Chapitre 3

L'os : morphologie, structure et composition chimique

Aurélien Gourrier[1], Ina Reiche[2]
1- Université de Grenoble Alpes, CNRS, LIPHY, F-38000 Grenoble, France
2- Sorbonne Universités, Université Paris VI, LAMS UMR 8220 CNRS, Paris, France et Rathgen-Forschungslabor, Staatliche Museen zu Berlin - Preußischer Kulturbesitz, Berlin, Allemagne

3.1 Introduction

L'os en contexte archéologique n'est plus vivant, tout au plus reste-t-il des traces de son passé biologique. Néanmoins, l'ensemble des processus taphonomiques et diagénétiques est guidé par l'architecture de l'organe au moment de la mort de l'organisme. De sorte que, quel que soit le devenir de l'artefact prélevé, une bonne connaissance de l'objet ne peut être obtenue sans prendre en compte sa complexité architecturale et sa composition initiales. Cette tâche est d'autant plus complexe qu'il est parfois difficile de resituer l'artefact dans son contexte squelettique. Ce chapitre vise à donner quelques clés indispensables pour ce faire. L'accent sera mis, sur la description de la hiérarchie structurale, depuis l'échelle macroscopique, jusqu'à celle du matériau, composite et nanostructuré. Ce choix est dicté, d'une part par l'intérêt évident d'éviter des redondances avec la littérature existante, relativement centrée sur des aspects biologiques, histologiques ou morphométriques et, d'autre part, car c'est dans ce domaine qu'ont eu lieu les principales avancées dans la dernière décennie. L'augmentation récente du nombre d'études publiées sur la nanostructure osseuse, en particulier, et son impact sur les propriétés multi-échelles, laissent à penser que ce domaine aura un impact durable dans l'avenir.

3.2 Macro- et microstructure osseuse

L'os assure deux grandes classes de fonctions au cours de la vie de l'organisme : biomécanique, pour assurer le maintien et la protection des organes et biologique, pour maintenir l'homéostasie du calcium et assurer la production de cellules sanguines [1]. Plusieurs conséquences importantes découlent de cette diversité fonctionnelle : 1) les phénomènes mécaniques et physico-chimiques en jeux se situent sur

plusieurs échelles dimensionnelles : macroscopique pour la transmission des efforts mécaniques ; cellulaire pour la production de globules rouges ; moléculaire pour la gestion des flux physiologiques ; 2) les dynamiques temporelles de ces phénomènes peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur : de la seconde ou moins pour la contrainte mécanique, de quelques minutes ou heures pour le stockage de calcium et la production de cellules, semaines ou mois pour la réparation de fractures. Dès lors, il semble évident qu'une telle diversité fonctionnelle ne peut se faire qu'au travers d'une complexe adaptation du matériau et de sa géométrie. Dans le cas de l'os, les constituants de base sont relativement simples, au sens qu'ils sont en nombre restreint et très répandus dans la nature : majoritairement du collagène, une phase minérale sous forme de phosphate de calcium et de l'eau. L'optimisation des propriétés est, donc, principalement obtenue par l'élaboration d'une architecture complexe de l'organe de façon éminemment hiérarchique [2,3]. Le collagène s'assemble en fibrilles, qui s'organisent de façon plus ou moins denses pour former le tissu osseux, minéralisé, qui enferme un réseau cellulaire dense, les tissus nerveux et le réseau vasculaire formant ainsi une microstructure complexe définissant l'organe. De sorte que, s'il est parfois nécessaire de se focaliser sur une échelle donnée pour comprendre un phénomène d'intérêt, il est rarement possible de comprendre un changement sans en comprendre les impacts à chaque niveau de la hiérarchie structurale.

3.2.1 Diversité macroscopique

L'os est, avant tout, un organe qui peut être classé suivant des critères morphométriques en quatre catégories : les os longs tels que le tibia, le fémur, le radius ; les os courts, tels que les tarses ; les os plats, comme le crâne ou l'épaule et les os de formes plus complexes, typiquement les vertèbres [4]. Quelles que soient les modifications diagénétiques, si l'artefact observé a conservé sa forme globale initiale (os entier), il est généralement possible d'en identifier l'origine en se référant aux archives archéozoologiques / paléontologiques. L'examen visuel peut être accompagné d'une observation avec un matériel portable ou de laboratoire de microscopie avec un faible grossissement (loupe, zoom digital, binoculaire, microscope). Dans le cas ou l'artefact est inaccessible à l'observation directe (e.g. dans un conteneur fermé de type urne funéraire), d'autres moyens d'observation peuvent être mis en œuvre, tels que l'imagerie par ultrasons ou la tomographie des rayons X. Une image virtuelle bi- ou tridimentionelle peut ainsi être reconstruite par informatique, ce qui peut faciliter l'analyse morphométrique et la classification.

Critères d'analyses : morphométriques (forme, géométrie)

Outils analytiques : contrôle visuel et optique ; ultrasons ; tomographie X basse résolution.

3.2.2 Os cortical et trabéculaire : l'adaptation biomécanique

Le problème devient plus complexe si l'on considère un fragment osseux et qu'il n'est pas possible de le resituer par rapport à d'autres fragments pour retrouver la forme globale de l'os originel. D'autres informations doivent alors être prises en compte qui ont pour origine la formation (modelage) et le remodelage osseux.

Les différents types d'os peuvent être associés à des modes distincts de formation et de croissance [5]. Ainsi, les os longs croissent à partir d'un précurseur cartilagineux progressivement résorbé et remplacé par la matrice osseuse, tandis que les os plats croissent entre deux membranes qui agissent comme surfaces de nucléation. Le point commun est que la formation procède de façon directionnelle, suivant des axes ou perpendiculairement à des plans (voire des surfaces courbes) bien définis, définissant ainsi la géométrie de l'organe. Par ailleurs, la nécessité pour l'os d'assurer plusieurs fonctions biologiques nécessite de compartimenter au moins partiellement les différents constituants (moelle, réseau vasculaire, cellulaire). Ceci résulte dans la formation d'une enveloppe externe dense, dit os cortical, et d'une partie interne d'os poreux, spongieux, dit os trabéculaire (Figure 1). L'os spongieux permet de renforcer les parties les plus soumises aux efforts mécaniques et s'organise suivant des directions privilégiées, assurant ainsi une légèreté à l'organe, tout en offrant un volume non négligeable pour héberger la moelle. Dans certains os, comme les vertèbres, l'intégralité du volume intérieur formé par l'enveloppe corticale est constitué d'os trabéculaire, tandis que dans d'autres, comme la plupart des os longs, seules les extrémités (épiphyses) en sont pourvues, la partie centrale (diaphyse) étant presque intégralement libre pour l'occupation par la moelle.

