

Titre: Caractérisation des propriétés mécaniques des disques
Title: intervertébraux et de leurs relations avec l'imagerie quantitative
par résonance magnétique

Auteur: Maximilien Recuerda
Author:

Date: 2010

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Recuerda, M. (2010). Caractérisation des propriétés mécaniques des disques
Citation: intervertébraux et de leurs relations avec l'imagerie quantitative par résonance
magnétique [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/468/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/468/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Delphine Périé-Curnier
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES DISQUES INTERVERTÉBRAUX
ET DE LEURS RELATIONS AVEC L'IMAGERIE QUANTITATIVE PAR RÉSONANCE
MAGNÉTIQUE

MAXIMILIEN RECUERDA
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
DÉCEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES DISQUES
INTERVERTÉBRAUX ET DE LEURS RELATIONS AVEC L'IMAGERIE QUANTITATIVE
PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE

présenté par : RECUERDA Maximilien

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph.D., présidente

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, D.Sc., membre et directrice de recherche

M. GARON Martin, Ph.D., membre

DÉDICACE

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre.

[Aristote]

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Delphine Périé-Curnier pour avoir su me guider à travers ce projet de maîtrise et pour ces judicieux conseils, ces nombreux encouragements, sa disponibilité et ses corrections. Je tiens également à remercier les différentes personnes qui ont travaillé à la réussite du projet. Merci à Irène Londoño pour ces conseils éclairés, à Charlotte Zaouter pour l'aspect biochimique du projet, à Guillaume Guilbert pour son implication et le temps passé à l'IRM et aux co-auteurs pour l'énergie dépensée à la correction et la rédaction des articles.

Je remercie ma famille et mes proches pour le soutien qu'ils ont fait preuve tout au long de mes études.

Un remerciement tout particulier pour le soutien moral, la bonne humeur et l'aide technique de l'équipe de Sainte-Justine : Barthélémy Valteau, Kessen Patten, Bahe Hachem, mais aussi du groupe de recherche du LMBCAO et du laboratoire de mécano-imagerie tissulaire du professeur Delphine Périé-Curnier, notamment Julien Gervais pour avoir eu la patience de me supporter pendant ces deux années.

Ce travail de recherche a été financé en partie par la Chaire de recherche industrielle CRSNG/Medtronic en biomécanique de la colonne vertébrale du Pr CE. Aubin du département de génie mécanique.

RÉSUMÉ

Les pathologies du disque intervertébral étant un problème de santé majeur dans les pays occidentaux, établir des diagnostics précoces par des outils non invasifs est nécessaire. Les premiers signes de dégénérescence s'accompagnent d'un changement du comportement mécanique des disques intervertébraux qui pourrait être détecté par l'imagerie par résonance magnétique (IRM) quantitative. Afin d'estimer les changements mécaniques précoces du disque intervertébral, il est indispensable d'établir de fortes corrélations entre les propriétés mécaniques et les paramètres IRM.

Notre étude se base sur l'hypothèse que l'IRM est sensible aux propriétés mécaniques du disque et que chacune des données mécaniques du disque intervertébral peut enfin être reliée à une combinaison de paramètres IRM.

Pour réaliser les corrélations, les propriétés mécaniques doivent être définies. Or, dans la littérature, les caractéristiques mécaniques sont sujettes à des variations à cause des protocoles utilisés principalement pour la compression non confinée. À cause de l'absence d'études sur le sujet, la première partie du projet a consisté à définir quel protocole mécanique était le plus fiable, et le plus pertinent pour déterminer les propriétés mécaniques de l'annulus fibrosus et du nucléus pulposus. Pour mener à bien cette étude, des disques caudaux bovins ont été testés et des modèles mathématiques (viscoélastique, BPVE) ont été adaptés au type de données expérimentales. Il en résulte que l'annulus et le nucléus doivent être testés selon deux protocoles différents et que l'application d'une précontrainte et d'un gonflement libre avant le test fournit de meilleures données expérimentales. L'application de la précontrainte et le gonflement du tissu permettent de se rapprocher des conditions physiologiques du disque lors du test mécanique.

Dans la littérature, les corrélations entre propriétés mécaniques et paramètres IRM sont modérées, ce qui justifie la réalisation d'une nouvelle étude prenant en considération plus de paramètres mécaniques et des régressions multiples avec les paramètres IRM pour une meilleure compréhension des relations entre le comportement mécanique du disque et l'imagerie. Pour cette étude, des disques intervertébraux ont été extraits des queues de bovins puis digérés ex-vivo par la trypsine. Trois types de digestion ont été réalisés avec des concentrations et des durées différentes, et un groupe in-situ était conservé comme groupe témoin. Ensuite, l'annulus et le nucléus de chaque disque ont été testés par un ensemble de tests mécaniques (compression non

confinée, compression confinée et mesure de la perméabilité) associés à l'imagerie par résonance magnétique et à des essais biochimiques.

L'étude se démarque par la mesure de la perméabilité directe reliée aux acquisitions IRM sur le disque intervertébral. Les acquisitions IRM ont permis d'obtenir les temps de relaxation (T1, T2 et T2*), le ratio du transfert d'aimantation (MTR) et la diffusion (FA et ADC) et les essais biochimiques ont évalué la teneur en protéoglycane des tissus. Les résultats de l'étude ont montré que la digestion a eu un effet sur les propriétés mécaniques et moindrement pour les paramètres IRM. La diffusion a été largement influencée par la digestion, ce qui souligne que l'intégrité de la matrice a été dégradée et non l'ensemble des contenus biochimiques. Cette tendance a été confirmée par les essais biochimiques qui confirment une dégradation nette entre les groupes extrêmes (in situ et digéré 24h) mais moins marquée entre chaque groupe. Les faibles changements des contenus biochimiques expliquent en partie le peu d'effet observé sur le signal IRM. Entre les propriétés mécaniques et IRM, de faibles corrélations directes existent et ainsi que des corrélations multiples modérées, cependant les corrélations directes et multiples sont plus importantes si on ne considère que les groupes extrêmes. Avec les groupes extrêmes, une combinaison des paramètres IRM est capable de prédire 60% des variations des perméabilités radiale et axiale de l'échantillon.

Les essais biochimiques réalisés sur une partie des échantillons (24 par tissus) ont permis d'apprécier qualitativement l'effet de la digestion sur les différents groupes. Pour pallier les incertitudes amenées par les outils de mesure des contenus biochimiques, des coupes histologiques ont été réalisées afin d'obtenir un aperçu qualitatif et quantitatif des contenus biochimiques. Quelques limites peuvent être apportées à l'étude, notamment au niveau de la digestion, car l'effet de l'hydratation et de l'activité enzymatique sur les paramètres mécaniques et IRM n'a pas été clairement identifiée.

Notre recherche fondamentale a permis d'une part de mieux comprendre le comportement mécanique du disque grâce à l'étude sur l'influence des protocoles expérimentaux sur la réponse mécanique du disque et d'autre part de contribuer au développement d'un outil de diagnostic à partir des corrélations IRM-mécanique. Cette étude peut servir de base de comparaison avec une étude similaire sur le comportement dynamique des disques accompagnée de l'utilisation de nouvelles séquences IRM comme le CEST (Chemical exchange saturation transfer) ou le T1p.

ABSTRACT

Intervertebral disc pathologies are a major health problem in occidental countries and thus the use of early non-invasive diagnostic tool is necessary. The first signs of intervertebral discs (IVD) degeneration is a change in their mechanical behavior and this can be detected by quantitative magnetic resonance imaging (MRI). To assess the early mechanical changes in the IVD, it is essential to establish strong correlations between mechanical properties and MRI parameters.

The hypothesis of our study is that MRI parameters are sensitive to changes in IVD mechanical properties and that each mechanical parameter will be strongly correlated to a set of MRI parameters.

To investigate correlations between the two parameters, mechanical properties need to be defined; however, several reports have shown that mechanical properties vary accordingly to the protocols used principally in unconfined compression. Therefore, the first part of this project consisted in defining the most reliable and the most relevant protocol to assess the mechanical properties of the annulus fibrosus and the nucleus pulposus. To this aim, caudal bovine discs were tested and mathematical models (viscoelastic, BPVE) were suited to the experimental data. The results showed that annulus and nucleus should not be tested with the same protocol, and the best experimental data were obtained with a pre-loading and a swelling of the sample. The pre-load and the swelling represent the closer physiological conditions of the disc during the mechanical test. In the literature, mechanical properties correlate moderately to MRI parameters, therefore there is a need for studying more mechanical parameters and multi-linear regression with MRI parameters for a better understanding of the relationships between the mechanical and MRI properties of the disc. Isolated discs were digested by trypsin in an ex-vivo condition. Discs digestion was performed by three different ways with varying trypsin concentrations and time of digestion, and an in-situ group was used as a control. Then, the annulus and the nucleus for each disc were subjected to a set of mechanical tests (unconfined, confined, and direct measure of permeability) associated with the MRI and biochemical assays (proteoglycan content). The novelty of the study is that the direct permeability measurement is related to MRI acquisitions of the intervertebral discs. MRI parameters used were the relaxation times (T_1 , T_2 , T_2^*), the magnetization transfer ratio (MTR) and the diffusion (FA and ADC) and the biochemical assays

were used to investigate the proteoglycan content of tissues. Results showed that enzymatic digestion influences the mechanical properties of the disc and lower their MRI parameters. The diffusion was strongly influenced by the digestion; thus suggesting a degradation of the matrix integrity rather than changes in the biochemical contents. Biochemical assays on the disc further confirmed a clear degradation between extreme groups (in-situ and 24h digestion) but less prominent and important within each group. The low content of biochemical changes partly explains the little effect observed on the MRI signal. Weak direct correlations exist as well as moderate multiple correlations, however, direct and multiple correlations are greater if only the extreme groups are considered. With the extreme groups, a combination of MRI parameters can predict 60% variations of radial and axial permeability of the samples.

Biochemical tests performed on several samples (24 per tissue) were used to qualitatively assess the effect of enzymatic digestion on the different groups. To overcome the uncertainty of the biochemical measuring assay, histological sections were carried out to further analyse the qualitative and quantitative biochemical content of the discs. The limits of this study are that the effect of hydration and enzyme activity on the discs' MRI and mechanical parameters were not clearly identified.

Our fundamental research, on the one hand, helps to a better understand the mechanical behavior of the intervertebral disc thanks to the study of the influence of experimental protocols on the mechanical response of the disc and on the other hand our study contributes to the development of a diagnostic tool from MRI-mechanical correlations. This study should be used to be compared with a similar study on the dynamic behavior of the disc with the use of new MRI sequences such as CEST (Chemical exchange saturation transfer) or T1 ρ (spin-lock magnetic resonance imaging).

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| DÉDICACE..... | III |
| REMERCIEMENTS | IV |
| RÉSUMÉ..... | V |
| ABSTRACT | VII |
| TABLE DES MATIÈRES | IX |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XII |
| LISTE DES FIGURES..... | XIII |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | XVI |
| LISTE DES ANNEXES..... | XVII |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE | 2 |
| 1.1 Anatomie du disque intervertébral | 2 |
| 1.1.1 Le rachis | 2 |
| 1.1.2 Nucléus pulposus..... | 3 |
| 1.1.3 Annulus fibrosus | 4 |
| 1.1.4 Dégénérescence du disque intervertébral | 4 |
| 1.1.5 Méthodes de dégénérescence « artificielle »..... | 8 |
| 1.2 Essais mécaniques | 10 |
| 1.2.1 Tests en compression non confinée..... | 10 |
| 1.2.2 Tests en compression confinée..... | 21 |
| 1.2.3 Mesure de la perméabilité | 26 |
| 1.3 Imagerie par résonnance magnétique (IRM)..... | 31 |
| 1.3.1 Présentation IRM..... | 31 |

| | | |
|------------|---|----|
| 1.3.2 | Corrélations entre paramètres IRM et composants biochimiques..... | 39 |
| 1.3.3 | Corrélations entre paramètres IRM et propriétés mécaniques | 43 |
| CHAPITRE 2 | OBJECTIFS-HYPOTHESES..... | 45 |
| CHAPITRE 3 | TESTS MÉCANIQUES –PRÉSENTATION ARTICLE N°1..... | 47 |
| 3.1 | Présentation de l'article:..... | 47 |
| 3.2 | Article n°1: Influence of experimental protocols on the mechanical properties of the intervertebral disc in unconfined compression..... | 47 |
| 3.2.1 | Abstract | 49 |
| 3.2.2 | Introduction | 49 |
| 3.2.3 | Methods..... | 51 |
| 3.2.4 | Results | 53 |
| 3.2.5 | Discussion | 55 |
| 3.2.6 | Conclusion..... | 58 |
| 3.2.7 | Acknowledgements | 59 |
| 3.2.8 | References | 59 |
| 3.2.9 | Figures and tables..... | 62 |
| CHAPITRE 4 | CORRÉLATION PROPRIÉTÉS MÉCANIQUE ET IRM – PRÉSENTATION ARTICLE N°2..... | 65 |
| 4.1 | Présentation de l'article :..... | 65 |
| 4.2 | Article n°2: Assessment of mechanical properties of isolated intervertebral discs using quantitative Magnetic Resonance Imaging | 65 |
| 4.2.1 | Abstract | 67 |
| 4.2.2 | Introduction | 68 |
| 4.2.3 | Methods..... | 70 |
| 4.2.4 | Results | 74 |

| | | |
|--|---|-----|
| 4.2.5 | Discussion | 76 |
| 4.2.6 | Conclusion..... | 78 |
| 4.2.7 | Acknowledgements | 78 |
| 4.2.8 | References | 78 |
| 4.2.9 | Figures and tables..... | 83 |
| CHAPITRE 5 COMPLÉMENT SUR LES TESTS DE COMPRESSION ET LA MESURE DE LA PERMÉABILITÉ | | 86 |
| 5.1.1 | Modèles mathématiques utilisés en compression non confinée..... | 86 |
| 5.1.2 | Conception des montages expérimentaux | 86 |
| 5.1.3 | Protocole de perméabilité..... | 89 |
| CHAPITRE 6 COMPLÉMENT PROTOCOLE DE DIGESTION | | 92 |
| CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE | | 98 |
| CONCLUSION | | 102 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 104 |
| ANNEXES | | 114 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1-1 : Grades de Thompson, avec leurs définitions cliniques..... | 6 |
| Tableau 1-2: Classification de Pfirrmann [9] | 6 |
| Tableau 1-3 : Variation du contenu en eau, GAG, collagène selon les grades de Thompson selon l'étude de Antoniou et al. [10]..... | 9 |
| Tableau 1-4 : Valeur de perméabilités pour le cartilage selon le modèle mathématique..... | 20 |
| Tableau 1-5 : Valeur pour le module d'agrégat et la perméabilité selon la littérature | 25 |
| Tableau 1-6 : Valeurs de perméabilité mesurées pour l'annulus fibrosus de disques humains dans les 3 directions [42]..... | 30 |
| Tableau 1-7: Temps de relaxation typique pour certains organes humains | 35 |
| Tableau 1-8 : Principales corrélations entre les propriétés IRM et les composants biochimiques | 39 |
| Tableau 1-9: Variation du T2-mapping selon les grades de dégénérescence dans l'AP et le NP du disque intervertébral [73] | 40 |
| Tableau 1-10 : Principales corrélations entre les propriétés mécaniques et IRM | 44 |
| Table 3-1: Table 1 - Protocols used for the unconfined compression experiments | 62 |
| Table 4-1: Table 1: Pearson correlation results between MR and mechanical parameters. The first line is the coefficient of correlation and the second the p value: | 83 |
| Table 4-2: Table 2: Multiple linear regressions between MR and mechanical parameters for NP and AF. The first line is the coefficient of determination and the second the p value: | 83 |
| Tableau 6-1: Résumé des groupes de digestion | 92 |
| Tableau 6-2: Coupes histologiques pour AF et NP..... | 96 |
| Tableau 6-3: Exemple d'analyse de coupes histologiques pour le NP | 97 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1-1: Représentation du rachis [1]..... | 2 |
| Figure 1-2: Unité fonctionnelle du rachis: 1 disque intervertébral entre 2 corps vertébraux [1]..... | 2 |
| Figure 1-3: Composition du disque adapté de Jongeneelen [1] | 3 |
| Figure 1-4: Avec l'augmentation de la dégénérescence, la limite entre le nucleus et l'annulus devient de moins en moins nette : le disque perd son contenu en eau et de sa hauteur. Avec des grades supérieurs, la perte de l'organisation dans l'annulus devient observable [7]..... | 5 |
| Figure 1-5: Disque sain (à gauche), disque dégénéré (à droite)[3] | 5 |
| Figure 1-6: Photographie de 3 dissections d'IVD avec des grades de Thompson différents, pour le grade 1 le NP est gonflé et la frontière NP-AF est nette, alors que pour le grade 5, le disque est atrophié, la frontière NP-AF n'est pas claire et il y a présence d'une hernie [8] | 5 |
| Figure 1-7: Les images IRM pondérées en T1 et en T2 montrent les variations du signal IRM, les flèches pointent les pathologies (Majumdar, Thomasson et al. 1991) | 7 |
| Figure 1-8: Montage expérimental en compression non confinée, l'échantillon est placé dans une solution saline et est compressé par un plateau de chargement relié à une cellule de charge. La compression axiale engendre une déformation radiale de l'échantillon | 10 |
| Figure 1-9: Conditions de pré-test : exemples de gonflement et de déformation appliqués avant la réalisation du test mécanique..... | 12 |
| Figure 1-10: Répétition d'un chargement de contrainte/relaxation. La force de réaction augmente brutalement lors de l'application de la déformation (pic de contrainte), puis le tissu se relaxe pendant le maintien de la déformation. | 13 |
| Figure 1-11 : Montage expérimental en compression confinée, l'échantillon est placé dans une chambre confinée et est compressé par l'intermédiaire d'un filtre poreux relié à un plateau de chargement et à une cellule de charge. | 21 |
| Figure 1-12: Montage pour la mesure de la perméabilité selon Heneghan et al.[2] | 27 |
| Figure 1-14: Antenne de tête..... | 32 |

| | |
|---|----|
| Figure 1-13: Installation IRM | 32 |
| Figure 1-16: Orientation aléatoire des spins dans l'espace | 33 |
| Figure 1-15: Spin d'un atome d'Hydrogène et décomposition du moment magnétique | 33 |
| Figure 1-17: Orientation des spins selon le champ B0 : la résultante magnétique est dans le sens du champ B0, car il y a plus de spins parallèles qu'antiparallèles | 33 |
| Figure 1-18: Retour à l'équilibre du spin après une perturbation (RF à 90°) | 34 |
| Figure 1-19: Relaxation de la composante T1 | 34 |
| Figure 1-20: Relaxation en T2 et calcul du T2* après l'impulsion à 180° | 35 |
| Figure 1-21: Spectre de fréquence pour les liaisons collagène-proton, la première impulsion sature les protons liés [66]..... | 36 |
| Figure 1-22: La première image est réalisée sans saturation (signal émis des protons liés et non liés), la deuxième image est saturée (signal émis que par les protons libres), ainsi la différence (3ième image) ne représente que le signal des protons liés, donc des macromolécules liées [66]..... | 36 |
| Figure 1-23: Tenseur de diffusion calculé..... | 37 |
| Figure 3-1: Fig. 1- Initial swelling condition: no swelling, semi-confined swelling and free swelling | 62 |
| Figure 3-2: Fig. 2: Effect of preload on the experimental data (blue curves) and theoretical fitting from BPVE model (red curves). Typical stress relaxation data obtained from protocols without preload (left graph) and protocols with preload (right graph)..... | 62 |
| Figure 3-3: Fig. 3: Results for the Annulus Fibrosus, a- Coefficients of determination for all protocols, b- Young's modulus E (in kPa) calculated by the viscoelastic model for all protocols, c- Permeability k (in $m^4/Ns \times 10^{-14}$) calculated by the BPVE model for all protocols. | 63 |
| Figure 3-4: Fig. 4: Results for the Nucleus Pulposus, a- Determination coefficients for all protocols, b- Young's modulus E (in kPa) calculated by the viscoelastic model for | |

| | |
|--|----|
| all protocols, , c- Permeability (in $\text{m}^4/\text{Ns} \times \text{e}^{-14}$) calculated by the BPVE model for all protocols. | 64 |
| Figure 4-1: Fig. 1: Experimental setup to measure the axial permeability. | 84 |
| Figure 4-2: Fig. 2: Mechanical parameters variations between in-situ group and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ | 84 |
| Figure 4-3: Fig. 3: MRI parameters variations between in-situ group and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue: digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ | 85 |
| Figure 4-4: Fig. 4: Biochemical contents variations between in-situ and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue: digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ | 85 |
| Figure 5-1 : Chambre compression confiné : (gauche) vue isométrique, (droite) vue en coupe avec la position de l'échantillon | 88 |
| Figure 5-2: Chambre de perméabilité : (gauche) aperçu du modèle 3D, (à droite) vue en coupe avec la position de l'échantillon | 88 |
| Figure 5-3 : Schéma du système de mesure de la perméabilité, l'échantillon (en rouge) est placé entre deux filtres poreux – étape1 : mise sous pression du système, étape2 : application d'une contrainte, étape3 : faible débit ajusté manuellement. | 90 |
| Figure 5-4 : Mesure directe de la perméabilité en $\cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ | 91 |
| Figure 6-1: Concentration en PG dans l'IVD normalisée par le poids de l'échantillon [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{g}$] . | 94 |
| Figure 6-2: Essai de répétabilité: concentration de PG dans l'AF..... | 95 |
| Figure 6-3: Essai de répétabilité: concentration de PG dans le NP..... | 95 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Sigles et abréviations présents dans le mémoire :

| | |
|-----------------|-----------------------------------|
| IVD | Disque intervertébral |
| NP | Nucléus pulposus |
| AF | Annulus fibrosus |
| Er | Module de relaxation |
| H _{A0} | Module d'agrégat |
| k | Perméabilité |
| kr | Perméabilité radiale |
| ka | Perméabilité axiale |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| RF | Radio fréquence |
| ROI | Région d'intérêt |
| T1 | Temps de relaxation longitudinal |
| T2 | Temps de relaxation transverse |
| TI | Temps d'inversion |
| TE | Temps d'écho |
| MTR | Ratio du transfert d'aimantation |
| FA | Fraction d'anisotropie |
| ADC | Coefficient apparent de diffusion |
| DWI | Diffusion weighted imaging |
| DTI | Diffusion tensor imaging |
| PG | Protéoglycane |
| GAG | Glycosaminoglycane |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| ANNEXE 1 – Plan assemblage 202 : Vue éclaté du montage | 114 |
| ANNEXE 2 – Plan sous assemblage 301 : Support filtre | 115 |
| ANNEXE 3 – Plan sous assemblage 302 : Chambre perméabilité | 116 |
| ANNEXE 4 – Mise en plan 401 : Chambre perméabilité | 117 |
| ANNEXE 5 – Mise en plan 411 : Chambre compression confinée | 118 |
| ANNEXE 6 – Mise en plan 402 : Support filtre | 119 |
| ANNEXE 7 – Mise en plan 405 : Plaque support..... | 119 |
| ANNEXE 8 – Protocole expérimental 101 : expérience générale | 120 |
| ANNEXE 9 – Protocole expérimental 201 : Dissection | 124 |
| ANNEXE 10 – Protocole expérimental 202 : Dégénérescence | 126 |
| ANNEXE 11 – Protocole expérimental 203 : DMMB | 128 |
| ANNEXE 12 – Protocole expérimental 204 : Acquisition IRM..... | 131 |
| ANNEXE 13 – Protocole expérimental 205 : Hydroxyproline..... | 134 |
| ANNEXE 14 – Protocole expérimental 206 : Compression non confinée | 137 |
| ANNEXE 15 – Protocole expérimental 207 : Compression confinée | 142 |
| ANNEXE 16 – Protocole expérimental 208 : Mesure directe de la perméabilité..... | 146 |
| ANNEXE 17 – Résultats complémentaires à l'article n°2 avec l'ensemble des groupes : Propriétés mécaniques..... | 152 |
| ANNEXE 18 – Résultats complémentaires à l'article n°2 avec l'ensemble des groupes : Paramètre IRM | 153 |
| ANNEXE 19 – Autres paramètres mécaniques complémentaires | 154 |

INTRODUCTION

Les maladies dégénératives du dos sont une importante cause de consultation parmi les maladies musculo-squelettiques et les pathologies liées au disque intervertébral (IVD) en sont une des principales sources. La dégénérescence du disque intervertébral est devenue un problème majeur de santé publique dans les sociétés occidentales ayant un impact social et économique très important. Actuellement il est très difficile voir impossible de connaître l'état mécanique d'un IVD avant de procéder à une discectomie ou à un traitement thérapeutique ce qui complique la tâche des praticiens. Connaître l'état mécanique de l'IVD apporterait une information précieuse aux cliniciens dans leur prise de décision. Ainsi, la recherche de diagnostic précoce, rapide et non invasif est indispensable pour prévenir ces maladies et pour assurer un suivi de l'évolution des pathologies. La réalisation d'un tel outil de diagnostic nécessite une recherche fondamentale afin d'acquérir une bonne connaissance de l'évolution du comportement mécanique des tissus couplé à un outil d'imagerie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) s'impose comme l'outil de prédilection pour le diagnostic précoce non invasif.

Les premiers signes de dégénérescence s'accompagnent d'un changement du comportement mécanique de l'IVD qui est lui-même caractérisé par différents tests mécaniques (traction, torsion, compression, perméabilité...). Cependant, la littérature n'est pas unanime sur le protocole de mesure des caractéristiques mécaniques par les tests de compression non confinée. Le comportement mécanique est modérément corrélé aux paramètres IRM quantitatifs et peu d'études ont cherché à établir des corrélations linéaires multiples, et certains paramètres mécaniques comme la perméabilité directe n'ont jamais été corrélés aux paramètres IRM.

Le premier objectif du projet portait sur la détermination d'un protocole fiable et précis pour l'évaluation du comportement mécanique du disque en compression non confinée, et le second objectif avait pour but de déterminer les relations entre les propriétés mécaniques déterminées par des tests mécaniques (compression confinée, non confinée et mesure de perméabilité) et les paramètres IRM de disques isolés sains ou préalablement digérés par une enzyme.

Une revue critique de la littérature a été réalisée afin de présenter l'ensemble des connaissances acquises sur le sujet et qui a permis de mieux définir les objectifs du projet. Les travaux répondants aux objectifs sont présentés par deux articles suivis de chapitres de compléments d'informations sur les expériences et résultats non présentés dans les articles. Enfin, dans la dernière partie, les limites et les recommandations du projet sont discutées.

CHAPITRE 1 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Anatomie du disque intervertébral

1.1.1 Le rachis

La colonne vertébrale supporte l'ensemble du squelette humain et est composée de 33 vertèbres (cf. Figure 1-1). Entre chaque vertèbre se trouve le disque intervertébral qui a trois principales fonctions : garder les vertèbres liées entre elles, absorber les chocs et les charges axiales, permettre la flexibilité de la colonne.

Le disque intervertébral est essentiellement composé de fibre de collagènes, et de protéoglycanes (PG), il représente la plus grande partie non vascularisée et sans terminaison nerveuse du corps humain. Sur les faces supérieure et inférieure du disque se trouvent les plateaux vertébraux qui permettent son alimentation en diffusant les nutriments vers le centre du disque (cf. Figure 1- 2).

Le disque est divisé en trois parties : la partie centrale appelée nucléus pulposus, l'annulus fibrosus interne et l'annulus fibrosus externe qui encerclent le nucléus. Les trois parties du disque sont constituées, dans des proportions différentes, de protéoglycanes, de collagènes, de chondrocytes, d'eau et de composants mineurs comme les fibronectines, lumicanes...[3]. Les disques sont moins denses que les autres tissus articulaires et ils se dégénèrent également plus rapidement [1].

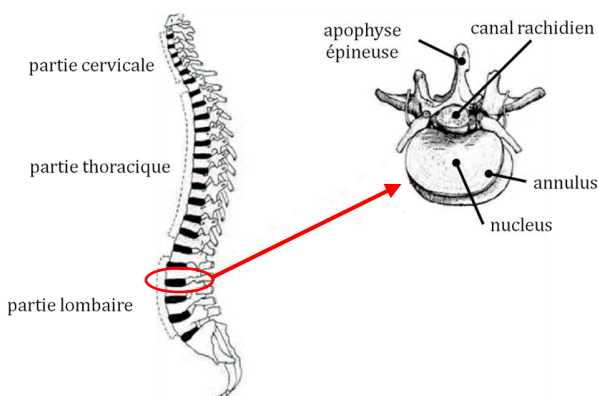


Figure 1-1 : Représentation du rachis [1]

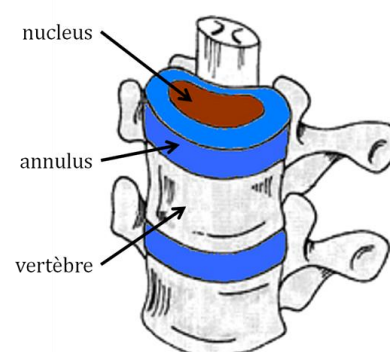


Figure 1-2 : Unité fonctionnelle du rachis: 1 disque intervertébral entre 2 corps vertébraux [1]

1.1.2 Nucléus pulposus

Le nucléus pulposus (NP) est la partie centrale gélatineuse et visqueuse du disque. Elle est composée de protéoglycanes (50% du nucléus sec) [4], d'eau et de collagène (15 à 20% du nucléus sec). Un mélange de protéoglycanes et d'eau forme une matrice gélatineuse isotrope qui s'entremêle de manière aléatoire dans le réseau de fibres de collagène (essentiellement de type II). Le collagène est une hélice triple de protocollagène pouvant se combiner de manières différentes pour former différents types de collagène. Dans le nucléus on retrouve du collagène du type II, VI, IX, XI.

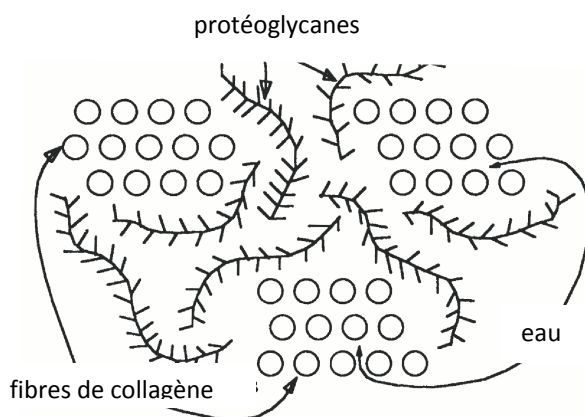


Figure 1-3: Composition du disque adapté de Jongeneelen [1]

Les protéoglycanes sont formés d'agrégats de sulfate de chondroïtine et de sulfate de keratine glycosaminoglycane qui sont attachés à une cellule principale. A leur tour, les protéoglycanes forment des agrégats appelés aggrécans, qui attachées avec l'acide hyaluronique forme un agrégat qui interagit avec le collagène de type II, ce qui permet au nucléus de garder sa pression osmotique [5, 6]. Les charges négatives des protéoglycanes sont responsables de la pression osmotique. Le nucléus transmet les efforts mécaniques grâce notamment à cette pression hydrostatique. L'eau représente environ 70 à 90 % du poids. Le nucléus contient à la fois des fibrocytes et principalement des chondrocytes.

1.1.3 Annulus fibrosus

L'annulus fibrosus (AF) est un puissant anneau fibreux dans la partie périphérique du disque. Il se divise en deux parties : l'annulus externe et l'annulus interne qui est en contact avec le nucléus. Il a une structure hétérogène anisotrope. L'annulus est composé d'une série de 15 à 40 couches successives, composées de fibres de collagènes inclinées de 28 à 43° par rapport au plan transversal de la colonne vertébrale [6]. Cette disposition permet à l'annulus de résister aux charges de tension, et à la pression radiale transmise par le nucléus lorsque celui-ci est en compression. L'annulus est attaché au nucléus et aux plateaux vertébraux, ce qui permet de créer un lien fort entre deux vertèbres. La proportion de collagène n'est pas régulière dans l'annulus : plus on s'éloigne du centre du disque, plus le collagène est présent [5]. Le type de collagène présent dans l'annulus est semblable à celui du cartilage ou des tissus fibreux comme les tendons, c'est à dire du type I, II, III, V, VI, IX, XI. [5]. Similairement au collagène, la concentration en protéoglycanes (20 à 30%) diminue également lorsqu'on s'éloigne du centre du disque [1]. La forte présence de collagène a pour effet de rendre l'annulus moins perméable que le nucléus. L'annulus est composé de fibroblastes et de chondrocytes. Les cellules sont allongées et alignées avec les fibres de collagènes dans la matrice extracellulaire.

1.1.4 Dégénérescence du disque intervertébral

Pour un disque sain, la frontière entre l'annulus et le nucléus est plutôt bien visible comme le montre la Figure 1-4. Par contre, dans un disque dégénéré, la frontière devient de moins en moins évidente, le nucléus devient fibreux et perd son homogénéité. Le disque change de morphologie et se désorganise. Les nerfs et le réseau sanguin sont aussi dégénérés dans la zone proche du disque. Cette dégénérescence se traduit par l'apparition de cellules mortes, nécrosées [7].

La dégénérescence est classifiée en cinq grades de Thompson selon les observations cliniques et en quatre grades de Pfirrmann selon l'imagerie par résonnance magnétique (IRM). Le grade 1 de Thompson indique une faible dégénérescence alors que le grade 5 de Thompson indique une très forte dégénérescence du disque. Les **Error! Reference source not found.** à Figure 1-6 et le Tableau 1-1 présentent les différents grades de Thompson.

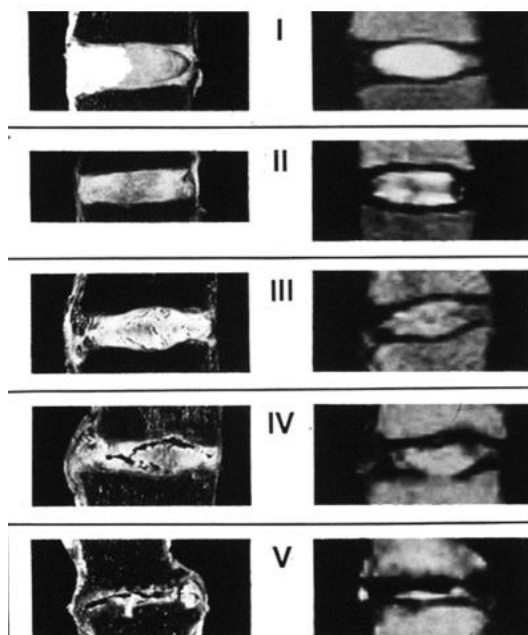


Figure 1-4: Avec l'augmentation de la dégénérescence, la limite entre le nucleus et l'annulus devient de moins en moins nette : le disque perd son contenu en eau et de sa hauteur. Avec des grades supérieurs, la perte de l'organisation dans l'annulus devient observable [7]

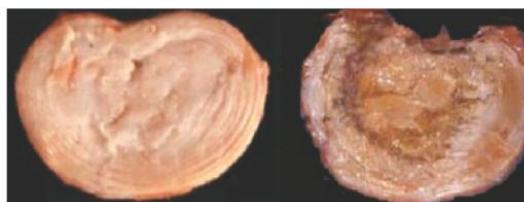


Figure 1-5: Disque sain (à gauche), disque dégénéré (à droite)[3]

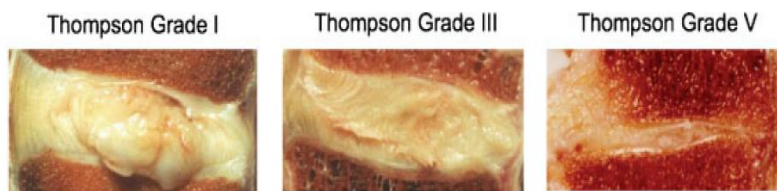


Figure 1-6: Photographie de 3 dissections d'IVD avec des grades de Thompson différents, pour le grade 1 le NP est gonflé et la frontière NP-AF est nette, alors que pour le grade 5, le disque est atrophie, la frontière NP-AF n'est pas claire et il y a présence d'une hernie [8]

Tableau 1-1 : Grades de Thompson, avec leurs définitions cliniques

| <i>Grade</i> | <i>Nucléus</i> | <i>Annulus</i> | <i>Plateau</i> | <i>Corps vertébral</i> |
|--------------|---|---|---|--|
| <i>I</i> | <i>Tissu gonflé</i> | <i>Lamelles fibreuses distinctes</i> | <i>Hyalin, d'épaisseur uniforme</i> | <i>Bords arrondis</i> |
| <i>II</i> | <i>Tissu fibreux blanc périphérique</i> | <i>Matière mucoïde entre les lamelles</i> | <i>Épaisseur irrégulière</i> | <i>Bords pointus</i> |
| <i>III</i> | <i>Tissu fibreux consolidé</i> | <i>Importante infiltration de mucoïde ; perte de la démarcation annulus-nucléus</i> | <i>Anomalie locale dans le cartilage</i> | <i>Premier signe de chondrophytes ou ostéophytes sur les bords</i> |
| <i>IV</i> | <i>Fissure horizontale aux plateaux</i> | <i>Dissociation locale</i> | <i>Fibrocartilage s'étend depuis l'os sous-chondral ; irrégularité et sclérose locale dans l'os sous-chondral</i> | <i>Ostéophytes de moins de 2mm</i> |
| <i>V</i> | <i>Fissures étendues dans NP et AF</i> | | <i>Sclérose répandue</i> | <i>Ostéophytes de plus de 2mm</i> |

Les stades de dégénérescence ont également été classés selon les images IRM pondérées en T2 (temps de relaxation transverse), c'est la classification de Pfirrmann. Les disques avec un stade avancé de dégénérescence sont en hyposignal sur les images en T2 comme le montre la Figure 1-7 ; on parle de disque noir. La classification de Pfirrmann est résumée dans la table ci-dessous :

Tableau 1-2: Classification de Pfirrmann [9]

| <i>Grade</i> | <i>Structure</i> | <i>Distinction NP-AF</i> | <i>Intensité du signal</i> | <i>Hauteur de l'IVD</i> |
|--------------|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>I</i> | <i>Homogène, blanc lumineux</i> | <i>Claire</i> | <i>Hyperintensité</i> | <i>Normal</i> |
| <i>II</i> | <i>Inhomogène, avec ou sans bandes horizontales</i> | <i>Claire</i> | <i>Hyperintensité</i> | <i>Normal</i> |
| <i>III</i> | <i>Inhomogène, gris</i> | <i>Pas nette</i> | <i>Intermédiaire</i> | <i>Normal à légèrement diminuée</i> |
| <i>IV</i> | <i>Inhomogène, gris ou noir</i> | <i>Pas nette</i> | <i>Intermédiaire à hypo-intensité</i> | <i>Normal à modérément diminuée</i> |

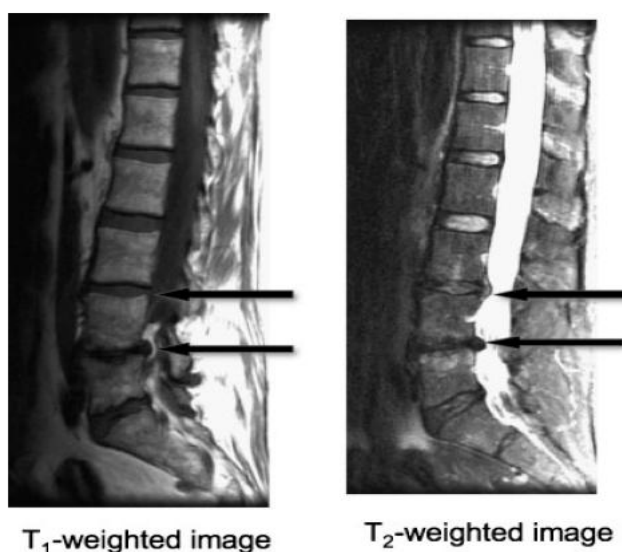


Figure 1-7: Les images IRM pondérées en T1 et en T2 montrent les variations du signal IRM, les flèches pointent les pathologies (Majumdar, Thomasson et al. 1991)

Au niveau biochimique, la dégénérescence se traduit par une perte des protéoglycanes. Les molécules d'agrégat se dégradent en petits fragments qui se détachent du tissu, ce qui a comme conséquence de faire chuter la pression osmotique de la matrice et d'entraîner une perte de l'hydratation du disque. Il y a aussi une perte de collagène mais dans une moindre mesure. Le collagène subit un changement de structure principalement pour le collagène de type II qui se désorganise. La structure en triple hélice du collagène se dénature et casse à cause de l'activité enzymatique [10]. L'activité enzymatique peut permettre de simuler la dégénérescence naturelle du tissu, car elle contribue à désorganiser les molécules comme le collagène, les protéoglycanes et les fibronectines.

Le contenu en fibronectine est également un signe de dégénérescence car plus le niveau de dégénérescence est important, plus son contenu augmente et plus sa forme se fragmente. Dans un disque sain, il y a équilibre entre une dégradation continue des protéines par des enzymes (métalloprotéinase ou l'agrécane) et de leur synthèse par les cellules du disque. Cet équilibre est garant de la qualité et de l'intégrité de la matrice du disque, et par conséquent des propriétés mécaniques intrinsèques du disque. [3]. L'augmentation de la présence de fibronectine perturbe l'équilibre de la matrice en diminuant la synthèse d'agrégat et en augmentant la production de métalloprotéinase.

La dégénérescence du disque modifie ses propriétés mécaniques. Avec la perte de protéoglycanes, la pression osmotique chute et le disque n'est plus capable de contenir l'eau sous l'effet d'une charge [11]. Avec un chargement, le disque s'écrase plus que normalement et perd plus rapidement son contenu en eau. Un autre effet lié à la perte de protéoglycanes est une distribution des contraintes modifiée au niveau de l'annulus et des plaques de cartilage.

Le changement des propriétés du disque a une forte influence sur la structure globale de la colonne. Les disques arthrosés supportent moins bien les efforts et ils perdent rapidement de la hauteur, alors dans certains cas les apophyses peuvent entrer en contact causant des douleurs. Cette perte de hauteur réduit la force de tension du ligament flavum, avec pour conséquence la perte de l'élasticité du ligament et son gonflement dans le canal rachidien menant à une sténose [3].

1.1.5 Méthodes de dégénérescence « artificielle »

1.1.5.1 Digestion

La digestion a pour but d'altérer les propriétés d'origine des tissus afin de simuler des pathologies ou de détecter l'effet d'une protéine en particulier.

Les tissus peuvent être digérés par différentes enzymes. Certaines études utilisent une seule enzyme avec un large spectre d'action, la trypsine par exemple [12], alors que d'autres ciblent les molécules à détériorer [13]. Antoniou et al. utilise dans son étude de la collagénase, de la trypsine et de la hyaluronidase [13]. Les enzymes sont directement injectées dans le NP d'une queue de bovin à une concentration de 5mg dissous dans 40µL de 50 mmol/l Tris contenant 1 mmol/l de tampon CaCl₂ à un Ph de 7.1. La collagénase a pour rôle de couper les protéines de collagène ce qui va augmenter la concentration de collagène dénaturé et changer la structure de la matrice [13, 14]. La trypsine, une protéase mammifère (souvent de la trypsine pancréatique bovine), catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques du côté carboxyle des résidus lysyl (résidu de la lysine) et arginyl. Cette protéine coupe le noyau de la protéine des protéoglycans [14]. La trypsine n'a que très peu d'effet sur le collagène [13]. Le traitement à la trypsine diminue le contenu en PG et réduit la pression osmotique [11, 12, 15]. La hyaluronidase clive les liaisons glycosidiques dans les chaînes de hyaluronates et de chondroïtine dans la molécule de protéoglycane [14]. La chondroitinase ABC est aussi utilisée pour dégrader les

glycosaminoglycanes se trouvant dans les protéoglycanes, précisément les chaînes de chondroïtine et de dermatane sulfate [16].

