

COUPLAGE PORO-MÉCANIQUE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES, EXPÉRIMENTATION SUR L'ANNULUS FIBROSUS

Dominique Ambard, Fabien Cherblanc, Pascale Royer
Laboratoire de Mécanique et Génie Civil, UMR-CNRS-UM, Université de Montpellier
163 rue Auguste Broussonnet, 34 090 Montpellier
Téléphone : 04 67 14 46 80, Télécopie : 04 67 14 39 23
Adresse(s) électronique(s) : dominique.ambard@univ-montp2.fr

Adrien Baldit
LaPDM, UMR-ENIM-UPVM, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Metz
1 route d'Ars Laquenexy, 57078 Metz Cedex 3
Téléphone : 03 87 79 66 64, Télécopie : 03 87 34 42 79
Adresse(s) électronique(s) : a.baldit@enim.fr

Mots clés : poro-mécanique, expérimental, biomécanique, annulus fibrosus, osmose, corrélation image

1 INTRODUCTION

L'annulus fibrosus est un tissu cartilagineux fibreux, qui composent la partie externe des disques intervertébraux, il est assimilé à un cartilage hyalin (Nerurkar et al., 2010) constitué de 60 à 85% d'eau (Acaroglu et al., 1995; Rannou et al., 2004). Sa masse sèche se répartit entre 10 et 20% de molécules de protéoglycanes, principalement dans la partie interne (Rannou et al., 2000), 65 à 70% de collagène orienté et le reste sont des molécules minoritaires et des cellules.

1.1 Échelle microscopique

Avec 6000 *cellules/mm*³, le disque intervertébral contient relativement peu de cellules par rapport aux cartilages articulaires. En terme d'espace, les cellules représentent 1% du volume total et sont réparties en fonction des régions avec : environ 3000 *cellules/mm*³ dans le nucleus et 9000 *cellules/mm*³ dans l'annulus (Bibby et al., 2001; Rannou et al., 2000, 2004; Maroudas et al., 1975).

La population cellulaire est dominée par deux types :

- Les **fibroblastes**, à l'origine de la production du collagène de type *I*, sont essentiellement dans la partie extérieure de l'annulus fibrosus (Bibby et al., 2001).
- Les **chondrocytes**, produisant les protéoglycanes et le collagène de type *II*, se trouvent dans tous les éléments du disque.

Ces cellules contribuent à l'homéostasie du tissu en produisant la matrice extra cellulaire constituée principalement de deux types de molécules :

- Les **collagènes** qui représentent de 44 à 51% de la masse sèche du disque (Kraemer, 2009) se répartissent différemment en fonction des zones. Dans l'annulus,

les collagènes sont de type *I, II, III, V, VI, IX* et *XI*, avec une prédominance du type *I*. Ces fibres de collagènes définissent la micro-structure du disque avec des longueurs de 10 à 100 μm et des diamètres compris entre 100 et 200 nm (Rannou et al., 2004; Inoue, 1981).

- Les **protéoglycanes**, à l'origine de l'hydratation du disque, sont regroupés, pour la plupart, en macro-agrégat représentant de 5 à 15% du poids sec de l'annulus fibrosus (Bibby et al., 2001). Ces molécules ont la particularité d'être chargées négativement et enchevêtrée dans les fibres de collagènes. Elles permettent ainsi de conserver une hydratation relativement constante du disque par des effets osmotiques.

1.2 Échelle mésoscopique

Une analyse histologique de ce tissu biologique révèle la structure mésoscopique de l'annulus fibrosus. En effet, la coloration au *Trichrome de Masson* révèle en bleu les fibres de collagène et l'élastine (Figure 1a) et confirme la constitution principalement collagénique d'un échantillon d'annulus fibrosus porcin (6 mois). Cette analyse montre une constitution lamellaire dans la direction radiale du tissu à l'échelle millimétrique qui forme des couches de lamelles concentriques de l'annulus fibrosus.

