



Suivi des propriétés biomécaniques de l'os néoformé au voisinage d'un implant en titane par diffusion micro Brillouin

R. Vayron^a, M. Matsukawa^b, R. Tsubota^b, V. Mathieu^c et G. Haiat^a

^aLaboratoire MSME, 61 avenue du Général de Gaulle, Bât P2, bureau 335, 94010 Créteil, France

^bLaboratory of Ultrasonic Electronics, Doshisha University, 610-0321 Kyoto, Japon

^cAgroParisTech - INRA, Bâtiment CBAI 1, avenue Lucien Brétignière, 78850 Thiverval Grignon, France

romain.vayron@u-pec.fr

L'utilisation d'implants osseux est aujourd'hui largement répandue en chirurgie dentaire, maxillo-faciale ou orthopédique. Cependant, les techniques existantes ne permettent pas une évaluation fiable des propriétés biomécaniques de l'interface os-implant. L'objectif de ce travail est d'utiliser la technique de diffusion micro Brillouin pour mesurer les propriétés biomécaniques de l'os néoformé à l'interface avec l'implant à l'échelle micrométrique. Pour cela, des pastilles en alliage de titane sont maintenues *in vivo* à une distance initiale de 200 μm de la surface aplanie de tibias de lapin. Après quelques semaines d'implantation, l'animal est sacrifié et les tibias prélevés. Des mesures de vitesse d'ondes élastiques à sept et treize semaines de cicatrisation sont effectuées par diffusion Brillouin dans l'os néo formé et dans l'os mature. Le contenu minéral des régions osseuses analysées par diffusion Brillouin est ensuite étudié par histologie. Les moyennes des vitesses mesurées par diffusion Brillouin sont plus faibles dans l'os néoformé (4966 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ à 7 semaines et 5030 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ après 13 semaines de cicatrisation) que dans l'os mature (respectivement 5305 et 5360 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Les observations histologiques révèlent que le tissu osseux néoformé est moins minéralisé que l'os mature. Plus le tissu osseux est minéralisé, plus les vitesses mesurées sont importantes.

1 Introduction

Les implants sont fréquemment utilisés en clinique [1-3] et ont permis des progrès considérables en chirurgie dentaire et orthopédique. Cependant, des échecs implantaires, qui peuvent avoir des conséquences dramatiques, se produisent encore et restent difficiles à anticiper.

La tenue à long terme de l'implant résulte d'une part de sa stabilité mais également du processus de cicatrisation via les phénomènes de remodelage osseux autour de l'implant, on parle d'ostéointégration. Les propriétés biomécaniques de l'interface os-implant jouent un rôle prépondérant dans le succès à long terme de l'implant mais les phénomènes mis en jeu restent mal compris. L'utilisation des techniques de caractérisation mécanique par diffusion Brillouin, par exemple, à différents temps de cicatrisation peuvent apporter des informations sur les propriétés de l'os environnant l'implant. Ces méthodes doivent être utilisées pour mieux comprendre les phénomènes de remodelage osseux et quantifier les propriétés mécaniques de l'os durant la cicatrisation.

La technique de diffusion Brillouin permet la mesure de la vitesse des ondes acoustiques par la mesure du décalage fréquentiel provoqué par la diffusion inélastique d'un faisceau laser sur cet échantillon. Cette réponse inélastique est engendrée par les fluctuations des constantes diélectriques dans l'échantillon, responsables de variations de l'indice de réfraction [4]. La technique de diffusion Brillouin a été utilisée pour mesurer les propriétés élastiques du tissu osseux à une résolution d'environ 10 μm . Après sept semaines de cicatrisation, les échantillons ont été prélevés et des mesures de vitesse d'ondes élastiques sont réalisées sur des coupes de 200 μm d'épaisseur dans l'os néoformé sous l'implant et dans l'os cortical mature. Des vitesses significativement plus faibles sont observées dans l'os néoformé par rapport à l'os mature. Ces résultats sont expliqués par les analyses histologiques qui montrent qu'après sept semaines de cicatrisation, le degré de minéralisation est plus élevé dans l'os mature que dans l'os néoformé. L'étude montre le potentiel de la technique de diffusion Brillouin pour la mesure des propriétés élastiques de l'os néoformé à l'échelle microscopique [5]. Cependant, la cinétique d'évolution des propriétés élastiques de l'os néoformé reste mal connue.