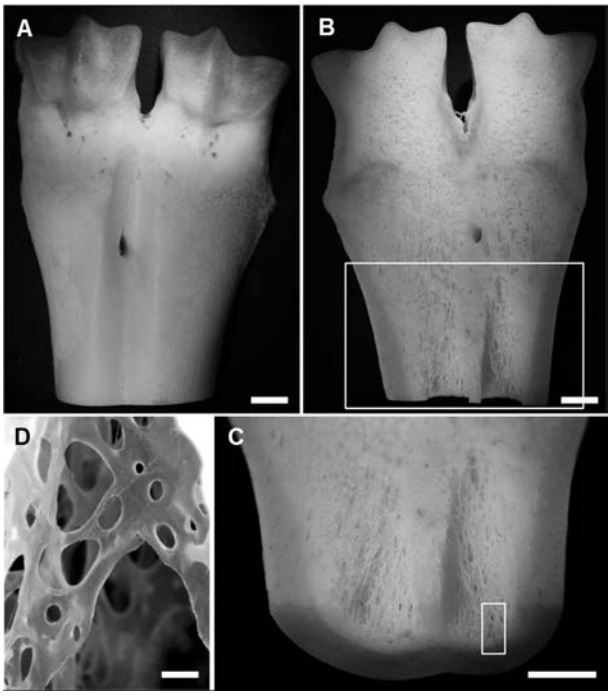


Figure 1 – Épiphyse de métatarse bovine dégraissée et déshydratée vue en surface (A) et en coupe longitudinale (B) (barre d'échelle 1 cm). L'agrandissement en C de la partie indiquée par un rectangle dans B permet de distinguer l'enveloppe corticale externe, dense, de l'os trabéculaire interne, très poreux (barre d'échelle 1 mm). Une observation à la loupe binoculaire (D) de la partie trabéculaire délimitée par le rectangle en C révèle la structure spongieuse de l'os avec une épaisseur de travées irrégulière (barre d'échelle 100 μm). © A. Gourrier (LIPHY).

L'épaisseur de l'enveloppe corticale varie selon le type d'os, le site anatomique, et l'espèce considérée, comme indiqué dans le Tableau 1. Les variations constatées pour l'épaisseur des travées trabéculaires sont moindres. Nombre d'études ont été réalisées sur la base d'une caractérisation du réseau trabéculaire, notamment dans le domaine biomédical, qui ont permis de définir des indices pouvant servir de marqueurs structuraux permettant d'identifier un stade de croissance ou de mettre en évidence une variation pathologique. Ces aspects restent relativement peu étudiés dans le domaine archéologique alors que la présence ou l'absence d'os trabéculaire, l'épaisseur de la corticale et/ou des travées, l'analyse des directions privilégiées des trabécules sont autant d'indicateur permettant d'identifier la nature d'un fragment osseux si celui-ci est suffisamment gros (typiquement de l'ordre de quelques cm^3 pour de l'os humain, > 10 cm^3 pour les grands mammifères, quelques mm^3 pour des petits mammifères ou oiseaux). Ces mesures sont typiquement effectuées par microscopie optique (bionoculaire, microscope faible grossissement 5x) ou par microscopie électronique (à balayage, grossissement 1000-10000x) sur des sections histologiques (2D) ou sur des surfaces de fracture. Une information plus précise peut être obtenue par microtomographie X qui présente l'avantage d'une visualisation 3D et permet donc une quantification plus précise. Par ailleurs, la plupart des appareils de microtomographie X de laboratoire sont parfaitement adaptés à la mesure d'échantillons de volumes 10 cm^3 > V > 1 mm^3.

Tableau 1 – Valeurs indicatives de paramètres caractéristiques de la microstructure osseuse dans la diaphyse fémorale de plusieurs espèces d'après [6,7] (estimation moyenne de sujets adultes sains).

Espèce	Épaisseur corticale de la diaphyse fémorale (mm)	Épaisseur des travées trabéculaires (μm)	Densité de lacunes ostéocytaires ($x10^3.mm^{-3}$)
Homme	10	140	30
Singe	10	150	40
Cochon	10	150	43
Chien	12	100	33
Vache	15	190	30
Lapin	9	160	60
Rat	0.4	80	90
Souris	0.2	80	80

Critères d'analyses : présence/absence d'os trabéculaire ; épaisseur de l'os cortical ; dimensions & géométrie des travées des trabécules

Outils analytiques : instrument de mesure type pied à coulisse ; microscopie optique ; microscopie électronique à balayage ; microtomographie X.

3.2.3 Les réseaux de porosités : au cœur de l'activité biologique

Dans tous les cas, la formation osseuse est assurée par des processus cellulaires complexes qui nécessitent une vascularisation à un stade précoce de la synthèse tissulaire

de sorte que l'os intègre un réseau dense d'artères, de vaisseaux sanguins et de nerfs. De plus, au cours de la formation tissulaire, une densité importante de cellules est piégée au sein du tissu (entre 10 000 et 90 000 /mm^3 selon les espèces et le site anatomique ; c.f. tableau 1). Enfin, un espace conséquent doit être dédié, au sein même de l'os, à la moelle osseuse. Il résulte donc, de la formation osseuse, un réseau dense de porosité sur trois niveaux : du millimètre et plus pour l'espace occupé par la moelle, de quelques dizaines de microns pour l'espace qui héberge le réseau vasculaire et nerveux, dit haversien, de quelques microns pour l'espace occupé par les cellules (lacunes) et d'environ 0,5 micron pour les ramifications entre cellules (canalicules). Ces différents réseaux de porosité étant très interconnectés, une première caractérisation indirecte peut être obtenue par des moyens couramment utilisés en science des matériaux destinés à mesurer les volumes de gaz ou de liquides pouvant être contenus dans l'objet. Ces méthodes ont au moins deux désavantages majeurs : 1) les porosités doivent être ouvertes pour permettre au fluides de circuler et 2) tout processus diagénétique ayant généré de la porosité (e.g. résultant d'une attaque par des microorganismes) induira un biais dans la mesure. De par les difficultés causées notamment par le premier point, on leur préfèrera, donc, une mesure plus directe reposant sur l'imagerie. Lorsque l'artefact peut être sectionné, ou qu'un prélèvement peut être effectué, une première observation par microscopie optique peut permettre d'obtenir une quantification partielle (2D) de la porosité jusqu'à l'échelle des lacunes (Figure 2). Une précision accrue peut être obtenue en utilisant un microscope électronique à balayage (MEB). Dans la grande majorité des cas, l'artefact doit être préservé et la mesure est alors principalement effectuée par tomographie X. Il importe, néanmoins de préciser que les dimensions de l'échantillon déterminent largement le type d'appareil de mesure et donc la résolution spatiale accessible. Ainsi, l'espace médullaire peut être visualisé pour la plupart des os entiers avec un matériel de laboratoire ou clinique, tandis que l'imagerie du réseau haversien requiert un échantillon de quelques cm^3 et celle du réseau lacunaire, tout au plus quelques mm^3 et nécessite plutôt une mesure sur une source synchrotron. Malgré cela, cette méthode présente l'avantage majeur de pouvoir visualiser le réseau même s'il est partiellement, voire totalement obstrué, si tant est que le matériau qui remplit les porosités soit de densité suffisamment différente pour obtenir un bon contraste.

