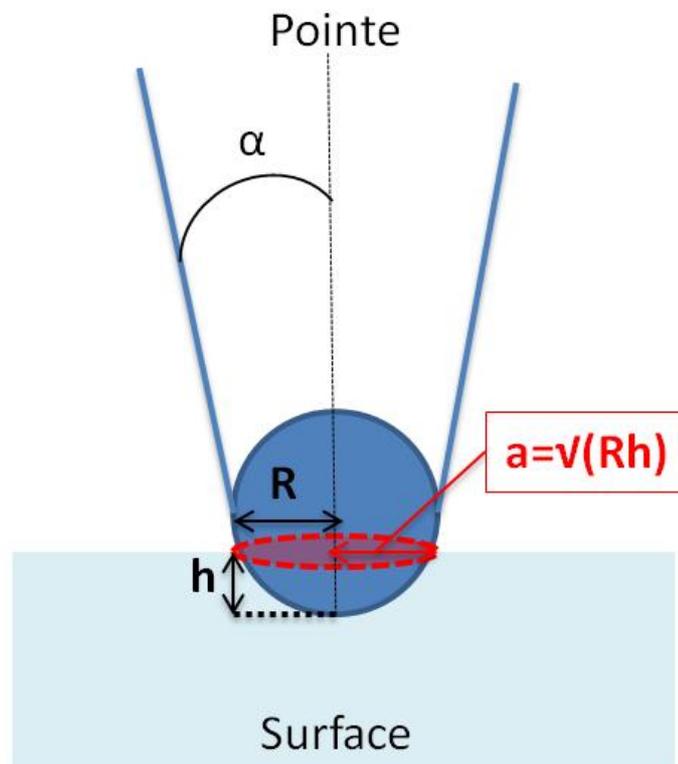


Figure 17. Cas de contact pour une indentation inférieure ou égale à R

- 2- L'indentation est supérieure au rayon R de l'apex de la pointe (figure 18). Dans ce cas là on assimile la pointe à une sphère à laquelle s'ajoute une partie de cône en contact avec la surface. Le rayon de l'aire de contact est : $a=R+(\tan\alpha \times (h-R))$ (3)

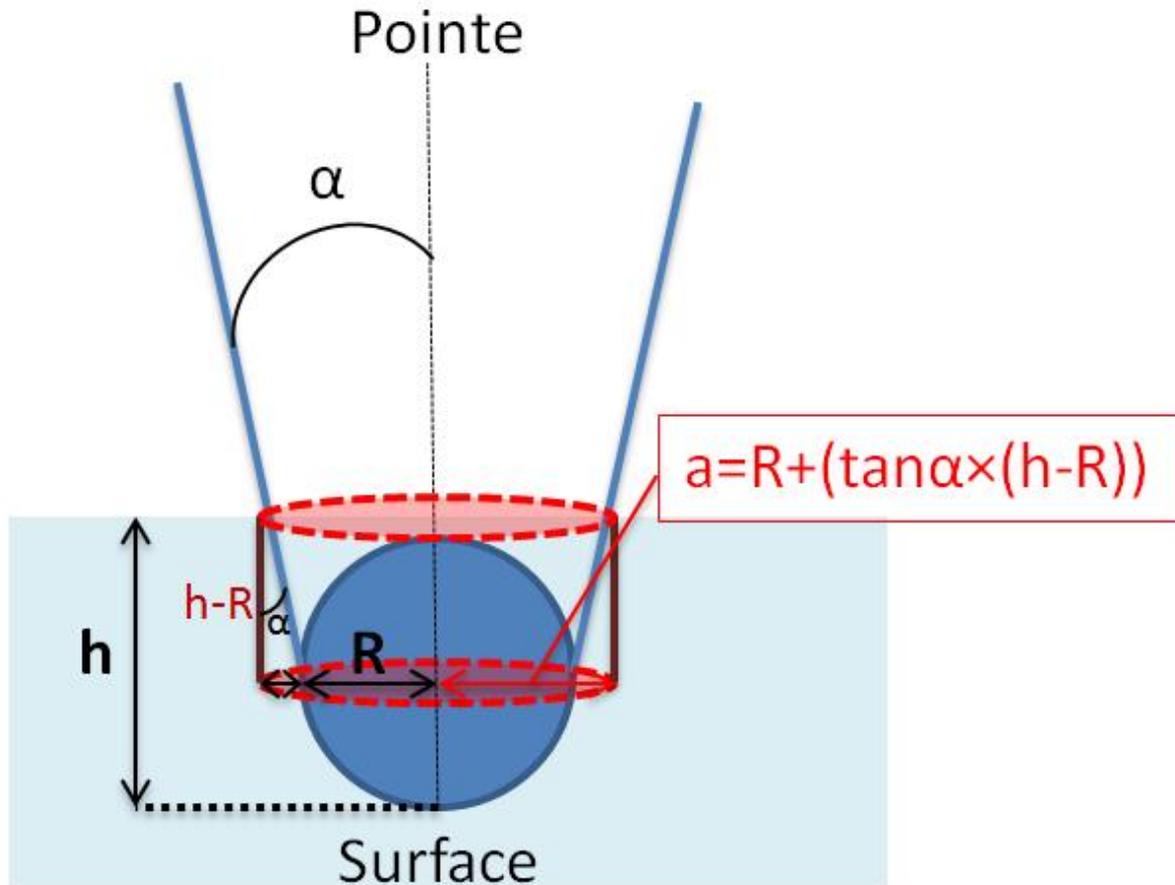


Figure 18. Cas de contact pour une indentation supérieure à R

Pour ce deuxième cas d'indentation supérieure au rayon R , il existe une autre approximation souvent utilisée dans la littérature, appelée modèle de Sneddon, qui assimile la pointe à un cône en contact avec la surface. Cependant ce modèle est plutôt utilisé pour des profondeurs d'indentation très grandes devant le rayon R , or dans notre étude les profondeurs d'indentations ne sont jamais largement supérieures au rayon, c'est pour cela que nous avons choisi un modèle intermédiaire plus adapté à notre situation. Il faut de toute manière garder à l'esprit que ce sont des approximations.

Dans la partie résultat nous verrons comment à partir des courbes nous utiliserons ces formules pour obtenir les modules d'Young.

2. Préparation des échantillons

Pour ce qui est des modèles animaux utilisés dans notre étude, nous avons pu remarquer que de nombreux auteurs ont utilisé un modèle de distraction ostéogénique chez le rat et le lapin pour étudier les mécanismes physiologiques, cellulaires et mécaniques. Ces études, ont validés le modèle murin et lapin en montrant que les processus de mise en place au cours des différentes phases du protocole de distraction étaient similaires chez le rat, le chien, le lapin et au niveau de biopsies humaines. Par ailleurs, les auteurs ont montré que les qualités mécaniques de l'os néoformé étaient équivalentes à celles obtenues chez le chien. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de réaliser ce protocole d'allongement osseux sur le gros animal plus difficile à mettre en œuvre tant d'un point de vue expérimental lui-même que d'un point de vue financier.

Pour cette étude nous avons donc utilisé des fémurs de jeunes rats (figure 19a) et de lapins (figure 19b) allongés par distraction de cal au laboratoire de chirurgie expérimentale de la Timone à Marseille.

Nous avons cependant récupéré des parties d'os sain sur ces fémurs car les cals osseux formés ont été analysés en histologie. Ce n'est pas dommageable pour notre étude car l'os néoformé est très analogue à l'os sain d'un point de vue mécanique et une étude de l'os sain était de toute manière obligatoire afin de le comparer avec le cal osseux.