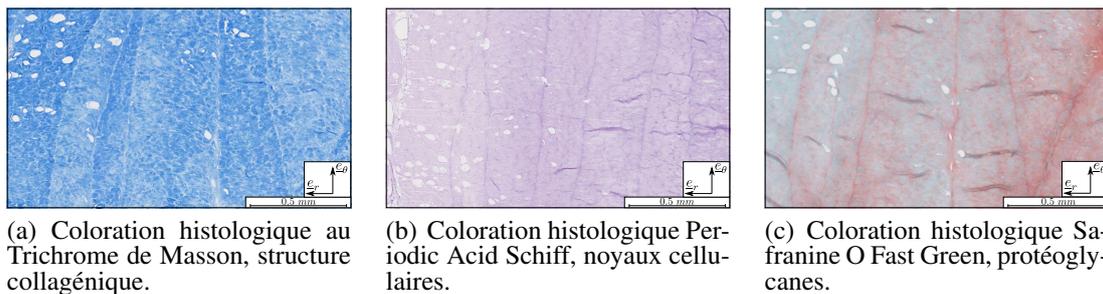


FIGURE 1 – Analyse histologique de la constitution de l'annulus fibrosus de porc.

A l'aide d'une coloration *Periodic Acid Schiff*, l'analyse histologique présente en mauve les polysaccharides faisant ressortir les noyaux cellulaires (Figure 1b). Ces cellules sont les points entourés d'un cercle qui représente respectivement le noyau et la membrane. Celles-ci sont relativement dispersées dans le tissu, mais des fortes concentrations apparaissent aux interfaces entre les lamelles et proches des vaisseaux lymphatiques représentés par les gros vides sur le côté gauche des images (Figures 1a à 1c) (Roberts et al., 2000).

Enfin, l'utilisation du colorant *Safranine O Fast Green* met en évidence la présence de protéoglycanes avec une couleur orangée. Un gradient positif est observé de gauche à droite de la figure 1c. Cette observation confirme une moindre concentration de protéoglycanes à l'extérieur du disque où les cellules chondrocytes sont minoritaires. De plus, la démarcation entre les lamelles apparaît avec cette coloration révélant une quantité plus importante de protéoglycanes aux interfaces en accord avec la localisation des cellules observée précédemment (Figures 1b).

1.3 Constituants et rôle biomécanique

La constitution biologique de l'annulus fibrosus suggère que le rôle de soutien structurel est réalisé en priorité par les fibres de collagène organisé en lamelle concentrique alternativement fibré. Cette disposition s'apparente à un matériau composite stratifié de manière concentrique dont l'angle des fibres par rapport au plan transverse varie de 45° à l'intérieur jusqu'à 25° à l'extérieur de l'annulus fibrosus (Noailly et al., 2005; Argoubi and Shirazi-Adl, 1996; Shirazi-Adl et al., 1986, 2010; Eberlein et al., 2001; Ferguson et al., 2004; Guerin and Elliott, 2006). Cette structuration des fibres de collagène confère au disque intervertébral ces caractéristiques de flexibilité. L'application d'une méthode d'homogénéisation des composites stratifiés à fibres longues (Elliott and Setton, 2001; Yin and Elliott, 2005) montre un comportement anisotrope et hétérogène (Skaggs et al., 1994). Elliott and Setton (2001) quantifient les coefficients de Poisson $\nu_{\theta z} = 1.8 \pm 1.4$ et $\nu_{\theta r} = 0.6 \pm 0.7$, coefficient de poisson supérieur à l'unité que l'on retrouve dans les structures à fibres longues orientées.

Les effets fortement non-linéaire rigidifiant des tissus collagéniques (Holzapfel et al., 2005) peuvent être décrits, à l'échelle méso-scopique, par deux mécanismes certainement concomitant. Dans l'état libre de contrainte, une fraction des fibres de collagène ne seraient pas tendues. Ces fibres détendues vont alors se tendre au fur et à mesure de la déformation et ainsi contribué à l'effet non linéaire (Cacho et al., 2007; Pezowicz et al., 2005). La seconde explication de cette non-linéarité peut s'expliquer par la réorientation des fibres dans la direction du chargement, cet effet se révèle maximal pour des angles des fibres par rapport à la direction de tension situé autour de 30° dans le cas de l'annulus fibrosus (Ambard and Cherblanc, 2009; Guerin and Elliott, 2006).