Le contenu en PG dans le NP diminue dans les disques dégénérés [14], et on observe que cette diminution est plus locale dans l'annulus. Le taux de GAG diminue avec l'âge et le grade de dégénérescence du patient seulement dans l'annulus antérieur. Le collagène reste constant dans le NP et chute dans l'AF antérieur. Bien que le contenu de collagène reste constant dans le NP, le contenu total des protéines et de collagène a grandement augmenté, suggérant que des tentatives de réparation ont eu lieu dans le NP dégénéré. [10]

Tableau 1-3 : Variation du contenu en eau, GAG, collagène selon les grades de Thompson selon l'étude de Antoniou et al. [10]

| Disc region | H ₂ O (%) | GAG ($\mu\text{g}/\text{mg dw}^*$) | Total collagen ($\mu\text{g}/\text{mg dw}^*$) | Denatured collagen (%) | Protein ($\mu\text{g}/\text{mg dw}^*$) |
|--------------|------------------------|--------------------------------------|---|------------------------|--|
| Nucleus | | | | | |
| Grade 2 | $82.7 \pm 4.2^\dagger$ | $622 \pm 152^\dagger$ | 18 ± 9 | $9.0 \pm 3.3^\S$ | $286 \pm 67^\P$ |
| Grade 3 | 78.7 ± 4.5 | $384 \pm 207^\ddagger$ | 29 ± 15 | 5.7 ± 3.7 | $434 \pm 196^\P$ |
| Grade 4 | 76.3 ± 5.0 | 230 ± 204 | 27 ± 9 | 6.1 ± 3.8 | 596 ± 248 |
| Grade 5 | 75.0 ± 1.4 | 86 ± 42 | 24 ± 1 | 9.5 ± 4.2 | 501 ± 174 |
| Anterior AF | | | | | |
| Grade 2 | 68.2 ± 3.2 | $179 \pm 45^\dagger$ | $77 \pm 8^\ddagger$ | 3.1 ± 1.0 | 564 ± 341 |
| Grade 3 | 69.7 ± 3.8 | $123 \pm 43^{**}$ | $77 \pm 19^\ddagger$ | 3.2 ± 3.8 | 506 ± 126 |
| Grade 4 | 69.6 ± 3.2 | 101 ± 42 | $60 \pm 21^{**}$ | 2.9 ± 1.7 | 508 ± 114 |
| Grade 5 | 68.0 ± 1.2 | 57 ± 31 | 32 ± 22 | 4.2 ± 1.7 | 501 ± 120 |
| Posterior AF | | | | | |
| Grade 2 | 72.8 ± 4.2 | 260 ± 51 | 72 ± 27 | $5.2 \pm 0.8^{**}$ | 434 ± 111 |
| Grade 3 | 75.2 ± 5.3 | 274 ± 196 | 69 ± 24 | $4.4 \pm 2.8^{**}$ | 479 ± 151 |
| Grade 4 | 72.7 ± 1.7 | 218 ± 267 | 86 ± 113 | 5.0 ± 3.6 | 603 ± 224 |
| Grade 5 | 72.5 ± 0.7 | 129 | 38 | 12.3 | 424 |

1.1.5.2 Sollicitation mécanique

Une autre méthode pour dégénérer les tissus est de leur faire subir un chargement cyclique. L'étude de Mwale et al. suggère d'appliquer un chargement mécanique cyclique car il a un plus grand effet sur les paramètres IRM que la trypsine (augmentation de T1 et T1 ρ , et diminution du MTR). Cependant, un traitement enzymatique par la trypsine produit plus de changements sur les propriétés mécaniques que le chargement mécanique (pression osmotique, perméabilité et module de compression) [14].

La sollicitation mécanique permet aussi une meilleure évacuation des résidus issus de la dégradation vers l'extérieur.

1.2 Essais mécaniques

Les caractéristiques intrinsèques des tissus peuvent être déterminées de différentes manières. Il existe les tests de compression confinée, non confinée et par indentation. Cette étude portera sur les tests en compression non confinée, en compression confinée et de mesure de la perméabilité.

1.2.1 Tests en compression non confinée

Les tests mécaniques en compression non confinée sont de manière générale les premiers tests que les équipes de chercheurs réalisent afin de connaître le comportement mécanique du tissu. Les essais mécaniques en compression non confinée sont des expériences plus faciles à réaliser que les tests en compression confinée car le montage est plus simple et moins compliqué à ajuster. Il existe deux types de test mécanique, un test en relaxation de contrainte et un test de fluage. Un test en relaxation de contrainte repose sur l'application d'un déplacement sur un échantillon (compression de la matière) qui est maintenu, ensuite la force de réaction de l'échantillon est mesurée (montage présenté à la Figure 1-8). Sous l'effet de la charge, l'échantillon peut se dilater radialement, cette dilatation pouvant être un critère de mesure. Contrairement au test en relaxation de contrainte, dans un test de fluage, une charge constante est appliquée et les déplacements engendrés sont mesurés. Ici le test en relaxation de contrainte sera utilisé.

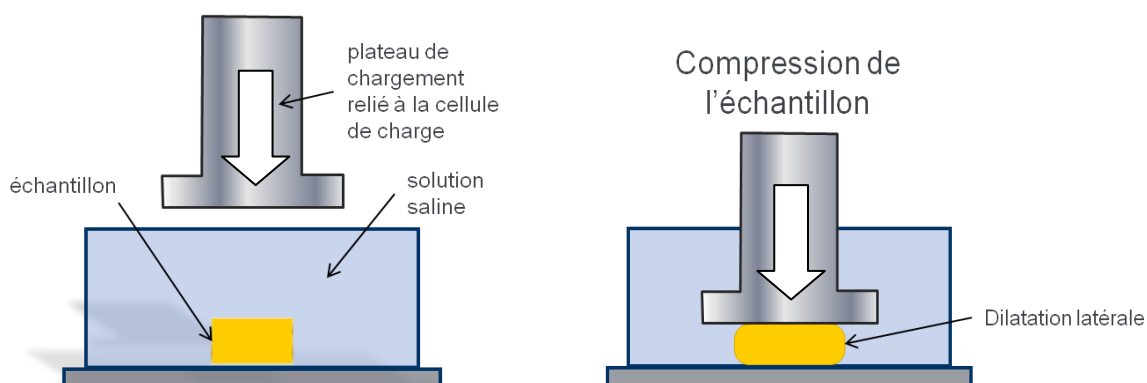


Figure 1-8: Montage expérimental en compression non confinée, l'échantillon est placé dans une solution saline et est comprimé par un plateau de chargement relié à une cellule de charge. La compression axiale engendre une déformation radiale de l'échantillon

1.2.1.1 Protocoles

Les essais mécaniques sont réalisés sur des échantillons prélevés sur des colonnes vertébrales animales ou humaines. Les disques intervertébraux animaux sont analysés peu de temps après la mort de l'animal dans un délai variant de 2h [17] à 48h [18] où les échantillons sont congelés en attendant les tests. Selon les études, les disques sont prélevés dans la partie lombaire [19] ou caudale tout en gardant un diamètre minimum de 20 à 25mm pour pouvoir faire des analogies avec le disque intervertébral humain [17]. Les échantillons extraits sont immédiatement enveloppés dans un film plastique et congelés à -80°C afin de les conserver et de ne pas détériorer les caractéristiques du disque [17].

Les échantillons congelés sont passés dans un microtome pour rectifier les surfaces du disque et les rendre parallèles. La valeur typique de l'épaisseur des échantillons est de 1.5 à 2 mm.

Pour réaliser les essais, on prélève des échantillons circulaires dans le disque avec un punch. Le diamètre du punch est de 2 à 3 mm pour des tissus comme le cartilage du genou ou l'annulus, et un peu plus large pour des tissus plus mous comme le nucléus (5mm).

Selon les auteurs, les punches sont laissés quelques minutes dans une solution saline jusqu'à atteindre l'équilibre hydrostatique, de 10min à une heure [20]. La solution saline peut être une solution de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) [21] ou du *PBS* [22] à un PH quasi neutre de 7.4.

Les tests consistent en une série de chargement en relaxation de contrainte. Les échantillons sont placés dans un pétri et on applique une charge avec un plateau non poreux et la force de réaction est enregistrée par une cellule de charge. Avant de commencer les essais mécaniques, les échantillons sont soumis à une pré-charge pendant 5 à 15 min pour s'assurer que les tests se dérouleront dans la région linéaire [23].

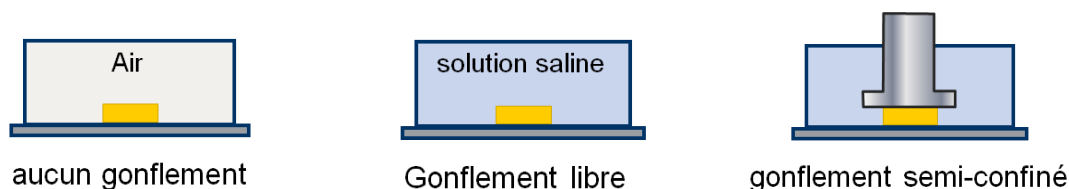
L'épaisseur initiale des échantillons est déterminée en appliquant une charge de 0.1N [20] ou par une méthode visuelle avec un léger changement de la force mesurée (utilisation d'une lampe en contre jour pour déterminer le contact) [22] ou par un micromètre [24].

Des cycles de contrainte-relaxation sont appliqués. La contrainte est créée en comprimant le tissu à une vitesse constante variant de 0.0001 à 0.01 m/s^{-1} jusqu'à atteindre 5 % de l'épaisseur initiale du tissu. Selon la vitesse d'application de la charge, le tissu se comporte différemment, dû

à sa viscoélasticité. Ensuite, l'échantillon se relâche le temps que la force de réaction diminue en deçà d'une valeur seuil. La valeur seuil est définie comme étant la pente de la courbe de la force de réaction en fonction du temps qui est typiquement de 0.1g/s.

Dans la littérature les protocoles varient au niveau de certains paramètres comme les conditions de pré-test (détermine les conditions de contrainte de l'échantillon avant le début du test mécanique), la charge de pré-compression, le taux de compression de chaque rampe, le nombre de rampe. Les conditions de pré-tests peuvent être du gonflement libre pendant 5 ou 10 min dans une solution (HBBS), un gonflement semi-confiné pendant 5 ou 10 min ou aucun gonflement. La pré-déformation varie entre 5% ou 10% de la hauteur initiale de l'échantillon et la déformation appliquée lors d'une rampe est également comprise entre 5% et 10% (cf. Figure 1-9).

Conditions de pré-test : Types de gonflements



Conditions de pré-test : valeurs de la pré-déformation

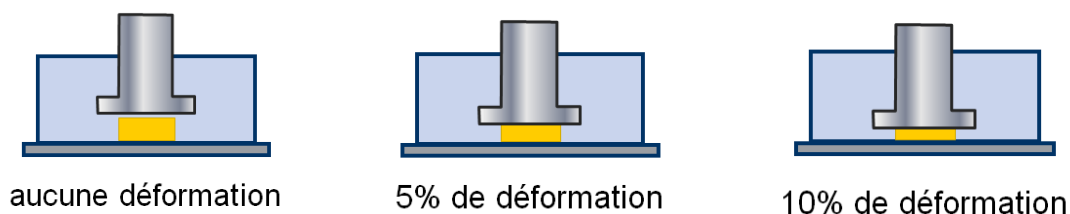


Figure 1-9: Conditions de pré-test : exemples de gonflement et de déformation appliqués avant la réalisation du test mécanique.

Typiquement les courbes obtenues sont de la forme suivante:

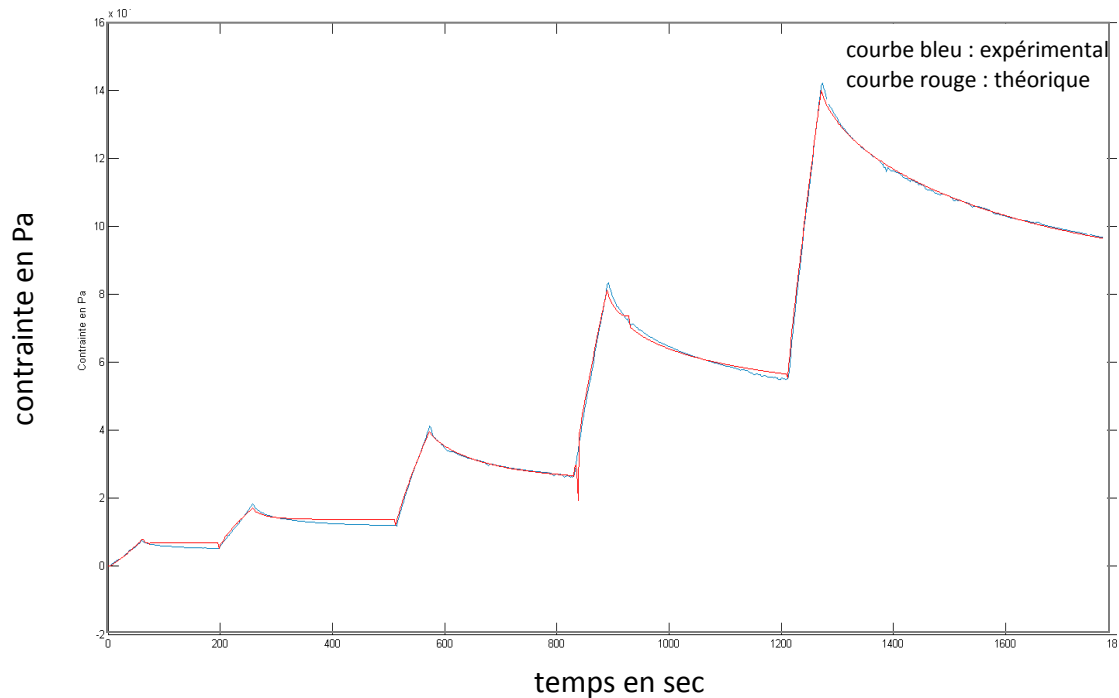


Figure 1-10: Répétition d'un chargement de contrainte/relaxation. La force de réaction augmente brutalement lors de l'application de la déformation (pic de contrainte), puis le tissu se relaxe pendant le maintien de la déformation.

1.2.1.2 Modèles utilisés

L'exploitation des courbes obtenues permet d'extraire les propriétés du disque. Les tests en compression non confinée permettent de déterminer le module d'Young par une lecture quasi directe des données expérimentales et le coefficient de perméabilité grâce à une courbe de régression exprimée par une formule théorique. Le coefficient de Poisson peut être directement déterminé par une camera mesurant le déplacement latéral lors du test. Enfin, le module d'agrégat (H_{A0}) peut être calculé grâce aux valeurs du module de Young et du coefficient de Poisson [25].

1.2.1.2.1 Équations constitutives des Modèles linéaires

L'utilisation d'un modèle linéaire implique certaines hypothèses de travail. Le tissu est assumé être composé d'une phase fluide et d'une partie solide et de plus le fluide et le solide sont supposés être incompressibles. Les équations de bases qui régissent le comportement sont :

- Équation de continuité

$$\nabla \cdot (\phi^s \mathbf{v}^s + \phi^f \mathbf{v}^f) = 0 \quad \text{Équation 1-1}$$

- Équation des moments :

$$\nabla \cdot \sigma^\alpha + \pi^\alpha = 0 \text{ avec } \alpha = s, f \quad \text{Équation 1-2}$$

- Équations constitutives

$$\sigma^s = -\phi^s p \mathbf{I} + \tilde{\sigma}^s \quad \text{Équation 1-3}$$

$$\sigma^f = -\phi^f p \mathbf{I} \quad \text{Équation 1-4}$$

$$\pi^s = -\pi^f = \frac{(\phi^f)^2}{k} \cdot (\mathbf{v}^f - \mathbf{v}^s) \quad \text{Équation 1-5}$$

ϕ^α représente la fraction volumique de la partie solide ou la partie fluide, \mathbf{v}^α représente la vitesse de la phase α . σ^α est le tenseur de contrainte global de la phase α . π est le moment de diffusion entre la matrice solide et le fluide interstitiel. Enfin $\tilde{\sigma}^s$ est la contrainte solide effective représentant la portion de la contrainte solide totale qui est en surpression dû au fluide [26].

1.2.1.2.2 Modèle : BPE

Le modèle biphasique poro-élastique linéaire est un des premiers modèles développés par Mow [27]. L'utilisation de ce modèle repose sur les hypothèses suivantes : la partie matricielle est considérée comme isotrope et linéaire élastique pour des déplacements infinitésimaux et le fluide est considéré comme non visqueux.

La contrainte solide effective s'exprime de la manière suivante :

$$\tilde{\sigma}^s = B_s \text{tr}(\epsilon^s) \cdot \mathbf{I} + 2\mu_s \mathbf{e}^s \quad \text{Équation 1-6}$$

où B_s est le module d'élasticité volumique, μ_s est le module d'élasticité en cisaillement et ϵ^s est le tenseur de contrainte infinitésimal de la matrice solide. B_s et \mathbf{e}^s s'exprime sous la forme suivante :

$$B_s = \lambda^s + \frac{2\mu_s}{3} \quad \text{Équation 1-7} \quad \text{et} \quad e^s = \epsilon^s - \frac{1}{3} \cdot \text{tr}(\epsilon^s) \quad \text{Équation 1-8}$$

μ_s et λ^s sont les constantes de Lamé qui s'expriment de la manière suivante :

$$\lambda = \frac{\nu E}{(1+\nu)(1-2\nu)} \quad \text{Équation 1-9}$$

$$\mu = \frac{E}{2(1+\nu)} \quad \text{Équation 1-10}$$

Le modèle biphasique poroélastique sous estime le pic de réaction et le début de la période de la réaction visqueuse du tissu mais il estime parfaitement l'état d'équilibre. Ces observations ont été faites pour des tests en compression non confinée et des tests d'indentation [28].

Les tissus mous comme le cartilage articulaire sont composés d'une matrice extracellulaire très dense avec une faible perméabilité du fluide interstitiel (flux dépendant). L'écoulement du fluide étant très lent, les déformations liées au phénomène viscoélastique sont aussi très lentes, alors le phénomène de relaxation est faible et tardif. La réponse viscoélastique à court terme ne peut être simulée que si le flux indépendant est modélisé. La mauvaise estimation du BPE est causée par l'absence du caractère visqueux dans le modèle et du flux indépendant de la matrice solide. Il est donc judicieux de prendre en compte cette propriété dans le modèle mathématique, tel que le modèle BPVE.

1.2.1.2.3 Modèle : BPVE

Les fibres de collagène dans les tendons et les ligaments sont connues pour être intrinsèquement viscoélastiques. On peut donc penser que la matrice extracellulaire du disque intervertébral, composée de protéoglycanes et de collagène, ait un comportement viscoélastique intrinsèque en l'absence de fluide interstitiel sous un chargement. Le modèle porovisco élastique biphasique [28] prend en compte la viscosité intrinsèque (flux indépendant) de la phase solide qui est indépendante du flux volumique du fluide interstitiel (flux dépendant). Dans la contrainte solide effective, la relaxation de la composante hydrostatique est différente de celle de la composante déviatorique. Expérimentalement, il est très difficile, voire impossible, d'isoler le flux indépendant de la composante hydrostatique car n'importe quelle déformation de la matrice solide impliquera un flux concomitant du fluide dépendant dans la matrice solide. Selon la littérature, la contrainte solide effective s'exprime sous deux formes différentes. La première

équation considère que la composante hydrostatique de la matrice solide effective est gouvernée par une pure loi élastique et la contrainte de la partie déviatorique par une loi viscoélastique, et la deuxième équation considère que les deux composantes sont gouvernées par une loi viscoélastique [28]. La contrainte solide effective s'exprime donc sous les formes suivantes [29]:

$$\tilde{\sigma}^s = \lambda \mathbf{eI} + 2\mu_s \int_0^t G(t-\tau) \frac{\partial \mathbf{e}}{\partial \tau} d\tau \quad \text{Équation 1-11}$$

$$\text{Et } \tilde{\sigma}^s = \lambda \int_0^t G(t-\tau) \frac{\partial \mathbf{eI}}{\partial \tau} d\tau + 2\mu_s \int_0^t G(t-\tau) \frac{\partial \mathbf{e}}{\partial \tau} d\tau \quad \text{Équation 1-12}$$

τ est la constante de temps de relaxation et \mathbf{e} est le composant déviatorique du tenseur de contrainte élastique, qui s'exprime comme vue précédemment.

Avec G qui est la fonction de relaxation :

$$G(t) = 1 + \int_0^\infty S(\tau) e^{-t/\tau} d\tau \quad \text{Équation 1-13}$$

et S est le spectre continu de relaxation :

$$S(\tau) = \begin{cases} \frac{c}{\tau} & \text{pour } \begin{cases} \tau_1 \leq \tau \leq \tau_2 \\ \tau \leq \tau_1, \tau \geq \tau_2 \end{cases} \end{cases}, \quad \text{Équation 1-14}$$

avec τ_1 et τ_2 les constantes de temps de relaxation à court et long terme, et le terme c représentent la magnitude du spectre d'énergie de relaxation.

L'étude de Suh et Disilvestro montre que les deux modèles porovisco-élastique donnent des résultats similaires, donc la caractéristique viscoélastique du fluide indépendant est quasi négligeable [28].

Ce modèle mathématique est approprié pour modéliser la réponse temporelle d'un disque de cartilage sain et dégénéré pour des tests en compression confinée, compression non confinée et des tests d'indentation [29].

Le modèle porovisco-élastique est le modèle qui approxime au mieux les données expérimentales, tant au niveau du pic de la force de réaction que pour la force d'équilibre. Il est capable de prédire simultanément la réaction axiale et latérale durant un test en compression non confinée ou d'indentation. Pour réaliser le recalage des données expérimentales par le modèle BPVE, il est important de définir les valeurs initiales des paramètres optimisés (Coefficient de

Poisson, perméabilité, module d'Young...). Le coefficient de Poisson de la matrice du tissu peut être estimé de 0.05 [28] à 0.24+/-0.09 [22] pour le cartilage articulaire et à 0.62+/-0.15 [30] pour le nucléus humain, même si les valeurs usuelles sont comprises entre 0.35 et 0.49.

Quelques limitations peuvent être formulées au modèle BPVE. Le modèle BPVE ne peut être utilisé que dans une plage de faible déformation, car le modèle mathématique repose sur l'hypothèse de déplacements infinitésimaux. Typiquement, les déplacements axiaux ne dépassent pas 10% de la hauteur initiale [30]. De plus, le modèle BPVE repose sur la propriété isotrope du tissu, mais les fibres de collagène sont orientées aléatoirement, sans directions apparentes dans le nucléus et sont organisées dans l'annulus. Pour l'étude du nucléus, l'hypothèse isotrope reste globalement correcte. Cependant pour l'annulus, il faut prendre en compte la propriété anisotrope du tissu pour obtenir de meilleurs résultats.

1.2.1.2.4 Modèle : BPVE renforcé de fibres

Afin de mieux considérer l'effet des fibres de collagène dans la matrice extracellulaire, le modèle BPVE a été complété par l'ajout de la rigidité des fibres du réseau de collagène. Le BPVE renforcé a été testé avec succès en compression non confinée, compression confinée et pour des tests d'indentation pour modéliser le comportement des fibres de collagène [29].

Dans la littérature, deux sortes de modélisation de la fibre de collagène existent, l'une où la fibre est simplement modélisée par un modèle de ressort (ressort linéaire en parallèle avec un ressort non linéaire, modèle de Li [31]) et l'autre par un système de ressort amortisseur en parallèle avec un ressort. Les fibres ne peuvent être représentées que dans une seule direction notée i . Les fibres de collagène sont supposées être viscoélastiques et ont une orientation aléatoire, la contrainte solide effective s'exprime donc :

$$\tilde{\sigma}^s = \sigma_m + \sum_{i=1}^{\text{totf}} \sigma_{f,i} \cdot \vec{v}_{\text{new}, i} \otimes \vec{v}_{\text{new}, i} \quad \text{Équation 1-15}$$

où $\sigma_{m,i}$ et $\sigma_{f,i}$ représente respectivement la contrainte normale et la contrainte fibreuse de la i -ième fibre orientée dans la direction portée par le vecteur $\vec{v}_{\text{new},i}$. La contrainte viscoélastique de la fibre s'exprime de la manière suivante :

$$\sigma_f = - \frac{\eta}{2 \cdot \sqrt{(\sigma_f - E_0 \varepsilon_f) E_\varepsilon}} \cdot \dot{\sigma}_f + E_0 \varepsilon_f + \left(\frac{\eta E_0}{2 \cdot \sqrt{(\sigma_f - E_0 \varepsilon_f) E_\varepsilon}} + \eta \right) \cdot \dot{\varepsilon}_f \text{ pour } \varepsilon_f > 0 \text{ Équation 1-16}$$

$$\sigma_f = 0 \text{ pour } \varepsilon_f < 0$$

Une récente étude de Wilson [32] montre que les fibres de collagène ne sont pas contraintes de la même manière selon les type d'architecture du collagène. Le futur de ce modèle proposera, pour modéliser au mieux la réalité, de prendre en compte la morphologie du réseau des fibres de collagène.

1.2.1.2.5 Modèle : TIBPVE

Le modèle biphasique isotrope transverse poroélastique est plus complet que les modèles précédents, car il prend en compte la déformation latérale en plus de la déformation axiale. Ce modèle [33] permet de mesurer simultanément le déplacement latéral et la force de réaction pour un test en compression non confinée. Dans un matériau isotrope transverse, toutes les fibres sont orientées dans une même direction. La direction parallèle à la fibre est appelée la direction longitudinale et la direction perpendiculaire est la direction transverse. La contrainte solide effective s'exprime telle quelle :

$$\tilde{\sigma}^s = C \cdot \varepsilon^s \text{ Équation 1-17}$$

Avec C qui représente la caractéristique isotrope du tissu. La constante C est décrite dans l'étude de Cohen sur les plaques de croissances osseuses.

Le modèle biphasique isotrope transverse poroélastique donne de bons résultats en utilisant une combinaison d'expérimentation de compression en confiné et en compression non confinée [22]. Cependant, le modèle TIBPVE n'est pas capable d'évaluer simultanément les données expérimentales du déplacement latéral et de la force de réaction. De plus, le modèle fournit une relaxation plus faible que prévu lorsque la rampe de contrainte appliquée est rapide.

1.2.1.2.6 Modèle de Kelvin et de Maxwell

Ce modèle utilise un solide de Kelvin et un système viscoélastique de Maxwell en parallèle. Il combine la caractéristique visqueuse du fluide avec la propriété élastique du solide. Ce modèle suppose, en plus des hypothèses déjà énumérées précédemment, que l'échantillon a

une géométrie cylindrique parfaite et que les surfaces de contacts sont sans frottement. Il permet de déterminer le module d'Young mais non la perméabilité.

Le module de relaxation est E_r , τ_e et σ_r sont les constantes de temps de relaxation et de fluage, E_i est le module instantané et μ est le coefficient de viscosité.

La contrainte est donnée par l'équation suivante :

$$\sigma(t) = \frac{3}{2} \cdot \frac{E_r u_i}{Z} \cdot \left[1 + \left(\frac{\tau_\sigma}{\tau_e} - 1 \right) \cdot e^{\left(-\frac{t-t_i}{\tau_e} \right)} \right] \quad \text{Équation 1-18}$$

où t_i est le temps pour la contrainte maximale de chaque phase de relaxation

1.2.1.3 Propriétés mécaniques

Les tests en compression non confinée donnent comme valeur principale le module d'Young, le coefficient de Poisson et la perméabilité pour certains modèles mathématiques.

Le module d'Young est de $5.39 \pm 2.56 \text{ kPa}$ (mean \pm SD) pour le nucléus pulposus humain [30], $0.63 \pm 0.18 \text{ MPa}$ pour le cartilage de genoux de bovin [34]. Les études utilisant les modèles porovisco-élastiques renforcés présentent des modules de rigidités plus élevés. Quant au modèle BPVE renforcé de fibres, le module de rigidité linéaire (E_0) est de 4.74 MPa et de 490.4 MPa pour la constante non linéaire (E_e), car le module de rigidité s'exprime de la manière suivante $E_f = E_0 + E_e \varepsilon_f$, où ε_f est la déformée [32]. L'étude de Li [31] sur le cartilage bovin donne des résultats légèrement différents, avec $E_0 = 3 \text{ Mpa}$ et $E_e = 1600 \text{ Mpa}$.

L'étude de Julkunen donne une rigidité (E_0) 6.63 MPa pour le cartilage humain ce qui est relativement proches de ceux pour le bovin [18]. Il est donc acceptable de travailler sur des échantillons bovins dans le but d'appliquer les méthodes à des cas humains.

Finalement selon la littérature il y a peu de données concernant les valeurs du module d'Young pour l'annulus et le nucléus du disque intervertébral. Comme pour le module d'Young, il existe une certaine variabilité dans les valeurs du coefficient de Poisson. Selon l'étude de Jurvelin qui présente une méthode optique de mesure du coefficient de Poisson [35], la valeur à court terme (3sec après application de la contrainte) est de 0.380 ± 0.065 et de 0.185 ± 0.065 à

l'équilibre. La valeur théorique du coefficient de poisson est comprise entre 0 et 0.5. Les valeurs sélectionnées pour le nucléus pulposus varient entre 0.35 et 0.49 [30]. Dans les expériences où il n'est pas prévu de mesurer le coefficient de poisson, une valeur en accord avec la littérature est choisie typiquement 0.5 pour le nucléus pulposus, 0.05 [28] ou 0.15 [36] pour le cartilage.

Le cartilage a été plus largement étudié que le disque intervertébral, et la composition du disque intervertébral est proche de celle du cartilage patellaire. Les protocoles développés pour le cartilage peuvent s'appliquer aux IVDs, mais les variations de protocoles et de modèles mathématiques utilisés donnent de la variabilité aux paramètres mécaniques, par exemple la perméabilité est très sensible au modèle mathématique comme le montre le Tableau 1-4 **Error! Reference source not found.** La perméabilité en compression non confinée est évaluée à $1.72 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{N.s}$ [34], à $0.5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ ou à $0.71 \pm 0.11 \cdot 10^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ [37] pour un cartilage articulaire sain.

Tableau 1-4 : Valeur de perméabilités pour le cartilage selon le modèle mathématique

| Étude | Tissu | Modèle mathématique | Perméabilité $\times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ |
|------------------------------|--------|--|--|
| Julkunen et al. 2008 [18] | Humain | Biphasique non linéaire (considérant la pression osmotique [38]) | 0.05127 |
| Wilson et al. 2006 [38] | Bovin | Biphasique non linéaire (considérant la pression osmotique [38]) | 0.00187 |
| Disilvestro et al. 2002 [34] | Bovin | Modèle BPVE | 1.72 |
| Disilvestro et al. 2001 [23] | Bovin | Modèle BPVE | 3.71 \pm 3.07 |

Les propriétés mécaniques précédentes sont indépendantes de la taille de l'échantillon [25]. Cependant, la réponse à l'équilibre est fortement dépendante des protéoglycanes et du réseau de collagène. La réponse dynamique est contrôlée par la pressurisation du fluide dans les tissus, qui est fortement dépendante du réseau de collagène, et aussi par la pression de gonflement induite par les protéoglycanes [25].

La matrice solide et le fluide interstitiel sont incompressibles, ce qui laisse penser qu'ils jouent un rôle important dans l'expansion latérale instantanée [39]. De plus, l'hypothèse de l'isotropie est remise en cause par les modèles anisotropes considérant des propriétés différentes

selon les directions [25]. En effet, les expériences menées par Julkunen [36] montre que la dilatation de l'échantillon dépend de l'orientation locale des fibres.

1.2.2 Tests en compression confinée

Les protocoles en compression confinée sont très semblables à ceux vus dans la partie des tests en « compression non confinée » (cf. Figure 1-11). L'avantage des tests en « compression non confinée » est de pouvoir déterminer le module d'Young, alors que les tests en confiné permettent d'estimer le module d'agrégat et la perméabilité axiale, qui sont deux composantes caractéristiques du comportement biomécanique des tissus mous.

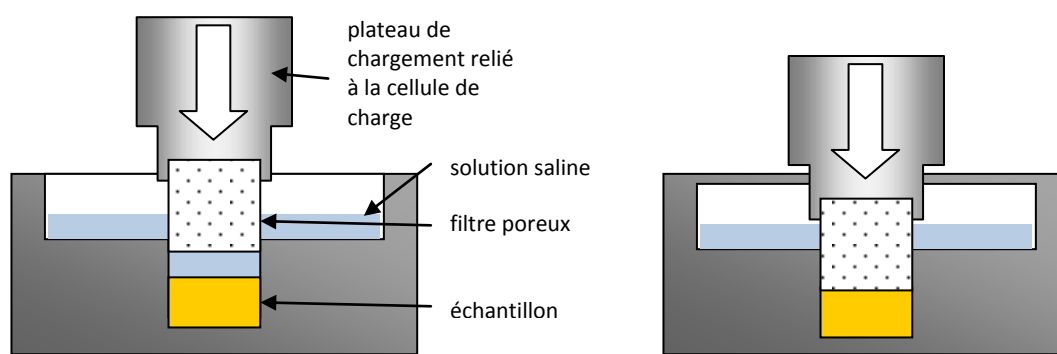


Figure 1-11 : Montage expérimental en compression confinée, l'échantillon est placé dans une chambre confinée et est compressé par l'intermédiaire d'un filtre poreux relié à un plateau de chargement et à une cellule de charge.

1.2.2.1 Protocole

La méthode de préparation de l'échantillon est identique au protocole des tests compression en non confinée.

Le montage en confiné est composé d'un puits percé dans un bloc de plastique, de métal ou d'acrylique, dans lequel l'échantillon se loge. L'échantillon est compressé par un filtre connecté à une cellule de charge instrumentée par un système informatique.

Le test commence par une période de relaxation qui permet au tissu de se relaxer et d'être saturé. Cette période varie de 10 min [17] à 3h [40] selon les études. Ensuite, des rampes de contrainte-relaxation sont appliquées comme pour le test en compression non-confinée, quatre rampes sur l'IVD [17] à 30 rampes sur le cartilage articulaire [41]. L'amplitude des rampes varie

de 5 à 10% [25, 42] avec une vitesse variant de 1 $\mu\text{m/s}$ à 100 $\mu\text{m/s}$ [17, 22, 25]. La durée de la relaxation est au minimum de 3600 sec [17] ou bien est déterminée par une pente de relaxation seuil (0,5g/min [41]).

1.2.2.2 Modèles utilisées

L'analyse des courbes expérimentales par les modèles mathématiques permet d'extraire les propriétés mécaniques à l'aide de régressions.

1.2.2.2.1 Modèle : BPVE

Le modèle BPVE [28] présenté dans la partie des tests compression non confinée peut être utilisé en compression confinée en adaptant paramètres et les conditions limites du modèles afin de simuler la bonne direction de la perméabilité, direction transversale en compression non confinée et longitudinale en compression confinée.

1.2.2.2.2 Modèle : Biphase non linéaire

Le modèle biphase non linéaire élastique de Mow et al. [43, 44] analyse le comportement du disque en se reposant sur la théorie biphase des déformations finies de la texture qui est intrinsèquement incompressible. Ce modèle prend pour hypothèse que le tissu est composé d'une phase solide élastique et d'un fluide intrinsèquement non visqueux et incompressible. La viscosité est responsable de l'échange dynamique entre les phases solide et liquide causé par les forces de frictions [45].

L'équation du modèle se base sur le tenseur de contrainte de Cauchy qui se définit comme suit [44]:

$$\sigma^s = -\phi^s \cdot p \cdot \mathbf{I} + \sigma^e \quad \text{Équation 1-19}$$

$$\sigma^f = -\phi^f \cdot p \cdot \mathbf{I} \quad \text{Équation 1-20}$$

$$\pi = \mathbf{K}(\mathbf{v}^f - \mathbf{v}^s) + p \cdot \mathbf{I} \cdot \phi^s \quad \text{Équation 1-21}$$

Avec σ^f et σ^s désignant tenseurs de contraintes des parties solide et fluide, p est la pression du fluide apparent, σ^e est la composante élastique de la partie solide. \mathbf{K} est un tenseur définissant

la diffusion de la friction résultant de la vitesse relative entre la phase solide (v^s) et fluide (v^f) [45]. ϕ^s et ϕ^f représente la part solide et fluide du tissu.

La propriété isotrope du tissu permet de résoudre les équations avec moins de paramètres à calculer. De plus en confiné, les déformations ne sont que dans une seule direction, ce qui simplifie l'équation de base [45]. Le tenseur de diffusion simplifié (K) et la perméabilité (k) peuvent être reliés sous la condition de faibles écoulements par la relation suivante :

$$K = (\phi^f)^2 / k \quad [46] \quad \text{Équation 1-22}$$

L'équation constitutive de la composante axiale (axe z) de la déformée et de la contrainte de Cauchy peut se réduire sous la forme suivante, le comportement mécanique étant caractérisé par deux constantes, la contrainte de la réponse élastique de la phase solide : le module d'agrégat en absence de déformation H_{A0} et le coefficient de non linéarité β .

$$\sigma_z^e = \frac{1}{2} H_{A0} \left(\frac{\lambda^2 - 1}{\lambda^{2\beta + 1}} \right) e^{[\beta(\lambda^2 - 1)]} \quad \text{Équation 1-23}$$

et la contrainte et la déformée sur l'axe z sont reliés par la l'équation suivante :

$$\lambda_z = 1 + \frac{\delta U(z,t)}{\delta z} \quad \text{Équation 1-24}$$

La perméabilité est décrite par la formule suivante est caractérisé par k_0 qui représente la perméabilité intrinsèque du tissu tissu en l'absence de déformations, et par M qui est le coefficient de non linéarité :

$$k = k_0 \left(\frac{\phi_0^s \cdot \phi^f}{(1 - \phi_0^s) \cdot \phi^s} \right) e^{[M(\lambda^2 - 1)/2]} \quad \text{Équation 1-25}$$

La résolution de l'équation différentielle suivante permet de déterminer les variables H_{A0} , β , k_0 et M :

$$\frac{\delta \sigma_z^e}{\delta \lambda} \cdot \frac{\delta^2 U}{\delta z^2} = \frac{\lambda}{k} \cdot \frac{\delta U}{\delta t} \quad \text{avec } 0 < Z < h \text{ et } t > 0 \quad \text{Équation 1-26}$$

h est l'épaisseur, t le temps, t_0 le temps initial de la rampe et V_0 la vitesse de déplacement de l'actuateur [47].

1.2.2.2.3 Modèle de Klisch

Le modèle de Klisch et al. [48] propose une autre alternative pour le calcul des paramètres mécaniques. Contrairement au modèle non linéaire de Holmes [44], le modèle de Klisch considère l'énergie libre du fluide. Ce modèle est basé sur le caractère biphasique du milieu, un solide élastique et un fluide visqueux. Un processus homéotherme quasi statique a été construit [48], tout en considérant que le milieu est composé d'une phase solide élastique et d'un fluide non visqueux, le caractère visqueux du fluide étant modélisé par un moment supplémentaire.

Après de nombreux développements et simplifications causées par le type de contrainte appliquée en compression confinée (force longitudinale), la perméabilité (k_0) et le module d'agrégat (H_{A0}) peuvent se calculer à l'aide des formules suivantes :

$$k = k_0 \left(\frac{\lambda_3 - \phi_0^S}{(1 - \phi_0^S)} \right) e^{[M(\lambda_3^2 - 1)/2]} \quad \text{Équation 1-27}$$

$$H_{A0} = \left. \frac{\partial T_{33,eq}^S}{\partial \lambda_3} \right|_{\lambda_3=1} = Q \cdot (1 - \phi_0^S) \left(\frac{Q \cdot (1 - \phi_0^S)}{2 \cdot \alpha_0} + \beta - 1 \right) + 4 \cdot \beta \alpha_0 + Q \cdot \phi_0^S \quad \text{Équation 1-28}$$

Avec Q ($Q > 0$) et α_0 sont des constantes du matériau avec des dimensions de contraintes [48].

1.2.2.2.4 Modèle Quadriphasique

Dans ce modèle, le comportement de gonflement et de contraction des tissus mous a été représenté par un modèle quadriphasique [49]. Il y a quatre phases : une phase solide, une phase fluide, les anions et les cations. Les équations sont résolues par éléments finis donnant des équations intégrales non linéaires qui sont ensuite linéarisées et résolues par la procédure d'itération de Newton-Raphson. Ce modèle quadriphasique permet de prendre en compte les effets électriques qui sont impliqués dans la pression osmotique des tissus.

1.2.2.3 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques présentées dans la littérature sont principalement la perméabilité longitudinale et le module d'agrégat, les autres paramètres constituant des équations ne sont pas systématiquement présentés.

La table suivante regroupe les différentes valeurs du module d'agrégat et de la perméabilité pour différents tissus (canin, bovin, humain) et pour différents types de modèles mathématiques :

Tableau 1-5 : Valeur pour le module d'agrégat et la perméabilité selon la littérature

| Article | % de déformation | Tissu | Modèle | H _{A0} en MPa | K ₀ en .10 ⁻¹⁵ .m ⁴ /Ns |
|------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|---------------------------|---|
| Best et al.[50] | | AF Humain | Linéaire Biphase | 0.38 +/- 0.16 | 0.25+/-0.11 |
| Frijns et al.[49] | 1 ^{er} rampe | AF Canin | Quadriphase | 1.1 | 0.2 |
| Drost et al.[51] | 1 ^{er} rampe | AF Canin | Linéaire biphasique | 1.01+/-0.31 | 0.32+/-0.115 |
| Houben et al.[52] | 1 ^{er} rampe | AF Canin | Linéaire biphasique | 1.47+/-0.41 | 0.16+/-0.11 |
| Péris et al.[16] | 0% | NP Bovin | Non linéaire biphasique | 0.35+/-0.05 | 0.67+/-0.09 |
| Péris et al.[17] | 0% | AF Bovin | Non linéaire biphasique | 0.8+/-0.1 | 0.23+/-0.19 |
| Péris et al.[16] | 0% | NP Bovin | Linéaire biphasique | 0.5+/-0.08 | 1.2+/-0.2 |
| Péris et al.[17] | 0% | AF Bovin | Linéaire biphasique | 0.9+/-0.1 | 0.9+/-0.3 |
| Johannessen et al.[53] | | NP Humain | Linéaire biphasique | | 0.9 |
| Klisch et al.[48] | 0% | AF Humain | Modèle de Klisch | 0.12+/-0.13 | 0.13+/-0.15 |
| Iatridis et al.[45] | 0% | AF Humain | Non linéaire biphasique | 0.56+/-0.21 | 0.21+/-0.10 |

AF : Annulus Fibrosus, NP : Nucleus Pulposus

Pour le nucléus, le modèle linéaire décrit mieux la courbe de contrainte que le modèle non linéaire mais le maximum de la contrainte est mieux approximé par le modèle non linéaire. La réponse à l'équilibre peut être linéaire ou non selon l'amplitude et la vitesse d'application de la contrainte, cette tendance se traduit par les valeurs des paramètres M et β dans le non linéaire [16].

Les valeurs du module d'agrégat et de la perméabilité sont sujettes à de grandes variations selon les études. Pour une même espèce, le module d'agrégat varie de 400% ([45] et [48]) et la perméabilité varie de 400% selon le modèle linéaire ou non linéaire [16].

Les paramètres initiaux des tests mécaniques sont également une source de variabilité. L'étude de Péris et al. [16] montre que, selon les conditions de pré-test, la réponse mécanique est influencée par: un gonflement libre ou un gonflement en confiné. La réponse mécanique présente

un écart type plus faible lorsque l'échantillon a gonflé en confiné [16]. Pour 5% de déformation, le module d'agrégat varie environ de 0,008 à 0,032MPa pour un gonflement libre et confiné, soit un rapport de 5. Les différences observées peuvent s'expliquer par l'importance de la pression osmotique à la réponse d'une charge [48]. Le type de modèle utilisé a une influence sur les propriétés mécaniques, tout comme les paramètres initiaux.

1.2.3 Mesure de la perméabilité

La perméabilité est une composante importante dans le comportement mécanique du disque intervertébral. Dans un disque sain, la charge mécanique est supposée être supportée par le fluide grâce à une importante pression osmotique [11, 54] et/ou par l'effet du fluide pressurisé [43]. Lorsque le disque est compressé, le fluide est expulsé vers l'extérieur [55]. Le transport du fluide dans le disque est crucial pour son comportement viscoélastique, la redistribution de la charge et le transport des nutriments [42]. La perméabilité est donc la capacité des tissus hydratés à être traversés par un fluide. Des expériences et analyses démontrent que la perméabilité est en étroit lien avec l'hydratation en eau [56], la densité des charges fixes du tissu, le coefficient de diffusion des ions [57] et le coefficient de friction entre le fluide et la matrice extracellulaire [46]. La perméabilité est donc fonction de la structure matricielle (collagène et protéoglycane) et du contenu en eau.