Cette présente étude vise à étudier la faisabilité de la technique de diffusion micro Brillouin pour la mesure de l'évolution des propriétés biomécaniques de l'os néoformé à l'interface avec l'implant à l'échelle micrométrique.

2 Matériel et Méthode

2.1 Implants

Des implants en forme de pastilles (5 mm \pm 0.05 mm de diamètre et de 3 mm \pm 0.05 mm d'épaisseur) ont été utilisés [5]. Les implants sont en alliage de titane de qualité médicale (Ti-6Al-4V), et leur surface a été traitée par sablage avec des particules du dioxyde de titane (TiO₂). L'état de surface obtenu correspond aux propriétés utilisées pour les implants en clinique [6]. Des capsules en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ont été placées autour des pastilles de titane afin de créer un espace de 200 μm entre le tissu osseux et le métal (voir Figure 1), ce qui correspond approximativement à l'écart moyen entre l'os et l'implant lors de sa mise en place en clinique [7, 8]. L'épaisseur de 200 μm de la chambre osseuse permet la création d'une cavité vide de tissu osseux le jour de l'opération et donc contenant exclusivement de l'os néoformé après le sacrifice (voir Figure 1). Deux implants ont été utilisés, ce qui correspond à un implant par lapin et un temps de cicatrisation (7 et 13 semaines).

3.2 Modèle animal

Trois lapins femelles de type New Zealand White âgés de 6 mois (Charles River, L'Arbresle, France) ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été hébergés dans une cage métallique dans un environnement en conformité avec les exigences des directives européennes.

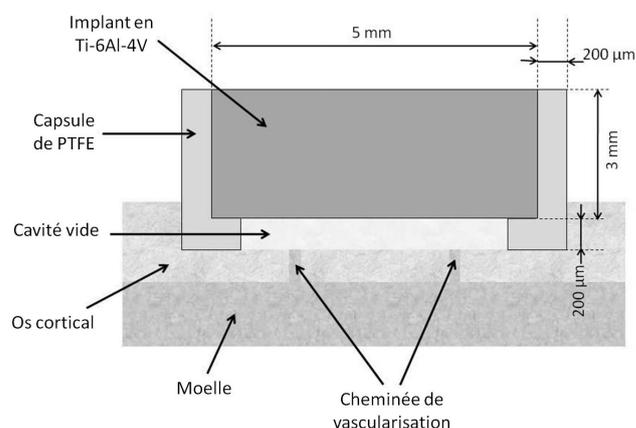


Figure 1 : Schéma descriptif du modèle chirurgical permettant l'obtention d'une cavité remplie exclusivement d'os néoformé après cicatrisation.

3.3 Procédure chirurgicale

Les lapins ont été anesthésiés par injection intramusculaire avec 0,5 mg/kg de Diazepam (Valium[®], Roche, Bâle, Suisse), 0,25 mg/kg de metedomidine hydrochloride (Domitor[®], Virbac, France), et 100 mg/kg de chlorhydrate de kétamine (Ketalar 500[®], Pfizer, France). Avant la chirurgie, les sites d'opérations ont été rasés et désinfectés avec de la bétadine. Ensuite, une incision longitudinale de la peau de 5 cm a été effectuée afin d'exposer la partie antéro proximale du tibia. Une incision a ensuite été pratiquée dans le périoste, exposant le site osseux d'implantation. Un dispositif de coupe à grande vitesse (Tivoly, Saint Etienne, France) a été utilisé avec une irrigation de sérum physiologique pour niveler une surface osseuse de 5,6 mm de diamètre afin d'assurer un écartement constant entre l'implant et l'os, comme décrit précédemment [9]. Un guide de forage sur mesure a été utilisé pour créer quatre trous (1,2 mm de diamètre et de 2 mm de profondeur) autour de l'implant. Avant la pose de l'implant, quatre trous (0,9 mm de diamètre) ont été percés à travers la surface de l'os cortical afin de permettre un écoulement de sang vers l'interface os-implant et ainsi favoriser le remodelage osseux. Six implants ont été posés (un sur chaque tibia) et stabilisés par des élastiques orthodontiques tenus par quatre vis d'ostéosynthèse de 1,6 mm de diamètre (Easy Implant, Chavanod, France).