La composition essentiellement hydrique de ce tissu biologique suggère que la phase liquide joue un rôle extrêmement important, outre son rôle de réserve et chemin de molécule nutritive (Ferguson et al., 2004; Accadbled et al., 2008; Magnier et al., 2009), elle a un rôle de dissipation énergétique et contribue ainsi au rôle d'amortissement du disque intervertébral. Même si les fibres de collagènes seules peuvent dissipées une énergie mécanique du fait de leur comportement visco-élastique (Holzapfel, 2006), la majeure partie de la dissipation mécanique lors des cycles de chargement décharge subit par les disques intervertébraux est réalisé par l'interaction de la phase liquide qui filtre dans la matrice fibreuse.

Le dernier composant du tissu sur lequel nous allons nous arrêter sont les protéoglycanes, ces molécules sont chargé négativement et par des effets osmotiques possèdent la propriété de retenir la phase aqueuse à l'intérieur du squelette poreux. L'effet osmotique résulte à l'échelle microscopique d'un équilibre électrique entre les charges positives et négatives fonction du PH et de la concentration en sel (NaCl) dissoute dans la phase aqueuse (Drost et al., 1995; Gu et al., 1998; Frijns et al., 1997).

Afin d'obtenir cet équilibre électrique, entre les charges fixes des protéoglycanes et des ions mobiles présent dans la phase aqueuse, le solvant liquide est attiré afin de diluer ou concentré les concentrations des charges positives et négatives (Huyghe and Janssen, 1997; Mow et al., 1998). Sous un chargement chimique, une modification du PH ou de la concentration en sel, l'état macroscopique évolue et le tissu biologique voit sa porosité modifiée. Si l'on considère que cette modification passe par une suite d'état d'équilibre électrique à l'échelle microscopique, les modèles quadri-phasique se réduise au modèle bi-phasique en introduisant un terme de pression osmotique (Wilson et al., 2005).

1.4 Une méthode de mesure

La plupart des comparaisons entre expérimentation et modèle bi-phasique avec pression osmotique sont effectués sur un test de compression confiné avec changement de concentration saline (Frijns et al., 1997; Yao et al., 2002). L'accord entre les simulations et les expériences est relativement correct au vu de la complexité du modèle et des expériences.

Toutefois, nous pensons que le test de compression confiné ne peut exacerber toute la physique de l'annulus fibrosus. En effet, seule une mesure, certes temporelle, de la force de compression ne peut faire ressortir le comportement anisotrope de l'annulus fibrosus et son couplage avec la phase fluide et la composante osmotique.

Pour remédier à cette absence, nous nous sommes efforcés de réaliser un test de traction uni-axiale dans la direction circonférentielle du disque intervertébral. Tout en ayant un essai mécanique relativement simple à mettre en place, nous nous approchons ainsi d'une sollicitation physiologique de l'annulus fibrosus situé dans la partie externe du disque intervertébral. En effet, sous un chargement de compression, le nucléus pulposus, situé au centre du disque, monte fortement en pression et fait gonfler l'annulus fibrosus qui dans sa partie externe se retrouve en traction. Shirazi-Adl (1989) et Costi et al. (2007) ont montré que cette zone du disque est soumise à une déformation circonférentielle d'environ 10%.