La structure du réseau poreux étant directement liée à la formation osseuse, les caractéristiques sont donc, a priori, spécifique à une espèce donnée. Cependant, une complication supplémentaire intervient dans l'interprétation de la structure de la porosité : chez certaines espèces, dont l'homme, le singe, le chien, le cochon, l'os est en permanence renouvelé par des processus cellulaires dits de remodelage [5]. Certaines cellules, les ostéoclastes, résorbent localement la matrice osseuse, puis d'autres cellules, les ostéoblastes viennent synthétiser du tissu frais pour combler la zone résorbée. Ce processus à pour effet de réparer des zones de tissu endommagé, de réorganiser le tissu pour répondre au mieux aux sollicitations mécaniques externes et d'assurer une vascularisation plus efficace. D'un point de vue analytique, cela permet d'intégrer deux notions supplémentaires : 1) il doit être possible de distinguer l'artefact dans différentes classes d'espèces sur la base de l'observation (ou l'absence) de traces de remodelage ; 2) le réseau poreux d'un os très remodelé sera extrêmement

anisotrope, ce qui implique que l'on doit y observer des directions préférentielles très marquées : dans le cas des os longs, le réseau haversien sera préférentiellement orienté parallèlement et, dans une moindre proportion, perpendiculairement au grand axe passant par les deux extrémités.

Paradoxalement, la richesse d'information contenue dans la structure multi-échelle du réseau de porosité demeure largement sous-évaluée malgré le fait que celle-ci peut constituer un atout important pour la caractérisation d'un artefact osseux.

Critères d'analyses : volumétrique, morphométriques (forme, géométrie), caractéristiques du réseau (nombre d'éléments, connectivité etc.)

Outils analytiques : microcopie optique et électronique ; tomographie X de laboratoire et synchrotron (μCT, nanoCT)

3.2.4 Microstructure & histologie

Outre la génération d'un réseau de porosité très texturé, les processus de remodelage ont aussi pour effet de modifier profondément la structure tissulaire de l'os (et donc ses propriétés mécaniques) [1]. De par sa nature spongieuse, l'os trabéculaire présente une grande surface accessible aux cellules (i.e. rapport surface/volume total de matière élevé) et est donc très fréquemment renouvelé. Durant ce processus, un volume de forme approximativement hémisphérique est entièrement résorbé et remplacé par du tissu frais. On parle alors de paquet osseux. Dans l'os cortical, beaucoup plus dense, les cellules progressent suivant une direction privilégiée dans l'axe d'un cône de résorption, formant ainsi un tube et le tissu frais est déposé sur les parois par couches cylindriques d'environ 8 μm d'épaisseur en laissant un canal central libre pour l'occupation par un vaisseau sanguin, les extensions nerveuses et les fluides physiologiques. Ce type de structure est appelé ostéon et peut occuper la quasi-totalité de l'enveloppe corticale d'un os humain mature (Figure 2A). De par le fait que ces structures présentent une organisation de la matrice collagénique très texturée, une observation par microscopie optique en lumière polarisée est idéale pour les mettre en évidence dès lors que la trame moléculaire organique est conservée (Figure 2D). Dans le cas contraire, une deuxième caractéristique du remodelage peut être utilisée : la phase de synthèse de tissu frais s'effectue suivant une séquence temporelle progressive consistant en un dépôt de matrice collagénique suivie d'une minéralisation progressive entre 18 et 24 mois suivant la formation osseuse. À terme, la fraction minérale peut occuper 50 à 60 $\%_V$ dans l'os humain. Ainsi, une microradiographie ou une microtomographie par rayons X permet de révéler les structures de remodelage grâce aux différences de densité minérale qui génèrent un contraste d'absorption des rayons X [8]. Dans l'analyse des phénomènes diagénétiques, l'hétérogénéité tissulaire pré-existante au moment de la mort de l'individu doit être prise en compte comme pouvant expliquer une partie des variations des propriétés physico-chimiques mesurées.

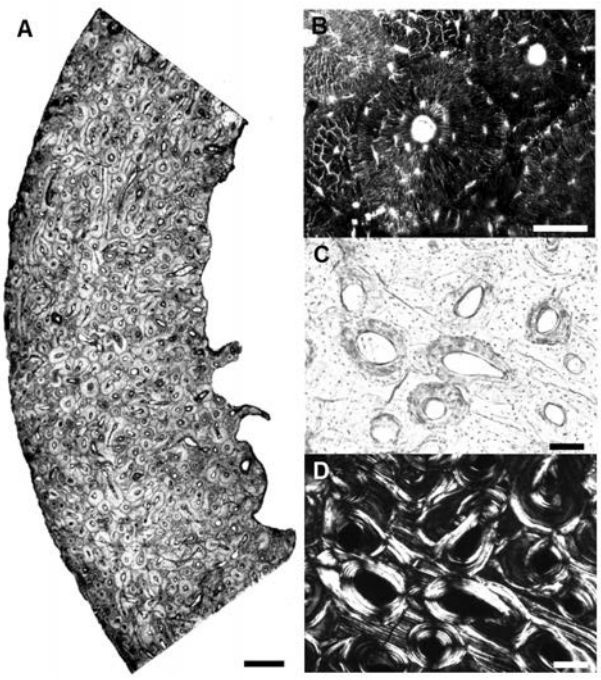


FIGURE 2 – Structure corticale humaine d'une section de diaphyse fémorale observée par microscopie optique en transmission (A) révélant les structures histologiques issues du remodelage (barre d'échelle 1 mm). Une observation à plus fort grossissement (C) dans les mêmes conditions permet de mettre en évidence les canaux centraux des ostéons (larges porosités) et les lacunes ostéocytaires apparaissant comme des points noirs (barre d'échelle 50 microns). L'observation en lumière polarisée (D) de la même zone que C révèle la structure lamellaire liée aux variations d'orientation du collagène déposé en strates successives. L'imagerie confocale par fluorescence d'un marqueur ayant imprégné la structure (B) permet de révéler l'étendue du réseau de porosité cellulaire (barre d'échelle 50 microns). © A. Gourrier, R. Genthial, D. Débarre, J.C. Vial (LIPHY).

3.3 Tissu et ultrastructure osseuse

3.3.1 L'organisation fibrillaire collagénique

La trame organique du tissu osseux est majoritairement constituée de collagène et d'une moindre fraction de molécules dites non-collagéniques, principalement des glycoprotéines. La structure et la fonction de ces dernières demeurent encore assez mal comprises. Par contraste, le collagène est une protéines ubiquitaire, extrêmement répandue dans les tissus vivants. En plus des os, on le retrouve comme constituant majeur des tendons, ligaments, du cartilage, de la cornée et de la dentine, ainsi qu'en fraction plus faible dans la peau, les artères etc. La diversité des fonctions assurées au sein des différents tissus découle de l'existence d'une grande variété de types de collagène [9]. Tous présentent néanmoins une caractéristique commune : les macromolécules sont formées de trois chaînes polypeptidiques contenant chacune au moins une région formée par la répétition de motifs de type -(Gly-X-Y-)$_n$- alternant Glycine et deux autres acides aminés, où n 337-343. Cette séquence spécifique résulte dans un enroulement des trois brins en triple hélice d'environ 300 nm de longueur