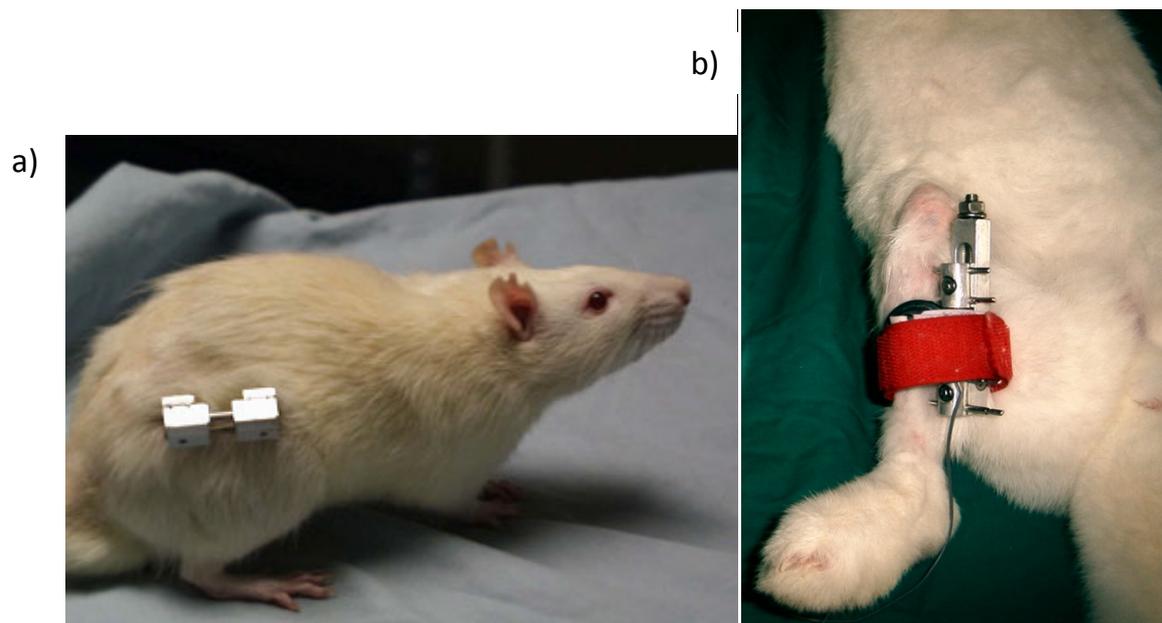


Figure 19. Photographie de distracteurs externe sur un rat (a) et sur un lapin (b)

Pour ce qui est de la préparation des échantillons recueillis, nous allons comparer les deux techniques que nous avons trouvées dans la littérature (II.3.a) afin de choisir celle qui est la plus adaptée pour notre étude et notre AFM.

a. Echantillons conservés au congélateur

Une partie des échantillons osseux sain prélevés a donc été congelée sur place à la Timone à -20°C , puis transporté dans une glacière jusqu'au Cinam où il a été également placé au congélateur à -20°C . Ensuite les échantillons osseux ont été collés sur une lame de microscope (figure 20) à l'aide d'une colle physiologique Histoacryl de BRAUN Aesculap.

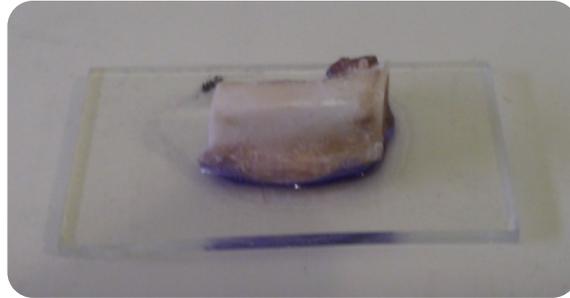


Figure 20. Echantillon osseux congelé collé sur une lame de microscope

Lorsque l'on souhaite tester ces échantillons, il faut attendre une heure après leur sortie du congélateur.

Rappelons que la conservation au congélateur est la technique qui permet de mieux conserver les propriétés mécaniques de l'os.

b. Echantillons mis sous résine

L'autre partie des échantillons a été préparée afin d'être testée fixée dans une résine. Ces échantillons ont été fixés dans l'éthanol à 70%, puis déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissantes et enfin, incorporés dans le polyméthacrylate de méthyle (PMMA).

On obtient alors des blocs de résine cylindriques d'environ 3cm de diamètre et 2 cm de hauteur (figure 21).

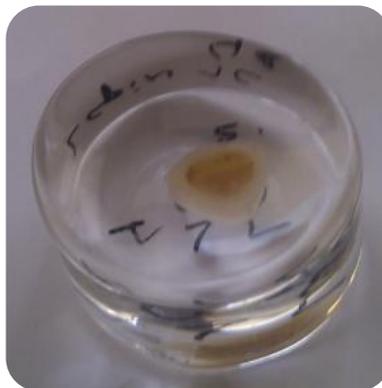


Figure 21. Morceau de fémur incorporé dans un bloc de résine PMMA

Ensuite nous avons recoupé les blocs de résine à la scie de précision, d'une part pour que le bout d'os soit « à fleur » de la résine, et d'autre part car les échantillons doivent faire moins de 1.5 cm de hauteur afin d'être testés à l'AFM.

Pour cela, nous avons utilisé une scie **BUELHER ISOMET 4000** (figure 22) qui se trouve dans une annexe de l'équipe GIBoc à la faculté de médecine de la Timone. Pour une découpe optimale de la résine nous avons programmé une vitesse de rotation de 1500 rpm et une vitesse d'avance de 19.0 mm/min.



Figure 22. Scie BUELHER ISOMET 4000

L'avantage de la résine est que l'on obtient un échantillon avec un état de surface parfaitement lisse ce qui est optimal pour les tests AFM, de plus elle permet d'accéder à deux « faces » de l'os (figure 23), ce qui permet une indentation dans deux directions de l'os.

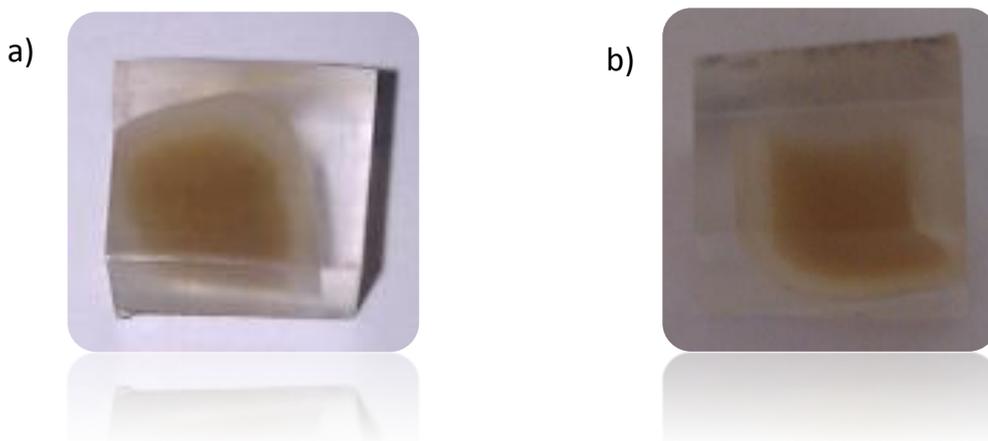


Figure 23. Photos de l'échantillon osseux fixé dans la résine sous deux angles différents : face 1 (a) et face 2 (b)

IV. Résultats

1. Choix du protocole expérimental

Après des séries de tests sur les deux types d'échantillons, nous nous sommes rendu compte que l'obtention de résultats avec les échantillons congelés étaient trop compliquée car la surface de l'os est trop rugueuse et pas assez plate (beaucoup de casse de pointes et problème pour approcher la pointe de la surface). Pour palier à ce problème, nous avons essayé de casser l'échantillon osseux à l'aide d'un marteau afin de récupérer des « débris » osseux à l'état de surface moins rugueux (figure 24). Cependant même avec cette technique, nous n'avons réussi à obtenir aucune image AFM des échantillons congelés.