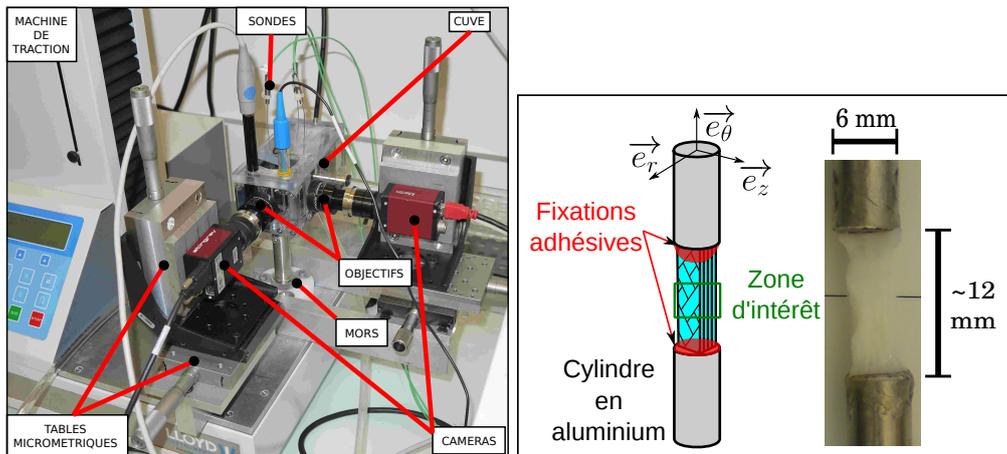
Pour capturer l'information anisotrope du comportement mécanique, nous utiliserons une mesure de déformation transversale à la direction de traction uni-axiale par une méthode de corrélation d'image. Pour capturer l'effet osmotique, nous solliciterons chimiquement l'éprouvette du tissu biologique en changeant la concentration saline extérieure.

2 MATÉRIELS et MÉTHODES

2.1 Le banc d'expérimentation

Une machine de traction uni-axiale équipée d'une cellule de force de 50 N (précision de ± 0.0025 N) a été adaptée pour des tests sur tissus biologiques. Deux caméras équipées d'objectifs de 28 mm ont été ajoutées sur le bâti de la machine pour pouvoir faire des acquisitions d'images dans les deux plans parallèles à l'axe de l'échantillon du tissu. Elles sont orientées perpendiculairement à la direction de sollicitation, e_θ , et permettent d'obtenir une résolution moyenne de $3.65 \mu\text{m}/\text{pix}$. Le réglage en position de la zone d'observation du tissu est réalisé par trois tables de déplacement micrométrique pour chaque caméra (Figure 2a).

Une enceinte étanche a été ajoutée pour contenir le bain physiologique (Figure 2a) et différentes sondes de mesure ont été disposées (une sonde pH , une sonde de conductivité et 3 thermocouples) donnant au cours de la durée de l'essai l'état de l'environnement du tissu. Pour réaliser les différents tests mécaniques, des disques intervertébraux porcins (5) et humains (3) sont disséqués pour obtenir des échantillons adaptés à la machine de traction.



(a) Banc d'expérimentation composé d'un bain thermostaté et contrôlé en PH et NaCl, de deux caméra et d'une machine de traction (b) Détail d'une éprouvette d'annulus fibrosus

FIGURE 2 – Banc d'expérimentation et éprouvette.

2.2 Les échantillons

Les segments de cochon, issus d'abattoir, ont été disséqués pour extraire les disques qui ont ensuite été divisés en quadrant : antérieurs, postérieurs et latéraux. Dans l'optique de développer une base de données humaines, des disques de femmes issus de dons à la science (moyenne d'âge : 81.2 ans) ont été utilisés. Ce matériel ne comprenait que des demi-disques (coté droit), l'autre moitié ayant été utilisée pour d'autres expérimentations (Follet et al., 2011).