et 1,5 nm de diamètre. Les différents types de collagène sont donc essentiellement déterminés par la nature des résidus X et Y et l'extension des domaines permettant de former la triple hélice. Dans le cas de l'os, le collagène est majoritairement de type I et contient une fraction importante (20%) de proline et d'hydroxyproline. Ces résidus ont la particularité de posséder un cyclique aromatique sur la liaison amide, ce qui diminue considérablement le nombre de degrés de libertés de la chaîne. La rigidité de ces macromolécules favorise une organisation dense par un alignement remarquablement parallèle. De plus, il existe une forte affinité entre certains domaines macromoléculaires, ce qui résulte dans un décalage entre deux molécules adjacentes et à la création de liaisons covalentes entre celles-ci par voie enzymatique. Le long de l'axe, deux molécules consécutives sont séparées par un espace ou "gap" de l'ordre de 35 nm. Cet assemblage macromoléculaire dense se traduit par la formation de fibrilles de collagène dont le diamètre varie entre 30 nm dans la cornée à environ 100 nm dans l'os et dont la longueur peut atteindre plusieurs microns. Ces fibrilles peuvent être mises en évidence par observation MEB (Figure 3). Par ailleurs, cette organisation supramoléculaire se manifeste en MET par une alternance de bandes claires et sombres perpendiculaires à l'axe avec une période de 64-67 nm résultants du recouvrement partiel ou total de molécules adjacentes. S'il est parfaitement établi que ces fibrilles constituent des domaines de collagène dont l'organisation supramoléculaire est très homogène, la nature exacte de la surface des fibrilles ou de l'interface avec d'autres fibrilles demeure encore assez mal connue [10]. La présence d'une fraction faible (mais non négligeable) d'autre types de molécules de collagène plus flexibles et pouvant présenter des domaines globulaires incompatibles avec une organisation fibrillaire, ainsi que la présence de glycoprotéines supposées recouvrir la surface afin d'assurer la solubilisation des fibrilles lors de leur formation, pourraient être à l'origine des limitations de l'extension du diamètre des fibrilles.

Cette complexité a des conséquences directes d'un point de vue analytique car elles compliquent considérablement les analyses par rapport à un matériau uniquement constitué de collagène de type I. Cela résulte, en spectroscopie IRTF ou Raman, en un élargissement et un recouvrement important de bandes d'absorption ou des raies respectivement. De sorte qu'il est généralement très difficile d'attribuer précisément l'origine du signal à des modes de vibrations moléculaires bien identifiés. Néanmoins, les signaux IRTF et Raman constituent des signatures moléculaires suffisamment claires pour évaluer, par ex. l'état de conservation de la phase organique de l'os dans des os fortement altérés, de sorte que ces techniques sont quasiment incontournables lorsque cette question se pose. Un point sémantique nous paraît, par ailleurs, utile : de par le diamètre nanométriques des fibrilles de collagène, une terminologie plus précise devrait être « nanofibrilles » . La désignation dans la littérature de « microfibrilles » est, en ce sens, abusive, mais ce terme est tellement répandu qu'il fait l'acception générale. Nous nous bornerons à utiliser le terme de fibrilles, afin d'éviter toute source de confusion.

La structuration de la matrice organique osseuse en fibrilles a des conséquences très importantes du point de vue des propriétés tissulaires. Il est désormais établit que les performances biomécaniques de l'os sont très largement déterminées par l'organisation fibrillaire à volume, microstructure et densité minérale osseuse donnée

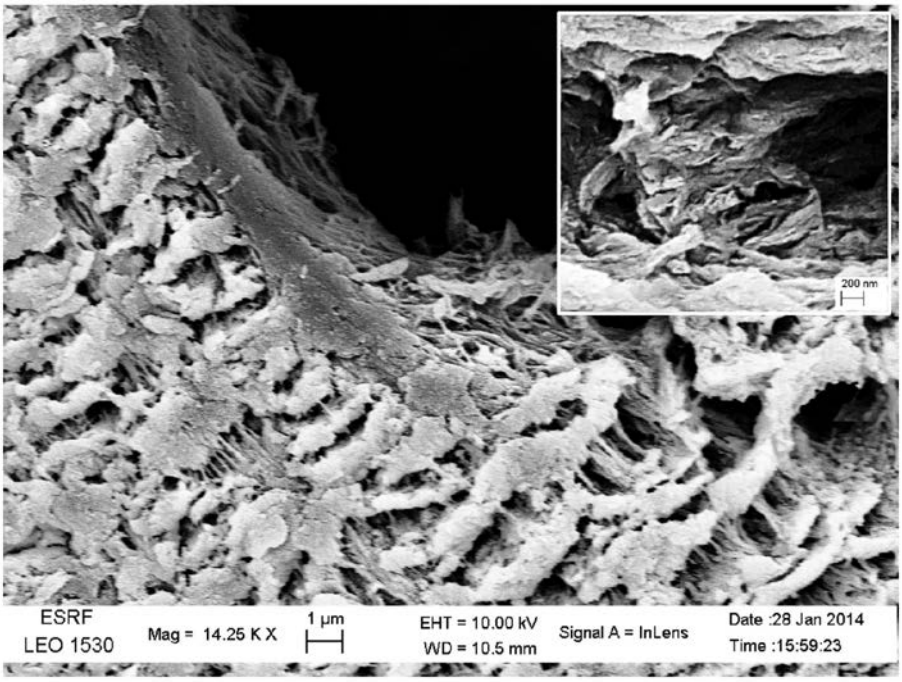


Figure 3 – Image MEB d'une section corticale de diaphyse fémorale humaine révélant la structure fibrillaire sous-jacente. L'insert obtenu à plus haute résolution permet de visualiser une structure sous forme de feuillets liée à l'organisation de la phase minérale. © A. Gourrier, M. Verezhak (LIPHY) & I. Snigireva (ESRF).

[1,11]. Cette organisation peut être décrite par deux situations extrêmes : celle dans laquelle les fibrilles sont déposées de façon complètement désorganisées pour former un tissu dit « fibreux » et celle dans laquelle les fibrilles s'assemblent de façon régulière suivant une direction privilégiée, par couches successives, au sein d'un tissu dit « lamellaire » . La variable déterminant le type d'organisation est la dynamique de formation tissulaire. Dans la phase de formation osseuse (de modelage), celle-ci est généralement rapide et s'effectue sous de faibles contraintes mécaniques. À l'opposé, elle est plus lente durant le renouvellement tissulaire (le remodelage), fortement directionnelle et très largement influencée par les efforts mécaniques appliqués sur l'os. L'os fibreux présentera, donc, une réponse mécanique isotrope par opposition au tissu lamellaire, très anisotrope, optimisé pour répondre aux contraintes suivant un axe principal bien défini (e.g. le long de l'os dans la diaphyse corticale des os longs). Le tissu fibreux est donc généralement formé dans les premiers stades de croissance et dans la phase initiale de résorption après une fracture. Il est progressivement remplacé par le tissu lamellaire. Une distinction peut être faite entre le remodelage dans l'os cortical et dans la partie trabéculaire. Dans la partie corticale, le remodelage résulte dans la formation d'ostéons cylindriques et les lamelles présentent donc une symétrie axiale. Dans l'os trabéculaire, la résorption s'effectue principalement à partir d'une surface très localisée et progresse de façon radiale par rapport aux surfaces des

travées. Les lamelles forment, donc, une structure de type « oignon » tronqué. Dans les deux cas de figures les fibrilles de collagène au sein d'une lamelle sont assemblées par couches successives et peuvent présenter une variation angulaire importante [12]. Ce sujet est encore au cœur de nombreuses études et devrait connaître de nouveaux développements dans la prochaine décennie. Quoi qu'il en soit, les connaissances actuelles montrent qu'il existe plusieurs niveaux hiérarchiques d'organisation du collagène : l'échelle moléculaire, celle de la fibrille et l'organisation fibrillaire au sein du tissu. Ainsi, dans le cas où une trame organique est encore présente dans l'objet archéologique, plusieurs analyses peuvent être effectuées selon la gamme dimensionnelle considérée : les spectroscopies IRTF/Raman permettront d'obtenir des informations sur la structure macromoléculaire ; la persistance de structures fibrillaires peut être mise en évidence par MET ; si la fraction collagénique initiale est suffisamment importante et bien conservée, une observation sous microscope en lumière polarisée constitue une méthode de choix, notamment de par sa simplicité de mise en œuvre.