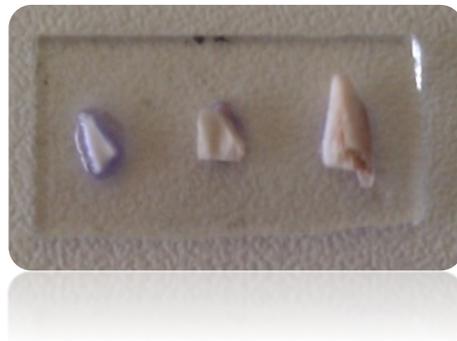


Figure 24. Débris d'os congelés

D'autre part, les tests sur les échantillons fixés sous résine ont été beaucoup plus concluants, car malgré un réglage très délicat et très sensible de l'AFM, nous avons tout de même réussi à imaginer correctement la surface de nos échantillons.

Nous avons donc opté pour la mise en résine. Les images et des mesures de force qui vont être présentées dans la suite du rapport ont été réalisées sur les échantillons d'os sous résine.

2. Mesures de force et détermination du module de Young

Pour obtenir les modules d'Young de nos échantillons osseux sous résine, il faut suivre la méthode que nous avons développée dans la partie III.1. Ainsi avant de faire la mesure de force, il faut tout d'abord faire une image de $1 \times 1 \mu\text{m}$ qui va servir de « cadre » à notre indentation. Pour cela nous allons partir d'une image plus large de $20 \times 20 \mu\text{m}$ puis zoomer en $5 \times 5 \mu\text{m}$ et enfin une dernière fois pour arriver à $1 \times 1 \mu\text{m}$ (figure 25). A chaque fois nous essayons de zoomer sur la zone qui nous paraît la plus intéressante de l'image.

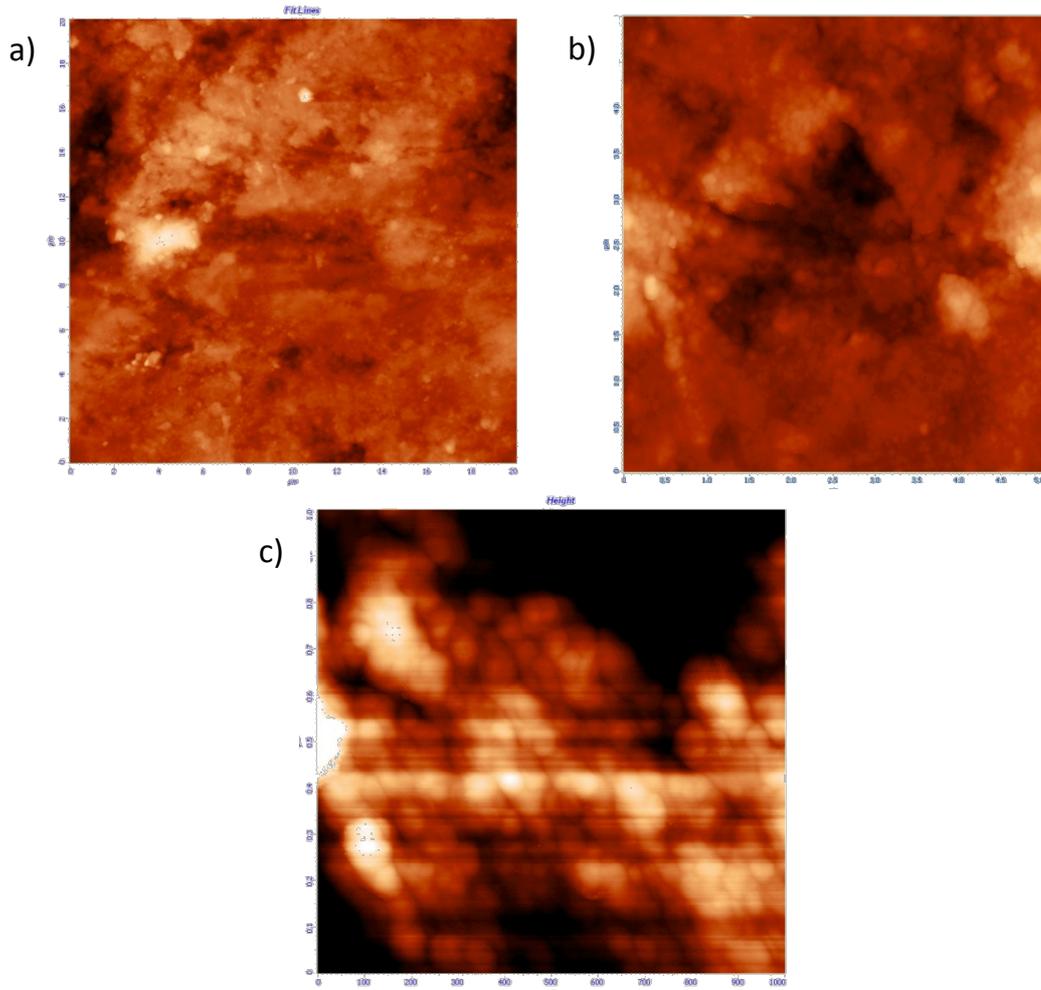


Figure 25. Images AFM échantillon os sain rat a) 20×20μm b) Zoom 5×5μm et c) Zoom 1×1μm

Ensuite comme on l'a expliqué dans le paragraphe III.1.g, on va indenter cette image en 225 points selon un quadrillage de 15 par 15 (figure 26).

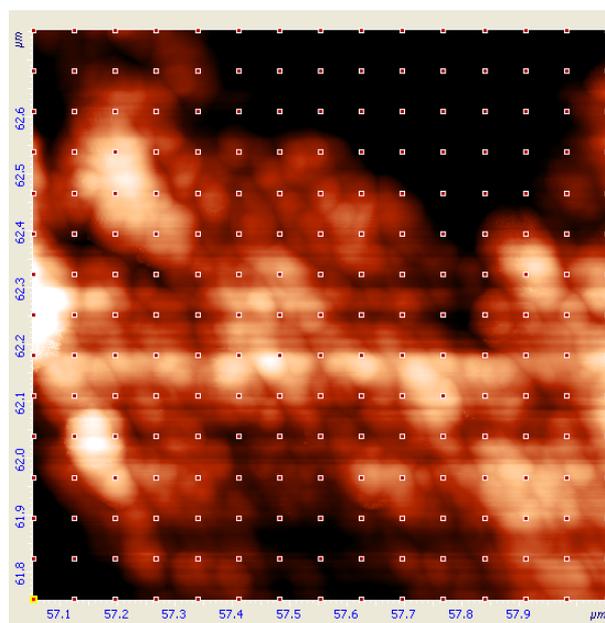


Figure 26. Image AFM de 1×1μm avec les lieux d'indentations

On obtient donc 225 courbes de la déflexion du levier en fonction du déplacement de la céramique piézo-électrique que l'on va transformer grâce au logiciel Igor en courbes de force appliquée à la pointe en fonction de la profondeur d'indentation en suivant la méthode décrite au paragraphe III.1.g.

Sur chacune de ces courbes, il va falloir placer manuellement quatre curseurs qui vont nous permettre d'obtenir les valeurs nécessaires au calcul du module d'Young par la formule (1) présentée au paragraphe III.1.h.