Les expérimentations biomécaniques d'échantillons organiques demandent souvent beaucoup de temps. La conservation des tissus est donc une préoccupation majeure. On retrouve dans la littérature quelques publications concernant l'impact de la congélation des tissus sur leurs propriétés physiques et biologiques. Dès 1997, Bass et al. (1997) ont étudié l'impact d'une congélation à -20°C durant 3 semaines sur le comportement poro-mécanique de 16 segments vertébral de porc contrairement à l'étude réalisée par Gleizes et al. (1998) qui compare le comportement mécanique de 19 segments d'agneaux conservé durant 3 mois à -18°C . Cette dernière semble confirmé les travaux antérieurs de Hickey and Hukinsa (1979) qui n'observe pas de différence significative de la structure collagénique par diffraction aux rayons X entre des annulus fibrosus de lapin frais et ceux conservé à -35°C .

En effet, les tissus biologiques pauvres en cellules sont moins sensible à la congélation que ceux riches en cellules (système nerveux, muscles) Gleizes et al. (1998). Il semble que la congélation produise des dommages tissulaires soit directement par la formation de cristaux de glace, soit indirectement par la mort cellulaire (Tomford et al., 1984, 1985).

En ce qui concerne la décongélation, les auteurs pratiquent pour la plupart une décongélation rapide, dans une solution de Ringer. Pour nos essais, les échantillons ont été conditionnés après extraction dans des tubes à essai contenant une solution physiologique et

congelés individuellement à -12°C dans l'attente de l'essai hydro-chimio-mécanique puis décongelés rapidement dans une solution physiologique à 37°C .

L'échantillon est ensuite découpé pour obtenir une forme parallélépipédique privilégiant la direction circonférentielle. Les échantillons sont ensuite collés à des porte-échantillons cylindriques en aluminium (Figure 2b) pour ensuite être fixés à la machine de traction.

La fixation des tissus biologiques est un problème classique et récurrent étant donné la taille des échantillons, leur sensibilité biochimique et leur rareté. La colle cyano-acrylate donne de très bons résultats sur les tissus mous hydratés car elle polymérise très rapidement malgré la présence d'eau (Ambard and Cherblanc, 2009; Fujita et al., 1997, 2000; Huyghe and Drost, 2004; Huyghe, 2010; Michalek et al., 2009, 2010; OConnell et al., 2012; Skaggs et al., 1994). Tout au long de cette préparation, l'échantillon baigne dans une solution physiologique ($[\text{NaCl}] = 0.15 \text{ mol.l}^{-1}$) pour éviter sa déshydratation. Au final, 19 éprouvettes de porc et 10 éprouvettes humaines ont pu être réalisées dont les dimensions sont une longueur $10 \pm 0.45 \text{ mm}$ et des largeurs $4 \pm 0.4 \text{ mm}$.

2.3 Le protocole hydro-chimio-mécanique

Pour pouvoir caractériser au mieux le comportement du tissu, les essais sont constitués d'une série de 6 étapes différentes. Ces tests sont réalisés dans une solution physiologique thermo-régulée ($[\text{NaCl}] = 9 \text{ g.L}^{-1}$ et $T = 37^{\circ}\text{C}$). Les déformations imposées au cours des tests sont de 10% car il s'agit du seuil physiologique maximal observé (Costi et al., 2007; Shirazi-Adl, 1989) à vitesse constante (0.01 mm.s^{-1}).