1.2.3.1 Protocole

La valeur de la perméabilité tissulaire est le point le plus critique des études, sa variabilité très importante est causée en partie par la méthode de calcul. Lorsque la perméabilité est calculée par une régression mathématique, sa valeur est sujette à de grandes variations car les méthodes d'optimisation ne présentent pas des solutions uniques et dépendent fortement des conditions initiales de la régression.

La mesure directe de la perméabilité est une réponse à toutes ces variations. Plusieurs méthodes existent pour la mesurer.

La méthode basée sur les relations de Darcy, assume que le fluide a un comportement newtonien. Le principe repose sur un débit d'un fluide traversant l'échantillon tout en mesurant l'évolution du différentiel de pression entre l'amont et l'aval de l'échantillon. Dans cette expérience de Gu et al. [42], un échantillon d'annulus de disque lombaire est placé entre deux chambres, l'une est reliée à une pompe seringue contrôlée par ordinateur avec un débit de 0,001ml/h, et l'autre chambre est reliée à l'air ambiant. Un capteur de pression mesure la différence entre les deux chambres. Le fluide utilisé est une solution saline phosphate tampon avec des inhibiteurs de protéases. Afin d'éviter la perte de protéoglycanes à cause du gonflement, une compression de 29% en moyenne a été appliquée, ce qui correspond à une contrainte de 0.1 à 0.15MPa. La perméabilité est calculée en ajustant le débit de la pompe seringue pour conserver une différence de pression constante.

L'étude de Heneghan et al. [2] sur le nucléus pulposus reprend la méthode utilisée par Gu et al. Le montage est présenté à la Figure 1-12. Cependant, l'échantillon est soumis à une succession de compressions, variant de 0% à 70% de compression avec une vitesse de $2\mu\text{m/s}$ puis la déformation est maintenue 2h. La mesure de la perméabilité se fait par l'injection du fluide à grande vitesse (jusqu'à $30\text{kPa} \pm 0,5\text{kPa}$) puis le débit est ajusté pour maintenir le différentiel de pression constant. Ainsi, pour chaque niveau de compression, la perméabilité est calculée, puis la perméabilité en absence de déformation peut être calculée par une régression.

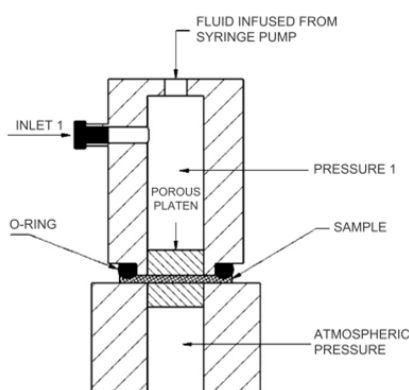


Figure 1-12: Montage pour la mesure de la perméabilité selon Heneghan et al.[2]

Pour la mesure de la perméabilité de l'os cortical, les mêmes formules de Darcy sont utilisées, mais le protocole diffère quelque peu. Un fluide visqueux est injecté dans le système et traverse l'échantillon de 5cm de long et d'un diamètre de 2,5cm. Son débit est calculé en

mesurant sur une période de temps d'au moins 30 secondes le temps nécessaire à un volume de 30ml pour traverser l'échantillon. La manipulation est répétée 3 fois afin de s'assurer que l'échantillon est saturé grâce au premier test.[58]

Une méthode particulière de mesure de la perméabilité macroscopique a été mise au point par Accadbled et al. [59] sur les plateaux vertébraux. Un piston contrôlé par une machine de compression (Enduratec 3200) permet de générer un débit dans le système. La pression en amont de l'échantillon est mesurée par une jauge à différentiel de pression, et la pression en aval est celle d'un réservoir de fluide. L'échantillon de forme cylindrique est inséré dans un tube en silicone, et la dimension du diamètre de l'échantillon est ajustée au diamètre du trou du silicone pour minimiser les fuites. La méthode de mesure consiste à appliquer un fort débit pour augmenter significativement la pression dans le montage, puis de bloquer le piston et d'attendre la relaxation du tissu. La courbe de relaxation est ensuite étudiée (cf : 1.2.3.2 Modèles utilisés). Le fluide utilisé dans ce montage est une solution à 0,9% de chlorure de sodium à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 10\%$.

1.2.3.2 Modèles utilisés

Le modèle le plus couramment utilisé est la relation de Darcy :

$$k = \frac{Q \cdot l \cdot \mu}{\Delta P \cdot S} \quad \text{Équation 1-29}$$

ou cela peut s'écrire sous la forme suivante : $k = \frac{v_0 \cdot \phi \cdot l \cdot \mu}{\Delta P}$ avec $v_0 = \frac{Q}{S \cdot \phi}$

k est la perméabilité en m^4/Ns , le débit Q en m^3/s , la différence de pression ΔP en Pa, la vitesse dynamique du fluide μ en Ns/m^2 , et l en m et s en m^2 étant la longueur et la section de l'échantillon. Dans cette équation, v_0 est la vitesse du fluide en m/s et ϕ est la porosité de l'échantillon [60].

Gu et al. [42] mesurent la perméabilité à pression constante en ajustant le débit, on fait le choix de calculer la perméabilité par la formule suivante :

$$k = \frac{Q/A}{\Delta P/h} = (Q/\Delta P) \cdot (h/A) \quad \text{Équation 1-30}$$

Où k est donc la perméabilité en m^4/Ns , Q en m^3/s est le débit, ΔP en Pa est la différence de pression à travers l'échantillon, A et h sont la section et la longueur de l'échantillon en m^2 et en m.

L'étude de Heneghan et al. utilise la même formule que celle de l'équation 1-29 pour calculer la perméabilité à chaque niveau de déformation, ensuite la perméabilité en absence de déformation est calculée par une régression non linéaire gouvernée par une des formules suivantes [2]:

$$k(\lambda) = k_0 \left(\frac{\lambda - 1 + \phi_0}{\phi_0} \right)^r e^{[M(\lambda^2 - 1)/2]} \quad [44] \quad \text{Équation 1-31}$$

$$k(\lambda) = k_0 e^{[M(\lambda - 1)]} \quad [46] \quad \text{Équation 1-32}$$

$$k = k_0 \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)^n \quad [61] \quad \text{Équation 1-33}$$

$$k = k_0 \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)^2 e^{[M(\lambda - 1)]} \quad [62] \quad \text{Équation 1-34}$$

Avec k_0 la perméabilité en absence de déformation, M , n et r sont des paramètres non dimensionnels qui permettent de relier k et λ , et ϕ est la porosité du tissu. Selon Robert et al. la porosité en absence de déformation pour le cartilage est de 0,8 [63] et la relation liant la porosité à la déformation est la suivante [2]:

$$\phi = 1 - \frac{1 - \phi_0}{\lambda} \quad \text{Équation 1-35}$$

La régression de l'étude est de la forme « logarithmique croissante » et la meilleure régression ($r=0,946$) a été trouvée pour le modèle de Holmes et Mow [44]. Ce modèle décrit le mieux la relation entre k et λ avec les valeurs suivantes :

$$k(\lambda) = 1.59 \times 10^{-15} \left(\frac{\lambda - 0.2}{0.8} \right)^{1.13} e^{[-0.02(\lambda^2 - 1)/2]} \quad \text{avec } R^2 = 0.952 \quad \text{Équation 1-36}$$

Un modèle mathématique utilisé est celui des fluides macroscopiques, selon l'étude d'Accadbled et al. [59]. Comme le flux est très faible, les effets dynamiques peuvent être négligés. La mécanique des milieux poreux avec écoulement des fluides quasi statiques est appliquée pour déterminer la perméabilité macroscopique. La formule utilisée est la suivante :

$$\frac{k_s}{\mu} = \frac{l_s \cdot s_p \cdot v_p}{s_s \cdot P_i} \cdot (1 - e^{-1/\tau}) \quad \text{Équation 1-37}$$

Avec le ratio k_s/μ issu de la régression des moindres carrées de la mesure de pression. P_i est la pression initialement appliquée, et τ est la constante de temps de la relaxation de la pression. l_s et s_s sont la longueur et la section de l'échantillon, et s_p et v_p sont la section et la vitesse du piston.

1.2.3.3 Propriétés mécaniques

Les valeurs issues de la mesure directe permettent de valider ou d'invalider les valeurs de perméabilité calculé pas les modèles mathématiques.

Les travaux de Heneghan et al. donnent une valeur de $1.59 \times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{N.s}$. Cette valeur est comparable aux valeurs obtenues par régression d'un modèle mathématique linéaire biphasique. [53]. L'ordre de grandeur de la perméabilité est la même que celle dans l'étude de Périé et al.[17], qui utilisait à la fois un modèle linéaire et non-linéaire biphasique. Cependant, les deux modèles de l'étude de Périé et al. reposent sur les équations de base de Holmes et Mow [44], d'où cette similitude dans les résultats.

La perméabilité est sensible au stade de dégénérescence et à la direction du flux [42]. La perméabilité radiale est toujours plus importante, quel que soit le grade de la dégénérescence. La perméabilité mesurée est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 1-6 : Valeurs de perméabilité mesurées pour l'annulus fibrosus de disques humains dans les 3 directions [42]

| Grade de dégénérescence | Valeur perméabilité en $\times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{N.s}$ | | |
|-------------------------|---|-------------------|---------|
| | Axiale | Circonférentielle | Radiale |
| I | 1,530 | 1,147 | 1,924 |
| II | 1,639 | 1,559 | 1,739 |
| III | 1,643 | 1,618 | 1,675 |

Les valeurs habituelles de la perméabilité pour les disques intervertébraux humains sont de l'ordre de $10^{-16} \text{ m}^4/\text{Ns}$ [45, 50].

La perméabilité est déterminée par la taille des « pores » dans le tissu, qui sont supposément plus grandes dans la direction radiale qu'axiale ou circonférentielle. La perte d'eau est responsable de la diminution des espace inter-fibres ou « pores » [42]. La perméabilité augmente avec l'augmentation de l'hydratation et diminue avec l'augmentation de la charge mécanique [57].

Selon Quinn et al. sous l'effet d'un chargement mécanique, la perméabilité diminue plus rapidement selon les directions perpendiculaires à la direction de la charge que dans la direction parallèle. Ainsi, l'anisotropie de la perméabilité augmente avec la charge. Avec un gonflement libre, les glycosaminoglycanes, qui procurent le plus de résistance au fluide sont orientés aléatoirement ce qui résulte à la matrice isotrope, même si on peut penser que la résistance au fluide aura une direction privilégiée [64]. Sous l'effet d'une charge, les glycosaminoglycanes ne sont plus orientés aléatoirement mais se réorientent au niveau moléculaire pour répondre à la contrainte appliquée. Il en résulte une direction privilégiée par les GAG et donc l'écoulement du fluide aura des profils différents selon les directions. La perméabilité du tissu devient anisotrope. Les déformations de la matrice de GAG entraînent une modification de l'anisotropie de la perméabilité[65]. Les travaux d'Accadbled et al. certifient qu'il n'existe pas de différence significative de la valeur de la perméabilité entre des échantillons stockés au frais et des congelés [59].

1.3 Imagerie par résonnance magnétique (IRM)

1.3.1 Présentation IRM

1.3.1.1 Principe

L'IRM est une technique d'imagerie médicale non invasive basée sur le principe de la résonnance magnétique nucléaire. Cette technologie donne des renseignements morphologiques dans l'espace avec d'excellents contrastes et des renseignements sur la nature des tissus et des flux circulants.

1.3.1.1.1 Installation matérielle

L'imagerie par résonnance magnétique repose sur l'utilisation d'un champ magnétique autour du patient créé par un aimant circulaire. Les champs magnétiques créés par des aimants supraconducteurs varient de 0.2 Tesla (T) à 3 Tesla en clinique jusqu'à 7 ou 14.3 Tesla en recherche (cf. Figure 1-13). De plus, des gradients d'aimantation de positionnement sont créés dans l'espace par des aimants de petites tailles. L'utilisation de blindages actifs et l'optimisation permettent de corriger les courants induits susceptibles de dégrader la nature du champ B_0 .



Figure 1-13: Installation IRM



Figure 1-14: Antenne de tête

Le signal IRM est créé par des ondes radio fréquence (RF) générées par des antennes spécifiques (cf. Figure 1-14) qui excitent les noyaux des molécules dans un volume d'intérêt. Les antennes communément employées sont les antennes de tête, de thorax et de genoux. Elles ont l'avantage de délivrer le signal d'excitation au plus près de la zone d'intérêt et d'avoir un très bon rapport signal/bruit pour la réception du signal.

1.3.1.1.2 Théorie physique, échos de spins $T1$ et $T2$

Naturellement, les protons ont des propriétés magnétiques, ils oscillent sur eux-mêmes, ce qui correspond au vecteur d'orientation qui caractérise le spin magnétique du proton (cf. Figure 1-15). Ce mouvement définit la fréquence de précession qui est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique environnant. Le mouvement de précession peut se décomposer en deux projections : une composante longitudinale et une transversale. Dans un environnement quelconque, le vecteur d'orientation du proton a une direction aléatoire et la résultante de l'ensemble des vecteurs d'orientation est donc nulle (cf. Figure 1-16). Cependant, lorsque les

protons sont immergés dans un champ magnétique, les vecteurs d'orientation ont tendance à s'aligner (dans le sens parallèle ou anti-parallèle) avec le champ magnétique, ce qui crée un vecteur d'aimantation global non nul (cf. Figure 1-17). L'imagerie par IRM se base toujours sur un ensemble de protons et non un seul; si on considère un groupe de spins dans un champ magnétique B_0 , statistiquement les composantes transverses des spins vont s'annuler et les composantes longitudinales donnent un vecteur d'aimantation parallèle et dans le même sens que B_0 (selon les statistiques de Boltzmann, il y a plus de spins parallèles qu'antiparallèles, cet écart augmente avec la force du champ B_0).

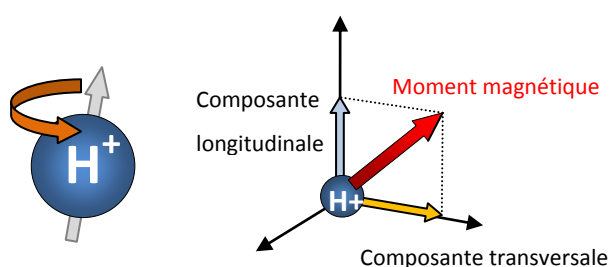


Figure 1-15: Spin d'un atome d'Hydrogène et décomposition du moment magnétique

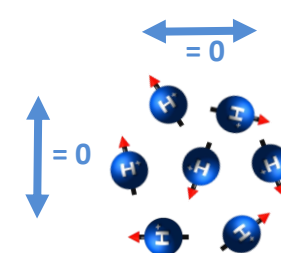


Figure 1-16: Orientation aléatoire des spins dans l'espace

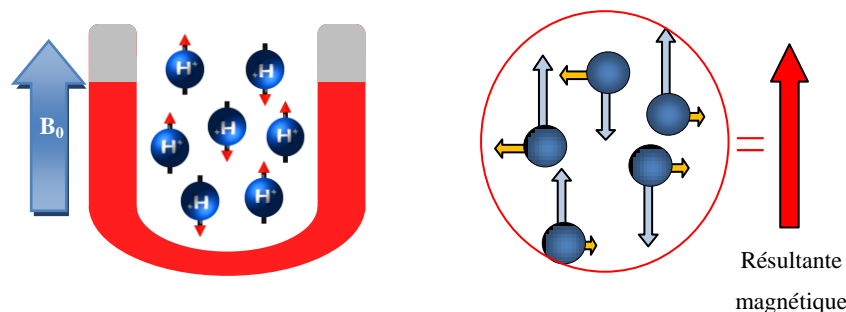


Figure 1-17: Orientation des spins selon le champ B_0 : la résultante magnétique est dans le sens du champ B_0 , car il y a plus de spins parallèles qu'antiparallèles

Les séquences d'acquisition commencent par une courte phase d'excitation grâce à une série d'ondes radiofréquences. L'onde RF entre en résonnance avec la fréquence de précession des spins, ce qui conduit à l'excitation de l'ensemble des spins, ensuite les spins ont tendance à revenir à leur état d'équilibre en restituant l'énergie apportée par l'onde RF (cf. Figure 1-18). L'onde RF provoque donc une bascule du vecteur d'aimantation (passage du sens parallèle vers

antiparallèle) c'est l'onde RF à 90° . L'évolution vers l'équilibre de la composante longitudinale traduit la différence entre les populations de spins parallèles et antiparallèle, et la composante transversale traduit le retour plus ou moins complet de la phase de l'ensemble des spins. La composante longitudinale retrouve l'état de basse énergie (sens « parallèle ») selon une courbe exponentielle qui est caractérisée par la constante T1 représentant 63% de la valeur finale atteinte (variant de 200 à 3000ms en général) (cf. Figure 1-19).

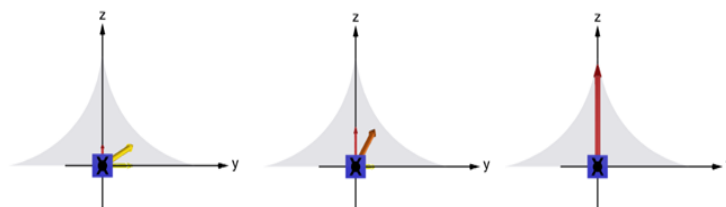


Figure 1-18: Retour à l'équilibre du spin après une perturbation (RF à 90°)

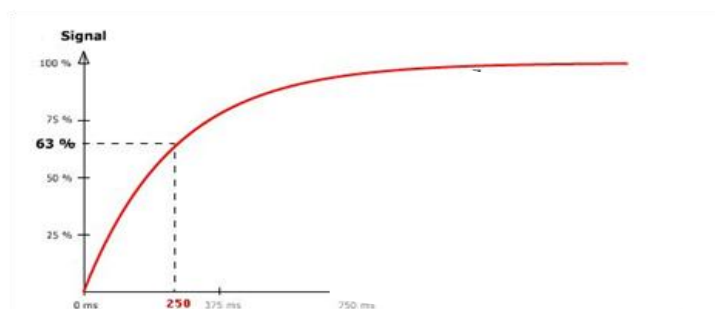


Figure 1-19: Relaxation de la composante T1

Le T1 est sensible à la mobilité des molécules, il sera plus court pour des grosses molécules. De manière similaire, la composante transversale qui est sensible à l'hétérogénéité du champ, retrouve son état d'équilibre selon une sinusoïde amortie appelée « signal de précession libre » (Free Induction Decay –FID). L'enveloppe de cette FID est une courbe exponentielle décroissante qui est caractérisée par la constante T2 représentant 37% de la valeur initiale. Cependant, à cause d'une l'hétérogénéité d'origine moléculaire et d'une l'hétérogénéité du champ B0 à l'échelle microscopique, l'enveloppe de la FID est une exponentielle décroissante en T2* et non en T2. Pour réellement observer la constante T2, il faut appliquer une deuxième RF à 180° pour rétablir la cohérence de phase et s'affranchir des hétérogénéités propres au champ B0. Ainsi, le signal obtenu est presque égal à la valeur initiale de la composante transverse, une légère atténuation est causée par l'hétérogénéité moléculaire qui correspond à la propriété T2 du

tissu. T2 se calcule en étant l'enveloppe de la sinusoïde amortie de l'onde RF à 90° combinée à celle de l'onde RF à 180° (cf. Figure 1-20).

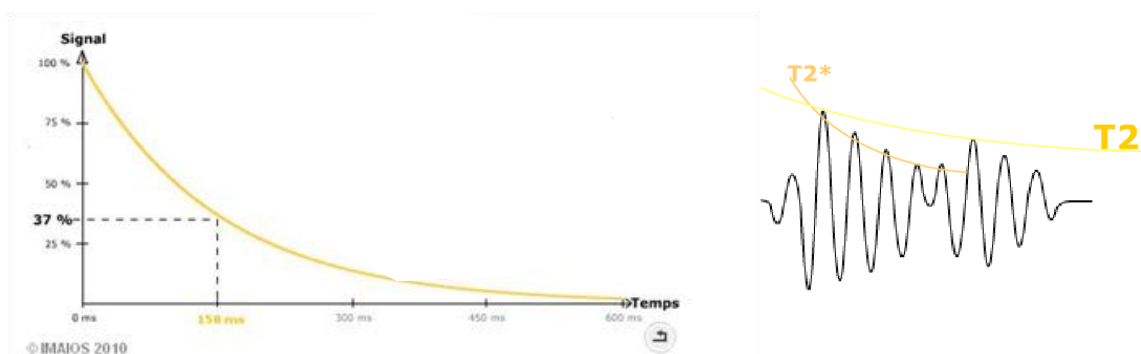


Figure 1-20: Relaxation en T2 et calcul du T2* après l'impulsion à 180°

Les séquences de base utilisée en SpinEcho sont une suite d'impulsions RF à 90° et 180° basées sur deux constantes importantes :

- le temps d'écho (TE) qui est le temps entre l'impulsion à 90° et la réception du signal de relaxation des protons du tissu, à noter que l'onde RF à 180° est à TE/2 seconde.
- Le temps de répétition (TR) qui est le temps entre deux impulsions à 90°

En ajustant les paramètres TE et TR, on peut réaliser des acquisitions pondérées en T1 ou en T2.

Tableau 1-7: Temps de relaxation typique pour certains organes humains

| Tissu | T1 (en ms) | T2 (en ms) |
|-------------------|------------|------------|
| Substance grise | 810 | 100 |
| Substance blanche | 680 | 90 |
| Foie | 420 | 45 |
| Graisse | 240 | 85 |

Il est également possible d'augmenter le contraste inter tissulaire par l'ajout de produit de contraste comme du gadolinium qui a pour effet de réduire les temps de relaxation des tissus.

1.3.1.1.3 Transfert d'aimantation

Le transfert d'aimantation permet de connaître le signal de certaines macromolécules; on procède par l'impulsion d'une onde RF de préparation décalée de 1500 Hz par rapport à la fréquence de précession des protons libres (contenus dans l'eau ou la graisse) qui a pour but de saturer les protons liés (cf. Figure 1-21). De part les échanges entre les protons liés et les protons

libres, la saturation des protons liés aux macromolécules est transmise aux protons libres proches. Le signal d'une zone contenant des protons liés sera donc réduit par rapport à une zone où il n'y a pas de protons liés. L'avantage de cette technique est important pour les tissus contenant des macromolécules comme dans les tissus cartilagineux avec les macromolécules de protéoglycanes.

Les séquences de transfert d'aimantation sont donc effectuées en deux temps, une image pondérée en T2 suivie d'une image saturée (cf. Figure 1-22).

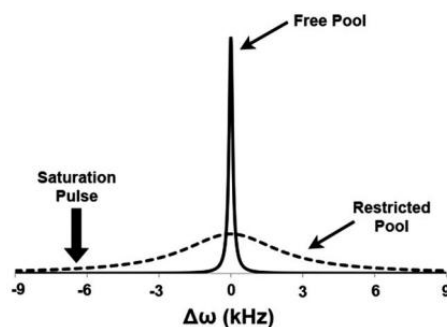


Figure 1-21: Spectre de fréquence pour les liaisons collagène-proton, la première impulsion sature les protons liés [66]

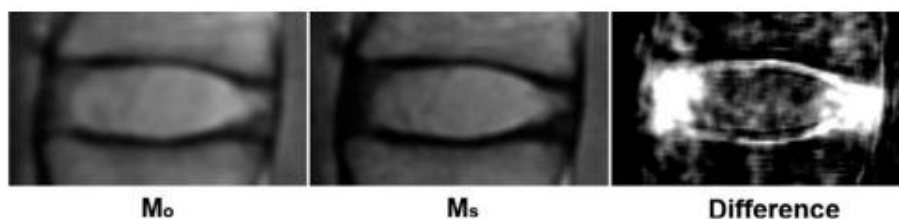


Figure 1-22: La première image est réalisée sans saturation (signal émis des protons liés et non liés), la deuxième image est saturée (signal émis que par les protons libres), ainsi la différence (3ième image) ne représente que le signal des protons liés, donc des macromolécules liées [66]

1.3.1.1.4 Diffusion

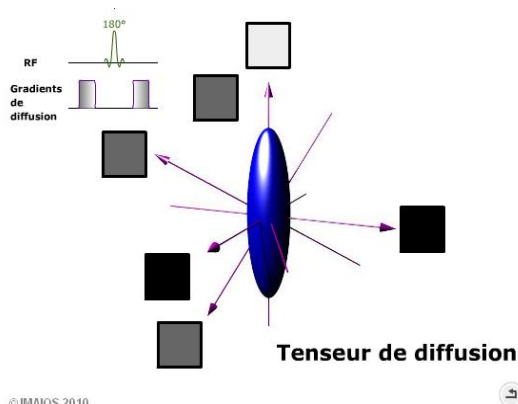
Les séquences de diffusion ont pour objectif de détecter les micromouvements des molécules d'eau dans l'organisme dans une unité de volume fonctionnelle (voxel). Le déplacement des molécules d'eau donne des informations d'une manière indirecte sur la structure du milieu environnant.

Le principe de l'imagerie par diffusion DWI (Diffusion weighted imaging) réside dans l'application de gradients magnétiques dans les 3 directions de l'espace. Un faible signal reflète

le déplacement dans le sens du gradient des molécules d'eau. Typiquement ce sont des séquences d'Echo-planar qui sont utilisées à cause de leur rapidité d'acquisition ce qui limite les risques d'artefact souvent présents avec l'imagerie par diffusion (distorsion de l'image...)

Le coefficient apparent de diffusion (ADC) permet de mettre en valeur la mobilité des molécules d'eau et il se calcule grâce à des gradients appliqués dans l'espace. La magnitude résultant des 3 images permet de calculer une image pondérée en diffusion globale (« image trace »). Mais à partir de seulement deux des 2 séquences avec des facteurs « b » différents, la diffusion est estimée par le coefficient apparent de diffusion. L'ADC (en mm^2/s) est un facteur qui est indépendant du T2, un hyposignal correspond à une absence de diffusion.

Le facteur « b » est déterminé par l'amplitude, la durée, et l'espacement dans le temps des gradients appliqués, donc plus les gradients sont intenses, appliqués longtemps et espacés dans le temps, plus le facteur « b » sera important. Ainsi pour une séquence en diffusion, une image sera acquise avec un facteur $b=0 \text{ s/mm}^2$ (pondérée en T2) et une autre avec un $b=1000 \text{ s/mm}^2$ (pondérée en diffusion).



Pour des tissus très organisés comme les fibres nerveuses, l'imagerie avec le tenseur de diffusion (DTI) est la plus adéquate. Il faut au minimum 6 gradients. Le tenseur de diffusion est un vecteur tridimensionnel qui synthétise l'ensemble des informations de diffusion dans n'importe quelle direction de l'espace.

Figure 1-23: Tenseur de diffusion calculé à partir de multi gradients

A partir de ce vecteur, on peut extraire le rapport d'anisotropie (Fraction d'Anisotropie - FA) qui détermine les directions privilégiées par la diffusion. La DTI (Diffusion tensor imaging) est par exemple un outil puissant pour la tractographie qui permet d'étudier in vivo les grands faisceaux anatomiques qui composent l'encéphale et de les reconstruire en trois dimensions.

Cependant, l'imagerie par diffusion est très sensible aux artefacts causés par les gradients, l'image peut être fortement perturbée : distorsion, dilatation, contraction. Les séquences DWI

sont sensibles aux macro-mouvements du patient comme les contractions cardiaques et les séquences DTI sont plus sensibles au croisement inter fibres en l'intérieur même d'un voxel.

1.3.1.1.5 Autres séquences

D'autres séquences IRM existent et se séparent en deux grandes familles de séquences : les séquences d'échos de spin avec une onde RF suivie d'une onde RF de rephasage à 180° et les séquences de gradient. Chacune de ces familles regroupe de nombreuses variantes et il existe également des séquences hybrides combinant les deux techniques.

Dans les séquences en échos de spin, nous retrouvons les séquences d'échos de spin rapide (fast spin echo), ultra-rapide échos de spin (Single shot FSE et Haste) afin d'augmenter la vitesse d'acquisition (utilisé en Diffusion) et les séquences en inversion/récupération. Dans la famille des séquences de gradient, les séquences d'échos de gradient avec destruction de l'aimantation transversale résiduelle (spoiled gradient echo), échos de gradient ultra-rapide (ultrafast gradient echo), l'écho planar (EPI)... ont été développées afin d'améliorer les contrastes et les vitesses des séquences.

1.3.1.2 IRM quantitatif

L'IRM quantitatif a pour objectif de déterminer les propriétés intrinsèques des tissus en faisant abstraction des conditions d'acquisition de l'image et des paramètres changeants à cause de la chaîne d'acquisition (le gain de l'image varie entre deux séquences d'acquisition).

Des images pondérées en T1 ou en T2 sont réalisées sur une coupe donnée du patient puis répétées un certain nombre de fois en faisant varier entre chaque acquisition un seul paramètre principal de la séquence (variation de TI ou de TE). Ainsi, la différence de signal observée entre deux images est forcément imputée à la variation du paramètre, et les variations causées par les éléments extérieurs au tissu s'annulent. Pour les images pondérées en T1, l'image est acquise typiquement entre 10 et 15 fois avec le paramètre TI qui varie par exemple de 50 à 1900ms. A partir de ce groupe d'images, la constante T1 est déterminée pour chaque pixel de l'image selon une formule exponentielle.

$$S_{I(T1)} = S_{I(T1=0)} \cdot (1 - 2 \cdot e^{(-T1/T1)}) \quad [20] \quad \text{Équation 1-38}$$

Il en est de même pour les images pondérées en T2 ou en T2*, à partir d'un groupe d'images l'évolution du signal dans le temps pour un pixel donné est approximée par une courbe exponentielle.

$$S_{I(TE)} = S_{I(TE=0)} \cdot e^{-TE/T1} \quad [20] \quad \text{Équation 1-39}$$

1.3.2 Corrélations entre paramètres IRM et composants biochimiques

L'estimation des contenus biochimiques des tissus ou de leurs propriétés mécaniques permet de détecter l'état de dégénérescence du tissu et ainsi de pouvoir diagnostiquer précocement une pathologie. Des acquisitions IRM en quantitatif sont réalisées sur les tissus à étudier pour déterminer les paramètres T1, T2, T2*, MT ou en Diffusion, puis parallèlement à ces acquisitions des tests biochimiques sont réalisés pour estimer le contenu en protéoglycanes ou en collagène. A partir des deux sets de données, des corrélations peuvent être établies. Les principales corrélations existantes entre les paramètres IRM et les contenus biochimiques sont synthétisées dans le Tableau 1-8.

Tableau 1-8 : Principales corrélations entre les propriétés IRM et les composants biochimiques

| | [GAG] | [collagène] | [eau] | dégénérescence |
|-----------|--|--|--|---|
| T1 | IVD porc [67] | | | IVD porc <i>Diminution [67]</i> |
| T1ρ | IVD humain <i>R2=0.70 [19]</i> Cartilage humain <i>R2=0.93 [68]</i> | | IVD humain <i>Faible</i> <i>corrélation [5]</i> | IVD humain <i>diminution [5]</i> |
| T2 | | Cartilage bovin <i>Relié au réseau de</i> <i>fibre [69]</i> | | IVD porc <i>diminution [67]</i> |
| MTR | | IVD humain <i>Forte corrélation[70]</i> | | |
| Diffusion | IVD humain <i>(ADC mean, ADCz) [13]</i> | | | IVD humain <i>diminution [13, 71]</i> |

1.3.2.1 T1, T1p et T2

Les paramètres T1 et T2 ont été corrélés avec le contenu en collagène du tissu selon l'étude d'Antoniou publiée, en 2006 [13]. Différentes enzymes ont été injectées dans une queue de bovin (trypsine, collagénase, hyaluronidase). L'injection de la collagénase a provoqué une diminution des signaux T1 et T2. De plus, la collagénase est une enzyme connue pour son effet sur la structure de la protéine de collagène en altérant sa structure en triple-hélice, ce qui laisse penser que les signaux MR T1 et T2 sont sensibles au collagène.

L'étude de Toffarin et al. [67] portant sur des tissus articulaires de porc démontre que le paramètre T1 est sensible à une déplétion excessive en protéoglycanes du tissu. Une étude sur le NP montre que les paramètres T1 et T2 diminuent significativement selon le grade de dégénérescence du disque mais présentent de faibles corrélations avec les contenus biochimiques, ce qui implique que la structure joue un rôle important [66]. Les paramètres IRM sont sensibles aux contenus des tissus mais aussi à la structure de la matrice des tissus.

Selon la littérature, le signal T2 est quant à lui fortement lié au réseau de fibres de collagène. Nieminen et al. a montré dans ces travaux portant sur le cartilage de genoux de bœuf, qu'après un traitement de 44h dans une solution avec de collagénase, le signal T2 diminue. Une étude plus récente de Wang [66] effectuée sur 4 sujets âgés de 30, 47, 54 et 69 ans abonde dans ce sens avec une légère diminution du T2 observée selon les grades de Pfirrmann. Il est aussi important de noter que le signal en T2 est différent entre le nucléus et l'annulus et ce, pour tous les grades de Thomson [72].

Tableau 1-9: Variation du T2-mapping selon les grades de dégénérescence dans l'AP et le NP du disque intervertébral [73]

| Grade | T2 Value of NP | T2 Value of AF | Distinction of NP and AF |
|-------|---|---|-----------------------------|
| I | High T2, homogeneous | Low T2, homogeneous | Clear with regular border |
| II | Mild decrease of T2, mildly inhomogeneous | Mild increase of T2, mildly inhomogeneous | Clear with irregular border |
| III | Moderate decrease of T2, moderately inhomogeneous | Moderate increase of T2, moderately inhomogeneous | Unclear |
| IV | Severe decrease of T2, severely inhomogeneous | Severe increase of T2, severely inhomogeneous | Lost |

Note—NP = nucleus pulposus, AF = annulus fibrosus.

Pour permettre la détection précoce des pathologies dégénératives, des études tendent à utiliser le T1 avec agent de contraste (Gadolinium) qui permet d'évaluer le contenu en

protéoglycanes. Cependant, le temps de propagation de l'agent de contraste est une limitation au procédé [74]. Dans une étude sur des disques cadavériques humains, des corrélations sont trouvées entre le signal T1rho et la concentration en GAG dans le nucléus (poids humide : $R^2=0.70$ ou poids sec : $R^2=0.67$) et également des corrélations avec le grade de dégénérescence ($R^2=0.76$) [75]. Une autre étude sur le cartilage animal de Weathon corrobore ces données : T1ρ est fortement corrélé avec les GAG ($R^2=0.926$) [68]. La seule étude ne trouvant pas de lien évident entre le T1rho et le contenu en GAG est l'étude de Mwale et al. [14]. La technique sodium IRM permet aussi d'estimer les protéoglycanes dans le cartilage articulaire [68] mais son application clinique est difficile à cause des modifications de l'instrumentation qu'il faut apporter au scanner clinique.

1.3.2.2 Ratio de transfert d'aimantation (MTR)

Au niveau des tissus cartilagineux comme le disque patellaire ou les disques intervertébraux, le signal du transfert d'aimantation est un outil souvent utilisé. Sur une étude portant sur des disques cadavériques humains avec différents grades de Thompson (grade de I à V) [66], le transfert d'aimantation augmente selon les grades de Thompson, mais n'est pas corrélé avec les contenus, ce qui laisse penser que le transfert d'aimantation est influencé d'une part par l'intégrité du tissu et d'une autre part sa composition.

Pour une dégradation de 36 heures avec de la collagénase, le MTR diminue [76] ce qui a été confirmé par d'autres études [70, 77]. Le MTR dépend de la concentration en collagène et de la concentration totale de protéines [70]. Le MTR est connu pour être plus lié au collagène qu'aux protéoglycanes [66, 76]. Un traitement à la trypsine qui agit plus sur les PG que le collagène, ne produit pas d'effet sur le MTR [13]. Cependant, pour le même traitement, une légère augmentation a été constatée [78] ce qui peut s'expliquer par une dégradation enzymatique des PG qui affecte indirectement la structure du tissu et du collagène environnant. Au niveau de la dégénérescence *in vivo*, seule une tendance a été observée par Wang : plus le sujet est âgé moins la démarcation annulus/nucléus est marquée [66].

1.3.2.3 Diffusion

Un important indice pour prédire les contenus et la structure tissulaire est la diffusion. La diffusion moléculaire diminue l'amplitude du spin écho et est utilisée pour caractériser la dégénération in vitro. L'étude de Chiu et al. [72] montre que l'ADC est clairement différent entre l'annulus et le nucléus, avec une valeur supérieure pour le nucléus, et aussi le coefficient de diffusion diminue quand le grade de Thompson augmente. Le coefficient de diffusion apparent peut s'interpréter d'une manière globale (ADC mean) ou selon chaque direction de diffusion (ADCx, ADCy et ADCz). Dans une étude in vivo sur 42 jeunes patients, Kertulla et al. a montré une diminution de la diffusion orientée pour les disques dégénérés par rapport à des disques sains, mais aucune différence n'est à noter dans la direction supérieure-inférieure (ADCz). L'ADC suggère que la perte d'intégrité du disque dépend de la direction [71]. Kurunlahti et al. ont trouvé que l'ADC est plus faible dans les disques lombaires dégénérés, bien que ce ne soit pas significatif [79]. Dans l'étude d'Antoniou [10], l'ADC a généralement tendance à diminuer avec la dégénérescence dans le NP ($1.299 \pm 0.152 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ pour un grade 2 et de $0.959 \pm 0.172 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ pour un grade 5) et seulement l'ADCx et l'ADCy dans l'annulus antérieur. Malgré ces corrélations, aucun lien significatif n'a été trouvé entre l'ADC mean et l'eau, l'ADC mean et la concentration en PG, mais il est inversement relié à la concentration en collagène dénaturé dans le NP. Dans le NP, l'ADCz est corrélé directement avec le contenu en PG et inversement au contenu global en protéines (significatif) et au contenu en eau (significatif). L'augmentation des grandes protéines dans le NP peut selon l'auteur diminuer la mobilité du fluide extracellulaire et donc l'ADC. La direction de la diffusion de l'ADC est donc importante pour comprendre le phénomène de diffusion. Dans une étude sur le tenseur de diffusion macroscopique à haut champ (7.1T) sur l'AF d'un disque porcin, Hsu et al. [80, 81] ont démontré que l'anisotropie de la diffusion est potentiellement reliée à l'orientation des fibres de collagène.

1.3.3 Corrélations entre paramètres IRM et propriétés mécaniques

Quelques études ont cherché à établir des liens entre ces contenus biochimiques et les propriétés mécaniques [16, 50]. Pour le disque intervertébral, l'étude la plus récente est l'étude de Périé et al. [17]. Cette étude rapporte que le module de compression est inversement relié au contenu en eau et directement relié à celui en GAG, tandis que la perméabilité est directement reliée au contenu en eau et inversement à celui en GAG pour des disques bovins.

Les liens entre propriétés mécaniques et contenus biochimiques sont une première étape pour une meilleure compréhension des processus et mécanismes biologiques qui mènent à une perte des caractéristiques mécaniques avec la dégénérescence.

De plus les paramètres IRM ont une certaine sensibilité vis-à-vis des contenus biochimiques qui sont eux-même en lien avec les propriétés mécaniques tissulaires. Ainsi, l'IRM a été étudiée comme outil non invasif pour évaluer les propriétés mécaniques des tissus.

Des corrélations entre les propriétés mécaniques et biochimiques ont été rapportées sur l'os trabéculaire, plus précisément entre le temps de relaxation transverse $T2^*$ et le module d'Young osseux [8, 82]. Dans d'autres études concernant le cartilage articulaire [69], le module d'Young, le module d'agrégat et le coefficient de Poisson sont déterminés par des tests de compression non confinée. Le signal $T1$ et le contenu en GAG sont capables de prédire 87% de l'évolution du module de Young pour le cartilage bovin. Kurkijavic [83] a étudié 13 genoux cadavériques humains dans un champ magnétique de 9,4T, le signal en $T1$ avec agent de contraste (gadolinium) permet d'être corrélé uniquement avec le module de Young au niveau du sillon fémoral ($r=0.87$ au mieux). Dans l'étude de Périé et al. [20], la perméabilité du NP des disques intervertébraux bovins présente une corrélation avec la relaxation longitudinale $T1$ ($r = 0.75$; $p = 0.03$). Nguyen et al. [19] ont trouvé une faible corrélation entre le $T1\rho$ et la pression osmotique ($R^2=0,59$), mais pour l'instant $T1\rho$ n'est pas corrélé significativement avec une propriété mécanique dans le disque intervertébral [14].

Le $T2$ et le MTR sont liés à la perméabilité avec respectivement $r = 0.78$ ($p = 0.02$) et $r = 0.85$ ($p = 0.007$). Enfin, toujours selon l'étude de Périé et al. une tendance se dessine entre la diffusion et le module d'agrégat d'une part et la diffusion et la perméabilité d'autre part [20].

L'ensemble des corrélations établies entre les paramètres mécaniques et IRM sont regroupées dans le Tableau 1-10. Avec l'utilisation des paramètres $T1$ et $T1\rho$ et dans des conditions particulières (utilisation de très haut champ, utilisation d'agent de contraste), les

corrélations trouvées sont fortes, sinon les corrélations entre l'IRM quantitatif et les propriétés mécaniques sont modérées. L'exploration de régressions multi paramètres avec l'étude de propriétés mécaniques supplémentaires peut permettre d'obtenir de meilleures corrélations.

Tableau 1-10 : Principales corrélations entre les propriétés mécaniques et IRM

| | Module d'Young | Module d'agrégat | Pression osmotique | Perméabilité |
|----------------------------------|--|---|---|---|
| T1 | Cartilage humain [84] | | IVD humain <i>tendance</i> $R^2=0,59$ [19] | IVD bovin (NP) $r = 0.75$ [20] |
| T1 avec agent de contraste | Cartilage bovin $r=0.87$ (gadolinium) [69] Genoux humain <i>forte corrélation</i> [83] | | | |
| T1p | IVD bovin <i>sensible au</i> <i>chargement cyclique</i> [14] | | IVD humain <i>tendance</i> [5] | IVD humain <i>multi</i> <i>corrélations</i> [19] |
| T2 | Cartilage porc [85] | | | IVD bovin (NP) $r = 0.78$ [20] |
| T2* | Os trabéculaire humain [8, 82] | | | |
| MTR | | IVD bovin (NP) <i>tendance</i> [20] | | IVD bovin (NP) $r = 0.85$ [20] |
| Diffusion | | IVD bovin (NP) <i>tendance</i> [20] | | |

CHAPITRE 2 OBJECTIFS-HYPOTHESES

Les propriétés mécaniques de l'IVD sont déterminées par différents protocoles et modèles mathématiques et il existe une certaine variabilité de ces paramètres dans la littérature. Cette variabilité s'explique par un manque de normalisation dans la réalisation des tests mécaniques en compression non confinée. Comme il a été détaillé dans la revue critique de la littérature, différents protocoles et modèles mathématiques sont utilisés et de plus les conditions initiales apparaissent jouer un rôle important sur la détermination des caractéristiques mécaniques. L'influence des protocoles expérimentaux sur la réponse mécanique a été étudiée en compression confinée, mais non en compression non confinée.

Dans la littérature, des corrélations ont été établies entre les contenus biochimiques et le signal IRM [66, 67, 69, 75, 76] pour le cartilage ou le disque intervertébral, mais peu d'études ont été réalisées en IRM quantitatif sur l'IVD [14, 77, 86]. Les mêmes contenus biochimiques ont été reliés aux caractéristiques mécaniques pour le disque au complet dans l'étude de Périé et al. 2006 [20]. Peu de travaux ont été réalisés à nos jours sur les corrélations entre les propriétés mécaniques et IRM. La recherche est plus avancée pour les tissus articulaires cartilagineux [36, 68, 69, 83] que pour le disque intervertébral, quelques corrélations significatives existent pour le NP (lien avec la perméabilité essentiellement) [86] et des tendances entre les paramètres sont à confirmer (lien avec H_{A0} , pression osmotique) [14, 19, 86]. Les corrélations établies entre les paramètres IRM quantitatif et les propriétés mécaniques sont donc généralement modérées et quelques régressions multi-paramètres ont été définies.

Afin de mieux estimer les changements mécaniques précoces de l'IVD in vivo, il est indispensable d'établir de nouvelles corrélations entre les propriétés mécaniques et les paramètres IRM. L'utilisation de l'IRM quantitatif permet-elle de caractériser le comportement mécanique du disque intervertébral?

Pour répondre à cette problématique, une méthodologie a été mise en œuvre pour définir d'une part les propriétés mécaniques par des tests physiques de compression et d'autre part par les propriétés magnétiques intrinsèques du tissu par des acquisitions en IRM quantitatif.