Pour l'obtention de notre module d'Young nous allons nous intéresser seulement à la première pente car l'interprétation des autres pentes est délicate. Sur cette première pente on va ainsi positionner deux curseurs (C et D) et le logiciel Igor va pouvoir calculer la valeur de la pente $\frac{\partial F}{\partial h}$.

Les deux autres curseurs (un rond et un carré) vont être placés aux deux extrémités de la pente afin d'avoir l'épaisseur de la couche traversée. Pour notre étude nous considérons que notre surface de contact se situe au milieu de cette première couche traversée donc notre profondeur d'indentation h nécessaire aux calculs de l'aire de contact sera donné par l'épaisseur de la couche traversée divisée par deux (figure 27).

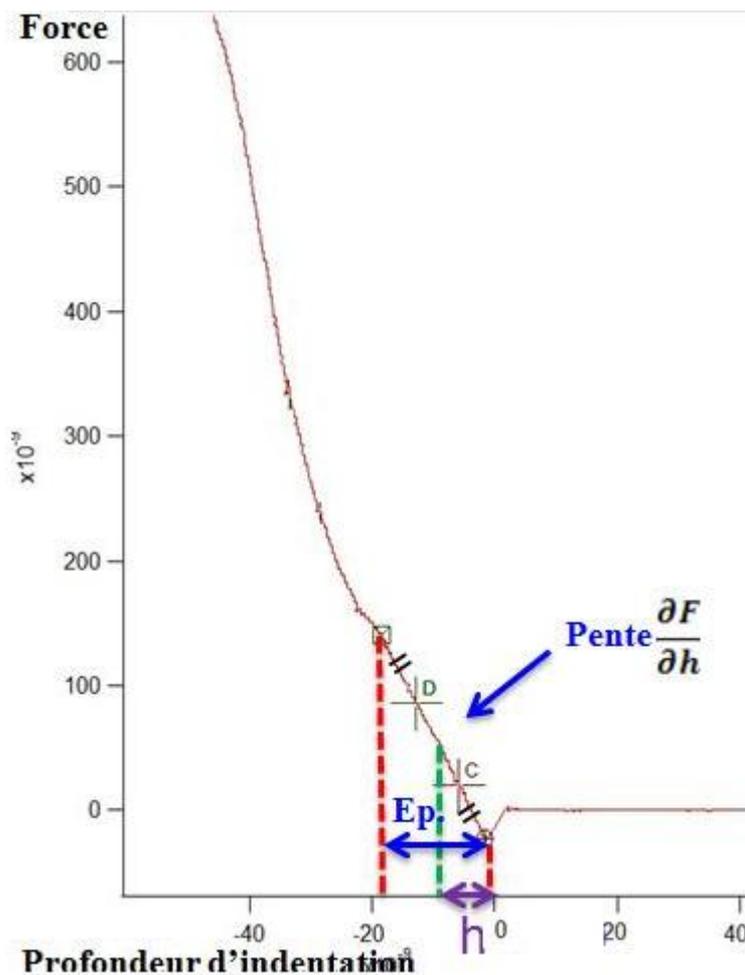


Figure 27. Courbe de force (N) en fonction de la profondeur d'indentation (m) avec les curseurs et les grandeurs mesurées

Il faut donc traiter les 225 courbes manuellement de cette manière en plaçant les quatre curseurs sur la première pente. Toutes les courbes n'ont pas la même allure il faut donc s'adapter aux différents cas de figure que l'on peut rencontrer (figure 28).

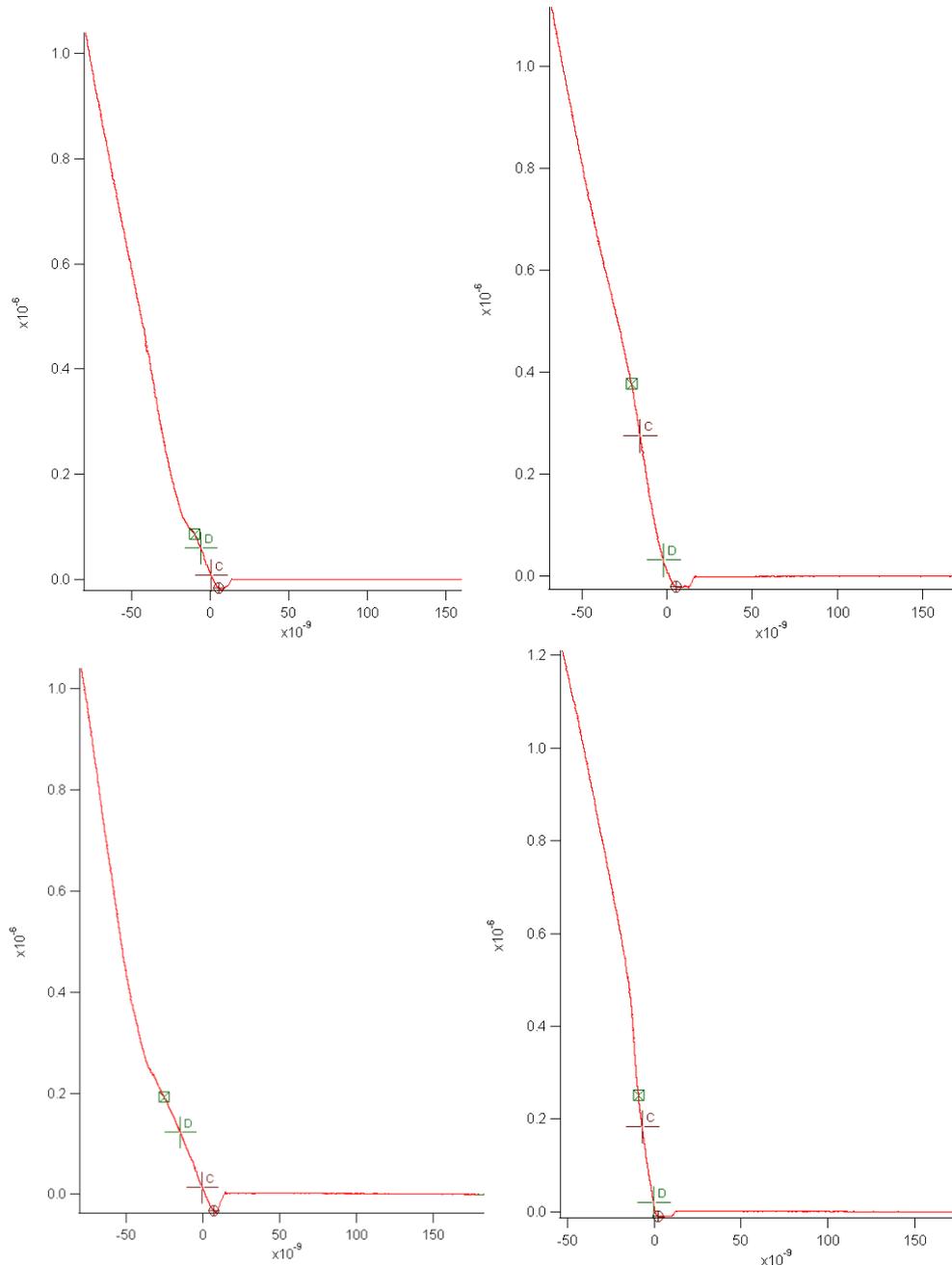


Figure 28. Exemples d'allures de courbes (force en N en fonction de la profondeur d'indentation en m) différentes avec le positionnement des quatre curseurs

Ensuite, dans le logiciel Igor nous avons rentré un programme (comportant les valeurs des constantes R , α et ν) qui va calculer automatiquement l'aire de contact grâce à la valeur de la profondeur d'indentation (l'épaisseur de la couche divisé par deux).