3.4 Protocol expérimental

Le premier lapin a été euthanasié 7 semaines après implantation à l'aide d'une surdose de pentobarbital, le second a été sacrifié à 13 semaines. Les tibias implantés ont été prélevés et préparés pour l'analyse histologique. La procédure histologique est décrite en détail dans [10, 11]. Cette procédure est un procédé classiquement utilisé pour des échantillons non-décalcifiés. Après fixation dans 10% de formol tamponné au phosphate pendant une période de quatre semaines, les échantillons sont rincés à l'eau, déshydratés dans de l'éthanol (cinq bains : 70 °, 80 °, 90 °, 95 ° et trois bains : 100 °, 24 h), dégraissés dans le xylène (deux bains, 12 h) et inclus dans du méthacrylate de méthyle (prise lente sur plusieurs jours). Des sections de 500 µm d'épaisseur ont été coupées à partir de chaque échantillon. Les sections ont été réalisées longitudinalement à l'implant et polies pour obtenir une lamelle d'une épaisseur de 190 µm en utilisant du papier abrasif (3M, P1200) et une machine de polissage automatisée (Exact Aparatbau GmbH Norderstedt, Allemagne). L'état de surface a été finalisé à l'aide de suspension d'alumine. Les surfaces ont ensuite été colorées avec du bleu de Stevenel et de la picro-fuchsine selon van Gieson pour une observation en microscopie optique standard. Les images histologiques ont été analysées afin de distinguer l'os mature de l'os néoformé. La distinction entre l'os mature et le tissu osseux nouvellement formé est réalisée sur la base de la coloration des échantillons d'os. La coloration obtenue à l'aide de la picro-fuchsine révèle le degré de minéralisation du tissu osseux de manière empirique.

Les différentes coupes issues des tibias gauches ont permis d'obtenir des lames contenant suffisamment d'os néoformé après 7 et 13 semaines de cicatrisation. Une lame à 7 semaines et une lame à 13 semaines ont été dédiées à la caractérisation des propriétés élastiques par diffusion micro-Brillouin.

La première étape consiste à repérer les zones d'os néoformé et les zones d'os mature à l'aide d'un microscope optique. Une fois que ces zones ont été identifiées, nous avons déterminé dans quelles régions pourraient être effectuées les séries de mesures. L'approche multi-modale combinant la diffusion micro-Brillouin et l'histologie a été utilisée afin de déterminer la nature du tissu osseux testé pour chaque point de mesure.

3.5 Dispositif de diffusion Micro-Brillouin

Les mesures par diffusion Brillouin ont été réalisées en collaboration l'Université de Doshisha au Japon. Le dispositif est constitué d'un interféromètre Fabry-Pérot (JRS Scientific Instruments, Zwillikon, Suisse) et d'un laser argon ionique d'une longueur d'onde $\lambda_0 = 514.5$ nm. Le dispositif de diffusion micro-Brillouin contient également un microscope destiné à la diffusion Raman (Photon Design, Tokyo, Japon) afin de contrôler la région mesurée. Le diamètre du faisceau laser focalisé sur l'échantillon est d'environ 10 µm. La puissance du laser à proximité de l'échantillon est d'environ 12 mW. Cette valeur est suffisamment faible afin de limiter l'impact de l'élévation de la température sur les mesures [241].

La diffusion Brillouin permet la mesure de vitesses d'ondes acoustiques dans un échantillon transparent par la mesure du décalage fréquentiel provoqué par la diffusion inélastique d'un faisceau laser sur cet échantillon. Cette réponse inélastique est engendrée par les fluctuations des constantes diélectriques dans l'échantillon, responsables de variations de l'indice de réfraction [4]. Lors de la propagation du faisceau laser incident (désigné par l'indice I dans ce qui suit) dans l'échantillon, des photons sont diffusés (indice D) avec une fréquence décalée par la création de phonons acoustiques (indice B) (voir Figure 2). Le vecteur d'onde des phonons, dont la vitesse est mesurée, dépend de la géométrie de diffusion employée. Cette géométrie définit l'orientation des faisceaux lumineux incidents et diffusés. La géométrie de diffusion retenue pour cette étude est la géométrie appelée RI0A (voir Figure 2) [12]. Pour la réaliser, une plaque métallique réfléchissante est placée sous l'échantillon. La réflexion du faisceau laser incident sur le réflecteur permet de simuler une source cohérente avec ce faisceau incident, symétrique par rapport au plan de l'échantillon [13]. En utilisant la conservation des moments et de l'énergie combinée aux lois de Snell-Descartes, la relation suivante est obtenue [4, 14, 15] :

$$v^{\theta A} = \frac{f_B \lambda_0}{2 \sin(\theta/2)} \quad (1)$$

où $v^{\theta A}$ est la vitesse acoustique se propageant parallèlement à la surface de l'échantillon, f_B est le décalage fréquentiel entre les faisceaux incident et diffusé, et $\theta/2$ est l'angle externe de diffusion (voir Figure 2). L'analyse des spectres fréquentiels permet la détermination du décalage fréquentiel f_B et donc de la vitesse acoustique $v^{\theta A}$ avec une erreur de mesure d'environ 1 % [13].