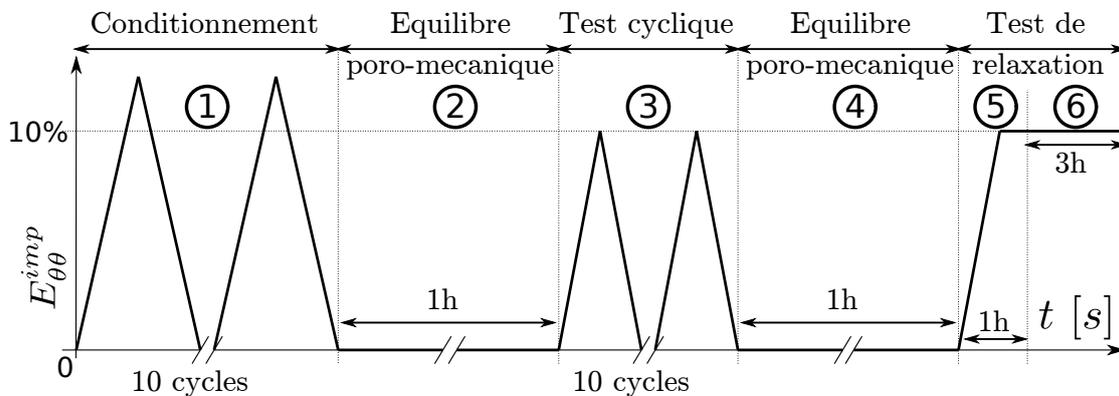


FIGURE 3 – Phases de chargement mécanique.

La première étape du protocole expérimental est une phase de conditionnement qui consiste en un chargement cyclique de 10 périodes avec des déformations imposées de $E_{max}^{condi} = 12\%$ comme l'illustre la phase 1 de la figure 3. L'intérêt de cette étape est de vérifier avant le test mécanique, la qualité du collage en chargement.

Il s'en suit un repos d'une heure (Figure 3 : phase 2) dans le bain thermo-régulé traduisant l'étape d'équilibrage poro-mécanique.

Enfin l'étape 3, de la figure 3, comprend 10 cycles de chargement à 10% de déformation au cours desquels des images sont acquises toutes les 4 secondes dans les deux plans transverses. La machine de traction étant pilotée en déplacement à vitesse constante (0.01 mm.s^{-1}), le taux de déformation est de l'ordre de 10^{-3} s^{-1} .

Une fois les cycles terminés, un nouvel équilibre poro-mécanique (Figure 3 : phase 4) est imposé pendant une heure avant la réalisation dans des conditions similaires aux tests précédents, une relaxation (Figure 3 : phase 6) d'une heure environ traduit la réponse du tissu pour un déplacement imposé. Il permet aussi d'obtenir un état d'équilibre et d'initialiser le test chimio-mécanique qui suit.

Une fois l'équilibre poro-mécanique établi par le test de relaxation sous tension, la sollicitation consiste à faire varier la concentration en sel, c_{ext} , de la solution imprégnant le tissu sur une période de trois heures environ (Figure 3 : phase 6) autour de la référence physiologique ($[NaCl] = 9 \text{ g.L}^{-1}$) entre 3 et 15 g.L^{-1} mettant en évidence la réponse du tissu aussi bien en force qu'en déformation.

3 RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats sont présentés en 3 étapes mettant en évidence successivement les résultats en efforts de traction uni-axiale lors des cycles, les déformations mesurées et pour finir la sensibilité chimique du matériau biologique. Concernant la précision de ces mesures, nous avons qualifié les mesures d'efforts et de déformation sur un suivi longitudinal de 48 heures qui a révélé une précision de mesure de $\Delta F = \pm 0.025 \text{ N}$ pour le capteur de force et une précision de mesure des déformations de $\Delta E = \pm 0.1 \%$.

3.1 Contrainte mécanique

La machine de traction pilotée en déplacement mesure des valeurs de force permettant de tracer les courbes classiques de contrainte (**Piola-Kirchhoff 1**)/déformation (Figure 4). Elles présentent un comportement non-linéaire avec un hystérésis non-négligeable lors des cycles de chargement. Au cours des cycles, la valeur maximale de la contrainte tend à diminuer et le comportement dissipatif, toujours présent, en fait de même comme l'illustre la figure 4. Au minimum cinq cycles sont nécessaires pour atteindre le régime permanent et obtenir un comportement relativement constant.

Ce processus d'accommodation au cours des cycles (Figure 4) est habituellement associé à un mécanisme de dissipation au cours des cycles et peut être représenté par l'indicateur, défini par :

$$E_d = \frac{1}{V} \int_{cycle} \sigma_{\theta\theta} dE_{\theta\theta} \quad (1)$$

Pour tenir compte de la variabilité des dimensions des éprouvettes, l'énergie est normalisée par le volume (Équation 1). En moyenne, à l'échelle des deux groupes d'échantillons, l'énergie volumique dissipée décroît au fur et à mesure des cycles mettant en évidence une phase de transition sur 5 cycles environ.