Ce programme va utiliser la formule (2) ou (3) pour calculer l'aire de contact selon la profondeur d'indentation (comme on l'a expliqué au paragraphe III.1.h), si elle est inférieure au rayon de la pointe (R=10nm), le programme va calculer l'aire à l'aide de la formule (2), et si elle est supérieure au rayon de la pointe alors on utilisera la formule (3).

Puis, grâce à la valeur de l'aire de contact A et de la pente $\frac{\partial F}{\partial h}$, le programme va calculer automatiquement le module d'Young pour chaque courbe en utilisant la formule (1) :

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} (1 - \nu^2) \frac{\partial F}{\partial h} \frac{1}{\sqrt{A}}$$

On obtient alors sur Igor un tableau comprenant les valeurs de la pente, de l'épaisseur, de l'aire de contact et du module d'Young (en Pa) pour chaque courbe (figure 29).

Point	'12053114_BreakF	'12053114_Pente1	'12053114_Epaiss	'12053114_Aire1	'12053114_Young
0	1	0	0	0	0
1	2	34.6828	1.55624e-08	2.44454e-16	1.78896e+09
2	3	12.7772	9.6835e-09	1.52108e-16	8.35501e+08
3	4	23.4223	2.05191e-08	3.22313e-16	1.05215e+09
4	5	0	0	0	0
5	6	14.7075	8.6196e-09	1.35396e-16	1.01935e+09
6	7	22.8443	1.08719e-08	1.70775e-16	1.40978e+09
7	8	33.2352	1.73365e-08	2.72322e-16	1.62421e+09
8	9	17.4475	1.40594e-08	2.20845e-16	9.46837e+08
9	10	15.8049	1.73837e-08	2.73063e-16	7.71341e+08
10	11	11.4519	5.82337e-08	9.03435e-16	3.07267e+08
11	12	29.7032	3.0613e-08	4.80868e-16	1.09239e+09

Figure 29. Tableau de valeurs sous Igor

Ensuite, on fait la moyenne des 225 modules d'Young de l'image afin d'obtenir un module d'Young moyen pour cette échantillon. On a fait donc différentes mesures de force pour les échantillons osseux de rat et de lapin sous résine (sur les deux faces du bloc de résine), ainsi que des mesures de force de la résine seule. Les valeurs obtenues sont résumées dans la figure 30. Les valeurs de la même couleur appartiennent à la même série de mesure, c'est à dire qu'elles ont été effectuées lors d'une même journée donc avec la même pointe, les mêmes réglages pour le laser, la même température et même condition d'humidité dans la pièce.

	Résine	Os sain rat (face 1)	Os sain rat (face 2)	Os sain lapin (face 1)	Os sain lapin (face 2)
Module d'Young (MPa)	685 ± 26	829 ± 34	997 ± 26	936 ± 28	991 ± 25
	403 ± 19	465 ± 27	516 ± 20		
		578 ± 21			

Figure 30. Valeurs de module d'Young obtenues pour les différents échantillons

V. Discussion

1. Image-t-on vraiment l'os ?

Etant donné que nous avons choisi une méthode de préparation des échantillons où l'os est fixé sous résine et que l'AFM donne une caractérisation morphologique à l'échelle nanométrique, il semble évident de se demander si nous avons imagé l'os ou seulement la résine dans laquelle l'échantillon est fixé.

Pour avoir des éléments de réponse, nous avons comparé les images que nous avons obtenues aux images trouvées dans la littérature (figures 5 et 6).

Ainsi en analysant les images obtenues à différentes échelles (figure 31), on se rend compte que l'on retrouve fréquemment cette structure granulaire caractéristique observée dans la littérature.

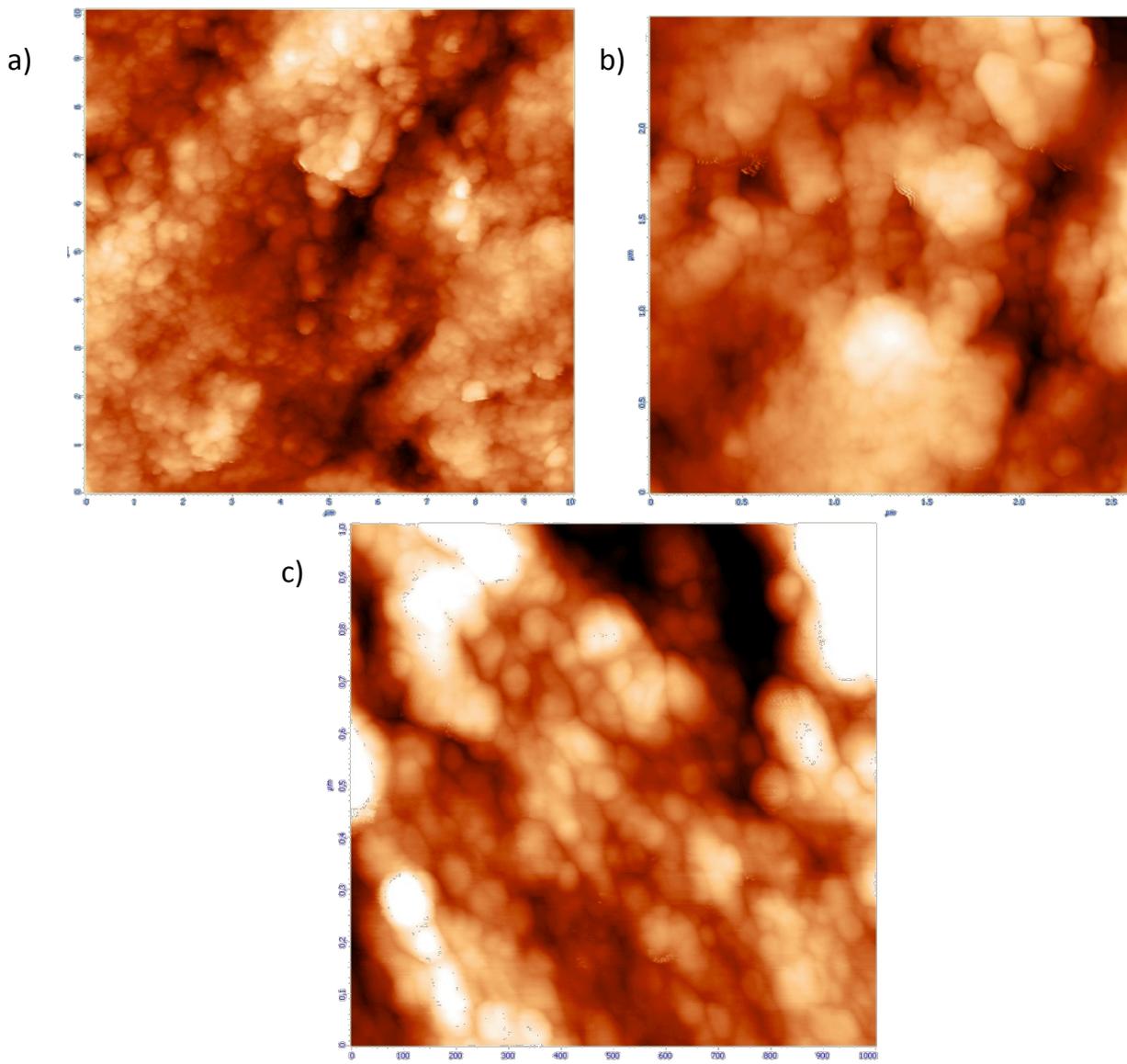


Figure 31. . Images AFM échantillon os sain rat a) $10 \times 10 \mu\text{m}$ b) $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ et c) $1 \times 1 \mu\text{m}$

On voit donc très clairement cette structure granulaire sur les images, et on peut dénoter une forte ressemblance avec les figures 5 et 6 trouvées dans la littérature. Cela constitue donc un bon argument qui porte à croire que nous avons bien obtenu des images de l'os. D'après la littérature, cette structure granulaire viendrait des fibrilles de collagène (II.2), ce qui semble cohérent car ces fibrilles ont une taille de l'ordre de la centaine de nanomètres.