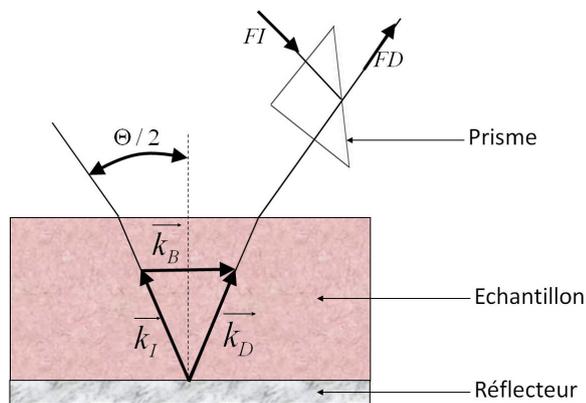


Figure 2 : Représentation schématique de la géométrie de diffusion $RI\theta A$ avec FI correspondant au faisceau incident, FD au faisceau diffusé, $\theta/2$ l'angle externe de diffusion, k_I le vecteur d'onde des photons incidents, k_D le vecteur d'onde des photons diffusés, k_B le vecteur d'onde des phonons dont la vitesse est mesurée.

3.5 Analyses statistiques

Une analyse de la variance (ANOVA) et un test Tukey-Kramer ont été effectués pour évaluer la différence de propriétés mécaniques entre le tissu osseux mature et néoformé.

3 Résultats

Le tableau 1 montre le nombre de mesures par diffusion micro-Brillouin effectués dans l'os nouvellement formé et dans l'os mature pour les deux lapins après 7 et 13 semaines de cicatrisation. La figure 3 montre une image histologique d'un échantillon obtenu après 13 semaines de cicatrisation. La zone de $200 \mu\text{m}$ située à proximité de la surface de l'implant est remplie de tissu osseux néoformé. Les rectangles blancs montrent les zones de mesure par diffusion micro-Brillouin.

Tableau 1: Nombre de mesures réalisées par diffusion micro-Brillouin dans l'os néoformé et mature à 7 et 13 semaines après implantation.

Temps de cicatrisation	7 semaines	13 semaines
Nombre de mesures par diffusion micro-Brillouin dans l'os néoformé	6	11
Nombre de mesures par diffusion micro-Brillouin dans l'os mature	3	3

Le tableau 2 montre les valeurs moyennes et les écarts types des vitesses acoustiques pour i) l'os néoformé aux deux temps de cicatrisation (7 et 13 semaines) et ii) le tissu osseux mature pour chaque échantillon considéré. Les valeurs moyennes des vitesses acoustiques mesurées dans l'os néoformé augmentent avec le temps de cicatrisation.

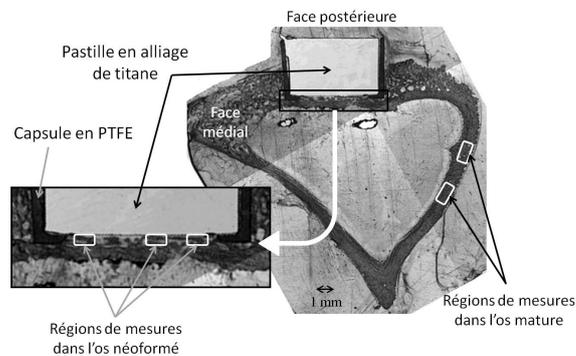


Figure 2 : Photographie de l'échantillon utilisé pour la détermination des propriétés élastiques de l'os néoformé après 13 semaines de cicatrisation. Les rectangles blancs montrent les différentes zones mesurées par diffusion micro-Brillouin dans l'os mature et néoformé.

Tableau 2: Valeurs moyennes et écarts-types des vitesses acoustiques (v) mesurées dans les tissus osseux néoformés et matures.