3.3.2 La nanostructure minérale

Si la matrice organique confère à l'os une certaine élasticité et permet d'absorber au moins partiellement les chocs (résilience), la rigidité de l'organe est principalement liée à la présence d'une phase minérale relativement dense (typiquement 1,5 $g.cm^{-3}$ dans l'os humain mature). Sa composition chimique est celle d'un phosphate de calcium hydraté $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ dont l'arrangement cristallographique peut être classée dans la famille des apatites, structure majoritaire des phosphates de calcium géologiques. Deux caractéristiques majeures différencient cependant le minéral osseux de son équivalent géologique :

a) dans l'os, les cristaux sont de dimensions nanoscopiques et sont très anisotropes, typiquement autour de 100 x 50 x 5 nm^3 et forment, donc, de fines plaquettes [13]. Cette anisotropie se reflète logiquement dans les propriétés mécaniques aux échelles supérieures et dépend éminemment de l'organisation des nanocristaux dans la matrice collagénique [1]. Cet aspect a mobilisé une attention considérable depuis les années 1970 et la démocratisation de la MET qui a permis d'établir l'essentiel des modèles utilisés à nos jours. L'acception générale va, actuellement, dans le sens d'une épitaxie très forte entre les nanocristaux minéraux et les fibrilles de collagène, l'axe *c* du cristal (orienté suivant la plus grande dimension de la plaquette) étant orienté le long de l'axe fibrillaire avec une précision > 4^o. Ce point a été largement validé par de nombreuses études de diffraction des rayons X et des neutrons [14]. En revanche, la localisation précise des nanocristaux dans la trame fibrillaire demeure encore assez floue. Un des modèles prédominants dans la littérature jusque dans les années 1990 était celui d'une localisation des nanocristaux dans les interstices générés par l'organisation des molécules de collagène dans la fibrille, les gaps, décrits dans la section précédente. Cette vision repose principalement sur des mesures par diffraction de rayons X et de neutrons dans les tendons minéralisés. Si les observations sont difficilement réfutables, il importe de considérer que la structure du tendon reflète mal l'organisation fibrillaire de l'os. En particulier, plusieurs auteurs ont pointé du doigt le fait que les interstices du collagène ne peuvent permettre d'accommoder qu'envi-

ron 35 % du volume total de minéral de l'os. Il est donc assez probable qu'une large partie du minéral osseux ne peut être qu'extra-fibrillaire. Plusieurs études complémentaires, notamment de MET 3D ont mis en évidence l'existence de nanocristaux minéraux entre les fibrilles de collagène [15]. Des résultats récents obtenus avec des techniques de préparation d'échantillons élaborées (polissage par bombardement ionique) ont permis de recueillir des données allant dans ce sens [16]. La question sous-jacente à ces observations est celle des mécanismes de croissance des cristaux, question cruciale pour comprendre les évolutions ultérieures de l'ultrastructure osseuse. Il est maintenant établi que la minéralisation de la matrice organique procède par deux phases : la première, suivant la formation d'une nouvelle matrice collagénique est très rapide (quelques jours), au cours de laquelle la minéralisation atteint près de 50 – 70 % du total mesuré dans l'os mature. La deuxième, beaucoup plus lente, dure environ 3 – 4 semaines et est souvent qualifiée de phase de « maturation » du minéral de par les changements structuraux perceptibles par spectroscopies FTIR ou Raman. Il est, donc, probable que la structuration de la phase minérale procède par des processus de nucléation, puis de croissance et implique des phénomènes de transports complexes encore mal compris à ce jour. La caractérisation de la phase minérale à l'échelle nanoscopique est actuellement un enjeu majeur. Trois méthodes se sont imposées comme incontournables pour ce faire : la MET, l'AFM et la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Chacune présente des avantages et inconvénients : la MET est probablement la plus précise, mais ne peut se faire que sur de très faibles volumes d'échantillons et nécessite une préparation compliquée induisant souvent des artefacts. L'AFM est une mesure de surface, sur échantillon poli, mais malgré le potentiel théorique de cette méthode, demeure encore peu utilisée. La SAXS est une mesure indirecte, permettant d'obtenir une caractérisation d'échantillons sur des volumes conséquents, mais ne permet de déduire que les valeurs moyennes des dimensions, formes et organisation des nanocristaux contenus dans le volume sondé par le faisceau de rayons X.

b) l'épaisseur des particules étant proche de 5 nm et ce, quelles que soient les espèces et le type d'os, le rapport surface/volume est beaucoup plus élevé que dans des cristaux géologiques. Ceci confère au minéral une réactivité chimique élevée et, donc, une forte capacité d'échange avec les ions environnants. La cristallochimie de ces nanocristaux est donc extrêmement complexe du fait de nombreuses substitutions chimiques constatées en fonction de l'environnement physiologique notamment de Na^+, Mg^{2+} ,K^+, Sr^{2+}, Cl^-, F^-. Par ailleurs, des fractions importantes (4,5 % chez l'homme) de groupes PO_4^{3-} et OH^- sont systématiquement substituées par des ions CO_3^{2-}. Ainsi, les substitutions et insertions d'ions de tailles variables, ajoutées à la présence de lacunes nécessaires pour respecter l'équilibre des charges du cristal, créent des distorsions importantes de la maille cristalline. La structure minérale de l'os prend donc la forme d'une hydroxyapatite carbonatée comportant un niveau de désordre non négligeable, qui se traduit par un élargissement et un recouvrement des pics de diffraction de RX. En pratique, il est donc souvent difficile d'attribuer précisément une structure cristallographique unique sur la base de mesures de diffraction de RX. Plusieurs structures peuvent donner des résultats similaires : fluoroapatite, carbonato-apatite, hydroxyapatite etc. Ainsi, une analyse chimique permettant de

doser les éléments minoritaires procure souvent des informations de premier choix : fluorescence X, PIXE, PIGE, SIMS sont autant de méthodes permettant d'atteindre ce but avec micro-/nano-sonde. Par ailleurs, de par leur capacités à sonder l'environnement moléculaire/atomique local, les spectroscopies IR et Raman sont très sensibles aux modifications cristallochimiques et constituent, donc, des outils incontournables. Une précision nous paraît importante : La diffraction de RX, qui permet de sonder l'arrangement atomique cristallin, est aussi fréquemment employée pour caractériser les dimensions des nanocristaux par analyse du profil des raies. Cette méthode est, en effet, fréquemment utilisée pour caractériser des cristaux de plus grandes dimensions (au moins > 100 nm) que celles de l'os. Or, dans le cas de cristaux de dimensions inférieures à 50-100 nm, il est extrêmement complexe de séparer la composante dimensionnelle de l'effet des contraintes cristallines dans l'élargissement des raies. Pour cette raison, nous déconseillons donc fortement l'utilisation de la diffraction de RX pour la mesure des dimensions de particules.