La caractérisation du IVD a nécessité de répondre aux objectifs suivants :

- Mettre en œuvre et réalisation de protocoles de tests mécaniques en compression confinée, compression non confinée et mesure de la perméabilité.
- Établir un protocole de dégénérescence tissulaire pour obtenir des tissus ayant un comportement mécanique différent.
- Réaliser et analyser des acquisitions en IRM quantitatif.
- Rechercher des corrélations entre les paramètres IRM et mécaniques.

Notre étude se base sur l'hypothèse que l'IRM est sensible aux propriétés mécaniques et biochimiques du disque et que chacune des données mécaniques du disque intervertébral peut être reliée à une combinaison de paramètres IRM.

Cette hypothèse se justifie par l'absence d'homogénéité dans les corrélations mécanique-IRM, et la grande dispersion des résultats. De plus, aucune étude n'a de manière complète établi de corrélation pour tous les paramètres mécaniques. L'hypothèse sera rejetée si l'analyse statistique des résultats ne révèle pas des relations significatives (corrélation supérieure à 60%).

CHAPITRE 3 TESTS MÉCANIQUES –PRÉSENTATION ARTICLE N°1

3.1 Présentation de l'article:

La réalisation des corrélations IRM-mécanique requiert l'estimation des paramètres mécaniques grâce à des tests mécaniques en compression non confinée. Cependant, à la lecture de la littérature, nous avons observé que les propriétés mécaniques et les protocoles expérimentaux pour l'AF et le NP étaient très variables selon les auteurs. La comparaison des protocoles et la détermination de leur influence sur la réponse mécanique est donc nécessaire à cause de l'absence d'étude sur le sujet et de la variabilité des paramètres imputée aux protocoles. Aucune étude n'a comparé de manière précise l'influence des conditions initiales et de test sur la réponse mécanique de l'IVD.

Cet article est intitulé «Influence of experimental protocols on the mechanical properties of the intervertebral disc in unconfined compression», et a été soumis pour publication à la revue Journal of Biomechanics en décembre 2010. La contribution du premier auteur à la préparation et à la rédaction de l'article est évaluée à 85%.

3.2 Article n°1: Influence of experimental protocols on the mechanical properties of the intervertebral disc in unconfined compression

Title :

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL PROTOCOLS ON THE MECHANICAL PROPERTIES
OF THE INTERVERTEBRAL DISC IN UNCONFINED COMPRESSION.

Authors :

Maximilien Recuerda ^{1,2}

Simon-Pierre Côté ^{1,2}

Isabelle Villemure ^{1,2}

Delphine Périé ^{1,2}

Affiliations :

¹ École Polytechnique, Montréal, QC, Canada

² Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada

Corresponding author:

Delphine Périé

Phone: (1) 514-340-4711 # 4437

Fax: (1) 514-340-5264

E-mail address: delphine.perie@polymtl.ca

Keywords:

Intervertebral Disc, unconfined compression test, permeability, mechanical properties, experimental protocol

Word count: 2750

3.2.1 Abstract

The lack of standardization in experimental protocols for unconfined compression tests of intervertebral discs (IVD) tissues is a major issue in the quantification of their mechanical properties. Our hypothesis is that the experimental protocols influence the mechanical properties of both annulus fibrosus (AF) and nucleus pulposus (NP). IVD extracted from bovine tails were tested in unconfined compression stress-relaxation experiments according to 6 different protocols, where for each protocol, the initial swelling of the samples and the applied preload were different. The Young's modulus was calculated from a viscoelastic model, and the permeability from a linear biphasic poroviscoelastic model (BPVE). Important differences were observed in the prediction of the mechanical properties of the IVD according to the initial experimental conditions, in agreement with our hypothesis. The protocol including an initial swelling, a 5% strain preload and a 5% strain ramp is the most relevant protocol to test the annulus fibrosus in unconfined compression, and provides a permeability of $5.0 \pm 4.2 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ and a Young's modulus of $7.6 \pm 4.7 \text{ kPa}$. The protocol with semi confined swelling and a 5% strain ramp is the most relevant protocol for the nucleus pulposus, and provides a permeability of $10.7 \pm 3.1 \times 10^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ and a Young's modulus of $6.0 \pm 2.5 \text{ kPa}$.

3.2.2 Introduction

The intervertebral disc (IVD) is an essential component of normal spinal function; it permits spine motion, distributes large loads and dissipates energy (Rohlmann et al. 2006). To realize these tasks, the IVD is composed of a complex structure that consists of an inner part called the nucleus pulposus (NP) and an outer ring of fibrous cartilage called the annulus fibrosus (AF). The NP consists of a gelatinous tissue of proteoglycans, water and other proteins enclosed in a

random oriented collagen matrix (Iatridis et al. 1998). The AF is structured as a succession of rings, 15-25 concentric lamellae (Urban and Roberts 2003). In each lamella, collagen fibers are orientated approximately with an edge of 30° with respect to the transverse plane, this orientation changing alternatively between two successive layers (Galante 1967; Ghosh 1988).

During life, the composition and the structure of the IVD can degenerate because of a damage or aging. Degeneration is the main cause of back pain and becomes a major health problem in industrialized countries. Several studies (Urban and McMullin 1988; Iatridis et al. 1998) demonstrated a relationship between the state of degeneration and the mechanical properties. Thus, numerous studies have reported the mechanical properties of intervertebral discs (human, bovine, porcine...) using confined compression, indentation, or unconfined compression (Yao et al. 2002; Perie et al. 2005; Mwale et al. 2008; Nguyen et al. 2008) combined with mathematical models to quantify the Young's modulus or compressive modulus, Poisson's ratio, permeability and/or viscoelastic properties from experimental data. However, unconfined compression has been more commonly used for the study of articular cartilage than for IVD (DiSilvestro and Suh 2002; Li et al. 2003; Wilson et al. 2006; Julkunen et al. 2008). Many experimental protocols are reported, which results in a large variability of the computed mechanical properties. Differences between the experimental protocols include the initial conditions, the number of ramps (from 1 to 4), the ramp velocity (from 1 to 7.1% strain/s) and the ramp amplitude (from 5 or 10%). Initial conditions are defined by the pretest swelling (from 10 min to 1 hour) and the pre-strain (5% to 10% strain) (DiSilvestro and Suh 2002; Korhonen et al. 2002; Allen and Athanasiou 2006; Julkunen et al. 2008). Variability in mechanical properties resulting from different experimental protocols was already observed for confined compression tests done on the IVDs (Perie et al. 2005). The hydraulic permeability computed from biphasic models varies from 0.13 to $1.2 \cdot 10^{-15}$ m^4/Ns and Young's modulus ranges from 0.12 ± 0.13 to 0.74 ± 0.13 MPa (Best et al. 1994; Iatridis

et al. 1998; Klisch and Lotz 2000; Perie et al. 2005). Perie et al. (Perie et al. 2005) found that the best initial condition for confined compression of the IVD was the confined swelling, which provided mechanical properties with lowest relative variances for both AF and NP.

The lack of standardization in experimental protocols for unconfined compression tests of IVD tissues is a major issue in the quantification of their mechanical properties. Our hypothesis is that the experimental protocols influence the mechanical properties of the both AF and NP. Thus, the aim of this study was to determine the best experimental protocol to be used for the evaluation of the mechanical properties of bovine NP and AF.

3.2.3 Methods

Bovine tails were obtained from a local slaughterhouse (Viandes Forget, Terrebonne, QC, Canada) within 4 hours of slaughter. Three to four intervertebral discs were harvested from each tail, wrapped in plastic and frozen at -80°C . All discs were microtomed at -25°C to control the thickness ($2.61 \pm 0.87\text{mm}$), and to obtain flat and parallel surfaces. Samples from the AF and NP were further extracted using 4mm diameter biopsy punches. Each sample was tested in unconfined compression using one of the six following protocols (Table 1). Three conditions of swelling were tested: no swelling, free swelling and semi-confined swelling (Fig. 1). In the case of free swelling, tissues were bathed in a saline solution (PBS) during 10 minutes without loading. In the case of semi-confined swelling, sample soaked in the solution during the same time with an impermeable smooth platen on the top preventing any axial displacement but allowing radial displacement. Three pre-strain values were also tested: no preload, 5% strain and 10% strain. Lastly, six compression ramps of either 5% or 10% strain were used. Only the most used protocols in the literature were tested, thus resulting in six tested protocols with one change

of condition between two protocols. Twelve AF and twelve NP samples were tested under each of the six protocols, except for protocol 6 in the NP, for a total of 72 AF and 64 NP samples.

The unconfined compression apparatus was composed of a non porous platen that compresses the sample in a glass petri dish filled with saline solution (PBS). Loads were recorded with a load cell, whose range and resolution were, respectively, 17 and 0.026N, and axial displacements were controlled via an encoder of 100mm range and 0.5mm resolution. After soaking, the thickness of the sample was measured with a tare force ensuring the contact between the sample and the platen. This tare force was set at $8 \cdot 10^{-5}$ N and $6 \cdot 10^{-5}$ N for the AF and NP, respectively. Following the initial swelling and pre-strain conditions of the six protocols, successive stress-relaxation ramps were applied. A relaxation criterion of 0.1g/min was used to allow samples to reach equilibrium (Suh and DiSilvestro 1999). Stresses were calculated from the recorded force and the cross-sectional area of the sample, and the strain was calculated from the displacement divided by the initial thickness of the sample.

Two models were used to fit the stress relaxation data: a viscoelastic model (Allen and Athanasiou 2006) and a linear biphasic poroviscoelastic model (BPVE) (DiSilvestro et al. 2001; DiSilvestro et al. 2001). The viscoelastic model is based on a Maxwell-Kelvin solid and assumes that the tissue behaves as an elastic element connected in parallel with a Maxwell viscoelastic element. The viscous nature of fluids and the elastic nature of solid are considered. The model allows calculating the Young's modulus (E) and the viscosity (μ) of the tissue from the equilibrium stress-strain data (Allen and Athanasiou 2006).

The BPVE model assumes an incompressible, isotropic, viscoelastic solid phase and an incompressible, inviscid fluid phase based on the initial biphasic poroelastic model by Mow et al.

(Mow et al. 1980). This model is based on the continuity equations (Biot 1962) and accounts for an intrinsic viscoelasticity of the solid phase that is independent of the bulk flow of the interstitial fluid. To reduce the number of input variables, the Young's modulus calculated by the viscoelastic model was used by the BPVE, thus the BPVE model allows calculating the permeability (k), the Poisson's ratio (ν), and the viscoelasticity (c) from experimental data. The governing equation of the BPVE model are presented in details in DiSilvestro et al. (DiSilvestro et al. 2001).

Mechanical properties were determined by curve fitting of the numerical solution to the experimental stress-relaxation data (Matlab, The MathWorks, Inc). For each protocol, the ability of mathematical models to fit the experimental data with exactitude was assessed by evaluating the coefficient of determination and the associated standard error. For each ramp, a set of parameters was calculated then to determine the mechanical properties for zero-strain, a new exponential regression was used to fit the mechanical parameters estimated for different strain.

All data were expressed as mean value \pm standard deviation (SD). Student t-tests were used to compare the Young's modulus and the permeability calculated from the data from the six protocols, with significance set at $p < 0.05$.

3.2.4 Results

Annulus fibrosus

Determination coefficient

Protocols 4, 5 and 6 fitted the experimental curves with a coefficient of determination greater than 0.8 (Fig. 3-a). Protocols without preload presented abnormal stress-strain curves, the model simulations did not provide a good agreement with experimental data, and the relaxation

equilibrium and the pick of the stress-relaxation curve could not be easily fitted (Fig. 2). Hence, protocols that estimated the most accurately the mechanical properties of the AF were the ones including a preload of 5 or 10%.

Young's modulus

The Young's modulus, which overall varied from 7.6 kPa to 15.6 kPa among protocols, was higher for protocols 1, 3 and 6 than for protocols 2, 4 and 5 (Fig. 3-b). The most important standard deviations resulted from protocols 1, 3 and 6. Protocol 4 and 5 exhibited the lowest standard error in determining the Young's modulus. Significant differences were found between protocols 3 and 4 ($p<0.05$), and between 4 and 6 ($p<0.05$).

Permeability

Protocols showed converse trends between the prediction of the permeability value and the Young's modulus. The permeability varied between $2.0e^{-14}$ and $7.8e^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ (Fig. 3-c). Protocol 1 was unable to predict a reliable value of permeability, as shown by its high standard errors. The permeability computed from protocol 4 was approximately two times higher than from protocol 5. There were significant differences between protocols 4 and 6, and between protocols 3 and 4 ($p<0.05$).

Other properties

The Poisson's ratio was 0.47 ± 0.03 with a slight variation depending on the protocols. The viscoelasticity ranged from 0.2 to 0.5, and the viscosity was nearby to $0.3 \text{ (MPa.s}^{-1}\text{)}$.

Nucleus Pulposus

Determination coefficient

The coefficient of determination was very low for protocol 1 ($R^2<0.5$), protocol 1 and 3 provided abnormal stress-strain curves like for the AF. Protocols 2, 4, 5 and 6 presented a high

coefficient of determination ($R^2 > 0.8$) (Fig. 4-a). However, protocol 6 was not statistically significant due to the small number of samples tested ($n=4$ in the NP). Thus, the most accurate protocol to evaluate the mechanical properties of the nucleus with the lowest standard deviation was the protocol 2 including semi-confined swelling and a ramp of 5% strain.

Young's Modulus

The Young's modulus varied from 4 to 15 kPa (Fig. 4-b). It was overestimated by protocols 1 and 6, and no statistical difference was found between results produced by the others protocols (3, 4 and 5) and protocol 2. The standard error of protocols 1 and 6 were too high to consider the result of these protocols relevant.

Permeability

The permeability varied from $0.55e^{-13}$ to $1.75e^{-13} \text{ m}^4/\text{N.s}$ (Fig. 4-c). Protocols 2, 3 and 4 predicted similar values of permeability, but the standard error was less important for protocol 2 than for protocols 3 or 4. Protocols 1 and 6 presented the highest values of permeability with an important standard error. As for the AF, the value calculated by the protocol 4 was twice higher than protocol 5.

Other properties

The Poisson's ratio and the viscosity were almost unchanged for all protocols (0.51 ± 0.01 and $0.01 \pm 0.005 \text{ MPa/s}$ respectively). The viscoelasticity ranged from 0.2 to 0.5.

3.2.5 Discussion

Different preloading and swelling conditions were tested on bovine annulus fibrosus and nucleus pulposus prior to unconfined stress-relaxation compression tests. Important differences were observed in the prediction of the mechanical properties of the IVD according to these initial

experimental conditions, in agreement with our hypothesis.

Preloading is an important experimental condition, which has a large influence on both AF and NP in evaluating their mechanical properties. Without preload, only the last ramps were similar to standard stress-relaxation curves. With preload, the contact between the load cell and the sample was ensured and unexpected responses during the first ramp was avoided. The initial condition most closely representing the physiological condition of the IVD is a preloading of the tissue before the beginning of the test as it simulates the in situ stress applied by adjacent vertebral bodies in the upright position. Protocols without preload (1, 2, 3 for the AF and 1, 3 for the NP) were rejected because of their too low determination coefficients and their too important standard errors.

Excessive deformations lead to an overestimation of the Young's modulus in both the AF and NP and to an underestimation of the permeability in the AF. Protocol 6 was rejected in both the AF and NP since the strains were too important (up to 60% at the final ramp). With important deformations, the assumption of constant cross area during the mechanical test is not respected and the mathematical models cannot be applied, thus fewer tests were performed in the NP. Moreover the mathematical models cannot predict the zero strain Young's modulus because of the exponential fits used. The behaviour of the interstitial fluid is also changed; the fluid equilibrium is no longer reached so the tissue hydration doesn't represent the physiological conditions. The permeability and the relaxation are linked. Hence with excessive deformations, the relaxation is only defined by the intrinsic viscoelasticity properties of the solid phase (proteoglycans), and not by the fluid interstitial flow. However, it is known that the relaxation is more influenced by the fluid interstitial flow than by the intrinsic viscoelasticity. Additionally high strains (up to 20%) lead to permanent alterations of the tissue. These alterations could be

due to damages to the matrix structure (Périe et al. 2006).

In unconfined compression, the protocols used to test AFs or NPs are different since these tissues do not have the same structural composition. The most relevant protocols to estimate the mechanical parameters is the protocol 4 for the AF, which includes a free swelling and a preload of 5%, and the protocol 2 for the NP, which includes a semi-confined swelling and no preload. For the AF, protocol 4 and 5 were equivalent, but for protocol 4 the resulting mechanical properties were computed with the lowest strain rate, which is preferable to avoid plastic deformation of the matrix structure. For the NP, experimental data from protocol 2 were easily fitted by the mathematical model, with the best coefficient of determination of the study. This result can be explained by the intrinsic structural composition of the NP. The gelatinous and viscous properties of the NP allow a free swelling larger than for the AF. Semi-confined swelling creates an induced stress which could be comparable to a preload. Therefore, data acquired this way were as accurate as that of a protocol with a preloading. However the value of this induced preload is unknown and could produce errors on the estimation of the initial strain, which is used in the mathematical models to compute the mechanical properties. In unconfined compression, no value of an induced preload has been reported in the literature yet.

The computed Young's modulus in the NP (5.9 kPa) agrees with the values reported by Cloyd (5.39kPa) for human NP (Cloyd et al. 2007). For AF, no reference was available in the literature to compare the computed Young's modulus. The computed effective permeability cannot be directly compared to the literature. In the literature, the permeability was calculated in confined compression (Best et al. 1994; Iatridis et al. 1998; Klisch and Lotz 2000), and so the computed permeability was axial whereas in unconfined compression it was a radial permeability.

Therefore the size of the exchange surfaces changes. In unconfined compression the fluid passes through the lateral wall, whereas in confined compression, the fluid passes only through the upper surface. This could explain the 100 fold factor found between permeabilities calculated in this study and reported in the literature. No value of direct radial permeability exists in the literature, so the estimated permeability can be only compared between the tested protocols.

Some experimental parameters like species differences provided intra-group variability, but this variability is the same for all the groups because they were randomly designed. Inter-group differences reflect the initial conditions changes. Mechanical properties of bovine and human discs are similar (Jesse et al. 2008), even if the bovine nucleus grossly appears less gelatinous than the human disc (Périer et al. 2006).

The viscoelastic model is the good model to calculate the Young's modulus, since this parameter is calculated at the equilibrium point of the curve and it is adjusted with the shape of the relaxation, as opposed to the poroviscoelastic model that takes into account only the equilibrium point. The choice of the biphasic mathematical model is relevant to calculate the permeability because the second model includes both phases of the tissue.

3.2.6 Conclusion

The experimental protocols in unconfined compression influence the mechanical response of the IVD. These observations justify the necessity of having standardized experimental protocols for unconfined compression tests of intervertebral disc NP and AF. The protocol including an initial swelling, a 5% strain preload and a 5% strain ramp is the most relevant protocol to test the annulus fibrosus in unconfined compression. The protocol with semi confined swelling and a 5%

strain ramp is the most relevant protocol for the nucleus pulposus.

3.2.7 Acknowledgements

The NSERC/Medtronic Industrial Research Chair in Spine Biomechanics from Pr. CE Aubin, the Mechanical Engineering department and the Research and Innovation Directorate from the Ecole Polytechnique for the financial support.

3.2.8 References

- Allen, K. D. and K. A. Athanasiou (2006). "Viscoelastic characterization of the porcine temporomandibular joint disc under unconfined compression." Journal of Biomechanics **39**(2): 312-322.
- Best, B. A., F. Guilak, et al. (1994). "Compressive mechanical properties of the human anulus fibrosus and their relationship to biochemical composition." Spine (Phila Pa 1976) **19**(2): 212-21.
- Biot, M. A. (1962). "Mechanics of deformation and acoustic propagation in porous media." Journal of Applied Physics **33**(4): 1482-1498.
- Cloyd, J. M., N. R. Malhotra, et al. (2007). "Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds." Eur Spine J **16**(11): 1892-8.
- DiSilvestro, M. R. and J. K. Suh (2002). "Biphasic poroviscoelastic characteristics of proteoglycan-depleted articular cartilage: simulation of degeneration." Ann Biomed Eng **30**(6): 792-800.
- DiSilvestro, M. R., Q. Zhu, et al. (2001). "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: II---Effect of Variable Strain Rates." J. Biomech. Eng. **123**(2): 198-200.

- DiSilvestro, M. R., Q. Zhu, et al. (2001). "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: I---Simultaneous Prediction of Reaction Force and Lateral Displacement." J. Biomech. Eng. **123**(2): 191-7.
- Galante, J. O. (1967). "Tensile properties of the human lumbar anulus fibrosus. ." Acta Orthopaedica Scandinavica **100**(4-91).
- Ghosh, P. (1988). The Biology of the intervertebral disc. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Iatridis, J. C., L. A. Setton, et al. (1998). "Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviors of human anulus fibrosus in compression." J Biomech **31**(6): 535-44.
- Jesse, C., M. Beckstein, et al. (2008). "Comparison of Animal Discs Used in Disc Research to Human Lumbar Disc." SPINE **33**(6): E166–E173.
- Julkunen, P., W. Wilson, et al. (2008). "Stress-relaxation of human patellar articular cartilage in unconfined compression: prediction of mechanical response by tissue composition and structure." J Biomech **41**(9): 1978-86.
- Klisch, S. M. and J. C. Lotz (2000). "A special theory of biphasic mixtures and experimental results for human annulus fibrosus tested in confined compression." J Biomech Eng **122**(2): 180-8.
- Korhonen, R. K., M. S. Laasanen, et al. (2002). "Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation." J Biomech **35**(7): 903-9.
- Li, L. P., M. D. Buschmann, et al. (2003). "Strain-rate dependent stiffness of articular cartilage in unconfined compression." J Biomech Eng **125**(2): 161-8.
- Mow, V. C., S. C. Kuei, et al. (1980). "Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments." Journal of Biomechanical Engineering **102**(1): 73-84.
- Mwale, F., C. N. Demers, et al. (2008). "Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading." J Magn Reson Imaging **27**(3): 563-73.

- Nguyen, M., W. Johannessen, et al. (2008). "Noninvasive Quantification of Human Nucleus Pulposus Pressure with Use of T1{rho}-Weighted Magnetic Resonance Imaging." Journal of bone and Joint Surgery **90**: 796-802.
- Périer, D., J. C. Iatridis, et al. (2006). "Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI." Journal of Biomechanics.
- Perie, D., D. Korda, et al. (2005). "Confined compression experiments on bovine nucleus pulposus and annulus fibrosus: sensitivity of the experiment in the determination of compressive modulus and hydraulic permeability." J Biomech **38**(11): 2164-71.
- Rohlmann, A., T. Zander, et al. (2006). "Analysis of the influence of disc degeneration on the mechanical behaviour of a lumbar motion segment using the finite element method." Journal of Biomechanics **39**(13): 2484-2490.
- Suh, J. K. and M. R. DiSilvestro (1999). "Biphasic poroviscoelastic behavior of hydrated biological soft tissue." Journal of Applied Mechanics, Transactions ASME **66**(2): 528-535.
- Urban, J. P. and J. F. McMullin (1988). "Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration." Spine **13**(2): 179-87.
- Urban, J. P. and S. Roberts (2003). "Degeneration of the intervertebral disc." Arthritis Res Ther **5**(3): 120-30.
- Wilson, W., J. M. Huyghe, et al. (2006). "A composition-based cartilage model for the assessment of compositional changes during cartilage damage and adaptation." Osteoarthritis Cartilage **14**(6): 554-60.
- Yao, H., M. A. Justiz, et al. (2002). "Effects of swelling pressure and hydraulic permeability on dynamic compressive behavior of lumbar annulus fibrosus." Ann Biomed Eng **30**(10): 1234-41.

3.2.9 Figures and tables

Table 3-1: Table 1 - Protocols used for the unconfined compression experiments

| Protocol | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------|----|---------------|------|------|------|------|
| Swelling | - | Semi-confined | free | free | free | free |
| Preload | - | - | - | 5% | 10% | 10% |
| Ramp | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 10% |

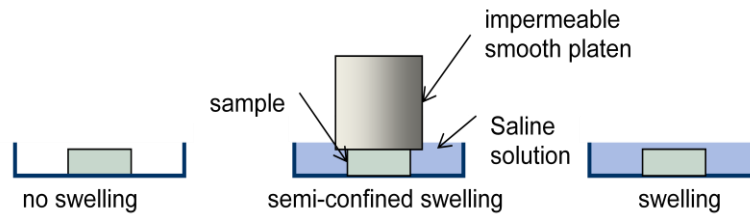


Figure 3-1: Fig. 1- Initial swelling condition: no swelling, semi-confined swelling and free swelling

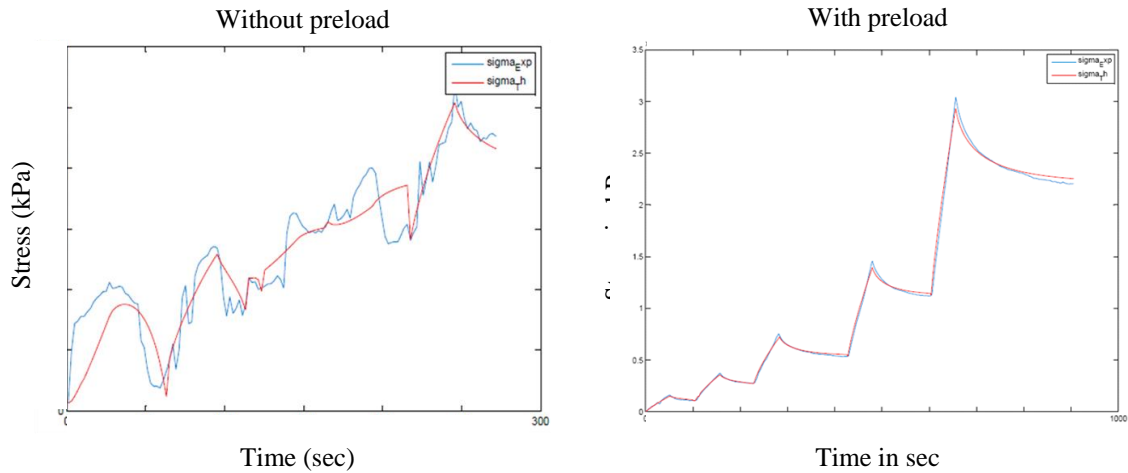


Figure 3-2: Fig. 2: Effect of preload on the experimental data (blue curves) and theoretical fitting from BPVE model (red curves). Typical stress relaxation data obtained from protocols without preload (left graph) and protocols with preload (right graph).

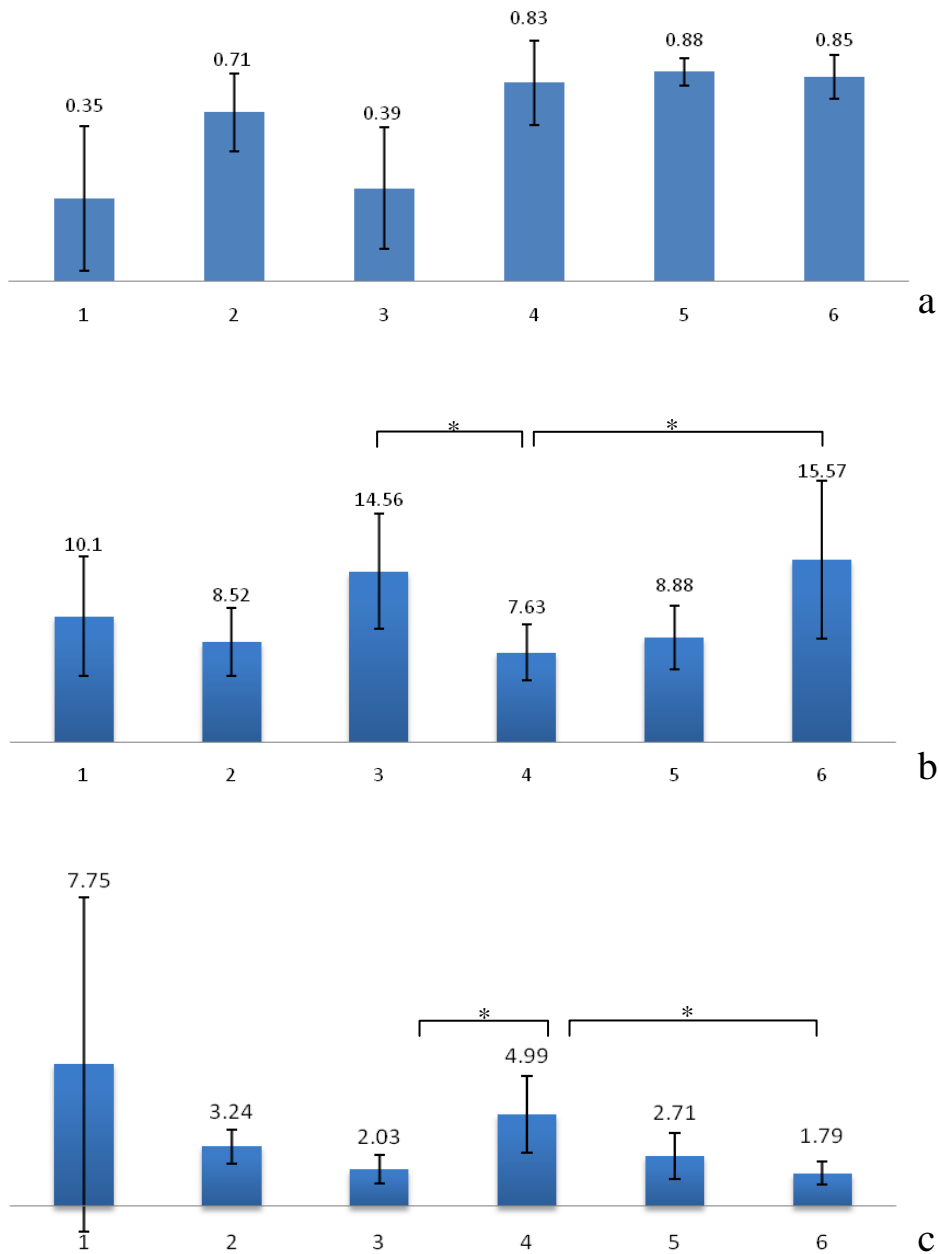


Figure 3-3: Fig. 3: Results for the Annulus Fibrosus, a- Coefficients of determination for all protocols, b- Young's modulus E (in kPa) calculated by the viscoelastic model for all protocols, c- Permeability k (in $\text{m}^4/\text{Ns} \times 10^{-14}$) calculated by the BPVE model for all protocols.

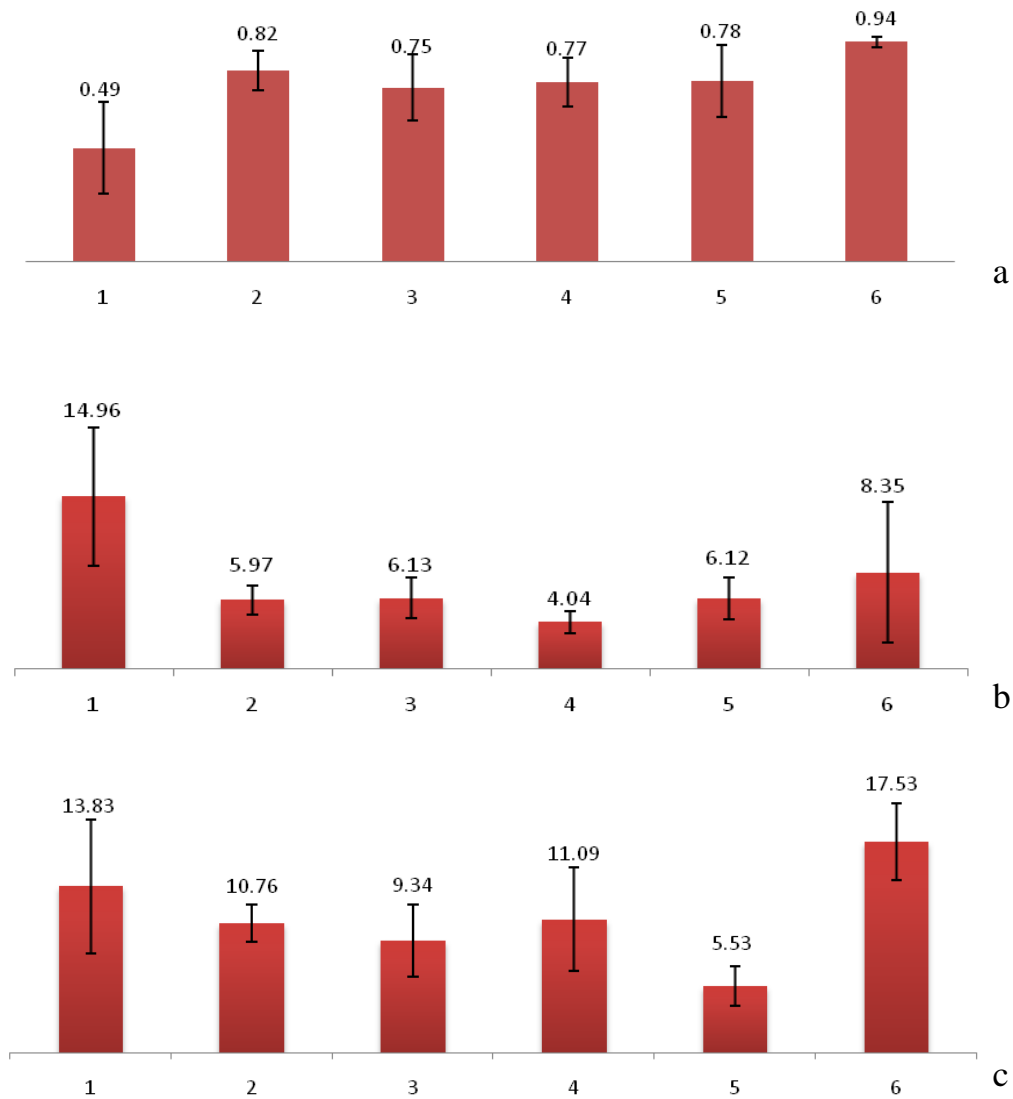


Figure 3-4: Fig. 4: Results for the Nucleus Pulposus, a- Determination coefficients for all protocols, b- Young's modulus E (in kPa) calculated by the viscoelastic model for all protocols, c- Permeability (in $\text{m}^4/\text{Ns} \times \text{e}^{-14}$) calculated by the BPVE model for all protocols.

CHAPITRE 4 CORRÉLATION PROPRIÉTÉS MÉCANIQUE ET IRM – PRÉSENTATION ARTICLE N°2

4.1 Présentation de l'article :

Le diagnostic précoce des pathologies par l'utilisation de l'IRM quantitatif crée le besoin de connaître les caractéristiques mécaniques du disque et les relations existantes avec les paramètres IRM. Dans la littérature, les corrélations modérées existantes justifient la réalisation d'une nouvelle étude prenant en considération plus de paramètres mécaniques et des régressions multiples avec les paramètres IRM pour une meilleure caractérisation des propriétés mécaniques du disque grâce à l'IRM. Les IVD ont été digérés de manière isolée, les paramètres IRM quantitatifs ont été acquis, puis les IVD ont été testés mécaniquement en compression non confinée, confinée et avec une mesure directe de la perméabilité

Cet article est intitulé «Assessment of mechanical properties of isolated intervertebral discs using quantitative Magnetic Resonance Imaging», et a été soumis pour publication à la revue Journal of Biomechanics en décembre 2010. La contribution du premier auteur à la préparation et à la rédaction de l'article est évaluée à 85%.

4.2 Article n°2: Assessment of mechanical properties of isolated intervertebral discs using quantitative Magnetic Resonance Imaging

Title :

ASSESSMENT OF MECHANICAL PROPERTIES OF ISOLATED INTERVERTEBRAL
DISCS USING QUANTITATIVE MAGNETIC RESONANCE IMAGING

Authors :

Maximilien Recuerda^{1,2}

Guillaume Gilbert³

Gilles Beaudoin⁴

Delphine Périé^{1,2}

Affiliations :

¹ École Polytechnique, Montréal, QC, Canada

² Centre de recherche CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada

³ Philips Healthcare, Montréal, QC, Canada

² Notre Dame Hospital, University of Montreal, Montreal QC, Canada

Corresponding author:

Delphine Périé

Phone: (1) 514-340-4711 # 4437

Fax: (1) 514-340-5264

E-mail address: delphine.perie@polymtl.ca

Keywords:

Intervertebral Disc, compression tests, mechanical properties, Quantitative MRI, multiple regressions

Word count: 2854

4.2.1 Abstract

MRI offers great potential as a sensitive and non-invasive technique for describing the alterations in mechanical properties of intervertebral discs (IVDs). However, large standard deviations were observed in the determination of the mechanical properties and low coefficients of correlation were observed between mechanical properties and MRI parameters. Our hypothesis is that the compressive modulus and the hydraulic permeability of the IVD can be predicted by a combination of MRI parameters.

For the first time, the intrinsic properties of isolated IVDs were assessed by quantitative MRI and three different mechanical tests (unconfined compression, confined compression and direct permeability measure).

Isolated IVDs soaking in a trypsin solution was efficient to degenerate discs as it resulted in a $21\pm4\%$ hydration, a GAG decrease in the NP and an alteration of the structure in both AF and NP. The mechanical properties were sensitive to this digestion: the compressive modulus decreased while the permeability increased. The quantitative MRI parameters were also sensitive to this digestion.

No direct correlations were found between the mechanical properties and the MRI parameters for both *in-situ* and *digested* IVDs. However, the MRI parameters chosen in this study (T1, T2, MT, FA, ADC) can assess up to 60% of the radial or axial permeability, but only 30% of the Young's modulus or aggregate modulus. The lost of R^2 amplitude when combining the *in-situ* and *digested* groups suggests that these relationships have to be defined for each state of the degeneration process.

4.2.2 Introduction

MRI has been investigated as an early diagnostic tool of intervertebral disc (IVD) degeneration by correlating the MRI parameters to the IVD degeneration. IVD water, proteoglycan (PG) and collagen contents were found to be correlated to the longitudinal relaxation time (T1), the transverse relaxation time (T2), the time constant of the exponential decay of magnetization during a spin-lock radiofrequency pulse (T1 ρ), the magnetization transfer ratio (MTR) and the diffusion (Toffanin et al. 2001; Antoniou et al. 2006) (Antoniou et al. 1998; Antoniou et al. 2006), (Niemenen et al. 2004). (Johannessen et al. 2006), (Paajanen et al. 1994; Laurent et al. 2001) (Antoniou et al. 2004). T1 and T2 decreased when the Thompson grade increased in the NP (Paajanen et al. 1994; Antoniou et al. 1998; Chiu et al. 2001). MT sequence was sensitive to Thompson grades in in-vivo studies (Paajanen et al. 1994) and slightly to Pfirrmann grades (Wang et al. 2010). Furthermore changes in the extracellular matrix structure and fiber organization altered the MTR (Antoniou et al. 1998). The apparent diffusion coefficient (ADC) values decreased with increasing Thompson grades and also with increasing loading of the IVD (Chiu et al. 2001; Kurunlahti et al. 2001). Antoniou et al. (Antoniou et al. 2004) showed that the ADC in the NP decreased with a decrease in PG and water contents. ADC expressed in all three orthogonal directions suggested that the lost of disc integrity was direction dependant (Kerttula et al. 2001).

Quantitative MRI was also used to estimate the mechanical properties of joint tissues. T1gd with contrast agent (dGEMRIC method) was strongly correlated to the Young's modulus of bovine humeral cartilage, and was able to predict up to 87% of Young's modulus variation (Niemenen et al. 2004). T1gd and the Young's modulus were also found to be associated within the human femoral groove (Kurkijarvi et al. 2004). The hydraulic permeability and T1 were found to be correlated in caudal bovine NP (Perie et al. 2006). Weak linear correlation was found

between T1 ρ and the osmotic pressure of the human NP (Nguyen et al. 2008). On bovine discs, strong relationships were found between permeability and MRI parameters including T1 ρ ($R^2=0.83$; $p=0.056$) in the NP and correlations were found between axial permeability and T1 ρ in the annulus fibrosus (AF) and between compressive modulus and T1 ρ in the NP (Mwale et al. 2008). According to Nissi et al. (Nissi et al. 2007), the equilibrium stiffness was significantly associated to T1 or T2 in the human patellar cartilage but not in the bovine and porcine knee joints. T2 and permeability were correlated in bovine NPs and the only mechanical property associated to the MR diffusion was the permeability, and a trend was found between diffusion trace and H_{A0} (P rie et al. 2006).

MRI offers great potential as a sensitive and non-invasive technique for describing the alterations in mechanical properties of IVDs or cartilage. However, large standard deviations were observed in the determination of the mechanical properties of the IVD and low coefficients of correlation were observed between mechanical properties and MRI parameters. The assessment of the permeability value was usually done by mathematical model regression, but it can be estimated more accurately by direct measurement using a custom setup according to the Darcy theory (Gu et al. 1999; Accadbled et al. 2008; Heneghan and Riches 2008).

Our hypothesis is that the compressive modulus and the hydraulic permeability of the IVD can be predicted by a combination of MRI parameters. Our specific aim is to measure the mechanical properties, using confined and unconfined compression tests and direct permeability measurements, and the MRI parameters of isolated bovine IVDs, in-situ and digested, and to investigate the relationships between these parameters.

4.2.3 Methods

Samples preparation

Bovine tails were obtained from a local slaughterhouse (Viandes Forget, Terrebonne, QC, Canada) within 4 hours of death. The two proximal discs were harvested from each tail and thirty discs with 15mm thickness were randomly separated in two groups. The discs from the *in-situ* group (n=15) were wrapped in plastic to prevent dehydration. The discs from the *digested* group (n=15) were digested in PBS solution with 5mg/ml of trypsin from bovine pancreas (T8003 Sigma-Aldrich), during 24 hours at 37° with shaking. A light platen of plastic was placed on the top of the disc to avoid bulging during the treatment. Their wet weights were measured before and after digestion to quantify the percentage of hydration.

MR imaging

Immediately after digestion, samples were removed from the shaking water bath, and were gently blotted to remove absorbed water. Thickness and weight of discs from both groups were measured just before the MRI acquisition. Discs were placed in chambers filled with a PBS solution. A light platen was placed on the top to stabilize the discs during the MRI acquisition. The acquisition was performed using a 3T whole-body apparatus (Philips Achieva X-Series). Images for the quantification of T1 and T2 were acquired using a multiple inversion recovery turbo spin-echo (TSE) sequence for T1 (TR/TE=2100/6.3ms, 15 inversions times (TI) from 50 to 1900ms) and a multi-echo turbo spin-echo (TSE) sequence for T2 (TR=2000ms, 10 TE every 15ms). T1 and T2 were extracted (Matlab, r2007 Mathworks, Natick, MA) from the signal intensity (SI) by fitting equations (1) and (2) (Wright et al. 2008).

$$SI_{T1} = S_0 \cdot \left\{ 1 - (1 - \cos(\alpha)) E_{T1} \left(1 - E_{TW} f^N \left(1 - \frac{E_{TE/2}}{2} \right) \right) \right\} \quad (1)$$

with $f(x) = 1 - E_{TE} \cdot x$, $E_{TI} = e^{-\frac{TI}{T_1}}$, $E_{TW} = e^{-\frac{TW}{T_1}}$, $E_{TE} = e^{-\frac{TE}{T_1}}$ and $N=8$

$$SI_{TE} = SI_{(TE=0)} \cdot e^{-TE/T_2} \quad (2)$$

Where SI is the signal intensity, TW is the time in ms between the last refocusing pulse and the next inversion pulse, and N is the number of refocusing pulses.

The MTR was obtained using two gradient echo sequences (TR/TE=83/3.8 ms), one with the off-resonance pulse applied at 1100Hz down to the free water proton resonance frequency (Ms) and the other one without it (Mo) (Wang et al. 2010). MT ratio was calculated from equation (3) (Henkelman et al. 2001).

$$MTR = \frac{M_0 - M_s}{M_0} \quad (3)$$

The last sequence measured the ADC and the fractional anisotropy (FA) using a spin-echo EPI diffusion-weighted sequence (TR/TE=2000/40 ms) with 15 non-collinear diffusion and a b value of 1000 s/mm². ADC and FA were calculated using equations (4-6) (Le Bihan et al. 1986; Kingsley 2006; Kingsley 2006):

$$SI_{(b)} = SI_{(b=0)} \cdot e^{-b \cdot D} \quad (4)$$

$$ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad (5)$$

$$F_A = \sqrt{\frac{3[(\lambda_1 - ADC)^2 + (\lambda_2 - ADC)^2 + (\lambda_3 - ADC)^2]}{2[\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2]}} \quad (6)$$

Where b is the diffusion encoding tensor, D is the diffusion tensor and λ are the eigenvalues of D.