	7 semaines		13 semaines	
	Néoformé	Mature	Néoformé	Mature
v (en m/s)	4966 ± 145	5305 ± 36	5030 ± 80	5360 ± 10

Le tableau 3 montre les différents résultats obtenus en ce qui concerne l'analyse statistique de la comparaison des variances entre les différents échantillons et les temps de cicatrisation. Les tests d'analyse de variance (ANOVA) révèlent des différences significatives à 7 semaines de cicatrisation pour la vitesse acoustique mesurée dans le tissu osseux néoformé par rapport au tissu osseux mature. Cette remarque est également valable lorsque l'os néoformé à 13 semaines de cicatrisation est comparé à l'os mature. Lorsque les données à 7 et 13 semaines sont rassemblées, l'ANOVA montre un effet significatif du temps de cicatrisation sur la vitesse acoustique. L'analyse Tukey-Kramer a révélé que les valeurs de la vitesse ultrasonore dans le tissu osseux nouvellement formé (7 et 13 semaines) étaient significativement différentes de celles du tissu osseux mature. Les valeurs de la vitesse des ultrasons du tissu osseux nouvellement formé à 7 semaines de temps de cicatrisation ne sont pas significativement différents de ceux à 13 semaines (voir tableau 4).

Tableau 3: P -value et F -statistique des tests ANOVA des vitesses acoustiques pour l'os néoformé (néo) et l'os mature (mature 7, respectivement mature 13) à 7 et respectivement 13 semaines de temps de cicatrisation.

Groupes comparés	Résultats ANOVA
néo 7 vs mature 7	$p=2,00*10^{-4}$ $F=30,86$
néo 13 vs mature 13	$p=1,53*10^{-5}$ $F=48,35$
néo 7 et 13 vs mature	$p=4,90*10^{-8}$ $F=38,2$

Tableau 4: P -value et F -statistique des tests ANOVA des vitesses acoustiques pour l'os néoformé (néo) et l'os mature (mature 7, respectivement mature 13) à 7 et respectivement 13 semaines de temps de cicatrisation.

Différence de v entre les différents temps de cicatrisation	Différence		
	moyenne	Borne inférieure	Borne supérieure
7 vs mature	357,1	240,0	474,3
13 vs mature	292,9	192,9	392,8
7vs 13	64,2	-48,6	177,1

4 Discussion

L'originalité de cette étude est de combiner des mesures par diffusion micro-Brillouin et des analyses histologiques afin d'évaluer i) la différence de propriétés biomécaniques entre l'os nouvellement formée et mature autour d'un implant, ii) la dépendance des propriétés biomécaniques osseuses au temps de cicatrisation.

Les ordres de grandeur des valeurs de vitesse sont supérieures aux valeurs couramment observées en utilisant les techniques QUS dans la littérature, valeurs comprises entre 3300 m.s^{-1} et 4500 m.s^{-1} dans l'os bovin [16, 17], et entre 3000 m.s^{-1} et 4600 m.s^{-1} dans l'os humain [18-20]. La différence entre les valeurs obtenues avec les techniques classiques QUS et avec la diffusion micro-Brillouin peut s'expliquer par la dispersion de vitesse, puisque les mesures ont été réalisées à des fréquences significativement différentes (mégahertz et gigahertz respectivement). Cette dispersion a été mis en évidence par notre groupe et a une valeur moyenne de $7 \text{ m.s}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$ [21]. En outre, le diamètre du faisceau de l'appareil de diffusion micro-Brillouin utilisé est d'environ $10 \mu\text{m}$, tandis que le diamètre du faisceau du QUS conventionnels est de l'ordre du millimètre.

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent s'expliquer par l'évolution de la minéralisation et l'évolution de la microstructure de l'os en fonction du temps de cicatrisation. L'observation histologique utilisée dans cette étude permet la détermination qualitative de la différence en termes de degré de minéralisation du tissu osseux en comparant la différence de luminosité apparente [22]. Un tissu minéralisé (tissu osseux mature) paraît plus sombre qu'un tissu moins minéralisé (tissu osseux néoformé). La figure 2 montre que l'écart de $200 \mu\text{m}$ d'épaisseur sous l'implant a été rempli par un tissu osseux formé après l'opération. Il apparaît plus brillant que l'os environnant l'implant, c'est à dire l'os mature. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec des études précédentes et montrent une augmentation des constantes élastiques et donc des vitesses de propagation des ondes acoustiques en fonction du degré de minéralisation du tissu osseux [23-25].