Nous avons également fait des images de la résine seule et de l'interface entre la résine et l'os afin d'établir une comparaison et voir si il y a des différences notoires (figure 32).

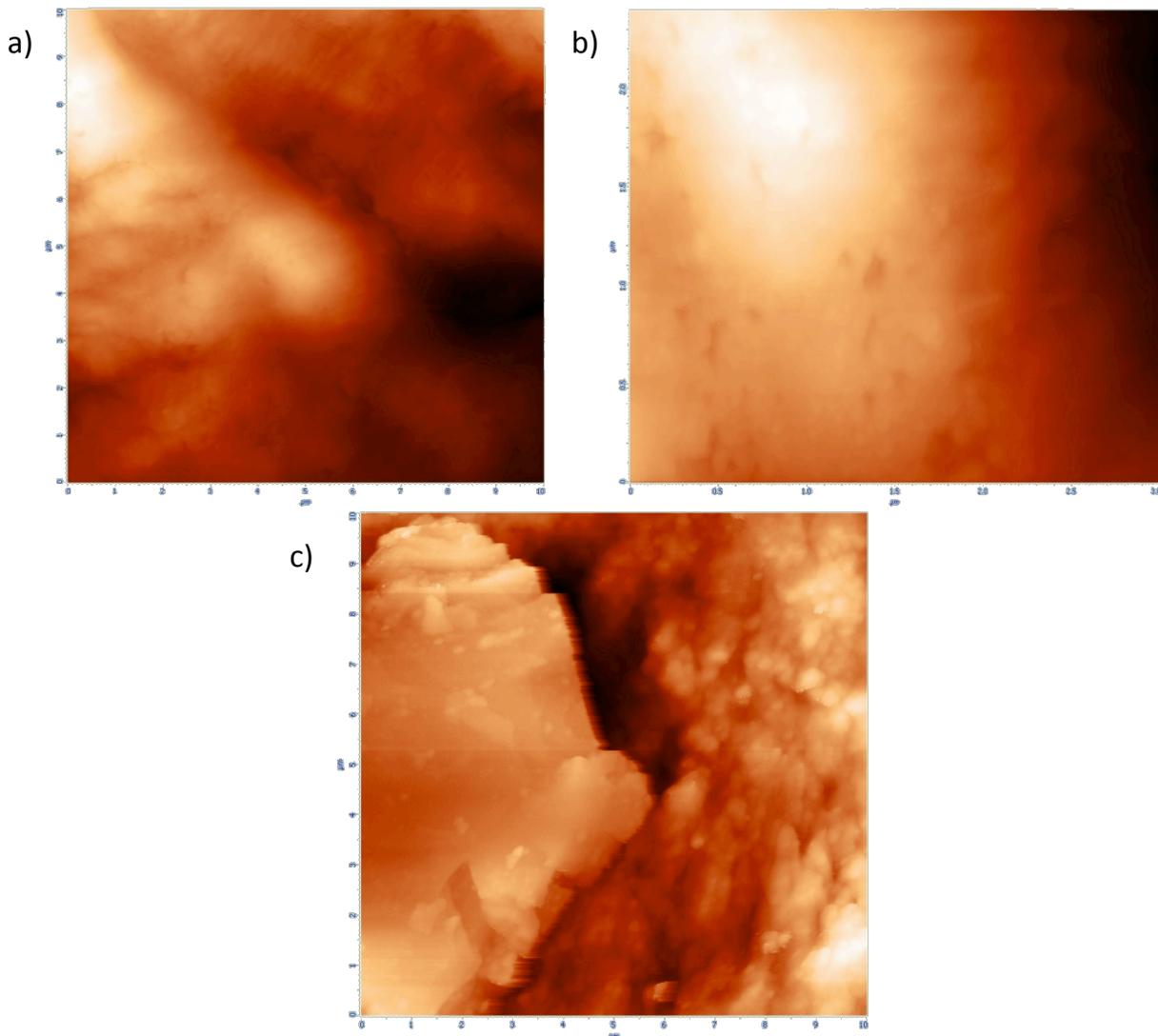


Figure 32. Images AFM a) résine 10×10μm b) résine 2,5×2,5μm et c) interface résine os sain de rat 1×1μm

Sur les images de résine seule, on peut observer une structure moins granulaire, plus « lisse » que les images de l'os. De plus sur l'image de l'interface, on peut voir une nette démarcation entre la partie granulaire de l'os et la partie plus lisse de la résine. Cela constitue donc un nouvel argument qui confirme que nous imageons bien l'os et non pas la résine dans laquelle il est fixé.

Pour être sûr que l'on image bien l'os, il faudrait à l'avenir essayer d'améliorer la préparation de l'os par congélation (en ajoutant une étape de ponçage par exemple), afin de pouvoir les tester à l'AFM et ainsi comparer les images avec celles obtenues sous résine.

2. Analyse des valeurs de module d'Young

Etant donné que nous avons peu de valeurs (neuf), il est compliqué d'établir des comparaisons et de tirer des conclusions. Précisons tout de même que ces neuf valeurs correspondent au traitement manuel de 2025 courbes!

De plus les barres d'erreurs de nos valeurs sont très importantes, ce qui rend encore plus délicate l'analyse et la comparaison des valeurs.

Au vue des valeurs, il semble que les modules d'Young pour la résine semblent légèrement inférieurs à ceux de l'os, mais pas assez nettement pour pouvoir l'affirmer. De plus les valeurs varient beaucoup selon la série de mesure. Il semble surtout y avoir un problème avec la série violette pour laquelle nous avons trouvé une valeur de la constante de raideur du cantilever de 14 N/m nettement supérieure à la gamme donnée par le constructeur (entre « ,5 et 8,5 N/m). Il y a donc peut être une erreur sur la détermination de cette valeur qui pourrait expliquer la différence de valeur du module de Young avec les autres mesures orange et verte.

Pour les deux faces étudiées de l'os les valeurs sont très proches également, même si sur la face 2 que l'on a obtenu les plus grands modules d'Young.

Pour ce qui est de l'os étudié, rat et lapin, nous manquons de valeurs pour établir une comparaison solide.

Nous avons également regardé si sur une image il se dégageait des zones avec des modules d'Young différents, en effet comme il y a 225 points d'indentation sur une image, il est possible d'indenter des zones différentes de l'os et donc d'obtenir des valeurs de module d'Young différentes. Pour observer cela, nous avons tracé un histogramme à partir des 225 valeurs de module d'Young où chaque barre représente le nombre de valeurs dans un certain intervalle. Sur toutes les séries de valeurs on obtient une répartition de type Gaussienne des histogrammes (figure 33), on peut donc en conclure qu'il n'y a pas de zones de modules d'Young différents sur les images testées. Cela indiquerait que l'on indente un seul matériau (les fibrilles de collagène par exemple) et que notre échantillon est homogène.