The segmentation of the regions of interest (ROI) was realized using SliceOmatic (Tomovision, Montreal, CA). A local ROI (punch area) was segmented for the ADC estimation to limit the artifacts.

Mechanical testing

Three mechanical tests were performed (unconfined and confined compression tests and direct permeability measurement). IVDs were punched with a 5mm diameter punch in both NP and posterior AF regions. From each punched sample, four slices with a thickness of 1.6 ± 0.5 mm were extracted, three slices being tested mechanically and one being reserved for biochemical measurements.

Unconfined compression

The unconfined compression test was performed using the mechanical testing machine Mach-1 (Biomomentum, Montreal, Qc, Canada). Before the test, tissues were bathed during 10 minutes in a saline solution (PBS) in free condition (AF) or in semi-confined condition (allowing only radial displacement) (NP). The thickness was measured with a tare load of 0.8g (AF) and 0.6g (NP) to ensure full surface contact. A preloading of 5% strain during 10min was applied to the AF. Five successive stress-relaxation ramps were applied using 5% strain increment. The relaxations were stopped when the slope of the curve reached a rate of 0.1g per min. The mechanical properties were computed (Matlab, r2007 Mathworks, Natick, MA) using a viscoelastic model (Allen and Athanasiou 2006) to evaluate the Young's modulus (E) and the viscosity (μ) and a linear biphasic poroviscoelastic mathematical model, BPVE (DiSilvestro et al. 2001; DiSilvestro et al. 2001) to evaluate the radial permeability (k_r), the Poisson's ratio (ν), and the viscoelasticity (c).

Confined compression

The confined compression test was performed with the same apparatus used for the unconfined compression test. A custom non porous acrylic chamber (5 millimeters diameter) was designed

and manufactured. The protocol described in previous studies (Iatridis et al. 1998; Perie et al. 2005) was used. However, the relaxation period was stopped when the force slope was lower than 0.1g/min instead of being constant. The aggregate modulus H_{A0} and the axial hydraulic permeability k_0 for zero-strain and their respective nonlinear coefficients β and M were computed from a non linear biphasic model (Mow et al. 1980) (Holmes and Mow 1990; Ateshian et al. 1997; Iatridis et al. 1998).

Permeability measurement

The apparatus used to measure the axial permeability consisted of a cylindrical acrylic chamber (Fig.1). Two filters (pore size: 60 μ m, ϕ 5mm) allow a fluid circulating through the tissue sample. The upper filter was stuck to the actuator controlled electronically by the mechanical testing machine (Mach-1, Biomomentum, Montreal, Qc, Canada). The fluid flow was regulated by a syringe pump (Cole Parmer, Vernon Hills, IL) using a 500 μ l Hamilton syringe and the flow pressure inside the system was measured by a 15psi gauge pressure. The outside pressure was the atmospheric pressure. The system was filled with PBS, the sample was introduced carefully in its chamber and the thickness was immediately measured with a tare load of 1g. The contact was maintained for 1h to obtain the stress equilibrium. The reacting force was continuously monitored. The fluid was injected from the syringe pump at a high rate (400 μ l/h) until a pressure difference across the sample of 40 ± 0.5 kPa was recorded. A low fluid rate was then injected (in a range of 20-25 μ l/h) and the fluid flow was manually adjusted until the equilibrium was reached, for a slope rate lower than 0,01g/min during a 5 min period. The hydraulic permeability (k_a) was calculated from the Darcy law (Heneghan and Riches 2008).

Biochemical composition evaluation

The last slice of the tissue punch stored at -25° was used for the determination of the sulfate-glycosaminoglycan (GAG) content as a measure of the PG content. The wet weight of samples was first measured. Then the wet tissues were digested by proteinase K and the GAG content was determined using the 1.9-dimethylmethylene blue assay using absorption spectrophotometry at 530nm (Farndale et al. 1986). GAG contents were normalized to the tissue wet weight. Only 12 samples per group were measured for GAG content to verify the trypsin digestion effect.

Statistical analyses

The two groups were compared using t-tests or Mann-Whitney tests if the normality test failed. Correlation tests between dependant (E , H_{A0} , k_r and k_a) and independent ($T1$, $T2$, MT , FA and ADC) variables were investigated using Pearson tests. Multi linear regressions were performed between the same dependant and independent variables to verify our hypothesis. The significance of all tests was set to $p \leq 0.05$. All statistical tests were performed using SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA). All results were expressed as Mean \pm SD.

4.2.4 Results

The enzyme treatment induced mechanical changes in both the AF and NP. E decreased significantly by 62% in the AF (from 30 to 11kPa, $p=0.02$), but not in the NP (from 17 to 9kPa; $p=0.174$) (Fig. 2-a). H_{A0} decreased significantly by 70-80% in both AF and NP (0.2 to 0.06MPa, $p=0.001$) (Fig. 2-b). The digestion process increased significantly k_r in both NP ($1.2e^{-14}$ to $5.4e^{-14}$ m⁴/Ns, $p=0.042$) and AF ($6.9e^{-14}$ to $1.9e^{-13}$ m⁴/Ns, $p=0.014$) (Fig. 2-c). k_a was almost unchanged for the AF but increased significantly for the NP ($1.0e^{-14}$ to $1.6e^{-14}$ m⁴/Ns; $p<0.001$) (Fig. 2-d).

The anisotropy of the permeability (ratio between the radial and axial permeability) decreased significantly by 46% in the AF, and not significantly by 20% in the NP (Fig. 2-e).

The MR parameters showed differences between the *in-situ* and *digested* groups (Fig. 3). T1 and T2 were almost unchanged between the two groups for the AFs, and increased significantly by 43 and 47% for NPs (T1: $p=0.039$ and T2: $p<0.001$). No significant differences were found for MTR, however it appeared to be lower for the *digested* groups. FA decreased significantly between the two groups ($p<0.001$), and was clearly greater in the AF than in the NP whatever the group. ADC decreased for the AF ($p=0.068$) and increased for the NP ($p=0.213$).

The colorimetric assays revealed significant changes in the GAG content (Fig. 4) for only NPs ($p=0.026$). Moreover, the IVD digestion was associated to a $21\pm4\%$ hydration.

Table 1 synthesizes the Pearson correlation between MR parameters and mechanical properties for both NP and AF. The correlations were weak (<0.5), except between FA and E ($r=0.51$; $p<0.001$) for the AF, between T2 and H_{A0} ($r=0.53$; $p<0.001$) and between T2 and k_a ($r=0.65$; $p<0.001$) for the NP.

Multi linear regressions (Table 2) showed that only 30% of E and H_{A0} can be explained by the MRI parameters ($p=0.06-0.07$), except for E in the NP. Almost 58% of k_r and 52% of k_a can be predicted by the MRI parameters (Equations 5 and 6, $p=0.003$ for the AF and $p=0.005$ for the NP). However correlations were found to be better in isolated groups than combined groups.

NP:

$$\begin{aligned}
 k_a = & 8,282 - (0,00550 * T1) + (0,0823 * T2) - (0,00277 * MT) - (8,908 * FA) \\
 & + (1331,136 * ADC) + (0,0965 * e^{((FA*5)/T2)*50})^{*3} \quad (5) \\
 & (r = 0,72 \quad , R^2 = 0,52 \quad , R^2_{adj} = 0,51, p<0.001)
 \end{aligned}$$

AF:

$$\begin{aligned}
 k_r = & 62,302 + (0,0442 * T1) - (1,315 * T2) + (2,122 * MT) - (376,811 * FA) \\
 & - (1837,625 * ADC) + (14,926 * e^{(FA*1000)/T1})^2 \quad (6) \\
 & (r = 0,76, R^2 = 0,58, R^2_{adj} = 0,57, p < 0.001)
 \end{aligned}$$

4.2.5 Discussion

Quantitative MRI acquisitions, unconfined and confined stress-relaxation tests in compression and direct permeability measurements were performed for the first time to our knowledge on isolated bovine IVDs, as opposed to previous studies done on bovine tail segments (Antoniou et al. 2006; Périe et al. 2006; Mwale et al. 2008). Isolated IVDs soaking in a trypsin solution was efficient to degenerate discs as it resulted in a $21 \pm 4\%$ hydration, a GAG decrease in the NP and an alteration of the structure in both AF and NP.

The mechanical properties were sensitive to our enzyme digestion: the compressive modulus decreased while the permeability increased, in agreement with Perie et al. (Perie et al. 2006). The ability of the disc tissue to withstand mechanical forces largely depends on the structural integrity of the matrix and on the biochemical contents (Best et al. 1994; Lyyra et al. 1999). The H_{A0} decrease is associated to both structural matrix integrity and biochemical content. The anisotropic behavior of the permeability is strongly dependent on the degenerative grade hence the permeability becomes slightly more isotropic with degeneration. The degeneration process is associated with change in water content and induces an increase in the pore size in the radial direction only, but no change in the porosity between collagen lamella (Gu et al. 1999). Thus, in this study, the changes in the permeability are depending on the fluid flow direction, for which the collagen orientation plays an important role, and might also be due to the tissue hydration.

The MRI parameters were sensitive to the trypsin digestion converse to a previous study (Mwale et al. 2008). Trypsin degradation on isolated IVDs combined to tissue hydration is different from the degeneration processes described in the literature. T1 and T2 increased whereas they were reported to decrease with degeneration (Antoniou et al. 2006). Trypsin digestion did not affect the MTR, as previously reported on bovine tails (Antoniou et al. 2006; Mwale et al. 2008). MTR is known to be correlated to the collagen structure and composition (Paajanen et al. 1994), and thus our digestion process seems to have not affected the collagen structure or content. This is justified knowing that trypsin catalyzes the hydrolysis of peptide bonds at the carboxyl side of lysyl and arginyl residues (Berg et al. 2003), and thus principally cleaves the proteoglycan core protein (Antoniou et al. 2006). The most sensitive MRI parameter was the FA, which suggests that the disc structure becomes more and more isotropic with the degradation (Antoniou et al. 2006) and the diffusivity increased only for the AF. This is in agreement with the permeability behavior that reflects the tissue structure and composition.

No direct correlations were found between the mechanical properties and the MRI parameters for both *in-situ* and *digested* IVDs. However, the MRI parameters chosen in this study (T1, T2, MT, FA, ADC) can moderately assess the radial or axial permeability and weakly the Young's modulus or aggregate modulus. These multi linear correlations are consistent with the literature (Périé et al, 2006). The lost of R^2 amplitude when combining the *in-situ* and *digested* groups suggests that the sensitivity of MRI to the mechanical properties is different for both groups. Specific correlations have to be defined for each state of the degeneration process.

The low coefficients of determination obtained showed that other MRI parameters should be included to evaluate the mechanical properties. Parameters like T1 ρ , CEST (Chemical Exchange

Saturation Transfer) and the orthogonal projections of ADC need to be explored for a better understanding of the mechanical properties of the IVD.

4.2.6 Conclusion

Intrinsic properties of the bovine IVD and their relationships were assessed. Trypsin degradation on isolated IVDs produces for the first time significant changes to MRI parameters and mechanical properties. Multiple linear regressions between MRI and mechanical parameters were highlighted but no direct correlations. However, these relationships have to be defined for each degeneration state of the tissue.

4.2.7 Acknowledgements

The authors thank Charlotte Zaouter, from the Molecular Biology and Orthopedic Laboratory of the CHU Sainte Justine, for her help in the biochemical experiments and Irene Londoño, from the Pediatric Mechanobiology Laboratory of the CHU Sainte Justine, for her advice and constructive criticism. The authors thank the NSERC/Medtronic Industrial Research Chair in Spine Biomechanics from Pr. CE Aubin, the Mechanical Engineering department and the Research and Innovation Directorate from the Ecole Polytechnique for the financial support.

4.2.8 References

Accadbled, F., J. M. Laffosse, et al. (2008). "Influence of location, fluid flow direction, and tissue maturity on the macroscopic permeability of vertebral end plates." Spine (Phila Pa 1976) **33**(6): 612-9.

- Allen, K. D. and K. A. Athanasiou (2006). "Viscoelastic characterization of the porcine temporomandibular joint disc under unconfined compression." Journal of Biomechanics **39**(2): 312-322.
- Antoniou, J., C. N. Demers, et al. (2004). "Apparent diffusion coefficient of intervertebral discs related to matrix composition and integrity." Magn Reson Imaging **22**(7): 963-72.
- Antoniou, J., F. Mwale, et al. (2006). "Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the nucleus pulposus of intervertebral discs." Spine (Phila Pa 1976) **31**(14): 1547-54.
- Antoniou, J., G. B. Pike, et al. (1998). "Quantitative magnetic resonance imaging in the assessment of degenerative disc disease." Magn Reson Med **40**(6): 900-7.
- Ateshian, G. A., W. H. Warden, et al. (1997). "Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments." J Biomech **30**(11-12): 1157-64.
- Berg, A., T. Singer, et al. (2003). "High-resolution diffusivity imaging at 3.0 T for the detection of degenerative changes: a trypsin-based arthritis model." Invest Radiol **38**(7): 460-6.
- Best, B. A., F. Guilak, et al. (1994). "Compressive mechanical properties of the human annulus fibrosus and their relationship to biochemical composition." Spine (Phila Pa 1976) **19**(2): 212-21.
- Chiu, E. J., D. C. Newitt, et al. (2001). "Magnetic resonance imaging measurement of relaxation and water diffusion in the human lumbar intervertebral disc under compression in vitro." Spine (Phila Pa 1976) **26**(19): E437-44.
- DiSilvestro, M. R., Q. Zhu, et al. (2001). "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: II---Effect of Variable Strain Rates." J. Biomech. Eng. **123**(2): 198-200.
- DiSilvestro, M. R., Q. Zhu, et al. (2001). "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: I---Simultaneous Prediction of Reaction Force and Lateral Displacement." J. Biomech. Eng. **123**(2): 191-7.

- Farndale, R. W., D. J. Buttle, et al. (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue." Biochim Biophys Acta **883**(2): 173-7.
- Gu, W. Y., X. G. Mao, et al. (1999). "The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar annulus fibrosus. Influence of age, degeneration, direction, and water content." Spine (Phila Pa 1976) **24**(23): 2449-55.
- Heneghan, P. and P. E. Riches (2008). "Determination of the strain-dependent hydraulic permeability of the compressed bovine nucleus pulposus." Journal of Biomechanics **41**(4): 903-906.
- Henkelman, R. M., G. J. Stanisz, et al. (2001). "Magnetization transfer in MRI: a review." NMR in Biomedicine **14**(2): 57-64.
- Holmes, M. H. and V. C. Mow (1990). "The nonlinear characteristics of soft gels and hydrated connective tissues in ultrafiltration." J Biomech **23**(11): 1145-56.
- Iatridis, J. C., L. A. Setton, et al. (1998). "Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviors of human annulus fibrosus in compression." J Biomech **31**(6): 535-44.
- Johannessen, W., J. D. Auerbach, et al. (2006). "Assessment of human disc degeneration and proteoglycan content using T1rho-weighted magnetic resonance imaging." Spine (Phila Pa 1976) **31**(11): 1253-7.
- Kerttula, L., M. Kurunlahti, et al. (2001). "Apparent diffusion coefficients and T2 relaxation time measurements to evaluate disc degeneration. A quantitative MR study of young patients with previous vertebral fracture." Acta Radiol **42**(6): 585-91.
- Kingsley, P. B. (2006). "Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part I. Tensors, rotations, and eigenvectors." Concepts in Magnetic Resonance Part A **28A**(2): 101-122.
- Kingsley, P. B. (2006). "Introduction to diffusion tensor imaging mathematics: Part II. Anisotropy, diffusion-weighting factors, and gradient encoding schemes." Concepts in Magnetic Resonance Part A **28A**(2): 123-154.

- Kurkijarvi, J. E., M. J. Nissi, et al. (2004). "Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) and T2 characteristics of human knee articular cartilage: topographical variation and relationships to mechanical properties." Magn Reson Med **52**(1): 41-6.
- Kurunlahti, M., L. Kerttula, et al. (2001). "Correlation of diffusion in lumbar intervertebral disks with occlusion of lumbar arteries: a study in adult volunteers." Radiology **221**(3): 779-86.
- Laurent, D., J. Wasvary, et al. (2001). "Quantitative and qualitative assessment of articular cartilage in the goat knee with magnetization transfer imaging." Magn Reson Imaging **19**(10): 1279-86.
- Le Bihan, D., E. Breton, et al. (1986). "MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders." Radiology **161**(2): 401-7.
- Lyyra, T., J. P. Arokoski, et al. (1999). "Experimental validation of arthroscopic cartilage stiffness measurement using enzymatically degraded cartilage samples." Phys Med Biol **44**(2): 525-35.
- Mow, V. C., S. C. Kuei, et al. (1980). "Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments." Journal of Biomechanical Engineering **102**(1): 73-84.
- Mwale, F., C. N. Demers, et al. (2008). "Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading." J Magn Reson Imaging **27**(3): 563-73.
- Nguyen, M., W. Johannessen, et al. (2008). "Noninvasive Quantification of Human Nucleus Pulposus Pressure with Use of T1{rho}-Weighted Magnetic Resonance Imaging." Journal of bone and Joint Surgery **90**: 796-802.
- Nieminen, M. T., yr, et al. (2004). "Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging." Journal of Biomechanics **37**(3): 321-328.
- Nissi, M. J., J. Rieppo, et al. (2007). "Estimation of mechanical properties of articular cartilage with MRI - dGEMRIC, T2 and T1 imaging in different species with variable stages of maturation." Osteoarthritis Cartilage **15**(10): 1141-8.

- Paajanen, H., M. Komu, et al. (1994). "Magnetization transfer imaging of lumbar disc degeneration. Correlation of relaxation parameters with biochemistry." Spine (Phila Pa 1976) **19**(24): 2833-7.
- Périer, D., J. C. Iatridis, et al. (2006). "Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI." Journal of Biomechanics.
- Perie, D., D. Korda, et al. (2005). "Confined compression experiments on bovine nucleus pulposus and annulus fibrosus: sensitivity of the experiment in the determination of compressive modulus and hydraulic permeability." J Biomech **38**(11): 2164-71.
- Perie, D. S., J. J. MacLean, et al. (2006). "Correlating material properties with tissue composition in enzymatically digested bovine annulus fibrosus and nucleus pulposus tissue." Annals of Biomedical Engineering **34**(5): 769-777.
- Toffanin, R., V. Mlynarik, et al. (2001). "Proteoglycan depletion and magnetic resonance parameters of articular cartilage." Arch Biochem Biophys **390**(2): 235-42.
- Wang, C., W. Witschey, et al. (2010). "Magnetization transfer ratio mapping of intervertebral disc degeneration." (1522-2594 (Electronic)).
- Wright, P., O. Mougin, et al. (2008). "Water proton and measurements in brain tissue at 7, 3, and 1.5T using IR-EPI, IR-TSE, and MPRAGE: results and optimization." Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine **21**(1): 121-130.

4.2.9 Figures and tables

Table 4-1: Table 1: Pearson correlation results between MR and mechanical parameters. The first line is the coefficient of correlation and the second the p value:

| | ANNULUS | | | | NUCLEUS | | | |
|------------|-------------|-----------------|----------------|----------------|---------|-----------------|----------------|----------------|
| | E | H _{A0} | K _r | k _a | E | H _{A0} | K _r | k _a |
| T1 | 0,05 | -0,17 | -0,23 | 0,25 | -0,19 | -0,39 | 0,33 | 0,33 |
| | 0,78 | 0,38 | 0,23 | 0,18 | 0,31 | 0,03 | 0,07 | 0,08 |
| T2 | 0,01 | 0,31 | -0,21 | -0,14 | -0,38 | -0,53 | 0,27 | 0,65 |
| | 0,96 | 0,10 | 0,28 | 0,47 | 0,04 | 0,00 | 0,14 | 0,00 |
| MT | 0,20 | 0,00 | 0,44 | -0,44 | -0,07 | -0,12 | -0,10 | -0,06 |
| | 0,30 | 0,99 | 0,01 | 0,02 | 0,72 | 0,53 | 0,60 | 0,77 |
| Diff - FA | 0,51 | 0,47 | -0,38 | 0,16 | 0,16 | 0,34 | -0,42 | -0,42 |
| | 0,00 | 0,01 | 0,04 | 0,40 | 0,39 | 0,07 | 0,02 | 0,02 |
| Diff - ADC | 0,39 | 0,30 | -0,25 | 0,04 | -0,17 | -0,16 | -0,06 | 0,22 |
| | 0,03 | 0,11 | 0,18 | 0,82 | 0,38 | 0,41 | 0,74 | 0,24 |

E= Young modulus, H_{A0}= aggregate modulus, k_r= radial permeability calculated in unconfined compression, k_a = direct measure permeability, FA=fractional anisotropy and ADC = apparent diffusion coefficient

Table 4-2: Table 2: Multiple linear regressions between MR and mechanical parameters for NP and AF. The first line is the coefficient of determination and the second the p value:

| | ANNULUS | | | NUCLEUS | | |
|-----------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| | All groups | Control | Trypsin | All groups | Control | Trypsin |
| E | 0,33 | 0,36 | 0,36 | 0,19 | 0,33 | 0,50 |
| | 0,07 | 0,48 | 0,60 | 0,37 | 0,59 | 0,23 |
| H _{A0} | 0,34 | 0,39 | 0,25 | 0,33 | 0,50 | 0,38 |
| | 0,06 | 0,39 | 0,77 | 0,07 | 0,35 | 0,56 |
| k _r | 0,58 | 0,60 | 0,63 | 0,43 | 0,61 | 0,55 |
| | 0,003 | 0,09 | 0,07 | 0,05 | 0,09 | 0,18 |
| k _a | 0,25 | 0,46 | 0,58 | 0,52 | 0,29 | 0,43 |
| | 0,20 | 0,26 | 0,11 | 0,005 | 0,42 | 0,23 |

E= Young modulus, H_{A0}= aggregate modulus, k_r= radial permeability calculated in unconfined compression, k_a = direct measure permeability, FA=fractional anisotropy and ADC = apparent diffusion coefficient

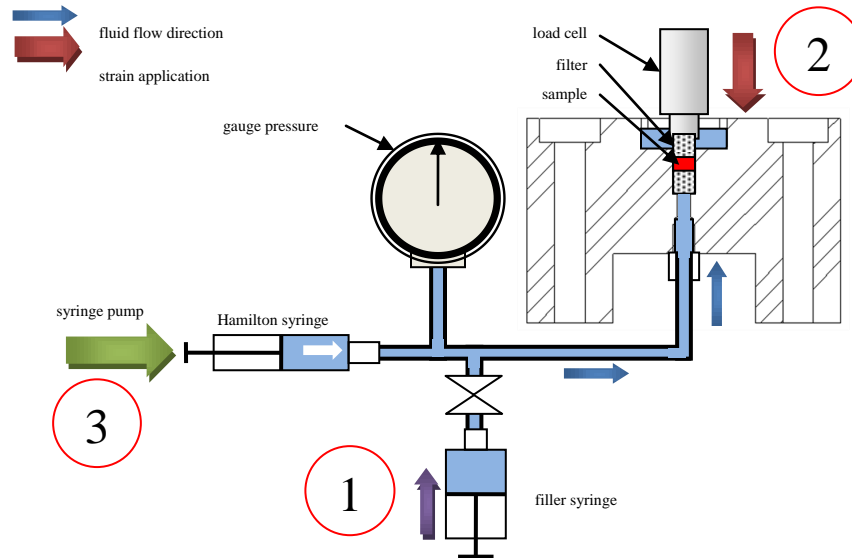


Figure 4-1: Fig. 1: Experimental setup to measure the axial permeability.

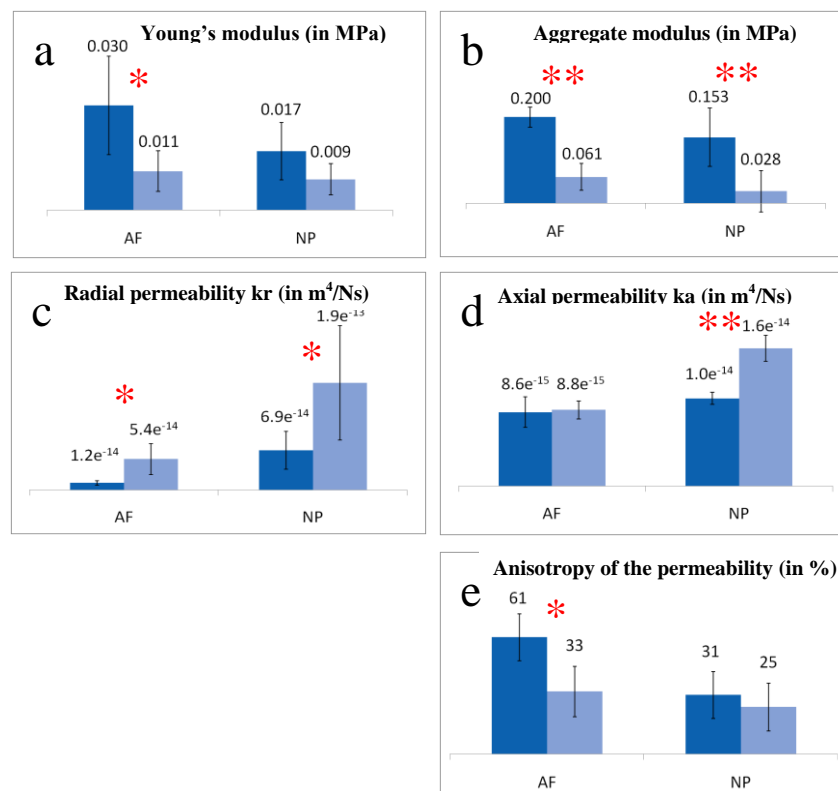


Figure 4-2: Fig. 2: Mechanical parameters variations between in-situ group and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$

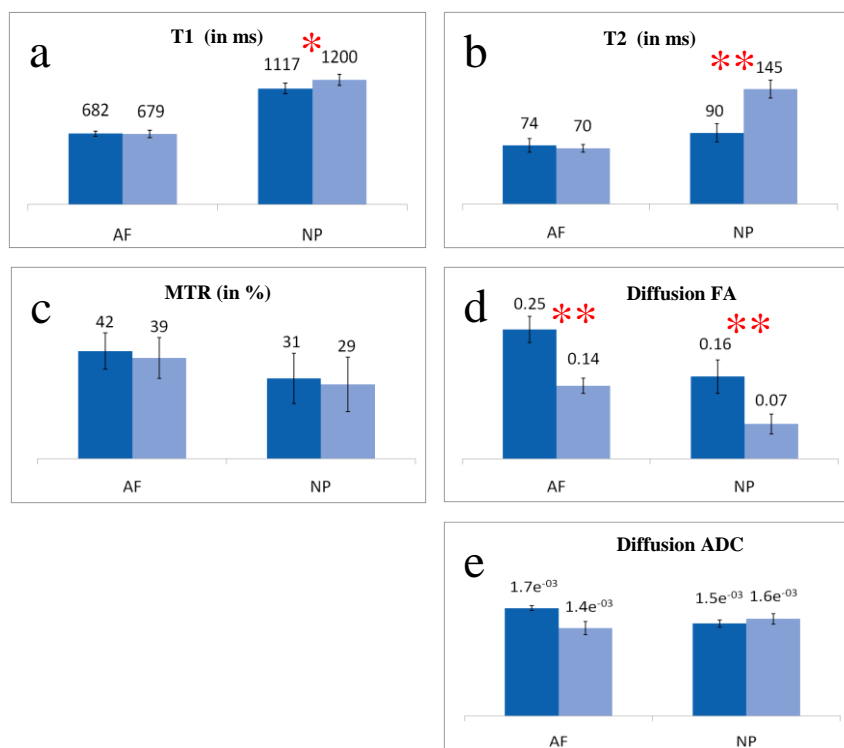


Figure 4-3: Fig. 3: MRI parameters variations between in-situ group and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue: digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by *p<0.05 and **p<0.001.

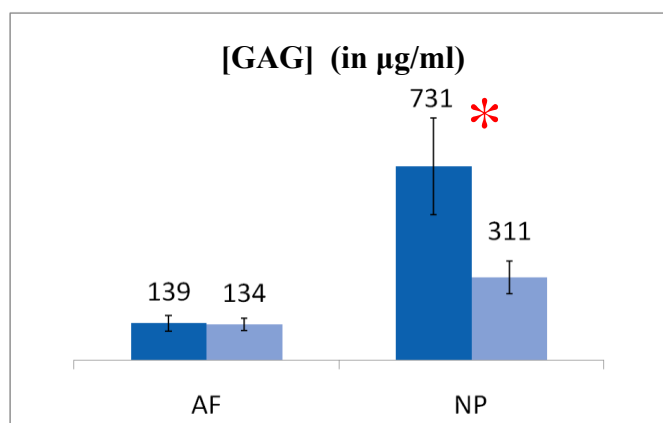


Figure 4-4: Fig. 4: Biochemical contents variations between in-situ and digested group. Dark blue: in-situ group, light blue: digested group. Significant differences between experimental groups are indicated by *p<0.05 and **p<0.001.

CHAPITRE 5 COMPLÉMENT SUR LES TESTS DE COMPRESSION ET LA MESURE DE LA PERMÉABILITÉ

5.1.1 Modèles mathématiques utilisés en compression non confinée

Les données issues des tests en compression non confinée ont été interprétées par trois modèles mathématiques différents : un modèle viscoélastique [87], un modèle BPVE [22, 23] et le modèle intégré dans le logiciel d'analyse du Mach-1 (modèle biphasique intégrant les fibres de collagène, cf. les travaux de Wilson et al. [29, 32]). Les deux premiers modèles ont été utilisés pour calculer le module d'Young, la viscosité puis la perméabilité transversale, le coefficient de poisson et la viscoélasticité. Le troisième modèle a permis également de calculer la perméabilité.

Le modèle intégré dans le logiciel du Mach-1 n'a pas été exploité en profondeur à cause de la variabilité provoquée par le choix du coefficient de Poisson. Le choix des modèles mathématiques fera probablement l'objet d'un article dédié à l'estimation de la perméabilité (perméabilité directe versus différents modèles mathématiques).

5.1.2 Conception des montages expérimentaux

La mesure directe de la perméabilité est un point important pour la précision de la mesure et devient un outil de référence pour comparer les valeurs de perméabilité calculées par les modèles mathématiques. De manière générale, la perméabilité est issue de régression des données expérimentales par des modèles mathématiques. Mais la méthode de régression est sensible aux paramètres initiaux du modèle ce qui produit de la variabilité comme il a déjà été vu précédemment.

Aucun montage expérimental adapté n'était disponible à Polytechnique, nous avons donc réalisé un montage spécialement conçu pour être compatible avec l'environnement de la machine de compression Mach-1 (Biomomentum, Montreal, Qc, Canada). Ce projet de conception a été amorcé et supporté en collaboration avec les stagiaires Philippe-André Beauchesne-Renaud pour la conception et choix du matériel des chambres de compressions et Maxime Deslauriers pour l'assemblage et le rodage du test de perméabilité. Philippe-André Beauchesne-Renaud a conçu les plans de base du montage expérimental et a sélectionné le matériel nécessaire, puis j'ai

finalisé ce projet en réalisant les mises en plan, et la fabrication des pièces. Maxime Deslauriers a, quant à lui, procédé à l'assemblage du test et aux premiers tests préliminaires qui sont restés à l'état d'ébauche, puis j'ai continué à améliorer le montage et la technique de mesure jusqu'à obtenir une méthode utilisable.

5.1.2.1 Compression confinée

Les principales contraintes à respecter pour la conception de la chambre de compression confinée étaient :

- Réaliser un puits de compression de 5mm de diamètre avec le minimum de jeu avec la cellule de charge;
- Obtenir la transparence du montage pour permettre un suivi visuel de l'expérience;
- Adapter aux dimensions du Mach-One pour la fixation du montage;
- Permettre le montage de la chambre et du stage dans l'espace disponible du Mach;
- Permettre un réglage précis en position de la chambre de compression par rapport à la cellule de charge.

Le montage de compression en confiné comprend les éléments suivants :

- Chambre en acrylique usinée (cf. Figure 5-1)
- Filtres poreux (pièces standards)
- Supports de filtre usinés
- Stage Newport micrométrique (pièces du commerce)
- Visserie (pièces standards)

Les dessins de définition et les mises en plans sont annexés à la fin du rapport (cf. Annexe 1 à 7).

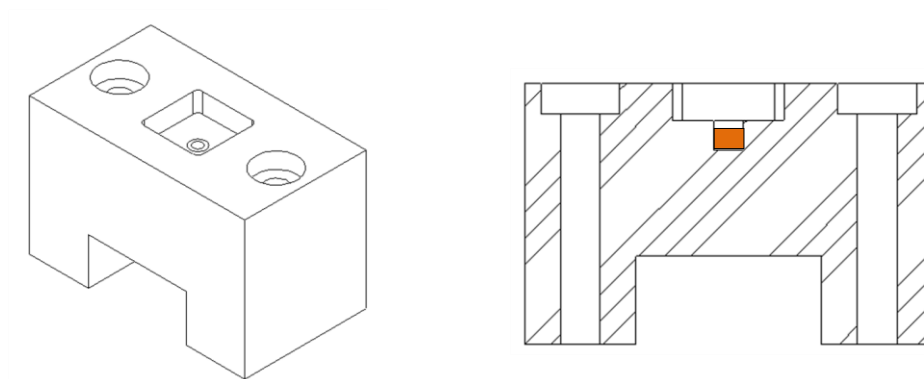


Figure 5-1: Chambre compression confiné : (gauche) vue isométrique, (droite) vue en coupe avec la position de l'échantillon

5.1.2.2 Montage de perméabilité

La chambre de perméabilité a été conçue à partir de la première chambre de compression (cf. Figure 5-2). Les contraintes de réalisation sont les mêmes sauf qu'il faut considérer en plus le passage d'un fluide à travers l'échantillon. Le fluide peut pénétrer dans la chambre par la partie inférieure et le surplus se déverse dans le réservoir placé au dessus du puits. La connexion de la chambre avec le système hydraulique se fait par des éléments de filetage standards.

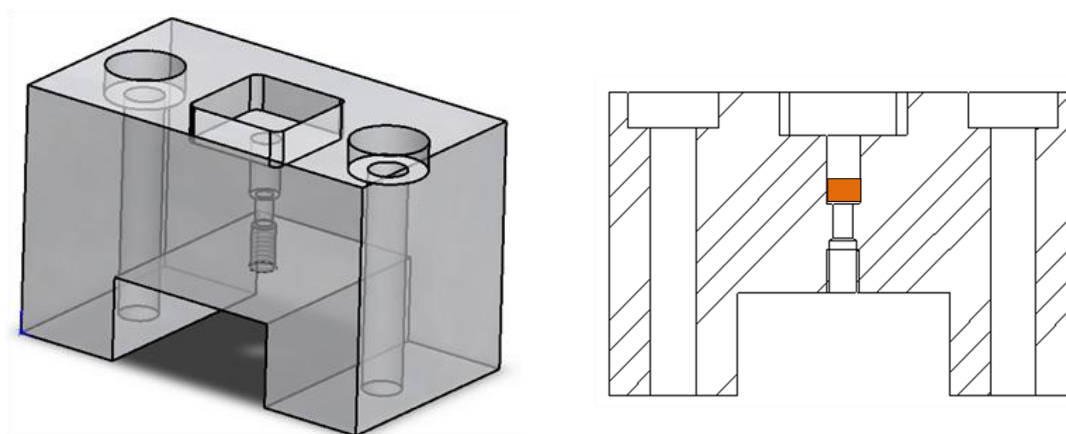


Figure 5-2: Chambre de perméabilité : (gauche) aperçu du modèle 3D, (à droite) vue en coupe avec la position de l'échantillon

Le montage est complété par une pompe « pousse seringue », une seringue Hamilton de 500µL, un manomètre et du câblage adéquat. La vitesse de déplacement du pousse seringue et de la seringue a été choisie en fonction de l'ordre de grandeur attendue pour la mesure de la perméabilité ($\sim 1.10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$).

5.1.3 Protocole de perméabilité

Deux méthodes de mesures ont été essayées (cf. partie 1.2.3.1 Protocole) et la technique consistant à mesurer un différentiel de pression a été conservée. La méthode de mesure directe se base sur la théorie de Darcy qui permet de mesurer l'écoulement d'un fluide dans une conduite. Cette méthode considère que le fluide qui traverse l'échantillon a un comportement Newtonien et l'évaluation de la perméabilité repose donc sur la mesure d'un différentiel de pression entre l'amont et l'aval d'un échantillon.

La Figure 5-3 présente le système dans son ensemble. L'échantillon est placé dans la chambre de compression entre deux filtres de même porosité. Une porosité de 60 microns a été choisie car elle permet à la fois un contact uniforme entre la surface du filtre (pores suffisamment petits) et l'échantillon ne présente que peu de résistance à l'écoulement du fluide (pores suffisamment grands).

Le test se déroule selon les grandes phases suivantes (cf. protocole en annexe) :

- Mesure de la hauteur de l'échantillon suivie d'une phase de relaxation de 40min, mesure de la pression osmotique
- Mise sous pression du système par l'injection d'un important débit (seringue de remplissage), puis la valve est fermée pour le restant du test. La mise en pression permet de détecter plus facilement les faibles variations de débit.
- Injection d'un fort débit (400µl/h) par le pousse seringue pour s'assurer que l'échantillon réagit à une variation de débit, puis un faible débit (20µl/h) est injecté. Le manomètre mesure la pression en continu et la cellule de force enregistre la force de réaction de l'échantillon ce qui permet de détecter très précisément s'il y a une augmentation ou une diminution de la pression dans le système

- Ajustement manuel du débit du pousse seringue pour obtenir un point d'équilibre de contraintes sur une période de 10 min minimum.

La hauteur de l'échantillon est mesurée grâce à une force seuil de 0.1g. Dans notre cas les tissus étaient saturés en eau et par conséquent la pression de gonflement était presque nulle, donc pour simuler la pression induite lors du gonflement, une force de 8g (AF) ou de 5g (NP) était appliquée. La force appliquée est acceptable car elle est inférieure à la pression de gonflement mesurée dans l'étude de Périé et al [16] pour le NP bovin qui est en moyenne de 14g.

Nicolas Savage a effectué une grande partie des tests de perméabilité pendant un stage d'été selon le protocole défini en ANNEXE 16.

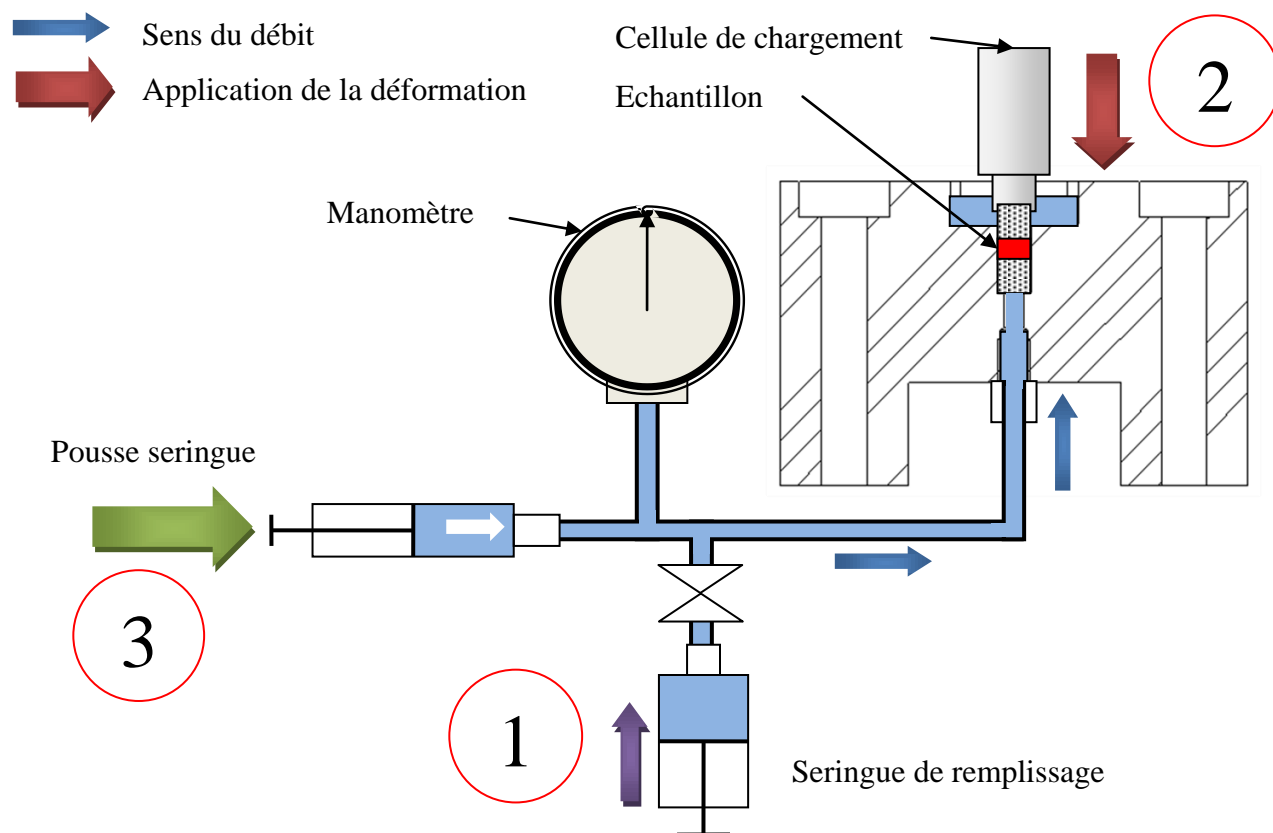


Figure 5-3 : Schéma du système de mesure de la perméabilité, l'échantillon (en rouge) est placé entre deux filtres poreux – étape1 : mise sous pression du système, étape2 : application d'une contrainte, étape3 : faible débit ajusté manuellement.

La mesure directe sur tous les groupes (cf. Tableau 6-1) est présentée à la Figure 5-4. La perméabilité augmente pour le NP selon le niveau de la digestion, variation de 10.0 à $15.9 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ alors que pour l'AF la perméabilité est quasi invariante (environ $8.5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$). L'étude d'Heneghan et al. [2] rapporte des valeurs plus faibles pour la mesure directe du NP bovin (0.32 à $2.08 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$) et la mesure directe de la perméabilité du NP humain est de $1.53 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ [42].

La méthode de mesure directe de la perméabilité présentée par Heneghan et al. [2] permet de calculer le paramètre k_0 (perméabilité en absence de déformation) par plusieurs mesures de perméabilité à des taux de déformation différents. Cependant, l'ensemble des échantillons de l'expérience présentée dans l'article 2 ont été testés avec une seule mesure de perméabilité et avec le minimum possible de déformation.

La différence potentielle causée par l'approximation de la mesure a été évaluée en comparant des valeurs de k_0 (obtenue pour des mesures répétées à différents taux de déformation suivi d'une régression) et les valeurs de k pour 5 % de déformations : l'écart obtenu est inférieur à 10%.

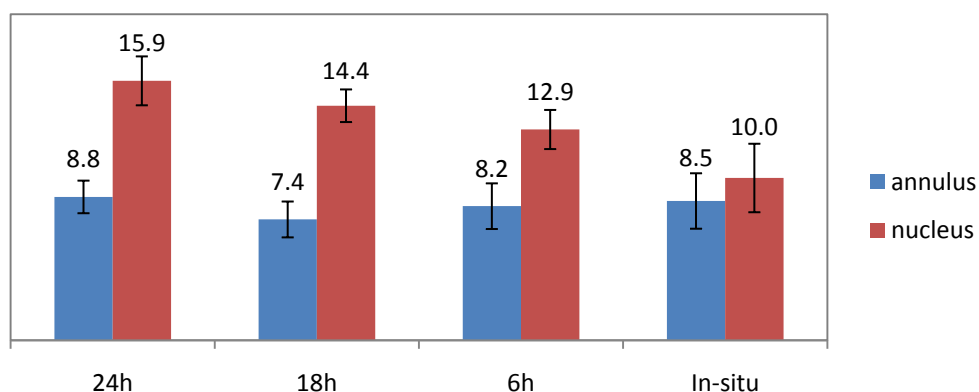


Figure 5-4 : Mesure directe de la perméabilité en $10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$

CHAPITRE 6 COMPLÉMENT PROTOCOLE DE DIGESTION

L'objectif premier du protocole de digestion était de créer des différences de comportement mécanique entre les différents groupes.