Cette étude comporte plusieurs limitations. Tout d'abord, deux échantillons seulement ont été considérés en raison de la complexité de la procédure chirurgicale, ce qui rend impossible d'estimer précisément la dispersion des valeurs des propriétés mécaniques expérimentales. Par conséquent, une attention particulière est nécessaire pour l'interprétation des valeurs de ces paramètres estimés avec notre méthode. Toutefois, il est important de souligner que la présente étude compare les propriétés biomécaniques du tissu osseux néoformé et mature plutôt que de fournir des mesures absolues. Pour des temps de cicatrisation inférieurs à 7 semaines, il n'est pas possible de mesurer une valeur

similaire par diffusion micro-Brillouin en raison de la faible quantité relative de tissu osseux disponible. D'autres régions comportant de l'os néoformé ont été mesurées, mais ces valeurs ne peuvent être comparées (régions anatomiques différentes, non présence de titane à proximité de l'os mesuré).

Enfin, le modèle d'implant en forme de pastille utilisé ici n'est pas représentatif de la situation clinique, car l'implant n'est soumis à aucune charge (hormis la force de maintien produite par les élastiques orthodontiques). Par conséquent, le tissu autour de l'implant manque de stimulation mécanique survenant dans le cas d'un implant en charge. Ce manque de stimulation mécanique peut provoquer une réaction de cicatrisation différente de la situation en charge.

5 Conclusion

Un dispositif de diffusion micro-Brillouin a été utilisé pour mesurer les vitesses acoustiques dans le tissu osseux mature et nouvellement formé, montrant un effet significatif sur le temps de cicatrisation. Cette étude confirme le potentiel de la technique de diffusion micro-Brillouin pour l'évaluation des propriétés osseuses à l'échelle du micromètre et donne un meilleur aperçu sur l'évolution des propriétés biomécaniques du tissu osseux nouvellement formé en fonction du temps de cicatrisation. Les résultats mènent à une meilleure compréhension de l'évolution clinique de l'implant en titane après la chirurgie et permet d'évaluer les propriétés mécaniques au cours de la cicatrisation. Ces données pourront être utilisées comme paramètres dans les simulations numériques.

Remerciements

Ce travail est supporté par l'Agence National de la recherche (ANR) via le programme EMERGENCE (projet Wawalimplant n°ANR-11-EMMA-039).

Références

- [1] Albrektsson, T., Dahl, E., Enbom, L., Engevall, S., Engquist, B., Eriksson, A. R., Feldmann, G., Freiberg, N., Glantz, P. O., and Kjellman, O., 1988, "Osseointegrated oral implants. A Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants," *J Periodontol*, 59(5), pp. 287-296.
- [2] Mathieu, V., Vayron, R., Richard, G., Lambert, G., Naili, S., Meningaud, J. P., and G., H., 2014, "Biomechanical determinants of the stability of dental implants: influence of the bone-implant interface properties," *J. Biomech.*, 47, pp. 3-13.
- [3] Haiat, G., Wang, H. L., and Brunski, J. B., In press, "Effects of biomechanical properties of the bone-implant interface on dental implant stability: from in silico approaches to the patient's mouth," *Annu Rev Biomed Eng.*
- [4] Damzen, M. J., Vlad, V. I., Babin, V., and Mocofanescu, A., 2003, *Stimulated Brillouin Scattering: Fundamentals and Applications*, IOP Publishing, London.