Ces différents aspects génèrent une certaine confusion dans la littérature dont il convient de tenir compte dans les analyses ultérieures. Néanmoins, il est tout à fait frappant de constater que des objets archéologiques peuvent, parfois, conserver au moins une partie de l'information à la nanoéchelle [17].

3.4 Variabilité biologique : de l'importance du remodelage osseux

Dans les parties précédentes, l'impact du remodelage osseux a été mis en avant pour décrire certaines variations structurales d'importances. Nous nous devons d'insister sur l'importance de ce processus dans toute analyse de matériel osseux. En premier lieu, le remodelage présente un impact à tous les niveaux de la hiérarchie structurale de l'os : la forme macroscopique, la microarchitecture, la structure histologique, l'organisation fibrillaire, la densité minérale et jusqu'à la structure moléculaire du collagène et atomique des cristaux minéraux. Il existe donc une grande variété d'indices qui peuvent être exploités, quelles que soient les dimensions de l'artefact considéré. Deuxièmement, l'impact du remodelage sur l'ensemble du squelette varie très fortement en fonction des espèces. Dans le cas de l'homme, on estime que la totalité du volume squelettique est renouvelé tous les 10 ans environ, étant entendu que certaines zones anatomiques sont beaucoup plus largement remaniées que d'autres. Ce constat reste largement vrai pour d'autres espèces, porcins, ovins, canidés, félidés etc. Pour les bovins, équidés, au contraire, le remodelage est beaucoup plus limité. Enfin, le remodelage peut être très influencé par l'état pathologique de l'individu. Une vaste littérature existe sur ce sujet qui est en dehors du cadre de cet ouvrage. Ainsi, la première question qui devrait se poser, en présence d'un vestige ou d'un fragment osseux, devrait être : quel sont les signes de remodelage observé ? En fonction des éléments de réponse, il devrait être assez rapidement possible d'obtenir des indices quand à la nature de l'os : espèce, âge, voire état pathologique. Par ailleurs, un effet négatif du remodelage sur la compréhension du tissu osseux est, précisément, qu'il entraîne une grande variabilité des indicateurs structuraux mesurables. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la composition chimique de l'os. Il est, par exemple, assez bien établi que les propriétés mécaniques tissulaires sont principalement dominées par la structure et l'organisation fibrillaire alors qu'une variation de

la composition du collagène n'a qu'un impact très limité. De la même façon, il existe une importante dispersion dans la composition chimique de la phase minérale, mais il n'est pas parfaitement clair que celle-ci joue un rôle déterminant sur les propriétés physiques qui restent dominées par la densité minérale. Un grand soin doit donc être apporté dans l'intégration de données caractérisant la nanoéchelle. Il est à peu près certain qu'un protocole ne permettant pas de relier ces données à d'autres obtenues à des échelles supérieures conduira à des erreurs d'interprétation.

3.5 Conclusions : potentiel informatif des os archéologiques sur les sociétés du passé

L'os est de par son passé biologique un témoin clé des conditions environnementales et de la vie des individus concernés. Il a enregistré dans sa structure, morphologie, composition chimique et isotopiques de nombreux marqueurs pouvant nous renseigner sur les modes de vie de notre passé. Il convient de tenir compte des modifications post-mortem de ces vestiges mais, grâce aussi aux derniers développements technologiques et à une compréhension de plus en plus fine de ces caractéristiques de la micro- à la nanoéchelle et de ses processus de formation et de remodelage, il est désormais possible de révéler d'une façon très détaillée les « messages » que l'os archéologique peut nous transmettre.

Le Tableau 2 rassemble de façon non exhaustive les informations pouvant être révélées par l'analyse des matériaux osseux archéologiques. Ce tableau indique également à quel niveau se situe l'information (morphologie, structure ou composition chimique du matériau).

Remerciements

A. Gourrier souhaite remercier Georges Boivin et Delphine Farlay de l'unité INSERM U1033 pour leur éclairage sur l'histologie osseuse, Manfred Burghamer et Christian Riekel de l'ESRF pour leur soutien dans l'analyse de l'ultrastructure osseuse ainsi que l'ensemble des chercheurs du LIPHY associés directement ou indirectement à ces recherches, en particulier Rachel Genthial, Mariana Verzhak, Delphine Débarre, Marie Plazanet et Jean-Claude Vial. Un remerciement particulier à Ismène Cotensin, Luna et Coline Gourrier pour la relecture de ce manuscrit et leur soutien indéfectible pour ce travail. I. Reiche souhaite remercier Céline Chadefaux et Peter Fratzl.

Tableau 2 – Informations révélées par l'analyse des matériaux osseux archéologiques.

Informations	Marqueur	Localisation dans le matériau
Informations contenues dans l'aspect et la morphologie des matériaux osseux archéologiques		
Mode de vie des populations	Traces d'utilisation	Surface
Utilisation du feu	Couleur	Surface
Type d'os et espèce	Forme macroscopique	Aspect marcroscopique
Espèce	Densité de lacunes ostéocytaires et épaisseur des travées trabéculaires	Micromorphologie
Pathologies	Aspect micromorphologique	Micromorphologie
Informations contenues dans la composition chimique des phases minérale et organique		
Datation	^{14}C	Collagène, carbonates, cholesterol, protéines non collagéniques
	Racémisation d'acides aminés (Rapport D/L de l'acide aspartique)	Collagène
	^{238}U, ^{235}U, ^{232}Th (éléments enrichis lors de la diagenèse des os archéologiques)	Apatite
Régimes alimentaires	Rapports élementaire Ba/Sr/Ca, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$	Apatite / Collagène
Climats	$\delta^{18}O$	Apatite
Habitat, migration des populations, environnement	$^{87}Sr/^{86}Sr$, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$, $^{206, 207, 208}Pb$	Apatite, collagène, carbonate
Origine des populations Degré de parenté	ADN	
Informations contenues dans la structure des matériaux osseux archéologiques		
Chauffe	Couleur	Surface
	Taille et organisation des cristaux de la phase minérale	Apatite
	organisation des fibres	Collagène
Espèces	Densité de lacunes ostéocytaires et épaisseur des travées trabéculaires	Aspect micromorphologie
Pathologies	Aspect micromorphologique	Micromorphologie

Bibliographie

[1] J. D. Currey, Bones : structure and mechanics, Princeton University Press, Princeton, 456 pages, 2002.

[2] J. D. Currey, The many adaptations of bone. Journal of Biomechanics. 36, 1487-1495, 2002.