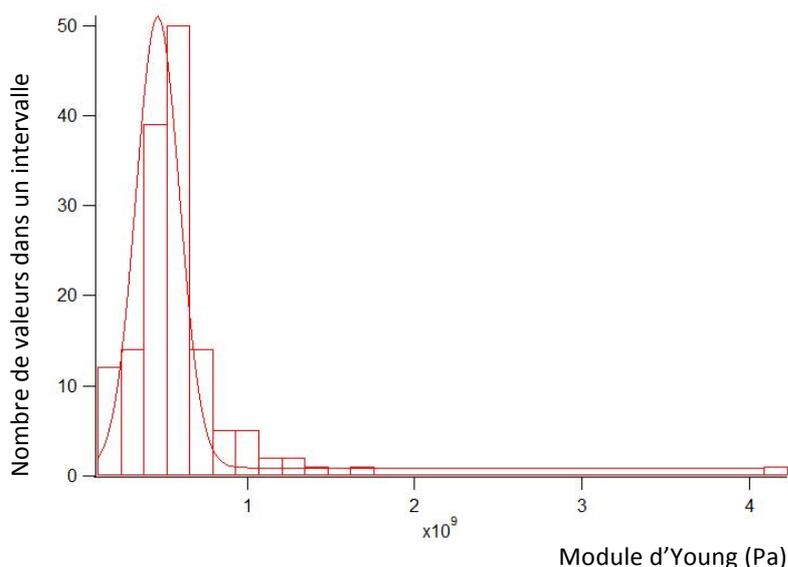


Figure 33. Histogramme de répartition des valeurs de Module d'Young (Pa) d'une image avec un lissage de type Gaussienne

Nous nous sommes posé la même question par rapport à l'épaisseur d'indentation. Sur chaque série de valeur, nous avons donc, à partir des 225 valeurs d'épaisseurs, tracé un histogramme de la même manière. Encore une fois, sur toutes les séries, on obtient une répartition de type Gaussienne des histogrammes (figure 34), donc cela confirmerais que l'on indente bien un même matériau dont l'épaisseur est d'environ 20nm.

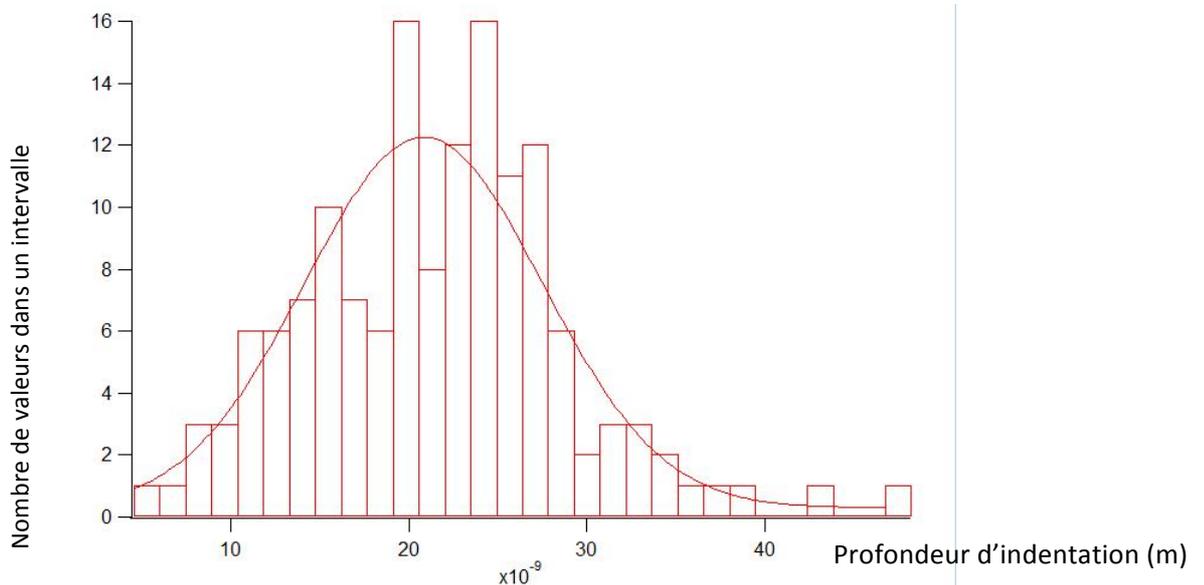


Figure 34. Histogramme de répartition des valeurs d'épaisseurs d'indentation (m) d'une image avec un lissage de type Gaussienne

Il est également important de rappeler que notre modèle comporte de nombreuses approximations, notamment le coefficient de Poisson dont on a fixé la valeur à 0,3 comme c'est souvent le cas dans la littérature. Il semble donc intéressant de regarder l'influence de ce paramètre sur nos résultats. Pour cela, sur une série de valeur, nous avons regardé l'influence du module d'Young en fonction du coefficient de Poisson. La courbe obtenue est présentée dans la figure 35.

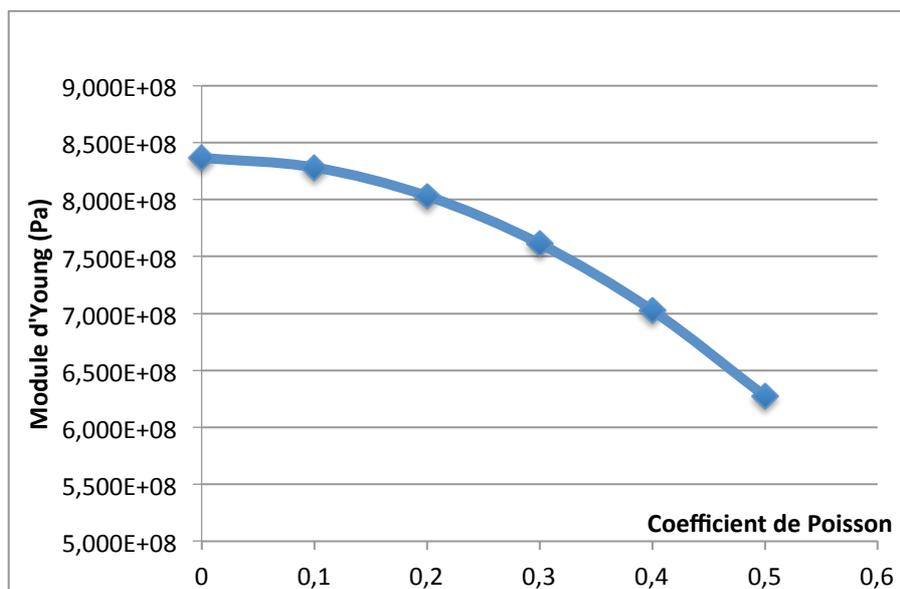


Figure 35. Variation du module d'Young en fonction du coefficient de Poisson

On peut ainsi remarquer que l'influence du coefficient de poisson est relativement faible (par rapport au module d'Young avec 0,3, on a une différence du résultat de 9% avec 0,1 ; 6% avec 0,2 ; 8% avec 0,4 et 18% avec 0,5), et ne modifie pas l'ordre de grandeur. Cependant, même si l'influence sur le résultat est plutôt faible (de l'ordre de 10%), ce n'est pas non plus négligeable et la meilleure solution constituerait donc à préalablement calculer précisément le coefficient de Poisson de notre échantillon.

Nos résultats dépendent également de nombreux autres paramètres comme la pointe, le réglage du laser, l'humidité ou la température. Les résultats pouvant varier d'une journée sur l'autre à cause de ces paramètres. Ainsi, il faudrait à l'avenir travailler sur ces paramètres afin de savoir ceux qui ont le plus d'influence sur notre valeur de module d'Young. Il faudrait par exemple sur une même journée de test faire des mesures avec des pointes ou des réglages du laser différents afin de voir leur influence respective.