- [5] Mathieu, V., Fukui, K., Matsukawa, M., Kawabe, M., Vayron, R., Soffer, E., Anagnostou, F., and Haiat, G., 2011, "Micro-Brillouin scattering measurements in mature and newly formed bone tissue surrounding an implant," *J Biomech Eng-T Asme*, 133(2), pp. 021006-021006.
- [6] Wennerberg, A., and Albrektsson, T., 2000, "Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 15(3), pp. 331-344.
- [7] Viceconti, M., Monti, L., Muccini, R., Bernakiewicz, M., and Toni, A., 2001, "Even a thin layer of soft tissue may compromise the primary stability of cementless hip stems," *Clinical Biomechanics*, 16(9), pp. 765-775.
- [8] Viceconti, M., Brusi, G., Pancanti, A., and Cristofolini, L., 2006, "Primary stability of an anatomical cementless hip stem: A statistical analysis," *J. Biomech.*, 39(7), pp. 1169-1179.
- [9] Ronold, H. J., and Ellingsen, J. E., 2002, "The use of a coin shaped implant for direct in situ measurement of attachment strength for osseointegrating biomaterial surfaces," *Biomaterials*, 23(10), pp. 2201-2209.
- [10] Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., Bierling, P., Hernigou, P., Layrolle, P., and Rouard, H., 2009, "Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate," *Biomaterials*, 31(2), pp. 270-278.
- [11] Soffer, E., Ouhayoun, J. P., Meunier, A., and Anagnostou, F., 2006, "Effects of autologous platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: The role of anatomical sites," *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 79B(1), pp. 86-94.
- [12] Sandercock, J. R., 1982, Trends in Brillouin-scattering - Studies of opaque materials, supported films, and central modes, in: M. Cardona, G. Guntherodt (Eds.), *Light scattering in solids III. Recent Results.*, Springer, Berlin.
- [13] Sakamoto, M., Kawabe, M., Matsukawa, M., Koizumi, N., and Ohtori, N., 2008, "Measurement of Wave Velocity in Bovine Bone Tissue by Micro-Brillouin Scattering," *Japanese Journal of Applied Physics*, 47(5), pp. 4205-4208.
- [14] Kruger, J. K., Embs, J., Brierley, J., and Jimenez, R., 1998, "A new Brillouin scattering technique for the investigation of acoustic and opto-acoustic properties: application to polymers," *J. Phys. D-Appl. Phys.*, 31(15), pp. 1913-1917.
- [15] Speziale, S., Jiang, F., Caylor, C. L., Kriminski, S., Zha, C. S., Thorne, R. E., and Duffy, T. S., 2003, "Sound velocity and elasticity of tetragonal lysozyme crystals by Brillouin spectroscopy," *Biophys. J.*, 85(5), pp. 3202-3213.
- [16] Lees, S., and Klopholz, D. Z., 1992, "Sonic Velocity and Attenuation in Wet Compact Cow Femur for the Frequency-Range 5 to 100 Mhz," *Ultrasound Med. Biol.*, 18(3), pp. 303-308.
- [17] Yamato, Y., Matsukawa, M., Otani, T., Yamazaki, K., and Nagano, A., 2006, "Distribution of longitudinal wave properties in bovine cortical bone in vitro," *Ultrasonics*, 44, pp. E233-E237.
- [18] Bensamoun, S., Tho, M. C. H., Luu, S., Gherbezza, J. M., and de Belleval, J. F., 2004, "Spatial distribution of acoustic and elastic properties of human femoral cortical bone," *J. Biomech.*, 37(4), pp. 503-510.
- [19] Laugier, P., and Haiat, G., 2010, *Bone quantitative Ultrasound*, Springer.
- [20] Mathieu, V., Vayron, R., Soffer, E., Anagnostou, F., and Haiat, G., 2012, "Influence of healing time on the ultrasonic response of the bone-implant interface," *Ultrasound Med Biol*, 38(4), pp. 611-618.
- [21] Haiat, G., Sasso, M., Naili, S., and Matsukawa, M., 2008, "Ultrasonic velocity dispersion in bovine cortical bone: An experimental study," *J. Acoust. Soc. Am.*, 124(3), pp. 1811-1821.
- [22] Artzi, Z., Givol, N., Rohrer, M. D., Nemcovsky, C. E., Prasad, H. S., and Tal, H., 2003, "Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 2: Morphometric analysis," *Journal of Periodontology*, 74(8), pp. 1153-1160.
- [23] Sansalone, V., Naili, S., Bousson, V., Bergot, C., Peyrin, F., Zarka, J., Laredo, J. D., and Haiat, G., 2010, "Determination of the heterogeneous anisotropic elastic properties of human femoral bone: From nanoscopic to organ scale," *J. Biomech.*, 43(10), pp. 1857-1863.
- [24] Sansalone, V., Bousson, V., Naili, S., Bergot, C., Peyrin, F., Laredo, J. D., and Haiat, G., 2012, "Anatomical distribution of the degree of mineralization of bone tissue in human femoral neck: Impact on biomechanical properties," *Bone*, 50(4), pp. 876-884.
- [25] Hodgskinson, R., Currey, J. D., and Evans, G. P., 1989, "Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone," *J Orthop Res*, 7(5), pp. 754-758.