[3] P. Fratzl et R. Weinkamer, Nature's hierarchical materials. Progress in Materials Science. 52, 1263-1334, 2007.

[4] J. M. Bourgery, N. H. Jacob, Atlas d'anatomie humaine et de chirurgie, Taschen, Cologne, 722 pages, 2005.

[5] C. Crowder, S. D. Stout, Bone Histology : an anthropological perspective. CRC Press, New Yprk, 417 pages, 2011.

[6] M. G. Mullender, R. Huiskes, H. Versleyen, P. Buma, Osteocyte density and histomorphometric parameters in cancellous bone of the proximal femur in five mammalian species. Journal of Orthopaedic Research. 14, 972-979, 1996.

[7] C. M. Bagi, E. Berryman, M. R. Moall, Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals : implications for drug discovery. Comparative Medicine. 61, 76-85, 2011.

[8] G. Boivin, P. J. Meunier, The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. Calcified Tissue International. 70, 503-511, 2002.

[9] P. Fratzl , Collagen : structure and mechanics, Springer, New-York, 524 pages, 2008.

[10] T. J. Wess, "Collagen Fibrillar Structure and Hierarchies" dans Collagen : structure and mechanics, ed. P. Fratzl, New-York, Springer, p. 49-80, 2008.

[11] M. Granke, A. Gourrier, F. Rupin, K. Raum, F. Peyrin, M. Burghammer, A. Saied, P. Laugier, Microfibril orientation dominates the microelastic properties of bone tissue at the lamellar length scale. Plos One. 8, e58043, 2013.

[12] W. Wagermaier, H.S. Gupta, A. Gourrier, M. Burghammer, P. Roschger, P. Fratzl, Spiral twisting of fibre orientation inside bone lamellae. Biointerphases. 1, 1-5, 2006.

[13] S. Weiner, W. Traub, Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. FEBS Letters. 206, 262–266, 1986.

[14] W. Wagermaier, A. Gourrier, B. Aichmayer, "Understanding hierarchy and functions of bone using scanning X-ray scattering method" dans Materials Design inspired by Nature : Function through Inner Architecture, eds. P. Fratzl, J. W. C. Dunlop, R. Weinkamer, RSC publishing, Cambridge, p. 46-73, 2013.

[15] W. J. Landis, K. J. Hodgens, J. Arena, M. J. Song, B.F. McEwen, Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. Microscopy Research Technology. 33, 192–202, 1996.

[16] E. A. McNally, H. P. Schwarcz, G. A. Botton, L. Arsenault, A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections. PLoS ONE. 7, e29258, 2012.

[17] I. Reiche, C. Chadefaux, K. Müller, A. Gourrier, Towards a better understanding of alteration phenomena of archaeological bone by a closer look at the organic/mineral association at micro- and nanoscale. Preliminary results on Neolithic samples from Chalain lake site 19, Jura, France. ArchéoSciences. 35, 143-158, 2011.

Encart 1.- La microscopie électronique

Ina Reiche[1], Céline Chadefaux[2]
1- Sorbonne Universités, Université Paris VI, LAMS UMR 8220 CNRS, Paris, France
et Rathgen-Forschungslabor, Staatliche Museen zu Berlin - Preußischer Kulturbesitz, Berlin, Allemagne
2- Chercheuse indépendante

La microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à un système d'analyse X (EDX)

Afin de détailler les observations histologiques des vestiges osseux, la microscopie électronique à balayage (MEB) permet de visualiser la morphologie osseuse et ses modifications diagénétiques à micro-échelle. Elle permet d'imager à plus ou moins fort grandissement, généralement entre 100 et 10000 fois dépendant du microscope, la section d'os afin d'obtenir des informations sur la conservation de la structure histologique du périoste (bord externe) vers l'endoste (bord interne). Il est également possible de mettre en évidence de nouvelles phases cristallines apparues lors de la diagénèse. Cette identification se fait d'une part par une caractérisation morphologique et d'autre part par une caractérisation chimique de la nouvelle phase. Pour une approche plus quantitative des observations, les micrographies électroniques peuvent servir pour définir des paramètres semi-quantitatifs pour évaluer l'état de préservation des vestiges osseux.

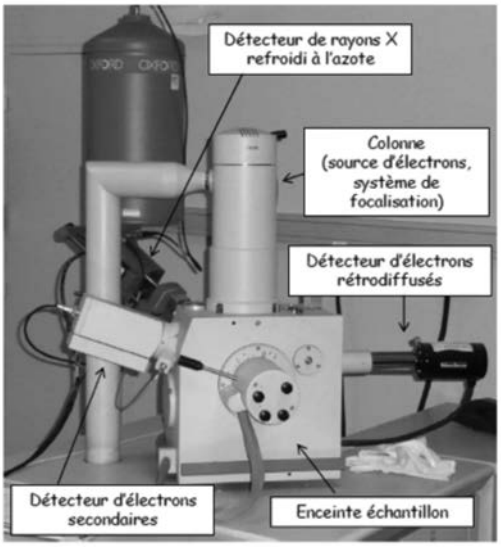


FIGURE 1 – Dispositif expérimental du MEB Philips XL 30 au C2RMF.

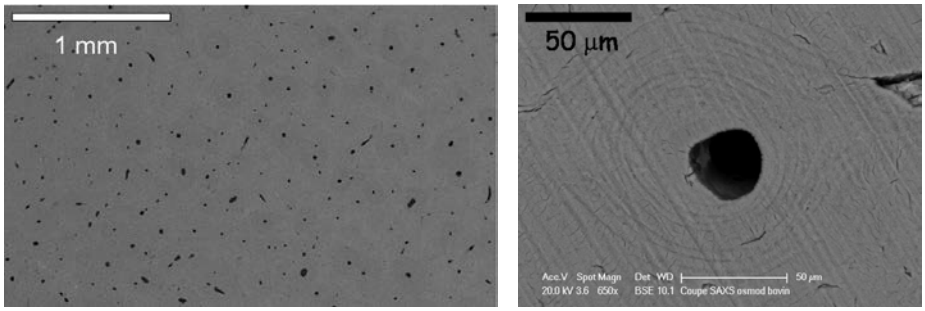
La Figure 1 présente le dispositif expérimental utilisé au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF) à Paris. Il s'agit d'un MEB Philips XL 30 couplé avec un système d'analyse dispersive en énergie. Cet appareil permet d'obtenir des informations sur la morphologie du matériau mais aussi sur sa composition chimique. La tension de travail est choisie en fonction du matériau. Pour l'os on utilise généralement 20 kV ce qui correspond à uncourant proche de 100 μA. Les observations sont menées avec deux détecteurs d'imagerie : un détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSE) afin d'obtenir des micrographies avec un contraste chimique et un autre permettant de détecter les électrons secondaires pour un contraste topographique. De plus, le système d'analyse X dispersif en énergie (EDX) permet l'identification des éléments chimiques présents (entre autre sous forme d'inclusions) dans la structure osseuse [1], [2].

Les observations sont réalisées sur des sections transverses d'une épaisseur de quelques millimètres. Ces sections sont au préalable polies puis métallisées au moyen de carbone afin de rendre le matériau conducteur. Un exemple de micrographies électroniques obtenues au MEB avec différents grossissements sur un os moderne est montré dans les Figures 2 et 3.