Enfin, par rapport à l'ordre de grandeur de nos valeurs, en les comparant aux valeurs trouvées dans la littérature, on se rend compte que nos valeurs sont cohérentes. En effet, Leong (2008) [5] dans son étude a trouvé des modules d'Young de 3 à 132 MPa pour des cals osseux de fémur rat, or un cal osseux est moins rigide que l'os sain. D'autre part, dans une autre étude menée par Thurner (2009) [8], encore une fois sur une fracture de fémur de rat, on trouve des valeurs allant de 0,61 à 1010 MPa, les valeurs les plus faibles correspondant au tissu formé au début de la fracture et les valeurs les plus élevées à l'os consolidé après 35 jours (donc très proche de l'os sain de nos échantillons). Dans cette même publication de Thurner, on trouve également des valeurs pour le fémur sain de rat entre 1140 et 1460 MPa ce qui est un peu plus élevé que nos valeurs mais toujours dans le même ordre de grandeur.

Ainsi, même si l'on peut difficilement analyser nos valeurs, on peut tout de même noter que les ordres de grandeurs trouvés sont cohérents, ce qui nous permet de penser que notre modèle mathématique d'obtention du module d'Young est lui aussi cohérent.

Conclusion

Tout d'abord, ce stage de fin d'étude m'aura permis d'établir un protocole expérimental et un modèle de traitement des données cohérent de part les images et les valeurs de module d'Young que nous avons obtenu. En effet après avoir testé deux méthodes différentes, nous avons mis en place une technique de préparation de l'os qui consiste à le fixer sous résine. Ensuite nous avons mis en place une méthode de traitement des données pour obtenir une valeur de module d'Young à partir des courbes de force obtenues grâce à l'AFM. Nous avons ensuite pu constater d'une part, que les images obtenues étaient cohérente avec la littérature et semblaient bien être de l'os et non de la résine, et d'autre part, que les valeurs de modules d'Young obtenues étaient elles aussi cohérentes avec la littérature.

La limite de ce travail tient dans le fait que le traitement des données étant une étape très longue (traitement manuel de 225 courbes pour obtenir une valeur), nous n'avons pas récupéré assez de données pour établir une analyse poussée et des comparaisons solides à partir des valeurs.

Cependant l'enjeu du stage n'était pas vraiment la, il s'agissait plus de voir si on pouvait mettre cette technique de nanoindentation par Microscopie à Force Atomique en œuvre, et de surcroît l'appliquer à des échantillons osseux préparés par nos soins. En effet la caractérisation par nanoindentation est une première pour l'Institut des Sciences Du Mouvement, ce travail pourra donc servir de base pour de futurs travaux de caractérisation de l'os en croissance.

Enfin ce stage m'a permis de travailler dans un domaine que j'apprécie tout particulièrement, celui de la biomécanique. J'ai notamment pu apprendre de nombreuses choses sur le matériau très complexe qu'est l'os. Ainsi, mon ambition professionnelle étant de travailler dans les biomatériaux, ce stage me permet de me constituer un parcours cohérent avec mes ambitions.

Bibliographie

1. P.K. Zysset et al. *Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur / Journal of Biomechanics* 32 (1999) 1005-1012
2. Wang X J, et al. *Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bovine bone measured by nanoindentation / VTrans. Nonferrous Met. SOC. China* 16(2006) 744-748
3. R.C. Paietta et al. *Influences of spherical tip radius, contact depth, and contact area on nanoindentation properties of bone / Journal of Biomechanics* 44 (2011) 285–290
4. P. Milovanovic et al. *Age-related deterioration in trabecular bone mechanical properties at material level : Nanoindentation study of the femoral neck in women by using AFM / Experimental Gerontology* 47 (2012) 154–159
5. P.L. Leong, E.F. Morgan. *Measurement of fracture callus material properties via nanoindentation / Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1569–1575
6. S.Pathac et al. *Measuring the dynamic mechanical response of hydrated mouse bone by nanoindentation / Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4 (2011) 34-43
7. A. A. Gaidash et al. *Nanoporous structure of bone matrix at osteoporosis from data of Atomic Force Microscopy and IR Spectroscopy / Journal of Osteoporosis* (2011) 121-128
8. P.J Thurner. *Atomic force microscopy and indentation force measurement of bone / Wiley & Sons, Inc. WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2009 1 624–649
9. J.Combes. *Etude de l'adhésion d'ostéoblastes sur substituts apatitiques par Microscopie à Force Atomique / Thèse* (2009)

Michaël CHAGNAUD
Elève-ingénieur Matériaux 2012



Stage de fin d'études

En collaboration avec l'Institut des Sciences du Mouvement et le Cinam

Caractérisation mécanique par nano indentation AFM de l'os animal en croissance

Résumé. Le callotasis est une technique chirurgicale d'allongement des membres chez l'enfant ou le jeune adulte, destinée à traiter les inégalités de membres, les petites tailles ou encore les fractures compliquées avec perte de substance osseuse. Son principe est de réaliser une distraction progressive d'un cal osseux, consécutif à une ostéotomie, à l'aide d'un fixateur externe. Quand l'allongement souhaité est atteint, le fixateur externe est maintenu en place durant le laps de temps nécessaire à la consolidation osseuse. Bien qu'ayant fait la preuve de son efficacité, le callotasis est à l'heure actuelle un traitement long et onéreux du fait de l'occurrence très fréquente de complications, en particulier des fractures itératives et des déformations après le retrait du fixateur externe dues à un défaut de consolidation osseuse. Dans la perspective d'améliorer la qualité de vie des jeunes patients, l'objectif du projet est d'optimiser la technique du callotasis afin de minimiser la durée de port du fixateur externe et le risque de fracture.

L'objectif de ce stage était, après une étude bibliographique, de se familiariser avec les techniques de caractérisation par microscopie à force atomique (AFM) et d'établir un protocole expérimental spécialement dédié au tissu osseux sain et néoformé (tissu du cal osseux). En effet l'AFM permet de faire de l'imagerie, mais permet également par la technique de nanoindentation d'obtenir des informations sur la rigidité du tissu et notamment le Module d'Young. Le stage s'inscrit dans un projet qui consiste à développer et exploiter un modèle expérimental d'allongement osseux du fémur de l'os animal en croissance.

En s'aidant de la littérature et des études déjà réalisées sur la nanoindentation de l'os, nous avons sélectionné deux techniques de préparation des échantillons osseux fréquemment utilisées, à savoir la congélation de l'échantillon et la fixation sous résine. Nous avons donc testé ces deux méthodes pour voir laquelle est la plus reproductible et donne les meilleurs résultats (image et mesure de force). Nous nous sommes rapidement rendu compte que l'os congelé est très délicat à imager et cause la casse de nombreuses pointes de l'AFM, nous avons donc opté pour la fixation sous résine. Sur ces échantillons nous avons donc grâce à l'AFM réalisé des images et des mesures de force. Nous avons ensuite élaboré une technique pour traiter les valeurs des mesures de force et ainsi obtenir des valeurs de module d'Young pour les échantillons.

Enfin nous avons analysé les images et les valeurs de modules d'Young obtenues. Pour les images, nous nous sommes demandé si elles correspondaient bien à l'os et non à la résine. Après comparaison avec les clichés trouvés dans la littérature et en observant des différences avec des images de résine seule, il semble que nous imageons bel et bien l'os.

Pour ce qui est des modules d'Young, le traitement des données étant très long, nous avons obtenu peu de valeurs, ce qui a rendu toute comparaison ou analyse délicate. Néanmoins les valeurs sont cohérentes avec la littérature ce qui nous conforte dans nos choix de protocole et de traitement des données.

Confidentialité

Les informations contenues dans ce rapport ne présentent pas de caractère confidentiel