Le protocole de dégénérescence a été établi avec l'aide de Quoc-Viet Tran étudiant à Polytechnique pendant son projet PI3. Quoc-Viet Tran a participé à la mise en place d'un pré-protocole par une série de tests d'essais erreurs, puis j'ai pour ma part validé et approfondi son travail pour ensuite utiliser le protocole de dégénérescence d'une manière routinière pour la suite des mes expérimentations. La digestion a été réalisée à l'aide de la trypsine car elle produit d'excellentes différences de comportement mécanique sur l'IVD et qu'elle est non sélective lors de la dégradation. En plus, la digestion est efficace car le disque trempe directement dans la solution de trypsine contrairement à une digestion par injection qui est plus difficile à diffuser dans le disque.

Après de nombreux essais, nous avons décidé de dégrader les disques de trois manières différentes (cf. Tableau 6-1).

Tableau 6-1: Résumé des groupes de digestion

| Groupe | Temps | Concentration [mg/ml] |
|------------|-------|-----------------------|
| In-situ | - | - |
| Groupe 6h | 6h | 0.05 |
| Groupe 18h | 18h | 0.1 |
| Groupe 24h | 24h | 0.5 |

L'effet sur les propriétés mécaniques a été important comme attendu (cf. ANNEXE 17). Le module d'Young et le module d'agrégat diminuent progressivement avec l'augmentation de l'état de digestion, et dans le même temps la perméabilité radiale et la perméabilité directe axiale augmentent. Des différences significatives sont observées entre les groupes extrêmes mais pas entre deux groupes consécutifs pour les quatre paramètres.

L'effet sur les paramètres IRM est moins évident comme le montre l'évolution du temps de relaxation T1 et T2, du transfert d'aimantation MT et des coefficients de la diffusion FA et

l'ADC (cf. ANNEXE 18). Les paramètres T1, T2, T2* et MT sont peu sensibles au traitement à la trypsine surtout pour l'AF. Pour le NP, il y a une augmentation du signal T1, T2 et T2* entre le groupe in-situ et le groupe digéré 6h, ensuite les trois groupes digérés sont équivalents avec une légère augmentation du signal selon le paramètre. Le groupe in situ a réagi différemment des autres groupes, ce qui laisse penser que l'hydratation à jouer un rôle important au niveau du signal IRM. Les paramètres T1, T2 et T2* ont donc étaient plus sensibles au phénomène d'hydratation qu'à celui de la dégradation par la trypsine.

Les paramètres FA et ADC, qui représentent l'organisation de la structure du tissu, ont largement été affectés. De plus FA, diminue progressivement avec les stades de dégénérescence, ce qui traduit une matrice de plus en plus isotrope. Cette tendance s'accompagne de la diminution dans l'AF et une timide augmentation dans le NP de l'ADC qui représente la capacité des molécules à pouvoir se déplacer dans le milieu. Les différences intergroupes ne sont pas significatives, mais des différences existent entre les groupes extrêmes. FA est le seul paramètre IRM qui a été sensible à l'évolution de chaque groupe.

Pour l'article, seuls les groupes in-situ et digérés pendant 24h (les groupes extrêmes) ont été retenus, car ces deux groupes permettent d'obtenir des tendances et corrélations alors que la combinaison de tous les groupes diminue considérablement les tendances.

Les paramètres mécaniques certifient que la dégradation par la trypsine a eu un effet distinct pour chaque groupe, les paramètres IRM sont moins explicites (excepté FA). Une des meilleures techniques pour évaluer l'effet de la digestion est de contrôler les quantités de protéines qui ont été dégradées. Les contenus en PG et en collagène ont été estimés par de essais biochimiques menés dans le laboratoire de F.Moldovan, le Laboratoire de Biologie Moléculaire et Orthopédique (LBMO) avec l'aide de Charlotte Zaouter.

L'objectif des essais biochimiques est de valider l'effet de la digestion et non de déterminer avec exactitude les contenus biochimiques ou de déterminer des corrélations avec propriétés mécaniques ou IRM.

Les contenus biochimiques ont été évalués sur 24 disques, cela représente 12 disques par groupe ce qui permet une analyse statistique pertinente. La détermination en PG a été insérée

dans l'article comme résultat. Cependant, le contenu en collagène n'y figure pas car les résultats sont difficilement interprétables.

Les protocoles expérimentaux étaient ceux utilisés dans les études de D. Périé réalisés à l'Université du Vermont à Burlington (Vermont, VT, USA). Le contenu en PG a été estimé par le protocole le plus répandu c'est-à-dire par essais colorimétriques en utilisant le colorant 1.9 diméthylethylène-blue (DMMB). Le protocole est joint en annexe (cf. ANNEXE 11). Le contenu en collagène a été déterminé par un test d'hydroxyproline (cf. ANNEXE 13). Les résultats liés au contenu en PG ne sont pas cohérents avec la dégradation effectuée (cf. Figure 6-1).

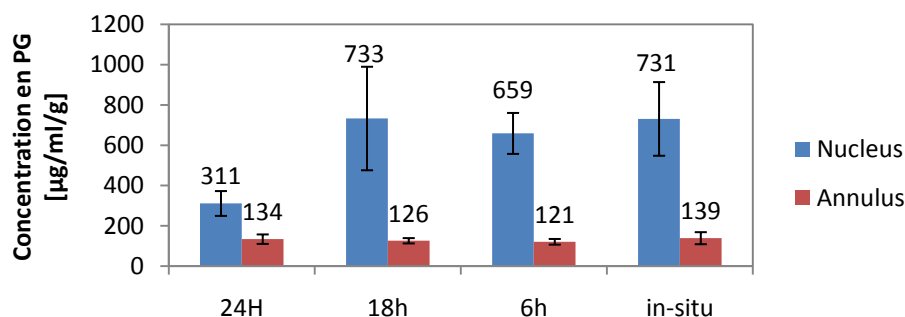


Figure 6-1: Concentration en PG dans l'IVD normalisée par le poids de l'échantillon [µg/ml/g]

La différence entre NP et AF est très marquée ce qui semble normal puisque le NP est largement composé de PG. La perte de PG semble se produire passé 18h de digestion avec une forte concentration de trypsine dans le nucléus et aucune variation notable n'est à noter dans l'AF. Le test DMMB est une méthode qualitative plus que quantitative et produit de la variabilité dans les résultats. Lors des pré-tests de mise au point, des échantillons digérés pendant 6h avec des concentrations de trypsine différentes ont été testés (0.05, 0.1 et 0.5mg/ml de trypsine, un échantillon par type de concentration). Le test a été fait deux fois sur la même solution de digestion et les résultats obtenus étaient variables, ce qui nous a mené à être prudents envers les résultats issus de la méthode DMMB (cf. Figure 6-2Figure 6-3). Le test de répétabilité présente des écarts de plus de 50% selon les valeurs. Même si un seul échantillon a été testé pour chaque concentration, cela nous donne un aperçu de la fiabilité du test. De plus, les résultats ne font

ressortir aucune tendance liée au niveau de digestion, ce qui peut s'expliquer par la courte durée de digestion dans ce cas ci (6h).

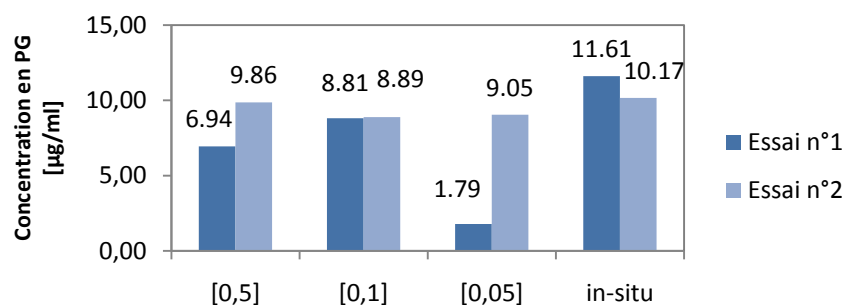


Figure 6-2: Essai de répétabilité: concentration de PG dans l'AF

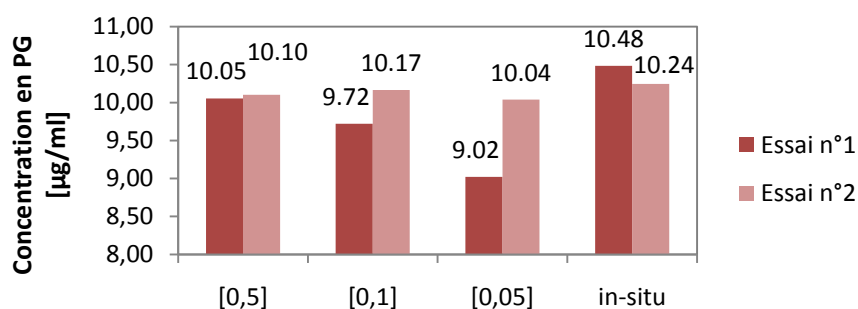
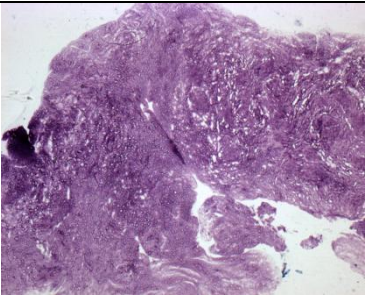
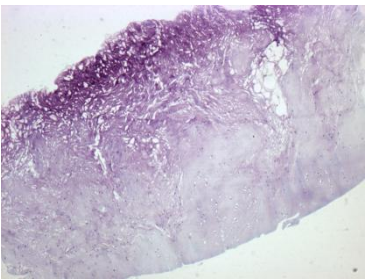
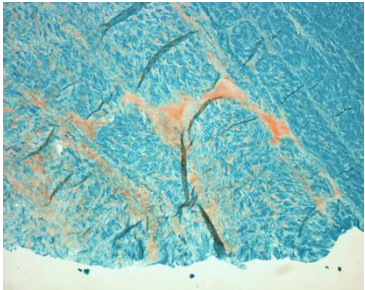
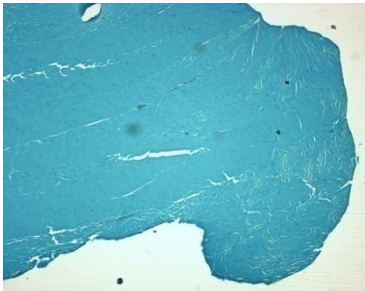


Figure 6-3: Essai de répétabilité: concentration de PG dans le NP

Afin de s'assurer de l'effet de la digestion de la trypsine, des coupes histologiques ont été faites pour observer l'état du tissu. Des colorations ont été appliquées pour marquer le collagène et les protéoglycanes. Les PG ont été colorées par la safranine O fast-green et le collagène par le bleu de toluidine.

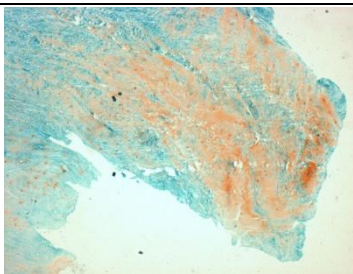
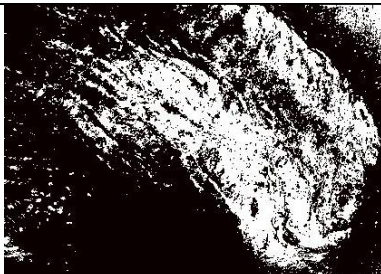
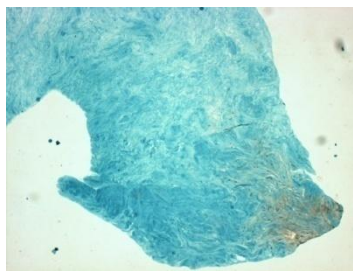
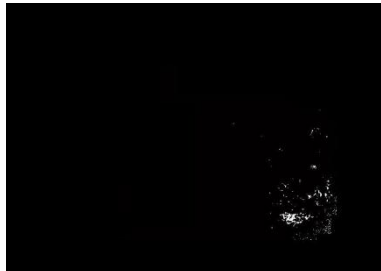
Tableau 6-2: Coupes histologiques pour AF et NP

| Groupe | | Annulus Fibrosus | Nucléus Pulposus | Observations |
|-----------|--|------------------|---|---|
| Collagène | Coloration au bleu de toluidine | In-situ |  | Présence de collagène, coloration intense |
| | | Digéré 24h |  | Coloration peu intense |
| PG | Coloration à la Safranise O fast-green | In-situ |  | Présence de PG, dominante orange |
| | | Digéré 24h |  | Pas ou peu de PG, dominante vert/bleu |

Les coupes histologiques confirment la présence de protéoglycanes (traces orange) et de collagène (violet intense) dans le groupe in-situ et prouvent l'évolution des contenus en fonction de la dégradation, ce que les essais biochimiques prouvent difficilement. Visuellement, les différences AF/NP sont très marquées pour le groupe in-situ et beaucoup moins pour les groupes digérés.

Un outil quantitatif a été développé sous Matlab ayant pour objectif de comptabiliser le nombre de pixels marqués par la coloration pour ensuite faire un rapport entre le nombre de pixels marqués et le nombre total de pixels de la coupe.

Tableau 6-3: Exemple d'analyse de coupes histologiques pour le NP

| Groupe | Coupe histo (microscope x5) | Analyse de pixels | Coefficient |
|------------|--|---|-------------|
| In-situ |  |  | 0.43 |
| Digéré 24h |  |  | 0.05 |

Les points lumineux représentent la présence de PG marqués par la coloration. Dans cet exemple, le ratio témoigne de la différence de concentration de collagène entre les deux échantillons.

Cependant, ces résultats ne sont qu'au stade préliminaire, une étude complète sur tous les disques mènerait probablement à des écarts entre les différents groupes. La détection de contour automatique reste à améliorer avec une calibration automatique.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de cette recherche fondamentale était de déterminer des relations entre les propriétés mécaniques et les paramètres IRM du IVD dans le but d'évaluer d'une manière non invasive les caractéristiques mécaniques du IVD dans un cadre de diagnostic précoce de maladies dégénératives. Quelques relations ont été établies avec des coefficients de corrélation modérés si on considère l'ensemble des échantillons et les coefficients de corrélation sont plus élevés si on considère chaque groupe isolément. Notre recherche a permis d'une part de mieux comprendre le comportement mécanique du IVD grâce à l'étude sur l'influence des protocoles expérimentaux sur la réponse mécanique du IVD et d'autre part de contribuer au développement d'un outil de diagnostic à partir des corrélations IRM-mécanique.

L'évaluation de l'influence du protocole expérimental sur les propriétés mécaniques en compression non confinée a complété les travaux similaires réalisés en compression confinée par Périé et al. [16]. Ainsi, les protocoles pour les deux types de compression ont été étudiés et évalués. Dans les deux études, l'importance d'une précontrainte avant le test est soulignée. En compression non confinée cette précontrainte se traduit par l'application d'une déformation du tissu maintenue pendant 10 min et en compression confinée, par un gonflement confiné. La précontrainte appliquée représente la charge naturelle exercée par les corps vertébraux sur les disques. L'application d'une précontrainte avec un gonflement du tissu permet de se rapprocher des conditions physiologiques du IVD lors du test mécanique.

Des variations ont été observées sur la prédiction des paramètres mécaniques en fonction du modèle mathématique utilisé. Des trois modèles utilisés (viscoélastique, BPVE et BPVE renforcé de fibres) en compression non confinée, seul deux ont été repris dans les articles. Le modèle BPVE présentait de bons coefficients de corrélation (0.83 à 0.94) avec les données en conformité avec l'étude de DiSilvestro et al. [22] qui présente des coefficients de corrélation entre 0.95 et 0.99. Cependant, une seule rampe était testée dans leur étude, ce qui est plus contrôlable pour l'ajustement des paramètres initiaux du modèle. Le modèle de Wilson et al. [29, 32] présente de grandes variations à cause des paramètres initiaux, en effet un coefficient de Poisson plausible doit être choisi pour réaliser le calcul, or une variation de 0,49 à 0,495 procure

une variation de facteur 10 sur la valeur de la perméabilité. Cette variabilité explique pourquoi ce modèle n'a pas été retenu pour l'étude.

En compression confinée, les valeurs de perméabilité calculées par le modèle biphasique non linéaire sont généralement 2 à 3 fois supérieures aux valeurs issues de la mesure directe de perméabilité et de plus le modèle biphasique présente de grande variabilité (écarts types importants). L'ordre de grandeur de la perméabilité pour l'AF est de $1.10^{-15} \text{ m}^4/\text{N.s}$ et de $1.10^{-14} \text{ m}^4/\text{N.s}$ pour le NP ce qui est supérieur d'un facteur 10 par rapport à la littérature. Le modèle biphasique non linéaire semble surestimer la valeur de la perméabilité.

L'effet de la digestion est marqué pour les propriétés mécaniques de chaque groupe, mais peu notable pour les paramètres IRM. Dans l'étude portant sur les corrélations IRM-mécanique, les deux groupes extrêmes ont été conservés, car ils présentent des différences. Entre le groupe in-situ et digéré 24h, il y a deux paramètres qui varient (temps de digestion et concentration de l'enzyme), et chacun a une influence sur l'état de digestion du disque.

Pour déterminer avec précision le rôle de chaque paramètre, des témoins hydratés pendant 6h, 18h et 24h auraient dû être réalisés. Ainsi, avec l'ajout de disques témoins, les effets de l'hydratation et de la trypsine auraient pu être dissociés, apportant une information supplémentaire sur la cause exacte de l'évolution des paramètres IRM. Les temps de relaxation T1 et T2 sont similaires pour les groupes digérés et nettement différents pour le groupe in situ, d'où l'importance de l'hydratation sur la sensibilité de T1 et de T2. De plus, des études affirment que la trypsine n'apporte pas de différence au niveau du signal IRM [13, 14, 86] ce qui nous fait réfléchir au réel impact de la dégradation par la trypsine versus l'effet de l'hydratation. L'hydratation pendant la digestion a été évaluée par la différence de poids humide pré et post digestion qui présente une hydratation similaire de $21 \pm 0.4\%$ pour tous les groupes digérés. Cependant, le paramètre de la diffusion présente des différences avec une digestion à la trypsine ce qui nous mène à modérer les conclusions de la littérature. Le protocole de digestion est une différence majeure avec les études précédentes, car dans notre cas, les disques sont isolés et trempent directement dans la solution. Dans la littérature, aucune étude n'utilise exactement cette méthode de digestion associée à l'acquisition IRM, donc la comparaison est difficile ce qui nous laisse penser que la trypsine a probablement eu un effet grâce au contact direct avec le tissu.

Le but de l'expérimentation était de créer des différences marquées entre les groupes quelque soit le moyen employé, cependant, les faibles différences obtenues nous ont conduit à affiner notre analyse pour mieux comprendre les raisons de ces différences. Lors de l'analyse, nous avons réalisé que l'importance de l'impact de l'hydratation sur les paramètres IRM a été sous-estimée. Finalement, dans l'objectif premier de l'expérience, l'utilisation de groupes témoin ne se justifiait pas, mais cela aurait été utile pour l'interprétation des résultats.

De meilleures relations ont été obtenues en ne sélectionnant que les deux groupes extrêmes. Si on considère chaque groupe de manière isolée, les corrélations entre les paramètres sont bien meilleures et elles sont statistiquement pertinentes. Cependant lorsqu'on regroupe les données des différents groupes, le nuage de données devient beaucoup plus bruité et les corrélations diminuent. Cela peut s'expliquer par des effets contradictoires des tendances de corrélation entre les groupes. Il se peut qu'une corrélation positive soit trouvée dans un groupe puis négative dans un deuxième, la réunion des deux groupes peut ne pas donner de corrélation intéressante. Les paramètres de viscosité et de viscoélasticité n'ont pas été spécifiquement exploités pour établir les corrélations car leur interprétation reste compliquée et leur variabilité est très importante. L'étude de l'ADC selon les directions orthogonales pourrait donner des corrélations supplémentaires notamment entre la perméabilité radiale et l'ADC_x ou l'ADC_y. Cette piste serait facilement réalisable et exploitable car tous les outils sont déjà en place.

Le test de DMMB est couramment utilisé dans la littérature pour déterminer le contenu en PG [14, 88, 89] et fournit des résultats fiables, c'est pourquoi nous l'avons choisi. Mais les tests biochimiques ont été longs à mettre en place, car les résultats obtenus étaient sujets à de grandes variations, compliquant l'interprétation. La répétabilité du test DMMB est un des points faibles de la méthode, c'est à cause de ce point que les coupes histologiques ont été réalisées. Les tests DMMB furent réalisés sur seulement 24 échantillons pour l'AF et 24 pour le NP pour donner une tendance de l'évolution du contenu en PG. L'absence de différences significatives inter groupes est peut-être causée par la faible sensibilité de la méthode par colorimétrie.

Les essais d'hydroxyproline qui ont été menés n'ont pas permis d'obtenir des résultats exploitables pour le contenu en collagène. Le protocole mis en œuvre n'était pas complètement opérationnel, des essais supplémentaires sont nécessaires pour réaliser le protocole de manière fiable. Il est à noter qu'il est également possible de déterminer la quantité de collagène perdu

pendant la digestion en mesurant les concentrations de collagène présent dans les milieux de digestion. À cet effet, des échantillons sont conservés à -20° pour de futures mesures du taux de collagène pour l'AF et plus difficilement pour le NP (peu de tissu exploitable).

Les essais biochimiques nous ont permis d'évaluer qualitativement l'effet de la digestion tout en considérant les erreurs potentielles des outils de mesure. Les coupes histologiques permettent d'obtenir un aperçu qualitatif des contenus. Les colorations utilisées ont une sensibilité à la présence de PG ou de collagène qui est mal évaluée, la sensibilité du colorant peut expliquer l'absence de coloration dans certains cas. Le programme développé sous Matlab pour comptabiliser le nombre de pixels colorés est un outil prometteur pour évaluer de manière quantitative des différences entre les différents groupes.

La mesure du poids sec et humide de l'échantillon est une information importante pour la suite de l'analyse des résultats de perméabilité car le contenu en eau est un facteur important pour la perméabilité. Cette mesure est toujours possible pour l'AF et un peu plus problématique pour le NP par le manque de tissu dans cette zone.

CONCLUSION

Les conclusions apportées par ce projet améliorent les connaissances du comportement mécanique du disque intervertébral et apportent des connaissances supplémentaires pour le diagnostic précoce non invasif des maladies dégénératives par l'IRM quantitatif.

Le projet de recherche fondamentale répond en effet à un réel besoin d'approfondissement de connaissances qui seront utiles pour de futures études d'imagerie ou des études de modélisation et de simulation par éléments finis qui nécessitent des données expérimentales.

Les travaux accomplis confortent en parti à l'hypothèse de départ et prouvent donc que le comportement mécanique du disque intervertébral peut partiellement être caractérisé par l'imagerie par IRM quantitatif. Pour répondre à l'hypothèse de travail, l'ensemble des objectifs ont été atteint et maintenant, les outils et méthodes développés sont opérationnels et disponibles pour de futurs travaux de recherche.

Pendant cette étude, un protocole a été défini en compression non confinée pour le nucléus pulposus et l'annulus fibrosus afin de déterminer d'une manière fiable et précise le comportement mécanique. Les conclusions révèlent l'importance de la présence d'une pré-compression sur l'échantillon avant d'effectuer des tests mécaniques en compression non confinée. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le disque est dans un environnement proche de ces conditions physiologiques : hydraté et pré-chargé.

La première étude a servi de base à l'établissement des corrélations IRM-mécanique. Le projet a couvert un large domaine d'étude par la réalisation de tests mécaniques, d'acquisitions IRM et des essais biochimiques sur l'AF et le NP. Les essais mécaniques ont porté sur des tests en compression non confinée, confinée et une mesure directe de perméabilité qui a été un point novateur du projet, car dans une même étude, la mesure directe de perméabilité n'avait jamais été associée aux autres tests mécaniques de compression et à l'IRM. Un ensemble de disques a été digéré à la trypsine pour des durées et concentrations différentes, les paramètres mécaniques et dans une moindre mesure les paramètres IRM ont été sensibles à la digestion. Des relations modérées ont pu être établies entre les paramètres IRM et mécaniques.

Les résultats obtenus peuvent être approfondis et complétés par la détermination de paramètres supplémentaires comme le contenu en eau, l'analyse des coupes histologiques et par

l'étude de paramètres IRM supplémentaires comme le T1 ρ ou le CEST (Chemical Exchange Saturated Transfer). Ce projet, avec une dégradation par chargement mécanique en dynamique pur ou combiné à un traitement enzymatique, pourra probablement améliorer les capacités de l'IRM à caractériser le comportement mécanique du disque intervertébral.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. J. M. Jongeneelen, "Biomechanics in the intervertebral disc," 2006.
- [2] P. Heneghan et P. E. Riches, "Determination of the strain-dependent hydraulic permeability of the compressed bovine nucleus pulposus," *Journal of Biomechanics*, vol. 41, no. 4, pp. 903-906, 2008.
- [3] J. P. Urban et S. Roberts, "Degeneration of the intervertebral disc," *Arthritis Res Ther*, vol. 5, no. 3, pp. 120-30, 2003.
- [4] B. Johnstone et M. T. Bayliss, "The Large Proteoglycans of the Human Intervertebral Disc: Changes in Their Biosynthesis and Structure with Age, Topography, and Pathology," *SPINE*, vol. 20, no. 6, pp. 674-684, 1995.
- [5] W. Johannessen, "Nucleus Pulposus Degeneration and its role in intervertebral function," 2006.
- [6] A. I. Chou, "The influence of biomaterial properties on the phenotypic behavior of intervertebral disc cells *in vitro* and *in vivo*," 2008.
- [7] J. P. Urban et C. P. Winlove, "Pathophysiology of the intervertebral disc and the challenges for MRI," *J Magn Reson Imaging*, vol. 25, no. 2, pp. 419-32, 2007.
- [8] S. Majumdar, D. Thomasson, A. Shimakawa, et H. K. Genant, "Quantitation of the susceptibility difference between trabecular bone and bone marrow: experimental studies," *Magn Reson Med*, vol. 22, no. 1, pp. 111-27, 1991.
- [9] C. W. Pfirrmann, A. Metzdorf, M. Zanetti, J. Hodler, et N. Boos, "Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 26, no. 17, pp. 1873-8, 2001.
- [10] J. Antoniou, C. N. Demers, G. Beaudoin, T. Goswami, F. Mwale, M. Aebi, et M. Alini, "Apparent diffusion coefficient of intervertebral discs related to matrix composition and integrity," *Magn Reson Imaging*, vol. 22, no. 7, pp. 963-72, 2004.

- [11] J. P. Urban et J. F. McMullin, "Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition, and degeneration," *Spine*, vol. 13, no. 2, pp. 179-87, 1988.
- [12] H. Yao, M. A. Justiz, D. Flagler, et W. Y. Gu, "Effects of swelling pressure and hydraulic permeability on dynamic compressive behavior of lumbar annulus fibrosus," *Ann Biomed Eng*, vol. 30, no. 10, pp. 1234-41, 2002.
- [13] J. Antoniou, F. Mwale, C. N. Demers, G. Beaudoin, T. Goswami, M. Aebi, et M. Alini, "Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the nucleus pulposus of intervertebral discs," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 31, no. 14, pp. 1547-54, 2006.
- [14] F. Mwale, C. N. Demers, A. J. Michalek, G. Beaudoin, T. Goswami, L. Beckman, J. C. Iatridis, et J. Antoniou, "Evaluation of quantitative magnetic resonance imaging, biochemical and mechanical properties of trypsin-treated intervertebral discs under physiological compression loading," *J Magn Reson Imaging*, vol. 27, no. 3, pp. 563-73, 2008.
- [15] E. H. Frank, A. J. Grodzinsky, T. J. Koob, et D. R. Eyre, "Streaming potentials: a sensitive index of enzymatic degradation in articular cartilage," *J Orthop Res*, vol. 5, no. 4, pp. 497-508, 1987.
- [16] D. Perie, D. Korda, et J. C. Iatridis, "Confined compression experiments on bovine nucleus pulposus and annulus fibrosus: sensitivity of the experiment in the determination of compressive modulus and hydraulic permeability," *J Biomech*, vol. 38, no. 11, pp. 2164-71, 2005.
- [17] D. Périe, J. C. Iatridis, C. N. Demers, T. Goswami, G. Beaudoin, F. Mwale, et J. Antoniou, "Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI," *Journal of Biomechanics*, 2005.
- [18] P. Julkunen, W. Wilson, J. S. Jurvelin, J. Rieppo, C. J. Qu, M. J. Lammi, et R. K. Korhonen, "Stress-relaxation of human patellar articular cartilage in unconfined compression: prediction of mechanical response by tissue composition and structure," *J Biomech*, vol. 41, no. 9, pp. 1978-86, 2008.
- [19] M. Nguyen, W. Johannessen, J. H. Yoder, A. J. Wheaton, E. J. Vresilovic, A. Borthakur, et D. M. Elliott, "Noninvasive Quantification of Human Nucleus Pulposus Pressure with

- Use of T1{rho}-Weighted Magnetic Resonance Imaging," *Journal of bone and Joint Surgery*, vol. 90, pp. 796-802, 2008.
- [20] D. S. Perie, J. J. MacLean, J. P. Owen, et J. C. Iatridis, "Correlating material properties with tissue composition in enzymatically digested bovine annulus fibrosus and nucleus pulposus tissue," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 34, no. 5, pp. 769-777, 2006.
- [21] E. Langelier et M. D. Buschmann, "Increasing strain and strain rate strengthen transient stiffness but weaken the response to subsequent compression for articular cartilage in unconfined compression," *J Biomech*, vol. 36, no. 6, pp. 853-9, 2003.
- [22] M. R. DiSilvestro, Q. Zhu, M. Wong, J. S. Jurvelin, et J. K. F. Suh, "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: I---Simultaneous Prediction of Reaction Force and Lateral Displacement," *J. Biomech. Eng.*, vol. 123, no. 2, pp. 191-7, 2001.
- [23] M. R. DiSilvestro, Q. Zhu, et J. K. F. Suh, "Biphasic Poroviscoelastic Simulation of the Unconfined Compression of Articular Cartilage: II---Effect of Variable Strain Rates," *J. Biomech. Eng.*, vol. 123, no. 2, pp. 198-200, 2001.
- [24] A. C. Chen, W. C. Bae, R. M. Schinagl, et R. L. Sah, "Depth- and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression," *J Biomech*, vol. 34, no. 1, pp. 1-12, 2001.
- [25] R. K. Korhonen, M. S. Laasanen, J. Toyras, J. Rieppo, J. Hirvonen, H. J. Helminen, et J. S. Jurvelin, "Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation," *J Biomech*, vol. 35, no. 7, pp. 903-9, 2002.
- [26] M. A. Biot, "Mechanics of deformation and acoustic propagation in porous media," *Journal of Applied Physics*, vol. 33, no. 4, pp. 1482-1498, 1962.
- [27] Van C. Mow et Anthony Ratcliffe, "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures," *Biomaterials*, vol. 13, no. 2, pp. 67-97, 1991.
- [28] J. K. Suh et M. R. Disilvestro, "Biphasic poroviscoelastic behavior of hydrated biological soft tissue," *Journal of Applied Mechanics, Transactions ASME*, vol. 66, no. 2, pp. 528-535, 1999.

- [29] W. Wilson, C. C. van Donkelaar, R. van Rietbergen, et R. Huiskes, "The role of computational models in the search for the mechanical behavior and damage mechanisms of articular cartilage," *Med Eng Phys*, vol. 27, no. 10, pp. 810-26, 2005.
- [30] J. M. Cloyd, N. R. Malhotra, L. Weng, W. Chen, R. L. Mauck, et D. M. Elliott, "Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds," *Eur Spine J*, vol. 16, no. 11, pp. 1892-8, 2007.
- [31] L. P. Li, J. Soulhat, M. D. Buschmann, et A. Shirazi-Adl, "Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model," *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, vol. 14, no. 9, pp. 673-82, 1999.
- [32] W. Wilson, C. C. van Donkelaar, B. van Rietbergen, K. Ito, et R. Huiskes, "Stresses in the local collagen network of articular cartilage: a poroviscoelastic fibril-reinforced finite element study," *J Biomech*, vol. 37, no. 3, pp. 357-66, 2004.
- [33] B. Cohen, W. M. Lai, et V. C. Mow, "A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis," *J Biomech Eng*, vol. 120, no. 4, pp. 491-6, 1998.
- [34] M. R. DiSilvestro et J. K. Suh, "Biphasic poroviscoelastic characteristics of proteoglycan-depleted articular cartilage: simulation of degeneration," *Ann Biomed Eng*, vol. 30, no. 6, pp. 792-800, 2002.
- [35] J. S. Jurvelin, M. D. Buschmann, et E. B. Hunziker, "Optical and mechanical determination of Poisson's ratio of adult bovine humeral articular cartilage," *J Biomech*, vol. 30, no. 3, pp. 235-41, 1997.
- [36] P. Julkunen, R. K. Korhonen, M. J. Nissi, et J. S. Jurvelin, "Mechanical characterization of articular cartilage by combining magnetic resonance imaging and finite-element analysis: a potential functional imaging technique," *Phys Med Biol*, vol. 53, no. 9, pp. 2425-38, 2008.
- [37] R. K. Korhonen, M. S. Laasanen, J. Toyras, R. Lappalainen, H. J. Helminen, et J. S. Jurvelin, "Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage," *J Biomech*, vol. 36, no. 9, pp. 1373-9, 2003.

- [38] W. Wilson, J. M. Huyghe, et C. C. van Donkelaar, "A composition-based cartilage model for the assessment of compositional changes during cartilage damage and adaptation," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 14, no. 6, pp. 554-60, 2006.
- [39] M. Wong, M. Ponticiello, V. Kovanen, et J. S. Jurvelin, "Volumetric changes of articular cartilage during stress relaxation in unconfined compression," *J Biomech*, vol. 33, no. 9, pp. 1049-54, 2000.
- [40] Y. Schroeder, D. M. Elliott, W. Wilson, F. P. Baaijens, et J. M. Huyghe, "Experimental and model determination of human intervertebral disc osmoviscoelasticity," *J Orthop Res*, vol. 26, no. 8, pp. 1141-6, 2008.
- [41] M. D. Buschmann, J. Soulhat, A. Shirazi-Adl, S. Jukka, Jurvelin, B. Ernst, et Hunziker, "Confined compression of articular cartilage: Linearity in ramp and sinusoidal tests and the importance of interdigitation and incomplete confinement," *Journal of Biomechanics*, vol. 31, pp. 171—178, 1998.
- [42] W. Y. Gu, X. G. Mao, R. J. Foster, M. Weidenbaum, V. C. Mow, et B. A. Rawlins, "The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar annulus fibrosus. Influence of age, degeneration, direction, and water content," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 24, no. 23, pp. 2449-55, 1999.
- [43] V. C. Mow, S. C. Kuei, W. M. Lai, et C. G. Armstrong, "Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments," *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 102, no. 1, pp. 73-84, 1980.
- [44] M. H. Holmes et V. C. Mow, "The nonlinear characteristics of soft gels and hydrated connective tissues in ultrafiltration," *J Biomech*, vol. 23, no. 11, pp. 1145-56, 1990.
- [45] J. C. Iatridis, L. A. Setton, R. J. Foster, B. A. Rawlins, M. Weidenbaum, et V. C. Mow, "Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviors of human annulus fibrosus in compression," *J Biomech*, vol. 31, no. 6, pp. 535-44, 1998.
- [46] W. M. Lai et V. C. Mow, "Drag-induced compression of articular cartilage during a permeation experiment," *Biorheology*, vol. 17, no. 1-2, pp. 111-23, 1980.

- [47] G. A. Ateshian, W. H. Warden, J. J. Kim, R. P. Grelsamer, et V. C. Mow, "Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments," *J Biomech*, vol. 30, no. 11-12, pp. 1157-64, 1997.
- [48] S. M. Klisch et J. C. Lotz, "A special theory of biphasic mixtures and experimental results for human annulus fibrosus tested in confined compression," *J Biomech Eng*, vol. 122, no. 2, pp. 180-8, 2000.
- [49] A. J. H. Frijns, J. M. Huyghe, et J. D. Janssen, "Validation of the quadriphasic mixture theory for intervertebral disc tissue," *International Journal of Engineering Science*, vol. 35, no. 15, pp. 1419-1429, 1997.
- [50] B. A. Best, F. Guilak, L. A. Setton, W. Zhu, F. Saed-Nejad, A. Ratcliffe, M. Weidenbaum, et V. C. Mow, "Compressive mechanical properties of the human anulus fibrosus and their relationship to biochemical composition," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 19, no. 2, pp. 212-21, 1994.
- [51] M. R. Drost, P. Willems, H. Snijders, J. M. Huyghe, J. D. Janssen, et A. Huson, "Confined compression of canine annulus fibrosus under chemical and mechanical loading," *J Biomech Eng*, vol. 117, no. 4, pp. 390-6, 1995.
- [52] G. B. Houben, M. R. Drost, J. M. Huyghe, J. D. Janssen, et A. Huson, "Nonhomogeneous permeability of canine anulus fibrosus," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 22, no. 1, pp. 7-16, 1997.
- [53] W. Johannessen et D. M. Elliott, "Effects of degeneration on the biphasic material properties of human nucleus pulposus in confined compression," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 30, no. 24, pp. E724-9, 2005.
- [54] H. D. Bush, W. G. Horton, D. L. Smare, et A. Naylor, "Fluid content of the nucleus pulposus as a factor in the disk syndrome; further observations," *Br Med J*, vol. 2, no. 4984, pp. 81-3, 1956.
- [55] W. J. Virgin, "Experimental investigations into the physical properties of the intervertebral disc," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 33-B, no. 4, pp. 607-11, 1951.
- [56] C. G. Armstrong et V. C. Mow, "Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 64, no. 1, pp. 88-94, 1982.

- [57] W. Y. Gu, W. M. Lai, et V. C. Mow, "Transport of fluid and ions through a porous-permeable charged-hydrated tissue, and streaming potential data on normal bovine articular cartilage," *J Biomech*, vol. 26, no. 6, pp. 709-23, 1993.
- [58] M. J. Grimm et J. L. Williams, "Measurements of permeability in human calcaneal trabecular bone," *J Biomech*, vol. 30, no. 7, pp. 743-5, 1997.
- [59] F. Accadbled, J. M. Laffosse, D. Ambard, A. Gomez-Brouchet, J. S. de Gauzy, et P. Swider, "Influence of location, fluid flow direction, and tissue maturity on the macroscopic permeability of vertebral end plates," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 33, no. 6, pp. 612-9, 2008.
- [60] P. Swider, M. Conroy, A. Pedrono, D. Ambard, S. Mantell, K. Soballe, et J. E. Bechtold, "Use of high-resolution MRI for investigation of fluid flow and global permeability in a material with interconnected porosity," *J Biomech*, vol. 40, no. 9, pp. 2112-8, 2007.
- [61] P. E. Riches, N. Dhillon, J. Lotz, A. W. Woods, et D. S. McNally, "The internal mechanics of the intervertebral disc under cyclic loading," *J Biomech*, vol. 35, no. 9, pp. 1263-71, 2002.
- [62] M. Argoubi et A. Shirazi-Adl, "Poroelectric creep response analysis of a lumbar motion segment in compression," *J Biomech*, vol. 29, no. 10, pp. 1331-9, 1996.
- [63] S. Roberts, J. Menage, et J. P. Urban, "Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 14, no. 2, pp. 166-74, 1989.
- [64] B. Reynaud et T. M. Quinn, "Anisotropic hydraulic permeability in compressed articular cartilage," *J Biomech*, vol. 39, no. 1, pp. 131-7, 2006.
- [65] T. M. Quinn, P. Dierickx, et A. J. Grodzinsky, "Glycosaminoglycan network geometry may contribute to anisotropic hydraulic permeability in cartilage under compression," *J Biomech*, vol. 34, no. 11, pp. 1483-90, 2001.
- [66] C. Wang, W. Witschey, A. Goldberg, M. Elliott, A. Borthakur, et R. Reddy, "Magnetization transfer ratio mapping of intervertebral disc degeneration," no. 1522-2594 (Electronic), 2010.