Microscopie électronique à transmission (TEM) couplée à un système d'analyse X dispersif en énergie (EDX) et à la diffraction électronique (SAED)

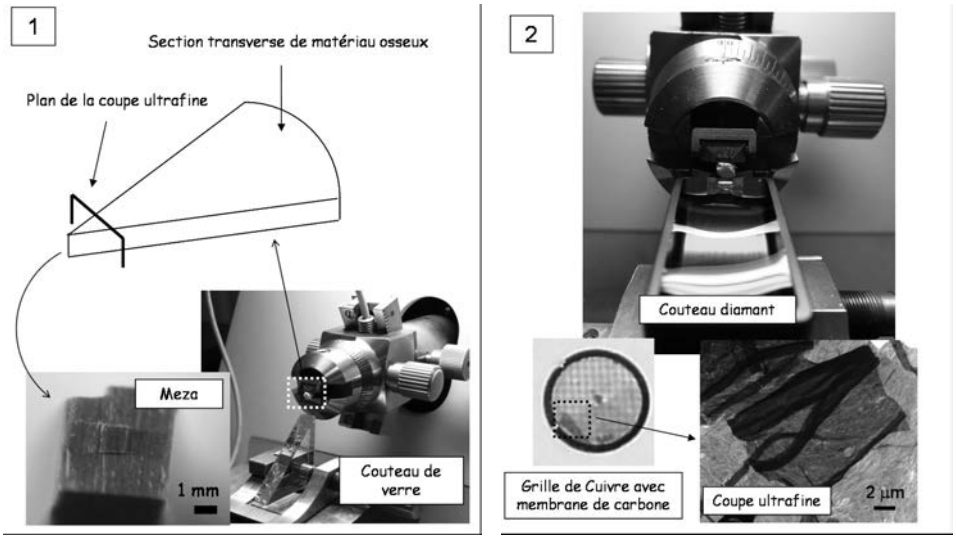
Le microscope électronique à transmission (MET) est un outil de choix pour caractériser la morphologie des matériaux osseux à l'échelle nanométrique car il permet d'observer directement l'organisation des fibres de collagène et des cristaux d'hydroxylapatite. Cette technique est moins fréquemment pratiquée sur les vestiges osseux archéologiques que le MEB car la préparation d'échantillons est fastidieuse surtout s'il est souhaité de conserver l'agencement entre le minéral et l'organique en travaillant sur des coupes ultrafines de matériaux osseux. Ce type de préparation est donc une étape cruciale des observations MET. Pour plus de détails sur le principe du MET, le lecteur pourra se référer à [3]. Le MET peut être couplé – comme le MEB - à un système d'analyse X (EDX) et, de plus, à la diffraction électronique (SAED) permettant une analyse structurale des échantillons.

Quelques expériences sur du matériel osseux archéologique ont été conduites au Centre Commun de Microscopie Electronique (CCME UMR 8080, Orsay)sur un microscope Philips EM208 avec une tension d'accélération de 80 kV. Cet appareil permet une analyse morphologique. Pour l'analyse structurale un autre dispositif expérimental situé au Laboratoire de Métallurgie Structurale (CECM UPR 2801 CNRS) a été employé. Ce dispositif est constitué d'un MET Jeol avec une tension d'accélération de 200 kV couplé à la fois à un système SAED et à un système EDX. Ces appareils permettent d'obtenir des micrographies avec une résolution spatiale de l'ordre de 0,1 nm et une taille de sonde de l'ordre de quelques nanomètres [1].



(a) (b)

FIGURE 2 – Micrographies électroniques en mode BSE réalisées sur une section épaisse d'os moderne bovin : a) vue générale de la structure histologique de l'échantillon à faible grandissement, b) système de Havers (canal de Havers et lamelles concentriques).



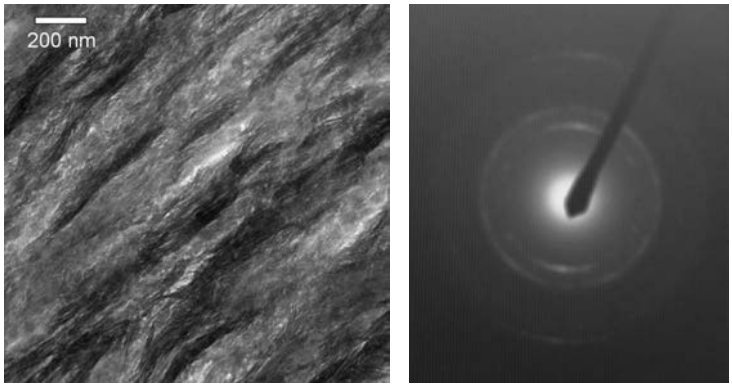
(a) (b)

FIGURE 3 – Etapes de préparation de coupes ultrafine par ultramicrotomie : 1. Façonnage d'une « meza » à la surface de l'échantillon à l'aide d'un couteau de verre.
2. Coupe des sections ultrafine à l'aide d'un couteau diamant puis dépôt sur une grille de cuivre.

L'observation en MET nécessite des échantillons présentant une épaisseur inférieure à 100 nm. Ces sections ultrafines peuvent être réalisées par ultramicrotomie [3]. Des coupes longitudinales de matériaux osseux d'une épaisseur de 70 nm ont été réalisées au CCME au moyen d'un ultramicrotome Reichert Ultracut E. Cette préparation se déroule en plusieurs étapes et a été réalisée sur le matériau osseux brut pour éviter toute interaction avec une résine d'enrobage. Ces étapes sont représentées dans les Figures 4 et 5. Une pyramide, appelée meza, est façonnée à l'aide d'un couteau de verre à la surface de la zone que l'on souhaite observer. Cette première étape permet de diminuer la surface de l'échantillon à couper et la préparer à la découpe au

couteau diamant.Les coupes ultrafines sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant (Diatom 35°) puis sont récupérées et déposées sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane en carbone.

Les analyses ont ensuite été menées à différents grandissements sur ces coupes pour caractériser l'état de conservation de l'ultrastructure des matériaux osseux archéologiques. Les Figures 6 et 7 montrent une micrographie électronique d'une section osseuse ultrafine avec la diffraction électronique correspondante [2].



(a) (b)

FIGURE 4 – Micrographie électronique réalisée en MET à 80 kV sur une section osseuse ultrafine. Diffraction électronique correspondant à la micrographie électronique montrée en Figure 6.

Bibliographie

[1] C. Chadefaux, Etablissement d'une nouvelle stratégie analytique multiéchelle de détermination de l'état de conservation des os et bois de cervidés archéologiques, thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2009.

[2] C. Chadefaux, I. Reiche, Archaeological bone from macro- to nanoscale. Heat-induced modifications at low temperatures. Journal of NanoResearch. 8, 157-172, 2009.

[3] J. Ayache, L. Beaunier, J. Pottu-Boumendil, G. Ehret, D. Laub, Guide de la préparation des échantillons pour la Microscopie électronique en transmission. Tome 1, Méthodologie, Presses Universitaires de Saint-Etienne, Saint-Etienne, 399 pages, 2007.