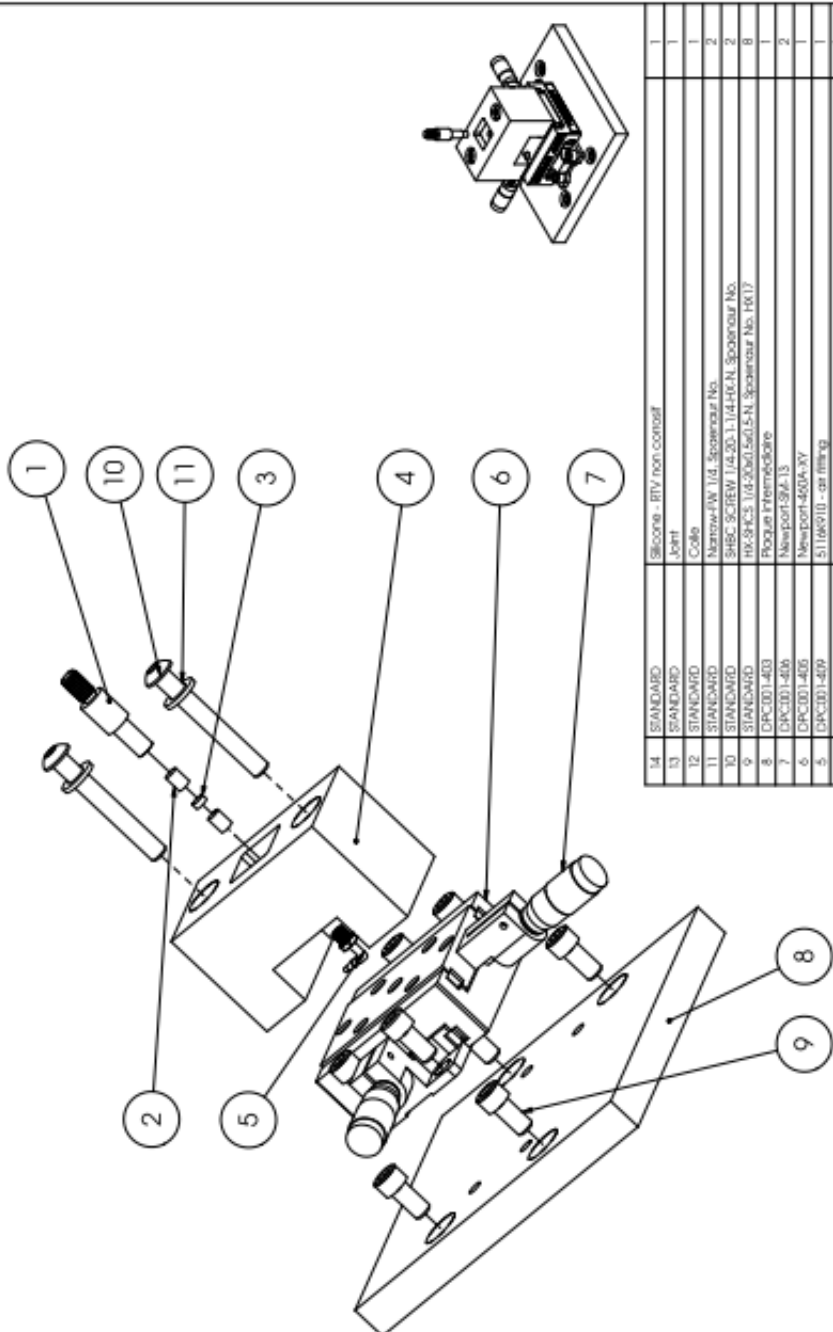
- [67] R. Toffanin, V. Mlynarik, S. Russo, P. Szomolanyi, A. Piras, et F. Vittur, "Proteoglycan depletion and magnetic resonance parameters of articular cartilage," *Arch Biochem Biophys*, vol. 390, no. 2, pp. 235-42, 2001.
- [68] A. J. Wheaton, G. R. Dodge, D. M. Elliott, S. B. Nicoll, et R. Reddy, "Quantification of Cartilage Biomechanical and Biochemical Properties via T1," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 54, pp. 1087–1093, 2005.
- [69] M. T. Nieminen, yr, J. s, M. S. Laasanen, J. Silvennoinen, H. J. Helminen, et J. S. Jurvelin, "Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging," *Journal of Biomechanics*, vol. 37, no. 3, pp. 321-328, 2004.
- [70] H. Paajanen, M. Komu, I. Lehto, M. Laato, et H. Haapasalo, "Magnetization transfer imaging of lumbar disc degeneration. Correlation of relaxation parameters with biochemistry," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 19, no. 24, pp. 2833-7, 1994.
- [71] L. Kerttula, M. Kurunlahti, J. Jauhiainen, A. Koivula, J. Oikarinen, et O. Tervonen, "Apparent diffusion coefficients and T2 relaxation time measurements to evaluate disc degeneration. A quantitative MR study of young patients with previous vertebral fracture," *Acta Radiol*, vol. 42, no. 6, pp. 585-91, 2001.
- [72] E. J. Chiu, D. C. Newitt, M. R. Segal, S. S. Hu, J. C. Lotz, et S. Majumdar, "Magnetic resonance imaging measurement of relaxation and water diffusion in the human lumbar intervertebral disc under compression in vitro," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 26, no. 19, pp. E437-44, 2001.
- [73] A. Watanabe, L. M. Benneker, C. Boesch, T. Watanabe, T. Obata, et S. E. Anderson, "Classification of intervertebral disk degeneration with axial T2 mapping," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 189, no. 4, pp. 936-42, 2007.
- [74] D. Burstein, J. Velyvis, K. T. Scott, K. W. Stock, Y. J. Kim, D. Jaramillo, R. D. Boutin, et M. L. Gray, "Protocol issues for delayed Gd(DTPA)(2-)-enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage," *Magn Reson Med*, vol. 45, no. 1, pp. 36-41, 2001.
- [75] W. Johannessen, J. D. Auerbach, A. J. Wheaton, A. Kurji, A. Borthakur, R. Reddy, et D. M. Elliott, "Assessment of human disc degeneration and proteoglycan content using

- T1rho-weighted magnetic resonance imaging," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 31, no. 11, pp. 1253-7, 2006.
- [76] D. Laurent, J. Wasvary, J. Yin, M. Rudin, T. C. Pellas, et E. O'Byrne, "Quantitative and qualitative assessment of articular cartilage in the goat knee with magnetization transfer imaging," *Magn Reson Imaging*, vol. 19, no. 10, pp. 1279-86, 2001.
 - [77] J. Antoniou, G. B. Pike, T. Steffen, H. Baramki, A. R. Poole, M. Aebi, et M. Alini, "Quantitative magnetic resonance imaging in the assessment of degenerative disc disease," *Magn Reson Med*, vol. 40, no. 6, pp. 900-7, 1998.
 - [78] M. L. Gray, D. Burstein, L. M. Lesperance, et L. Gehrke, "Magnetization transfer in cartilage and its constituent macromolecules," *Magn Reson Med*, vol. 34, no. 3, pp. 319-25, 1995.
 - [79] M. Kurunlahti, L. Kerttula, J. Jauhiainen, J. Karppinen, et O. Tervonen, "Correlation of diffusion in lumbar intervertebral disks with occlusion of lumbar arteries: a study in adult volunteers," *Radiology*, vol. 221, no. 3, pp. 779-86, 2001.
 - [80] W. Grunder, M. Wagner, et A. Werner, "MR-microscopic visualization of anisotropic internal cartilage structures using the magic angle technique," *Magn Reson Med*, vol. 39, no. 3, pp. 376-82, 1998.
 - [81] E. W. Hsu et L. A. Setton, "Diffusion tensor microscopy of the intervertebral disc anulus fibrosus," *Magn Reson Med*, vol. 41, no. 5, pp. 992-9, 1999.
 - [82] M. D. Jergas, S. Majumdar, J. H. Keyak, I. Y. Lee, D. C. Newitt, S. Grampp, H. B. Skinner, et H. K. Genant, "Relationships between young modulus of elasticity, ash density, and MRI derived effective transverse relaxation T2* in tibial specimens," *J Comput Assist Tomogr*, vol. 19, no. 3, pp. 472-9, 1995.
 - [83] J. E. Kurkijarvi, M. J. Nissi, I. Kiviranta, J. S. Jurvelin, et M. T. Nieminen, "Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) and T2 characteristics of human knee articular cartilage: topographical variation and relationships to mechanical properties," *Magn Reson Med*, vol. 52, no. 1, pp. 41-6, 2004.
 - [84] M. J. Nissi, J. Rieppo, J. Toyraas, M. S. Laasanen, I. Kiviranta, M. T. Nieminen, et J. S. Jurvelin, "Estimation of mechanical properties of articular cartilage with MRI -

- dGEMRIC, T2 and T1 imaging in different species with variable stages of maturation," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 15, no. 10, pp. 1141-8, 2007.
- [85] J. E. Berberat, M. J. Nissi, J. S. Jurvelin, et M. T. Nieminen, "Assessment of interstitial water content of articular cartilage with T1 relaxation," *Magn Reson Imaging*, vol. 27, no. 5, pp. 727-32, 2009.
 - [86] D. Périe, J. C. Iatridis, C. N. Demers, T. Goswami, G. Beaudoin, F. Mwale, et J. Antoniou, "Assessment of compressive modulus, hydraulic permeability and matrix content of trypsin-treated nucleus pulposus using quantitative MRI," *Journal of Biomechanics*, 2006.
 - [87] K. D. Allen et K. A. Athanasiou, "Viscoelastic characterization of the porcine temporomandibular joint disc under unconfined compression," *Journal of Biomechanics*, vol. 39, no. 2, pp. 312-322, 2006.
 - [88] M. E. Nimni, D. Cheung, et B. Strates, "Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 21, no. 6, pp. 741-771, 1987.
 - [89] R. W. Farndale, D. J. Buttle, et A. J. Barrett, "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue," *Biochim Biophys Acta*, vol. 883, no. 2, pp. 173-7, 1986.

ANNEXE 1 – Plan assemblage 202 : Vue éclaté du montage

Page 1



| | | | |
|-----|------------|--|----------|
| 14 | STANDARD | Silicone - RTV non corrosif | 1 |
| 13 | STANDARD | Joint | 1 |
| 12 | STANDARD | Cable | 1 |
| 11 | STANDARD | Marqueur N° 1/4, Spécifieur No. | 2 |
| 10 | STANDARD | SHRC SCREW 1/4-20, 1 1/4-20xL Spécifieur No. | 2 |
| 9 | STANDARD | HO-SHCS 1/4-20x1560-5-N, Spécifieur No. 1617 | 8 |
| 8 | GRCD01-403 | Plaque Intermediaire | 1 |
| 7 | GRCD01-406 | Newport 594-13 | 2 |
| 6 | GRCD01-405 | Newport 460A-XY | 1 |
| 5 | GRCD01-409 | 51169710 - car ring | 1 |
| 4 | GRCD01-401 | Charnière | 1 |
| 3 | GRCD01-410 | Ecranillon | 1 |
| 2 | GRCD01-404 | Fille pour | 2 |
| 1 | GRCD01-402 | Support fibre optique | 1 |
| No. | No. Dessin | Norm du composant | Quantité |

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

DELPHINE PERIE-CURNIER

NOTE

Changement de perméabilité

Matériau

DATE

ÉCHELLE

DESIGNATEUR

DATE

ÉCHELLE

CONTRACT

MOIS

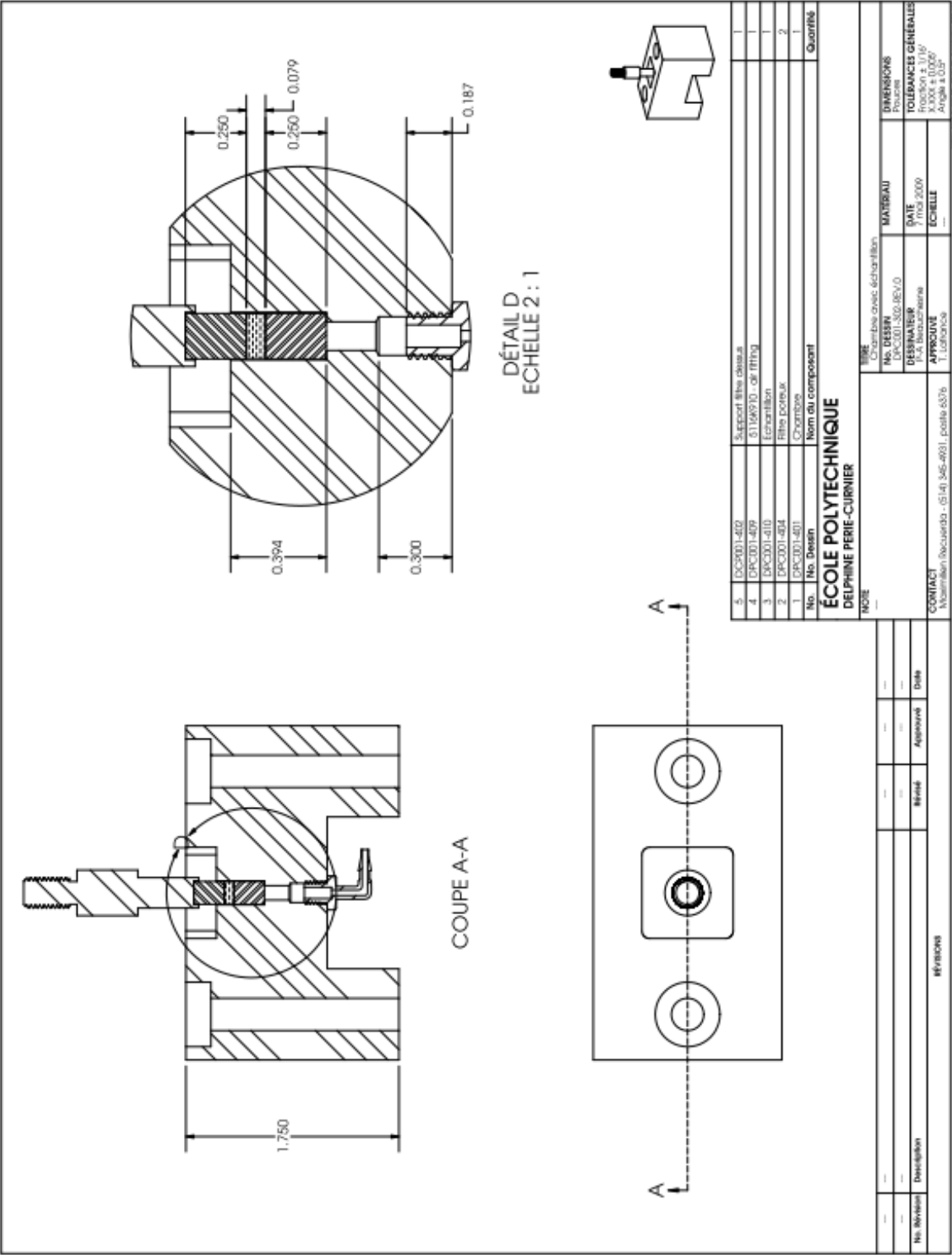
AN

ÉCHELLE

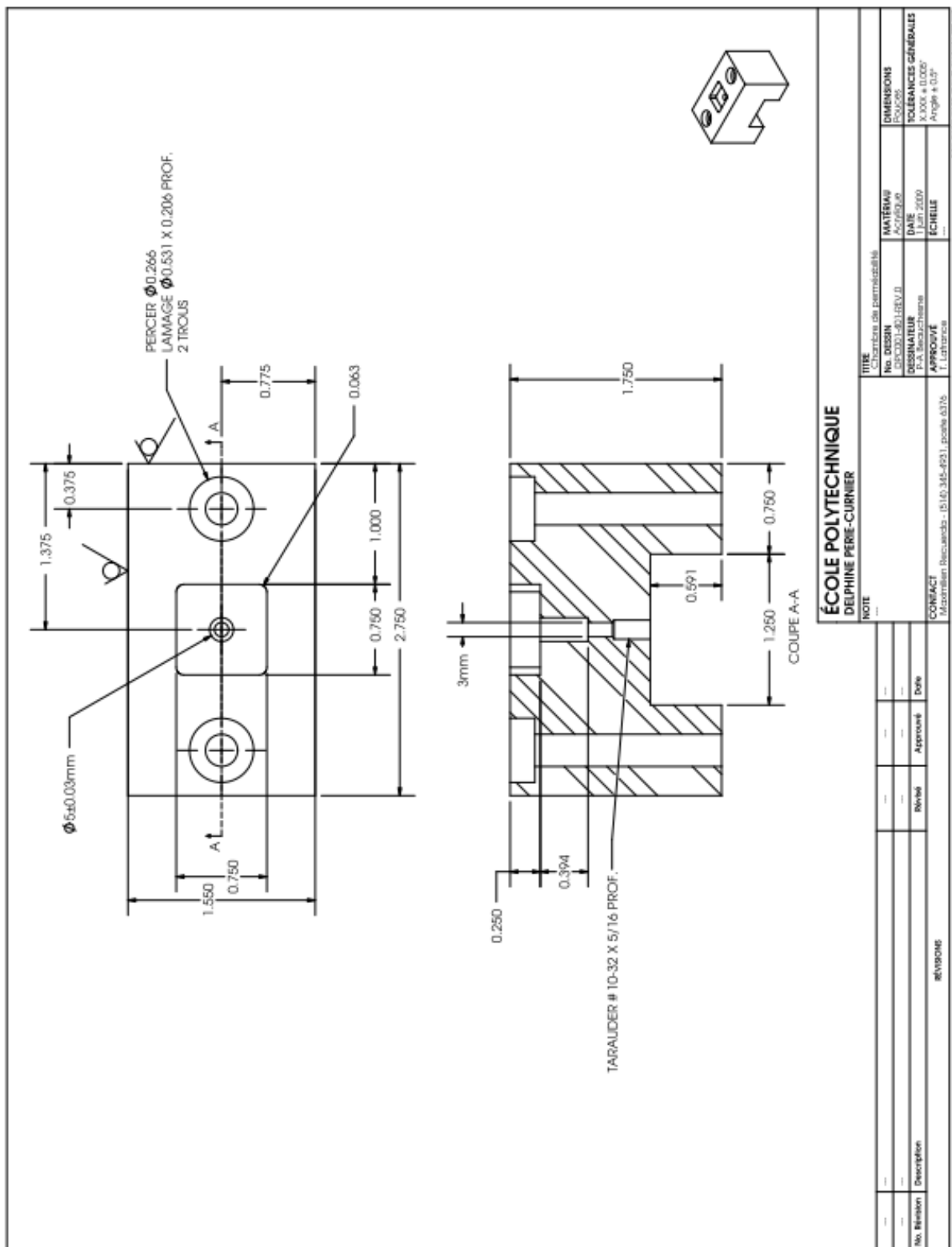
REVISIONS

REVISIONS

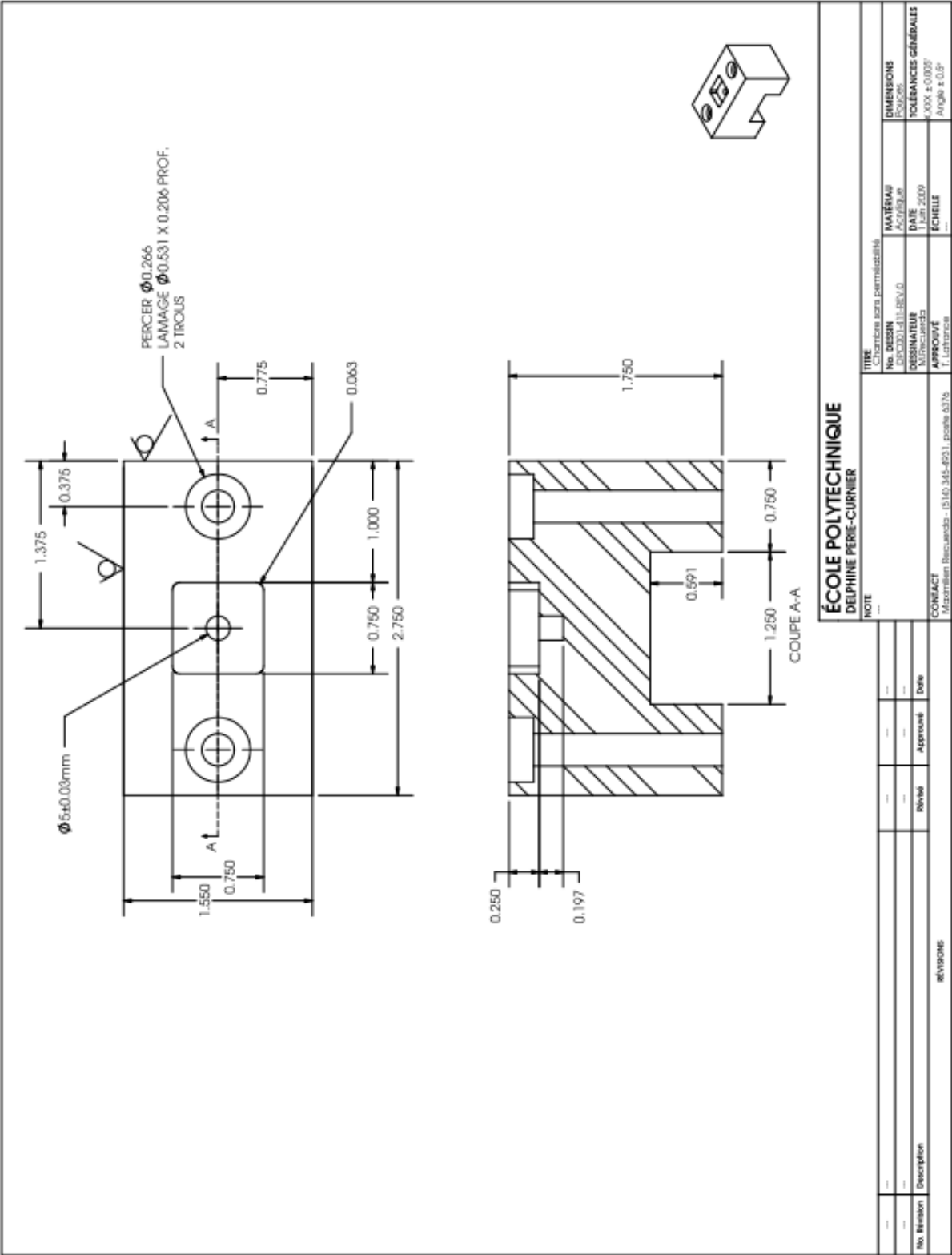
ANNEXE 3 – Plan sous assemblage 302 : Chambre perméabilité



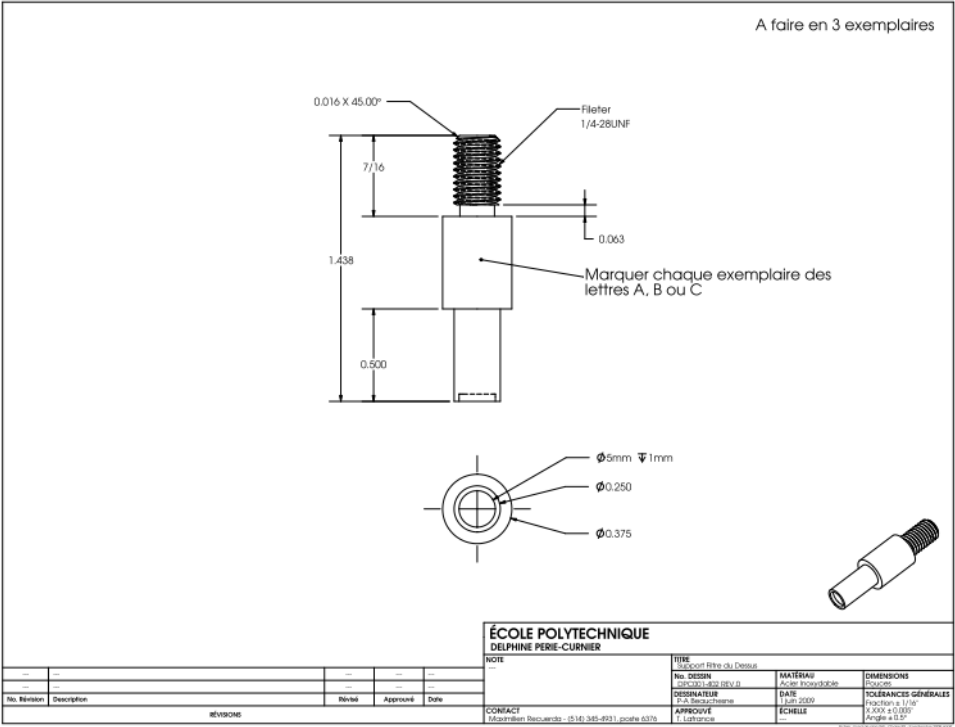
ANNEXE 4 – Mise en plan 401 : Chambre perméabilité



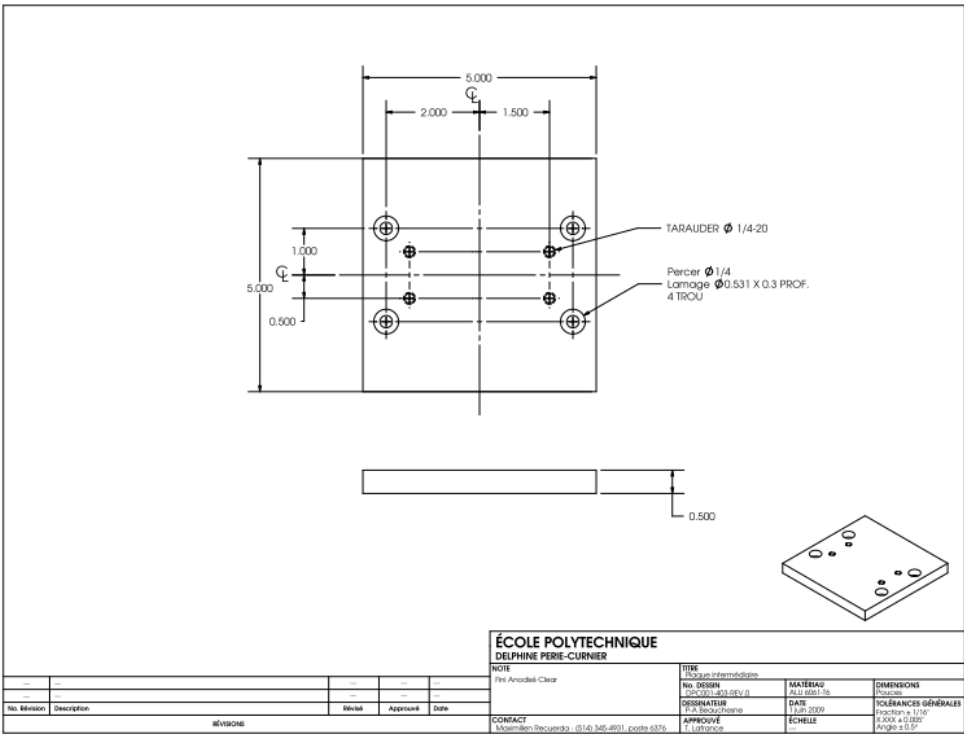
ANNEXE 5 – Mise en plan 411 : Chambre compression
confinée



ANNEXE 6 – Mise en plan 402 : Support filtre



ANNEXE 7 – Mise en plan 405 : Plaque support



ANNEXE 8 – Protocole expérimental 101 : expérience générale



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE MECANIQUE et
BIOCHIMIQUE

| | | | |
|--|---------------------------|---------------------------------|------------------|
| Protocole 101 : DPC-PROJET-00 | Date émission: 7 mai 2010 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 120 sur 172 |
| Révision # :00 | Révisé le: - | Modifié par : | |
| Titre : Dissection-Digestion-Acquisition IRM | | | |

1. OBJET:

Dissection des queues de bovins, digestions des disques digérés, acquisition IRM de ces disques, puis analyses biochimiques et mécaniques

2. APPEL

Ce protocole fait appel aux protocoles suivants :

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 2.1 Protocole 201 : DPC-DISS-00.docx | ⇒ Protocole de dissection |
| 2.2 Protocole 202 : DPC-DEGE-00.docx | ⇒ Protocole de dégénérescence |
| 2.3 Protocole 203 : DPC-DMMB-00.docx | ⇒ Protocole de test colorimétrique |
| 2.4 Protocole 204 :.docx | ⇒ Acquisition IRM |
| 2.5 Protocole 205 :.docx | ⇒ Protocole biochimique hydroxyproline |
| 2.6 Protocole 206 : DPC-TMNC-01.docx | ⇒ Protocole de test mécanique compression non confiné |
| 2.7 Protocole 207 :.docx | ⇒ Protocole de test mécanique de compression en confiné |

3. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

3.1 Matériel

Note : cf la section Matériel de chaque protocole

3.2 Produits

Note : Cf la section Produit de chaque protocole

3.3 Instruments

Note : Cf la section Instruments de chaque protocole

4. ÉTAPE 1 : Dissection

4.1 Disséquer les queues de bœufs

Note : Cf le protocole de dissection

5. ÉTAPE 2 : Dégénérescence

5.1 Faire plusieurs niveaux de dégénérescence

Note : Cf le protocole de dégénérescence

5.2 Ne pas congeler les disques, garder au frais (4deg)

6. ÉTAPE 2 : Acquisition IRM

6.1 Transporter les disques dans une glacière

6.2 Faire acquisition 24h au plus après la dissection

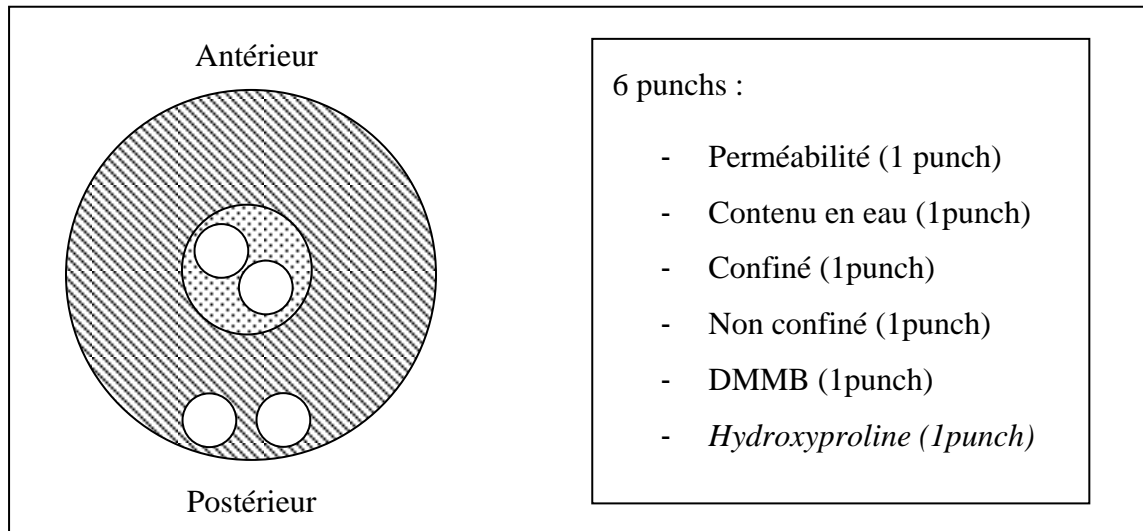
Note : Cf le protocole d'acquisition IRM

6.3 Congeler les échantillons à -80deg

7. ÉTAPE 2 : Punch

7.1 Puncher le nucleus et l'annulus

7.2 Stocker les punches dans des alicots



8. ÉTAPE 2 : Poids sec

8.1 Sécher les échantillons (AF et NP)

8.2 Peser les échantillons

8.3

9. ÉTAPE 2 : DMMB

9.1 Faire le test sur Annulus et le Nucleus

Note : Cf le protocole DMMB

10. ÉTAPE 2 : Hydroxyproline

10.1 Faire le test sur Annulus et le Nucleus

Note : Cf le protocole Hydroxyproline

11. ÉTAPE 2 : Compression non confinée

11.1 Faire le test sur Annulus et le Nucleus

Note : Cf le protocole Compression non confinée

12. ÉTAPE 2 : Compression confinée

12.1 Faire le test sur Annulus et le Nucleus

Note : Cf le protocole Compression confinée

13. ÉTAPE 2 : Perméabilité

13.1 Faire le test sur Annulus et le Nucleus

Note : Cf le protocole Perméabilité directe

ANNEXE 9 – Protocole expérimental 201 : Dissection



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE BIOCHIMIQUE

| | | | |
|--|---------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Protocole 201 : DPC- DISS-00 | Date émission: 7 mai 2010 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 124 sur 172 |
| Révision # :00 | Révisé le: - | Modifié par : | |
| Titre : Dissection de disques caudaux bovin | | | |

1. OBJET:

Dissection de disques intervertébraux de queues de bovin

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Scalpel #4
- 2.1.2 Lame 21
- 2.1.3 Planche de découpe
- 2.1.4 Pincés, ciseaux...
- 2.1.5 Couches à dissection
- 2.1.6 Film plastique
- 2.1.7 Ziploc
- 2.1.8 Vidanges
- 2.1.9 Gants, blouses...

2.2 Produits

- 2.2.1 Tissu de queues de bovin

2.3 Instruments

Aucun

3. ÉTAPE 1 : DÉCONGÉLATION DES QUEUES

3.1 Disséquer des queues fraîches ou faire décongeler au minimum 12h avant la dissection

4. ÉTAPE 2 : DISSECTION

4.1 Extraire les disques intervertébraux

4.2 Emballer le disque disséqué dans un film plastique

4.3 Marquer la face supérieure et la face postérieure avec une marque

4.4 Numéroter le disque

4.5 Noter la date du jour, âge de l'animal, sexe?

4.6 Emballer dans un ziploc, le disque, le numéro et informations supplémentaires

4.7 Congeler le disque à -80deg

5. ÉTAPE N : RANGEMENT ET NETTOYAGE

5.1 Jeter tous les déchets animaux dans des vidanges doublées et hermétiquement fermées

5.2 Nettoyer les ustensiles

ANNEXE 10 – Protocole expérimental 202 : Dégénérescence



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE BIOCHIMIQUE

| | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------|
| Protocole 203 : DPC-DEGE-00 | Date émission: 10 mai 2010 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 126 sur 172 |
| Révision # :00 | Révisé le: - | Modifié par : | |
| Titre : Dégénérescence du IVD | | | |

1. OBJET:

Dégénérer à 3 stades différents le disque intervertébral au complet

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Pots
- 2.1.2 Tubes pression anti-gonflement
- 2.1.3

2.2 Produits

- 2.2.1 HPBS à forte osmolarité
- 2.2.2 Trypsine

2.3 Instruments

- 2.3.1 Balance précision 1mg
- 2.3.2 Bain marie

3. ÉTAPE 1 : Préparation solutions

3.1 Solution trypsine à 0.05%

3.2 Solution trypsine à 0.1%

3.3 Solution trypsine à 0.5%

4. ÉTAPE 2 : Digestion

4.1 Mettre le disque en entier dans le pot

4.2 Ajouter la solution de trypsine ou la solution saline (témoin)

4.2.1 Groupe T : solution saline

4.2.2 Groupe 1 : Solution à 0.05% de trypsine

4.2.3 Groupe 2 : Solution à 0.1% de trypsine

4.2.4 Groupe 3 : Solution à 0.5% de trypsine

4.3 Placer le tube de pression

4.4 Ajuster la mousse pour appliquer une légère pression sur le disque

4.5 Fermer et étanchéifier avec de la paraffine

4.6 Placer les pots dans le bain marie avec agitations (120mvt/min)

4.6.1 Groupe 1 : 6h

4.6.2 Groupe 2 : 18h

4.6.3 Groupe 3 : 24h

5. ÉTAPE 3 : Arrêt de la digestion

5.1 Vider la solution

5.2 Ajouter du HPBS

5.3 Agiter légèrement

5.4 Laisser tremper pendant 3min

La solution saline rince l'échantillon et élimine l'enzyme

5.5 Répéter étapes 5.2 à 5.4, 3 fois

5.6 Congeler les disques à -80deg

La congélation stoppe le travail de l'enzyme

6. ÉTAPE 4 : RANGEMENT ET NETTOYAGE

6.1 Nettoyer pots et ustensiles

ANNEXE 11 – Protocole expérimental 203 : DMMB



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE BIOCHIMIQUE

| | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| Protocole 203 : DPC-DMMB-01 | Date émission: 2010 Mars 26 | Rédigé par: Charlotte Zaouter | Page 128 sur 172 |
| Révision # :00 | Révisé le: - | Modifié par : | |
| Titre : Protocole DMMB | | | |

1. OBJET:

Déterminer par un test de colorimétrie le contenu en GAG dans des IVD caudaux bovin

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Eppendorfs
- 2.1.2 Cuve 1.5ml

2.2 Produits

- 2.2.1 DMMB
- 2.2.2 Glycine
- 2.2.3 KCl
- 2.2.4 NaCl
- 2.2.5 Na₂HPO₄
- 2.2.6 KH₂PO₄
- 2.2.7 Na₂ EDTA, 2H₂O
- 2.2.8 Chondroïtine sulfate C
- 2.2.9 Trypsine
- 2.2.10 Protéïnase K

2.3 Instruments

- 2.3.1 Spectrophotomètre
- 2.3.2 Four 56° (overnight à réserver)

2.3.3 Four 90°

3. ÉTAPE 1 : PRÉPARATION DES SOLUTIONS

3.1 KH₂PO₄ pH 8.0 : (pour dilution PK)

Peser 6.8g de KH₂PO₄, ajouter 300ml H₂O. Mélanger. Ajuster le pH 8.0. Compléter à 500ml avec H₂O

3.2 Préparation solution de DMMB : 16 mg DMMB, 3.04g glycine, 2.37g NaCl

Dissoudre dans 1 L H₂O

Filtrer solution

Ajuster pH a 3 avec HCL 1M

Conserver dans bouteille brune durant 3 mois maximum a température ambiante

3.3 PK située au -20 °C du labo a Florina Moldovan (dans porte congélateur) aliquot de 250 µl a 10mg/ml

3.4 Préparation solution PBS (1Litre) numéro 2 (vérifier pH 7.4)

| | |
|--|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24g |
| KCl | 0.5591g |
| NaCl | 4.821g |
| Na ₂ EDTA,2H ₂ O | 35.5g |

3.5 Préparation de la chondroïtine sulfate C (10 mg/ml) (conserver a 4°C)

Préparer solution de chlorure de sodium a 0.9% (diluer dans H₂O) (90mg pour 10 ml)

Peser 10 mg de chondroïtine sulfate C et dissoudre dans 1 ml de chlorure de sodium 0.9% (solution mère)

3.6 Préparer solution stock de 1mg/ml (dilution 1/10 donc 100 µl de solution mère 10 mg/ml + 900 µl H₂O)

3.7 Préparation solution de digestion des disques :

0.01% trypsine : pour 100 ml peser 100 mg de trypsine et ajouter 100 ml de PBS préalablement préparé

0.1% trypsine : pour 100 ml peser 10 mg de trypsine et ajouter 100 ml de PBS préalablement préparé

3.8 Préparation PK a 50 µg/ml dans solution KH₂PO₄ pH 8.0 (pour digestion des punch) (selon volume désiré mais par exemple si besoin de 10 ml de PK a 50 µg/ml prélever 50 µl de PK a 10 mg/ml et ajouter 9950 µl de KH₂PO₄ pH 8.0)

4. ÉTAPE 2 : DOSAGE DES GAG

4.1 - Après avoir digéré les échantillons par la trypsine (contrôle, 0.1% et 0.01% pendant 6h, 12h, 24h)

4.2 - Digérer les punch (annulus et nucleus) a la protéinase K (50 µg/ml) in 100 mM K₂HPO₄ pH8 a 56 °C overnight

4.3 - Inactiver la PK pendant 10 minutes a 90°C

- 4.4 - Centrifuger 5 minutes a 10 000g
- 4.5 - Récupérer le surnageant dans nouveau eppendorf
- 4.6 - Conserver a -20 °C au congélateur

5. ÉTAPE 2 : PRÉPARATION DE LA GAMME ÉTALON (6 STANDARDS)

- 5.1 Prendre 50 µl de la solution stock de chondroïtine sulfate C (1 mg/ml) et ajouter 950 µl H₂O (2.5 µg de Chon)
- 5.2 Prendre 500 µl de a) et ajouter 500 µl H₂O (1.25 µg de Chon)
- 5.3 Prendre 500 µl de b) et ajouter 500 µl H₂O (0.625 µg de Chon)
- 5.4 Prendre 500 µl de c) et ajouter 500 µl H₂O (0.313 µg de Chon)
- 5.5 Prendre 500 µl de d) et ajouter 500 µl H₂O (0.156 µg de Chon)
- 5.6 Prendre 500 µl de e) et ajouter 500 µl H₂O (0.078 µg de Chon)
- 5.7 Prendre 50 µl de chaque standard et ajouter 950 µl de DMMB et lire au spectrophotomètre (530 nm) avant 1 minutes maximum
- 5.8 Pour le contrôle (cad le zéro) prendre 50 µl H₂O et ajouter 950 µl de DMMB
- 5.9 Faire duplicate des standards des contrôles et des échantillons
(pour [CS] a 2.5 µg DO (530 nm) comprise entre 0.16 et 0.19)

6. ÉTAPE 3 : RANGEMENT ET NETTOYAGE

- 6.1 Rangement

ANNEXE 12 – Protocole expérimental 204 : Acquisition IRM



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE IMAGERIE

| | | | |
|--|-----------------------------|---------------------------------|----------------|
| Protocole 204 : DPC-IRM-00 | Date émission: 2009 juin 01 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 131 sur 3 |
| Révision # :00 | Révisé le: | Modifié par : | |
| Titre : protocole d'acquisition IRM | | | |

1. OBJET:

Définir les configurations d'acquisition en IRM quantitatif pour obtenir des images en T1, T2, T2*, MTR et diffusion

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Une cuve IRM compatible (cuve avec 4 chambres faite par prototypage rapide)
- 2.1.2 Essuie-tout de type Kimwipes
- 2.1.3 Pincettes
- 2.1.4 Des poids légers pour maintenir les disques

2.2 Produits

- 2.2.1 HBSS, 50 mL

2.3 Instruments

- 2.3.1 IRM 3T

3. ÉTAPE 1 : Disposition des disques

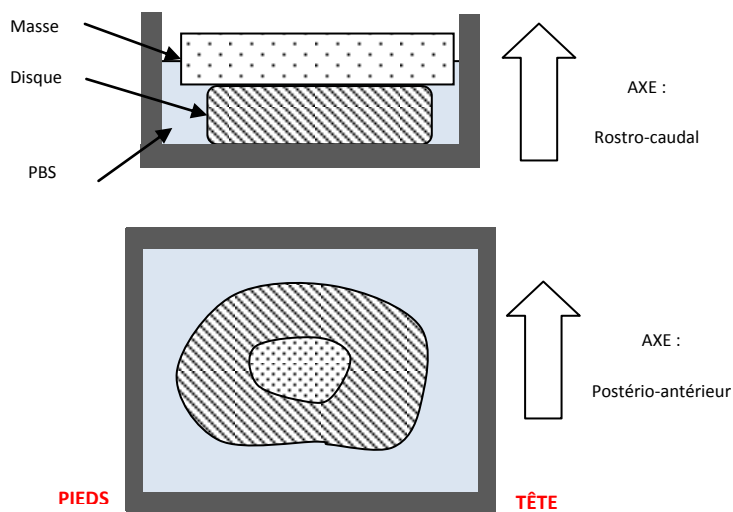
3.1 Faire l'acquisition sur des disques frais, le plus rapidement possible après leur dissection.

3.2 Positionner chaque disque dans une cuve

3.3 Placer tous les disques dans la même direction

Note : Orienter la face dorsale vers le haut (axe rostro-caudal) et garder la même direction postéro antérieure pour tous les disques pour pouvoir comparer facilement les images

3.4 Repérer la position spatiale de la cuve.



Note : Marquer la direction de la tête et des pieds de l'IRM

4. Séquences IRM

4.1 Temps de relaxation T1

Field of view :

| Dimension matrice | TR en ms | TE en ms | TI en ms | Nb de TI |
|-------------------|----------|----------|-----------|----------|
| 128x128 | 2100 | 8 | 50 à 1900 | 15 |

4.2 Temps de relaxation T2

Field of view :

| Dimension matrice | TR en ms | TE en ms | Nb de TE |
|-------------------|----------|----------|----------|
| 432x432 | 2000 | 15 à 90 | 6 |

4.3 Temps T2*

Field of view :

| Dimension matrice | TR en ms | TE en ms | Nb de TE |
|-------------------|----------|----------|----------|
| 192x192 | 60.6 | 5.7 | 11 |

4.4 Transfert d'aimantation

Field of view :

| Dimension matrice | TR en ms | TE en ms |
|-------------------|----------|----------|
| 224x224 | 82 | 3.6 |

4.5 Diffusion

Field of view :

| Dimension matrice | TR en ms | TE en ms | TD en ms | B value | NB de gradient |
|-------------------|----------|----------|----------|---------|----------------|
| 224x224 | 2000 | | | 1000 | 17 |

5. Rangement

5.1 Sortir le montage de l'IRM

5.2 Sécher délicatement les disques en les épongeant avec des Kimwipes

5.3 Les re-envelopper dans un film plastique et les congeler en conservant leur numérotation

ANNEXE 13 – Protocole expérimental 205 : Hydroxyproline

University of Vermont

Orig. Date: 11.11.01

Standard Operating Procedure(SOP)

Filename: OHassay

Author: Mills, J

1)Reagents:

1. Chloramine T (Sigma, cat.no. C-9887)
2. p-Dimethylaminobenzaldehyde (Sigma, cat.no. D-8904)
3. trans-4-Hydroxy-L-Proline (Sigma, cat.no. H-6002)
4. Citric acid (anhyd. Sigma, cat.no. C-0759)
5. Alpha-Chymotrypsin (Sigma C-3142)
6. Iodoacetamide (Sigma I-6125)
7. Pepstatin (A) (Sigma P-4265)
8. EDTA (E M Science EX 0550-5)
9. Trizma Base (Sigma T-1503)
10. NaN₃ (Sigma S-2002)
11. Proteinase A (Sigma P-2308)
12. TPCK (Sigma T-4376)
13. CH₃CO₂H (EM Science CAS 64-19-7)
14. Sodium Acetate (anhyd. EM Science SX0265-1)
15. HCl₄ (EM Science CAS 7601-90-3)
16. 2-Methoxyethanol (BDH B29198)
17. n-propanol (Fisher A 414-1)

2) Materials

- Alpha-Chymotrypsin: 50mg alpha-chymotrypsin, 0.25ml EDTA 200mM, 0.25ml Pepstatin(A) 2mg/ml, 0.25ml Iodoacetamide 200mM, 49.25ml Tris-Cl buffer 50mM w/0.5g/L NaN₃; final conc. 50ml

- Proteinase K: 50gm Proteinase K, 0.25ml EDTA 200mM, 0.25ml Pepstatin(A) 2mg/ml, 0.25ml Iodoacetamide 200mM, 49.25ml Tris-Cl buffer 50mM w/0.5g/L NaN₃; final conc. 50ml
- Citrate buffer: 25g citric acid, 35.8g sodium acetate(anhydr.), 17g NaOH and 6ml CH₃CO₂H(glacial) in 500ml distilled water, pH6.0
- Chloramin T solution: mix the following reagents in the order as written, 0.177g chloramine T, 10ml distilled water, 15ml 2-methoxy, 25ml citrate buffer
- DABA solution: mix the following reagents in the order as written, 2.5g DABA, 12.5ml HClO₄, 25ml n-propanol
- TPCK: 2mg/ml in 100% EtOH
- Std. stock soln OH-Prol in water(1mg/ml), store at -20C

3)SAMPLE PREPARATION:

- To sample add 200ul alpha-chymo, incubate for 24hrs. at 37C
- Add 2ul TPCK, vortex to mix, incubate for half hr. at 37C
- Centrifuge for 10mins. at room temp. and remove supernate to labeled tubes
- To residue left in tubes add 200ul proteinase K, incubate for 24hrs. at 56C
- Either boil for 10mins at 90C, to stop rxn or continue

4)METHOD:

- Take an aliquot from alpha-chymo extract and an aliquot from PK extract in separate tubes
- Add the same amount of 12N HCl to each tube and hydrolysis over night at 110C
- Lyophilize for 24hrs, use freeze-drier with NaOH/Acid trap
- Resuspend the tube content in no more than 1ml water, vortex
- Add active charcoal/resin mix 1:1 (just a pinch) and vortex for 10-15secs, centrifuge 10mins at highest speed, take clean supernate off
- Take an aliquot from the reconstituted alpha-chymo and add water to give 250ul
- Take an aliquot from the reconstituted proteinase K and add water to give 250ul
- **Make-up 6 STANDARD TEST TUBES**
- a) 40ul Stock Solution and add 1960ul water (- > 5ug collagen)
- b) Take 1ml from first tube, add 1ml of water (- > 2.5ug collagen)
- c) Take 1ml from tube 2, add 1ml of water (- > 1.25ug collagen)
- d) Same as above (- > 0.625ug collagen)
- e) Same as above (- > 0.313ug collagen)
- f) Same as above (- > 0.156ug collagen)
- Take 250ul of each standard and at the same time make-up control of 250ul water
- Make duplicates of standards, control and sample tubes
- Std. Curve: Set-up at 5.0ug to 0.156ug, OD for 5.0ug usually from 1.14 to 1.19
- To each tube, add 250ul NaCl (sat'd)
- To each tube, add 500ul Chloramin T and incubate for 4mins. at room temp

- To each tube, add 500ul DABA, incubate for 12mins. at 65C
- Let cool down to room temp.

5)MEASUREMENT:

- Measure absorbance with spectrophotometer at 560nm

6)SETTING-UP/PROGRAMING:

- For OH-Pro program:
- In Main Menu Screen:
 - a) Go To Standard Curve
 - b) Go to Prepare Standards
 - c) Press Test Types: OH-Pro, add stds. if needed, follow directions given
 - d) Go to Determination of Unknowns, follow directions given

ANNEXE 14 – Protocole expérimental 206 : Compression non confinée



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE MECANIQUE

| | | | |
|---|----------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Protocole 206 : DPC-TMNC-01 | Date émission: 2009 Mai 04 | Rédigé par: Simon pierre-Cote | Page 137 sur 5 |
| Révision # :01 | Révisé le: 10 mars 2010 | Modifié par : Maximilien Recuerda | |
| Titre : Protocole de chargement en compression non confinée de disques intervertébraux | | | |

6. OBJET:

Essai de relaxation de contraintes en compression non confinée d'un échantillon de disque intervertébral

7. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

7.1 Matériel

- 7.1.1 Pince non dentée à bout fin
- 7.1.2 Boîte de pétri de verre
- 7.1.3 Essuie-tout de type Kimwipes
- 7.1.4 *Biopsy punch* d'un diamètre de 4 mm
- 7.1.5 Feuille de paraffine
- 7.1.6 Trombone
- 7.1.7 Tige de chargement pour le MACH-1 Motion
- 7.1.8 Planche à découper
- 7.1.9 Maillet

7.2 Produits

2.1.1 HBSS, 50 mL

2.1.2 Éthanol à 70%

7.3 Instruments

2.3.1 Mach-1 Motion de Biosyntech

8. ÉTAPE 1 : OUVERTURE DU POSTE DE TRAVAIL

8.1 Ouvrir l'ordinateur, l'écran ainsi que le *Universal Motion Controller/Driver* à l'aide du bouton POWER.

8.2 Entrer le mot de passe : LaboMecano

8.3 Démarrer le logiciel Mach-1 Motion : *Start Menu > Programs > Biosyntech > Mach-1 Motion*

8.4 À partir de la barre de menu du logiciel, ouvrir la fenêtre d'affichage en temps réel, *Window > Real time display*, et la fenêtre de contrôle de l'actuateur, *Window > Actuators control window*

9. ÉTAPE 2 : CALIBRATION DU MACH-1 MOTION

9.1 Ouvrir la fenêtre de la cellule de charge, *Settings > Load cell*, et appuyer sur le bouton CALIBRATE.

9.2 Suivre les instructions affichées à l'écran

9.3 Une fois la calibration terminée, accepter le nouveau facteur de calibration

Note : La calibration n'est nécessaire qu'une seule fois par journée de tes, et est à refaire à chaque fois que le Mach crashe.

9.4 Visser sans trop serrer la tige de chargement sur le MACH-1 Motion

9.5 Déposer le pétri sur le plateau de chargement du MACH-1 Motion

9.6 En utilisant les commandes du *Actuator control window*, descendre le plateau de chargement jusqu'à toucher légèrement le fond du pétri.

Note : Faire un Zero Load lorsque l'actuateur est proche du pétri, puis descendre progressivement la tige avec des step de 50um (ou 25um) jusqu'à observer une force supérieure à 25g dans la fenêtre Real Time Display

Pour déplacer la tige, ne pas utiliser les flèches de l'actuator control window, au lieu, d'utiliser les fonctions Move of et Move to.

9.7 Effectuer un Zero Position dans l'onglet Settings

10. ÉTAPE 3 : PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 10.1 Plier la feuille de paraffine pour obtenir une épaisseur d'au moins 1 mm.
- 10.2 Découper un cercle dans la feuille de paraffine à l'aide du *biopsy punch* afin d'obtenir une couche protectrice pour le disque.
- 10.3 Sortir le disque à tester du congélateur et extraire un cylindre à l'aide du *punch*. Pour faciliter la manipulation, placer le disque sur la feuille de paraffine et presser le *punch* jusqu'à traverser la paraffine au complet.
- 10.4 À l'aide du trombone, pousser sur le disque pour extraire l'échantillon de l'outil.

Note : obtenir des échantillons de la hauteur voulue avec des surfaces parallèles : pousser l'échantillon sur moins d'un mm, puis couper l'échantillon à l'aide d'un scalpel au raz du punch, pousser de nouveau l'échantillon sur 2 mm (taille finale de l'échantillon) puis refaire une coupe au scalpel. Il est conseillé de faire les coupes lorsque l'échantillon et le scalpel sont gelés.

- 10.5 Retirer les couches de paraffine du cylindre en faisant attention de ne pas rayer l'échantillon. Placer le cylindre dans un pétri préalablement rempli de HBSS
- 10.6 Noter le temps
- 10.7 Rapidement remettre le disque inutilisé au congélateur

11. ÉTAPE 4 -1: CHARGEMENT POUR L'ANNULUS FIBROSUS

11.1 POSITIONNEMENT DE L'ÉCHANTILLON

- 11.1.1 Après 10 minutes de trempage, placer le pétri sur le plateau de chargement du *MACH-1 Motion* en plaçant l'échantillon sous la tige de chargement.
- 11.1.2 Descendre la tige de chargement jusqu'à ce que la lumière ne passe plus entre l'échantillon et le plateau de chargement. Pour aider, placer une source lumineuse derrière l'échantillon pour créer un fort contre-jour.

Note : Faire un Zero Load lorsque la tige est tout proche de l'échantillon, puis descendre la tige de 50 ou 25um jusqu'à observer une force de 0.8 à 1g dans la fenêtre Real Time Display

- 11.1.3 La position actuelle de l'actuateur correspond alors à la hauteur initiale de l'échantillon. Effectuer un Zero Load dans l'onglet Settings.

11.1.4 Calculer 5% de cette hauteur.

11.2 ÉTAPE 5 : CHARGEMENT DE L'ÉCHANTILLON

11.2.1 Paramétrage du test : Appuyer sur le bouton « + » au milieu de la fenêtre principale

11.2.2 Choisissez dans l'ordre les fonctions suivantes : « Wait », « Zero load » et « Stress Relaxation » puis valider

11.2.3 Double cliquer sur la fonction voulue pour la paramétrer. Pour le « Wait » choisir 10min, pour le stress relaxation entrer les paramètres suivants :

- Amplitude de la rampe : 5% de la hauteur initiale de l'échantillon (en μm)
- Vitesse de déplacement : 5 $\mu\text{m/s}$
- Nombre de rampes : 6
- Période d'échantillonnage : 100 ms
- Critère d'arrêt : Relaxation Rate
- Taux de relaxation : 0,1 g/min

11.2.4 Avant de lancer le test, sous l'onglet *Save*, entrer le nom du fichier de sauvegarde et l'emplacement désiré.

Note : Prendre garde que la sauvegarde est faite pour la fonction Stress Relaxation, le programme n'enregistre que la fonction souhaitée.

Note : Si désiré, la fonction *Sample* permet d'enregistrer une description de l'échantillon ainsi que de définir l'aire de l'échantillon utilisé par la suite par les calculs via le logiciel MACH-1 Analysis. (aire=12.56 pour un punch de 4mm)

11.2.5 Déplacer l'actuateur de 5% de l'épaisseur initiale de l'échantillon grâce aux commandes de l'*actuator command window*.

11.2.6 Lancer le test

12. ÉTAPE 4 -2: CHARGEMENT POUR LE NUCLEUS PULPOSUS

12.1 POSITIONNEMENT DE L'ÉCHANTILLON

12.1.1 Placer immédiatement le pétri sur le plateau de chargement du *MACH-1 Motion* en plaçant l'échantillon sous la tige de chargement.

12.1.2 Descendre la tige de chargement jusqu'à ce que la lumière ne passe plus entre l'échantillon et le plateau de chargement. Pour aider, placer une source lumineuse derrière l'échantillon pour créer un fort contre-jour.

Note : Faire un Zero Load lorsque la tige est tout proche de l'échantillon, puis descendre la tige de 50 ou 25µm jusqu'à observer une force de 0.6 à 0.8g dans la fenêtre Real Time Display

12.1.3 La position actuelle de l'actuateur correspond alors à la hauteur initiale de l'échantillon. Effectuer un *Zero Load* dans l'onglet *Settings*.

12.1.4 Calculer 5% de cette hauteur.

12.2 ÉTAPE 5 : CHARGEMENT DE L'ÉCHANTILLON

12.2.1 Paramétrage du test : Appuyer sur le bouton « + » au milieu de la fenêtre principale

12.2.2 Choisissez dans l'ordre les fonctions suivantes : « Wait », « Zero load » et « Stress Relaxation » puis valider

12.2.3 Double cliquer sur la fonction voulue pour la paramétrer. Pour le « Wait » choisir 10min, pour le stress relaxation entrer les paramètres suivants :

- Amplitude de la rampe : 5% de la hauteur initiale de l'échantillon (en µm)
- Vitesse de déplacement : 5 µm/s
- Nombre de rampes : 6
- Période d'échantillonnage : 100 ms
- Critère d'arrêt : Relaxation Rate
- Taux de relaxation : 0,1 g/min

12.2.4 Avant de lancer le test, sous l'onglet *Save*, entrer le nom du fichier de sauvegarde et l'emplacement désiré.

Note : Prendre garde que la sauvegarde est faite pour la fonction Stress Relaxation, le programme n'enregistre que la fonction souhaitée.

*Note : Si désiré, la fonction **Sample** permet d'enregistrer une description de l'échantillon ainsi que de définir l'aire de l'échantillon utilisé par la suite par les calculs via le logiciel MACH-1 Analysis. (aire=12.56 pour un punch de 4mm)*

12.2.5 Lancer le test

13. ÉTAPE 5 : RANGEMENT ET NETTOYAGE

13.1 Une fois le test terminé, relever la tige de chargement et disposer du disque selon les normes en vigueur.

13.2 Nettoyer et ranger le matériel selon les normes en vigueur.

Note : La solution de HBSS peut être réutilisée pour plusieurs tests si nécessaire.

Les lames et objets tranchants sont à jeter dans le bac prévu à cet effet.

Les échantillons et tissus sont à jeter dans les bacs jaunes dans un contenant fermé.

ANNEXE 15 – Protocole expérimental 207 : Compression confinée



Ecole polytechnique de Montréal
Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE MECANIQUE

| | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------------|----------------|
| Protocole 207 : DPC-TMC-01 | Date émission: 2009 juin 01 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 142 sur 4 |
| Révision # :00 | Révisé le: | Modifié par : | |
| Titre : Protocole de chargement en compression confinée de disques intervertébraux | | | |

1. OBJET:

Essai de relaxation de contraintes en compression confinée d'un échantillon de disque intervertébral

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Pince non dentée à bout fin
- 2.1.2 Essuie-tout de type Kimwipes
- 2.1.3 *Biopsy punch* d'un diamètre de 4 mm
- 2.1.4 Feuille de paraffine
- 2.1.5 Trombone
- 2.1.6 Tige de chargement pour le MACH-1 Motion
- 2.1.7 Planche à découper
- 2.1.8 Maillet

2.2 Produits

- 2.1.1 HBSS, 50 mL
- 2.1.2 Éthanol à 70%

2.3 Instruments

2.3.1 Mach-1 Motion de Biosyntech **ÉTAPE 1 : OUVERTURE DU POSTE DE TRAVAIL**

- 2.4 Démarrer l'ordinateur, l'écran ainsi que le *Universal Motion Controller/Driver* à l'aide du bouton POWER.
- 2.5 Entrer le mot de passe : LaboMecano
- 2.6 Démarrer le logiciel Mach-1 Motion : *Start Menu > Programs > Biosyntech > Mach-1 Motion*
- 2.7 À partir de la barre de menu du logiciel, ouvrir la fenêtre d'affichage en temps réel, *Window > Real time display*, et la fenêtre de contrôle de l'actuateur, *Window > Actuators control window*

3. ÉTAPE 2 : CALIBRATION DU MACH-1 MOTION

- 3.1 Ouvrir la fenêtre de la cellule de charge, *Settings > Load cell*, et appuyer sur le bouton CALIBRATE.
- 3.2 Suivre les instructions affichées à l'écran
- 3.3 Une fois la calibration terminée, accepter le nouveau facteur de calibration

Note : La calibration n'est nécessaire qu'une seule fois par journée de tes, et est à refaire à chaque fois que le Mach crashe.

- 3.4 Visser sans trop serrer la tige de chargement sur le MACH-1 Motion
- 3.5 Déposer le pétri sur le plateau de chargement du MACH-1 Motion
- 3.6 En utilisant les commandes du *Actuator control window*, descendre le plateau de chargement jusqu'à toucher légèrement le fond du pétri.

Note : Faire un Zero Load lorsque l'actuateur est proche du pétri, puis descendre progressivement la tige avec des step de 50um (ou 25um) jusqu'à observer une force supérieure à 25g dans la fenêtre Real Time Display

Pour déplacer la tige, ne pas utiliser les flèches de l'actuator control window, au lieu, d'utiliser les fonctions Move of et Move to.

- 3.7 Effectuer un *Zero Position* dans l'onglet *Settings*

4. ÉTAPE 3 : PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 4.1 Plier la feuille de paraffine pour obtenir une épaisseur d'au moins 1 mm.
- 4.2 Découper un cercle dans la feuille de paraffine à l'aide du *biopsy punch* afin d'obtenir une couche protectrice pour le disque.

4.3 Sortir le disque à tester du congélateur et extraire un cylindre à l'aide du *punch*. Pour faciliter la manipulation, placer le disque sur la feuille de paraffine et presser le *punch* jusqu'à traverser la paraffine au complet.

4.4 À l'aide du trombone, pousser sur le disque pour extraire l'échantillon de l'outil.

Note : obtenir des échantillons de la hauteur voulue avec des surfaces parallèles : pousser l'échantillon sur moins d'un mm, puis couper l'échantillon à l'aide d'un scalpel au raz du punch, pousser de nouveau l'échantillon sur 2 mm (taille finale de l'échantillon) puis refaire une coupe au scalpel. Il est conseillé de faire les coupes lorsque l'échantillon et le scalpel sont gelés.

4.5 Retirer les couches de paraffine du cylindre en faisant attention de ne pas rayer l'échantillon. Placer le cylindre dans un pétri préalablement rempli de HBSS

4.6 Noter le temps

4.7 Rapidement remettre le disque inutilisé au congélateur

5. ÉTAPE 4 -1: COMPRESSION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 POSITIONNEMENT DE L'ÉCHANTILLON

5.1.1 Remplir la chambre de PBS

5.1.2 Placer l'échantillon dans le puits de la chambre

5.1.3 Descendre avec précaution la tige de chargement jusqu'à atteindre une force de réaction de 1g.

Note : Faire un Zero Load lorsque la tige est tout proche de l'échantillon, puis descendre la tige de 50 ou 25µm jusqu'à observer une force de 0.8 à 1g dans la fenêtre Real Time Display

5.1.4 La position actuelle de l'actuateur correspond alors à la hauteur initiale de l'échantillon. Effectuer un *Zero Load* dans l'onglet *Settings*.

5.1.5 Calculer 5% de cette hauteur.

5.2 ÉTAPE 5 : CHARGEMENT DE L'ÉCHANTILLON

5.2.1 Paramétrage du test : Appuyer sur le bouton « + » au milieu de la fenêtre principale

5.2.2 Choisissez dans l'ordre les fonctions suivantes : « Wait », « Zero load » et « Stress Relaxation » puis valider

5.2.3 Double cliquer sur la fonction voulue pour la paramétrer. Pour le « Wait » choisir 40min, pour le stress relaxation entrer les paramètres suivants :

- Amplitude de la rampe : 5% de la hauteur initiale de l'échantillon (en µm ou mm)

- Vitesse de déplacement : 5 $\mu\text{m/s}$
- Nombre de rampes : 4
- Période d'échantillonnage : 100 ms
- Critère d'arrêt : Relaxation Rate
- Taux de relaxation : 0,1 g/min

5.2.4 Avant de lancer le test, sous l'onglet *Save*, entrer le nom du fichier de sauvegarde et l'emplacement désiré.

Note : Prendre garde que la sauvegarde est faite pour la fonction Stress Relaxation, le programme n'enregistre que la fonction souhaitée.

Note : Si désiré, la fonction *Sample* permet d'enregistrer une description de l'échantillon ainsi que de définir l'aire de l'échantillon utilisé par la suite par les calculs via le logiciel MACH-1 Analysis. (aire=12.56 pour un punch de 4mm)

Note : ATTENTION aux unités du logiciel : mm ou μm

5.2.5 Appliquer une force de 8 à 10g, attendre que la force se stabilise puis effectuer un « zero load »

5.2.6 Lancer le test

6. ÉTAPE 5 : RANGEMENT ET NETTOYAGE

6.1 Une fois le test terminé, relever la tige de chargement et disposer du disque selon les normes en vigueur.

6.2 Nettoyer et ranger le matériel selon les normes en vigueur.

Note : La solution de HBSS peut être réutilisée pour plusieurs tests si nécessaire.

Les lames et objets tranchants sont à jeter dans le bac prévu à cet effet.

Les échantillons et tissus sont à jeter dans les bacs jaunes dans un contenant fermé.

ANNEXE 16 – Protocole expérimental 208 : Mesure directe de la perméabilité



LABORATOIRE
BIOMECANIQUE

Dr Delphine Périé-Curnier

Ecole polytechnique de Montréal

Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine

PROTOCOLE MECANIQUE

| | | | |
|---|----------------------------|---------------------------------|--------------|
| Protocole 208 : DPC-PERM-00 | Date émission: 10 mai 2010 | Rédigé par: Maximilien Recuerda | Page 1 sur 6 |
| Révision # :00 | Révisé le: - | Modifié par : | |
| Titre : Protocole de mesure directe de perméabilité dans les IVD | | | |

1. OBJET:

Déterminer d'une manière directe la perméabilité du disque intervertébral; Il faut déterminer la valeur du débit injecté dans le tissu afin de conserver un différentiel de pression constant.

2. MATÉRIEL, PRODUITS ET INSTRUMENTS

2.1 Matériel

- 2.1.1 Pince non dentée à bout fin
- 2.1.2 Boîte de pétri de verre
- 2.1.3 Essuie-tout de type Kimwipes
- 2.1.4 *Biopsy punch* d'un diamètre de 5 mm
- 2.1.5 Feuille de paraffine
- 2.1.6 Pousse punch
- 2.1.7 Planche à découper
- 2.1.8 Maillet

- 2.1.9 Manomètre
- 2.1.10 Chambre de compression
- 2.1.11 Tubes et connectiques (1/16 ')
- 2.1.12 Seringue 60ml, et 25ul
- 2.1.13 Hamilton 250 ul (ou 500ul) et 10ul
- 2.1.14 Filtre 60u
- 2.1.15 Tige de chargement avec un filtre de 60u
- 2.2 Produits
 - 2.2.1 HBSS, 150 mL
 - 2.2.2 Éthanol à 70%
 - 2.2.3 Eau distillée
- 2.3 Instruments
 - 2.3.1 Mach-1 Motion de Biosyntech
 - 2.3.2 Pousse seringue xport
 - 2.3.3 Bain à ultrason

3. ÉTAPE 1 : MONTAGE DU CIRCUIT

- 3.1 Monter la chambre de compression, la stage micrométrique et la plaque de fixation sur le MACH-1
- 3.2 Connecter tous les éléments du système (sauf manomètre et seringue Hamilton).
- 3.3 Remplir le circuit avec la seringue 60ml (HBBS) jusqu'à disparition de bulles d'air.

Note : Incliner la seringue vers le haut pour assurer un bon remplissage sans air

- 3.4 Fermer la valve
- 3.5 Remplir le manomètre avec du HBSS

Note : Aspirer l'air emprisonné dans le manomètre par une série d'injection/aspiration jusqu'à qu'il ne reste quasiment plus d'air.

- 3.6 Connecter le manomètre au circuit

Note : Lors de la connexion faire couler du fluide, évite la présence de bulle d'air; fermer la valve lors de la connexion

- 3.7 Remplir la seringue Hamilton

3.8 Placer la seringue sur le pousse seringue

3.9 Connecter la seringue au circuit

Note : Lors de la connexion faire couler du fluide, évite la présence de bulle d'air

3.10 Si nécessaire : Ouvrir valve, chasser les bulles d'air restantes puis refermer la valve

4. ÉTAPE 2 : OUVERTURE DU POSTE DE TRAVAIL

4.1 Ouvrir l'ordinateur, l'écran ainsi que le *Universal Motion Controller/Driver* à l'aide du bouton POWER.

4.2 Entrer le mot de passe : LaboMecano

4.3 Démarrer le logiciel Mach-1 Motion : *Start Menu > Programs > Biosyntech > Mach-1 Motion*

4.4 À partir de la barre de menu du logiciel, ouvrir la fenêtre d'affichage en temps réel, *Window > Real time display*, et la fenêtre de contrôle de l'actuateur, *Window > Actuators control window*

5. ÉTAPE 3 : CALIBRATION DU MACH-1 MOTION

5.1 Ouvrir la fenêtre de la cellule de charge, *Settings > Load cell*, et appuyer sur le bouton CALIBRATE.

5.2 Suivre les instructions affichées à l'écran

5.3 Une fois la calibration terminée, accepter le nouveau facteur de calibration

Note : La calibration n'est nécessaire qu'une seule fois par journée de tes, et est à refaire à chaque fois que le Mach crashe.

5.4 Déposer le filtre de 60u dans le puis de la chambre de compression

5.5 Viser la tige de chargement avec le filtre de 60u

5.6 En utilisant les commandes du *Actuator control window*, descendre le plateau de chargement jusqu'à toucher légèrement le haut du puis.

5.7 Descendre progressivement la tige de compression, avec les vis micrométrique ajuster la position de la chambre pour réduire vers 0 la force verticale appliquée à la tige.

5.8 Quand l'actuator est proche du filtre poser dans la chambre, descendre par palier de 50 ou 25 um




Note : Faire un Zero Load lorsque l'actuateur est proche du pétri, puis descendre progressivement la tige avec des step de 50um (ou 25um) jusqu'à observer une force supérieure à 100g dans la fenêtre Real Time Display

Pour déplacer la tige, ne pas utiliser les flèches de l'actuator control window, au lieu, d'utiliser les fonctions Move of et Move to.

5.9 Effectuer un Zero Position dans l'onglet Settings

6. ÉTAPE 4 : CALIBRATION DU POUSSE SERINGUE

6.1 Dans le menu principal choisir : *Table >Select >Hamilton>Select>500ul>Select (ou capacité de la seringue choisie)*

6.2 Configurer un débit de 400ul :  >Volume>Select> Ajuster le volume avec les flèches  

7. ÉTAPE 5 : PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

7.1 Plier la feuille de paraffine pour obtenir une épaisseur d'au moins 1 mm.

7.2 Découper un cercle dans la feuille de paraffine à l'aide du *biopsy punch* afin d'obtenir une couche protectrice pour le disque.

7.3 Sortir le disque à tester du congélateur et extraire un cylindre à l'aide du *punch*. Pour faciliter la manipulation, placer le disque sur la feuille de paraffine et presser le *punch* jusqu'à traverser la paraffine au complet.

7.4 À l'aide de la tige, pousser sur le disque pour extraire l'échantillon de l'outil.

Note : obtenir des échantillons de la hauteur voulue avec des surfaces parallèles : pousser l'échantillon sur moins d'un mm, puis couper l'échantillon à l'aide d'un scalpel au raz du punch, pousser de nouveau l'échantillon sur 2 mm (taille finale de l'échantillon) puis refaire une coupe au scalpel. Il est conseillé de faire les coupes lorsque l'échantillon et le scalpel sont gelés. Envelopper dans du plastique les tranches de disques découpées non utilisées (utile pour d'autres manipulations)

7.5 Insérer l'échantillon dans le puis

7.6 Noter le temps

7.7 Rapidement remettre le disque inutilisé au congélateur

8. ÉTAPE 6 : MESURE DE LA PERMÉABILITÉ

8.1 Faire un *zeroload*

8.2 Avec l'actuator venir au contact de l'échantillon

Note : Le contact est établi avec une force de contact de 3g

8.3 Noter la hauteur de l'échantillon

8.4 Attendre 50min le gonflement de l'échantillon

Note : enregistrer la force de gonflement, cela permet de déterminer la pression hydrostatique, lorsque la force devient stable, l'échantillon a fini son gonflement (état d'équilibre)

8.5 Appliquer une déformation (5%, 10%, 15%...)

8.6 Attendre 10min la relaxation du tissu

8.7 Démarrer le pousse seringue avec une vitesse de 400ul

8.8 Ouvrir la valve

8.9 Augmenter manuellement la pression jusqu'à 30kPa avec la seringue 60ml

8.10 Fermer la valve

8.11 Attendre 5 à 6 min

Note : Attendre que la pression atteigne 40kPa

8.12 Commencer à enregistrer le test

8.13 Diminuer la vitesse du pousse seringue (20ul par exemple)

8.14 Attendre 15min,

Note : On choisi une vitesse arbitraire, et on attend que l'état se stabilise (la pression varie). Quand la force de réaction est stable (pente<0.001g/min), cela signifie que la combinaison pression/vitesse est correcte.

8.15 Si la force enregistrée n'est pas constante, ajuster manuellement la vitesse du pousse seringue

Note : Une fois la vitesse modifiée, il faut attendre 10min pour observer un effet sur la force de réaction enregistrée

8.16 Lorsque la force de réaction est stable (pente<0.001g/min), la combinaison pression/vitesse est noté

8.17 Ouvrir la valve (chute de pression)

8.18 Appliquer une nouvelle déformation

Note : Si l'échantillon a déjà subi 2 ou 3 niveaux de compression, il est préférable de changer d'échantillon, il faut donc refaire gonfler l'échantillon avant d'appliquer la déformation

8.19 Refaire les étapes 8.6 à 8.17

9. ÉTAPE 7 : RANGEMENT ET NETTOYAGE

9.1 Remonter l'actuateur

9.2 Sortir l'échantillon et le filtre

9.3 Placer le filtre et la tige de compression dans le bain à ultrasons pendant 3min

Note : Ne JAMAIS placer les seringues dans le bain à ultrasons

9.4 Déconnecter les seringues et le manomètre

9.5 Remplir les seringues 60ml et 25ml d'eau distillée

9.6 Remplir le circuit 2 ou 3 fois afin de vidanger le circuit du HBBS

Note : injecter de l'eau distillée dans la chambre de compression pour s'assurer le bon nettoyage de cette partie du circuit

9.7 Remplir le manomètre d'eau distillée

9.8 Vider le mieux possible le circuit de l'eau distillée

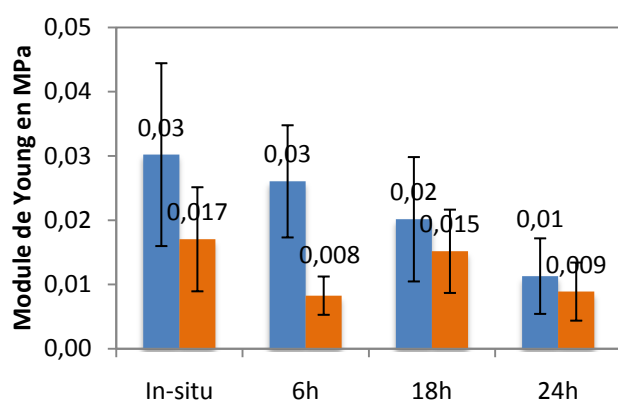
Note : Aspirer l'eau restante avec les seringues

9.9 Rincer et sécher les seringues et autre outils

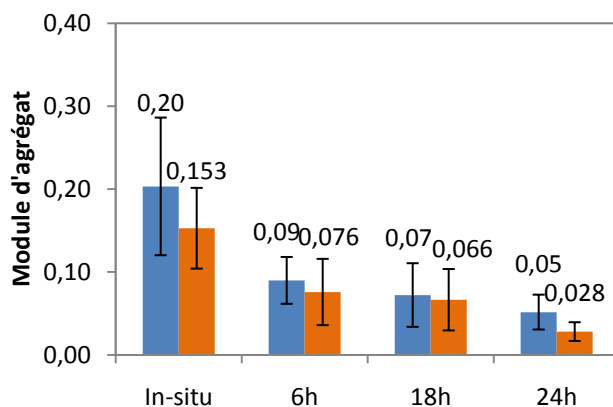
9.10 Nettoyer à alcool 70% la chambre de compression, le MACH-1 et les outils souillés par le HBBS ou le tissu

ANNEXE 17 – Résultats complémentaires à l'article n°2 avec l'ensemble des groupes : Propriétés mécaniques

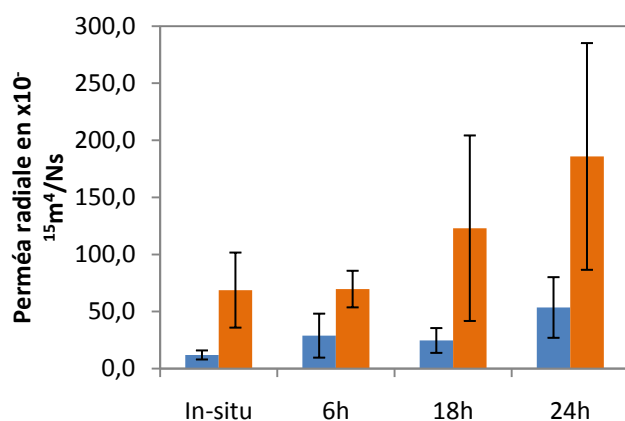
Annulus Fibrosus Nucleus pulposus



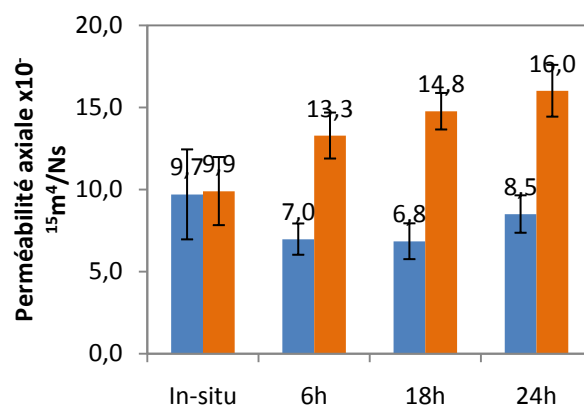
Annexe 17-1: Module de Young en MPa



Annexe 17-2: Module d'agrégat en MPa



Annexe 17-3: Perméabilité radiale en $\times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$



Annexe 17-4: Mesure directe de la perméabilité axiale $\times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$

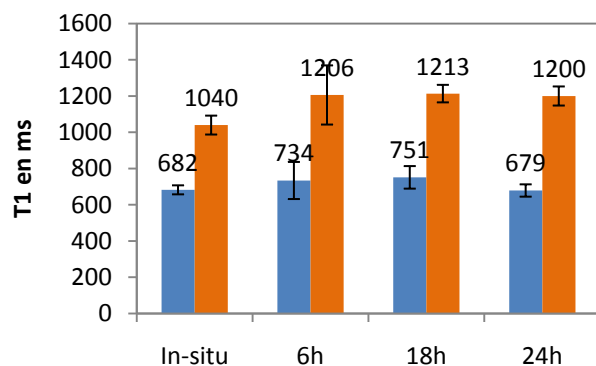
ANNEXE 18 – Résultats complémentaires à l'article n°2 avec l'ensemble des groupes : Paramètre IRM



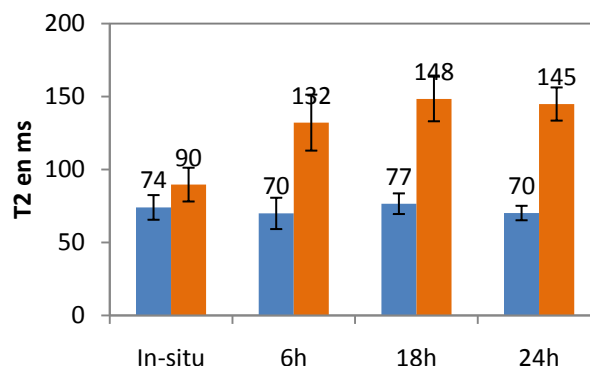
Annulus Fibrosus



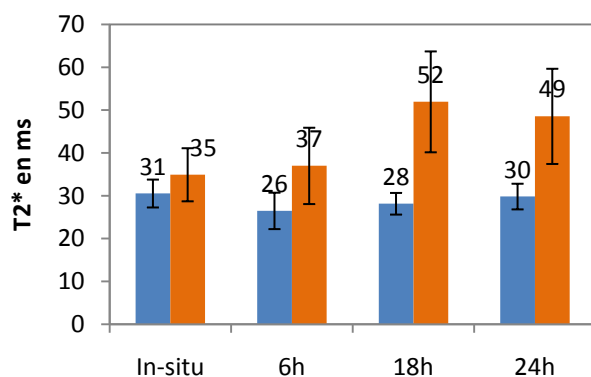
Nucleus pulposus



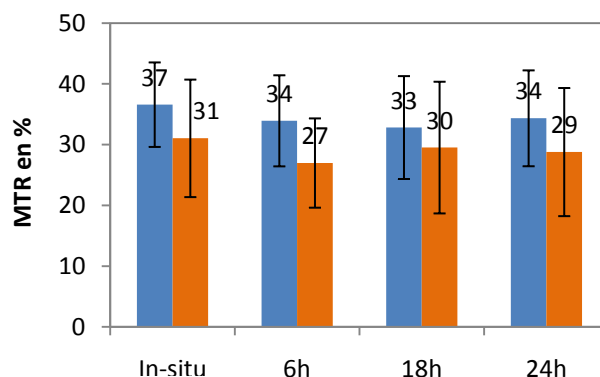
Annexe 18-5: Temps de relaxation T1



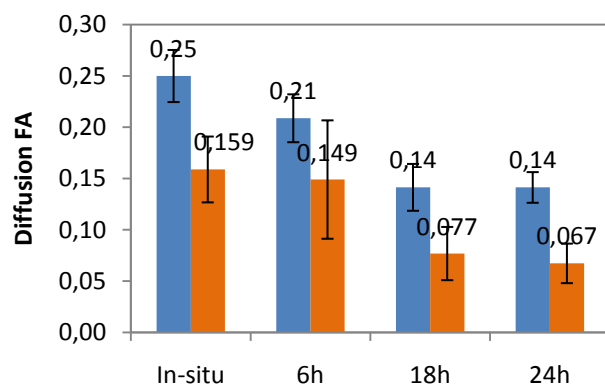
Annexe 18-6: Temps de relaxation T2



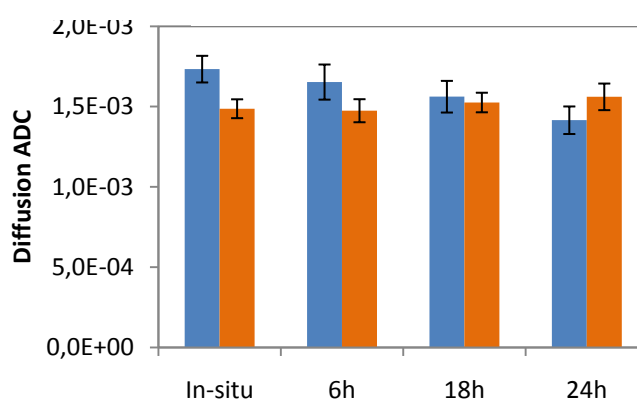
Annexe 18-7: Temps T2*



Annexe 18-8: Rapport MTR

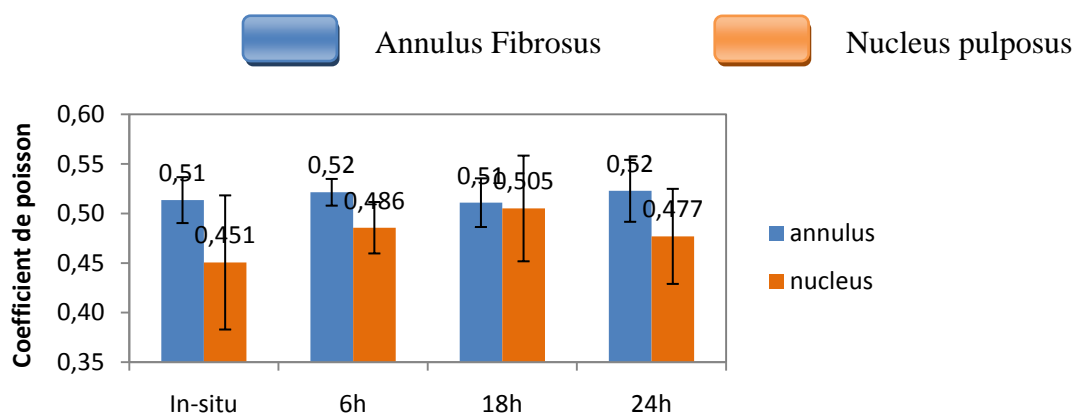


Annexe 18-9: Facteur d'anisotropie

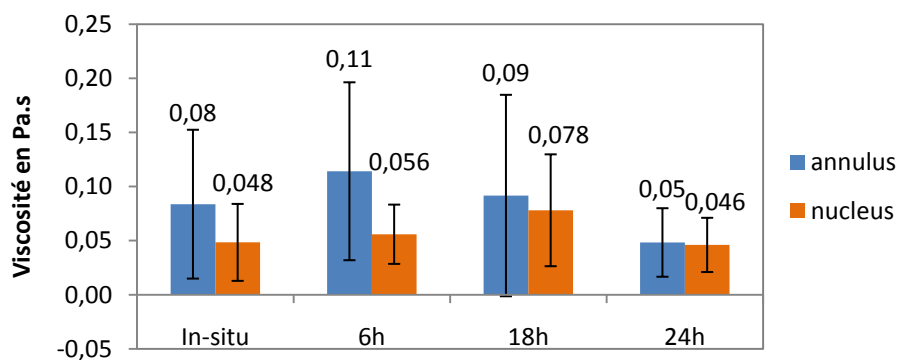


Annexe 18-10: ADC

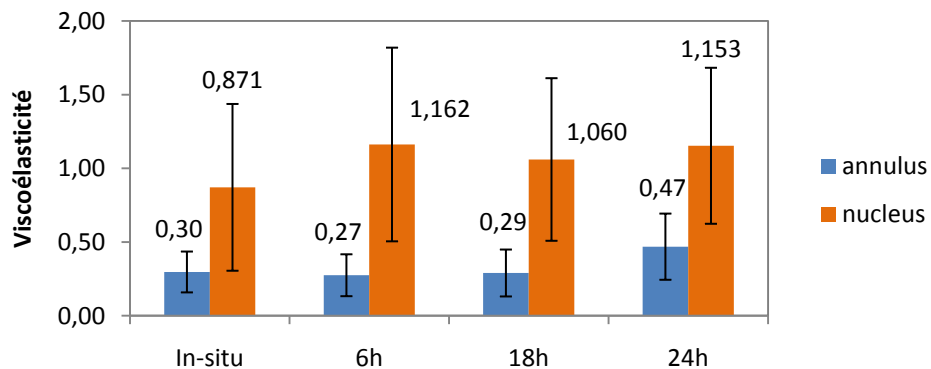
ANNEXE 19 – Autres paramètres mécaniques complémentaires



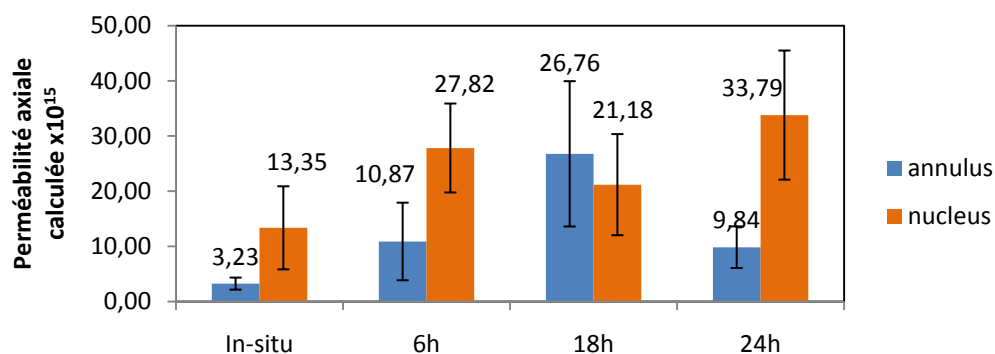
Annexe 19-7-1: Coefficient de poisson pour tous les groupes



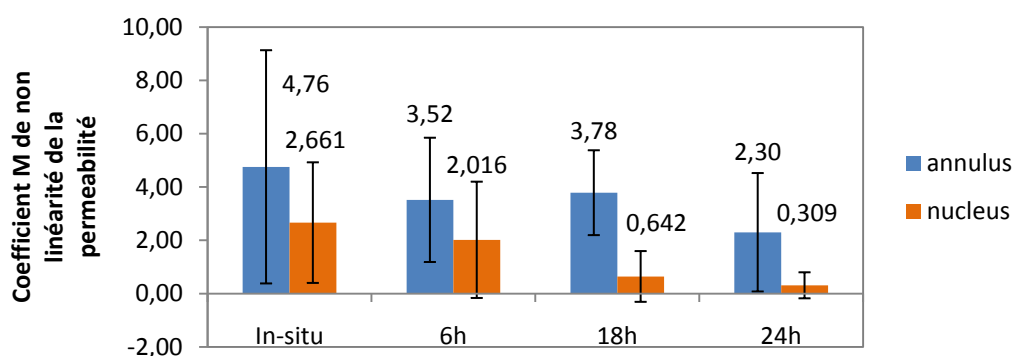
Annexe 19-7-2: Coefficient de viscosité pour l'ensemble des groupes



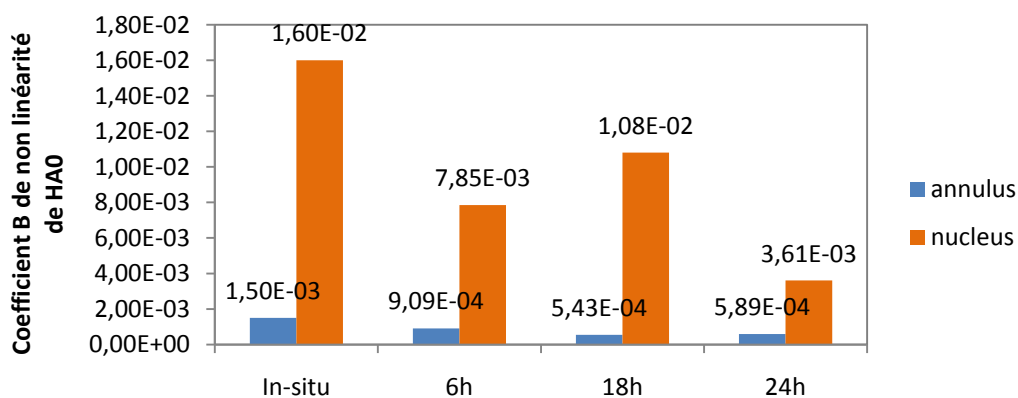
Annexe 19-7-3: Viscoélasticité pour tous les groupes



Annexe 19-7-4: Perméabilité axiale calculée par le modèle non linéaire $\times 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$



Annexe 19-7-5: Coefficient M de non linéarité de la perméabilité calculée par le modèle non linéaire biphasique



Annexe 19-7-6: Coefficient B de non linéarité du module d'agrégat