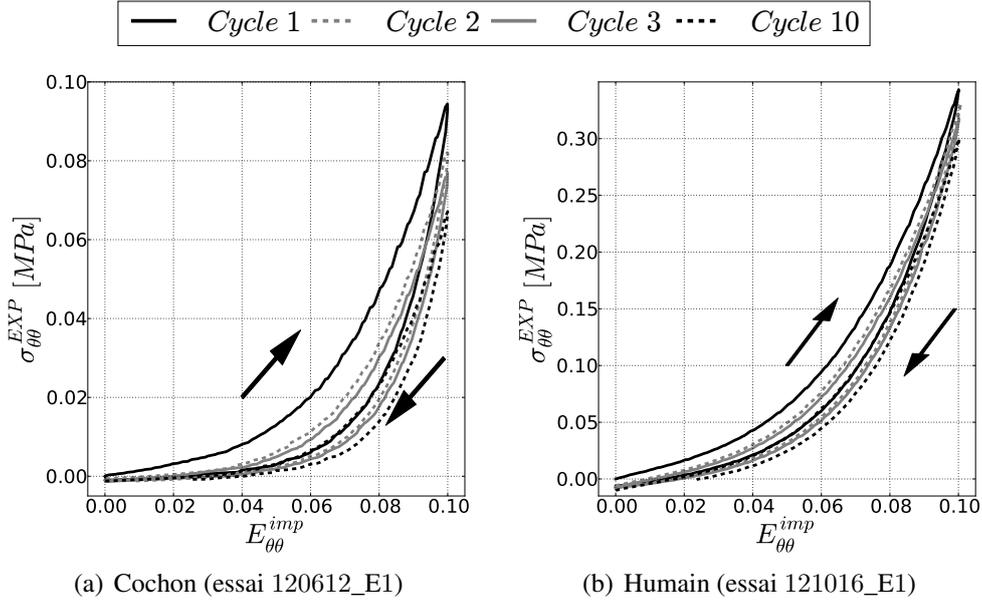


FIGURE 4 – Accommodation sur les trois premiers cycles ainsi que le dernier.

L'énergie dissipée par le tissu humain est légèrement plus importante que chez le cochon mais l'ordre de grandeur est identique en régime permanent $E_d \approx 4 \times 10^{-4} J.mm^{-3}$ et l'amplitude de diminution entre le premier et le dernier cycle est similaire $\Delta E_d \approx 7 \times 10^{-4} J.mm^{-3}$.

3.2 Déformations transversales locales

Les champs de déformations obtenus dans les deux plans transverses sont présentés sur les figures 5. Le principe est de déterminer la correspondance d'une image non déformée à une déformée pour en extraire le déplacement. Le tenseur des déformations, $\underline{\underline{E}}$, est alors calculé à partir du déplacement par la formulation de Green-Lagrange défini par :

$$\underline{\underline{E}} = \frac{1}{2} (\underline{\underline{\nabla u}}^T + \underline{\underline{\nabla u}} + \underline{\underline{\nabla u}}^T \cdot \underline{\underline{\nabla u}}) \quad (2)$$

où u est le déplacement local.

Lorsque des méthodes de corrélation d'images sont utilisées, le contraste des images est généralement augmenté artificiellement en utilisant des projections de peinture (Han et al., 2012) ou un seuillage des niveaux de gris (Guerin and Elliott, 2006, 2007). Ces techniques permettent d'obtenir des images avec des motifs contrastés et aléatoires. L'utilisation d'un mouchetis reste délicate sur des tissus biologiques immergés dans une solution physiologique.

La déformation transverse E_{rr} dans le plan des lamelles, est donné sur la figures 5. Le tissu se contracte globalement dans la direction e_{zz} lors du chargement alors que dans le plan des lamelles, le champs de déformations radiales (Figure 5) révèle clairement

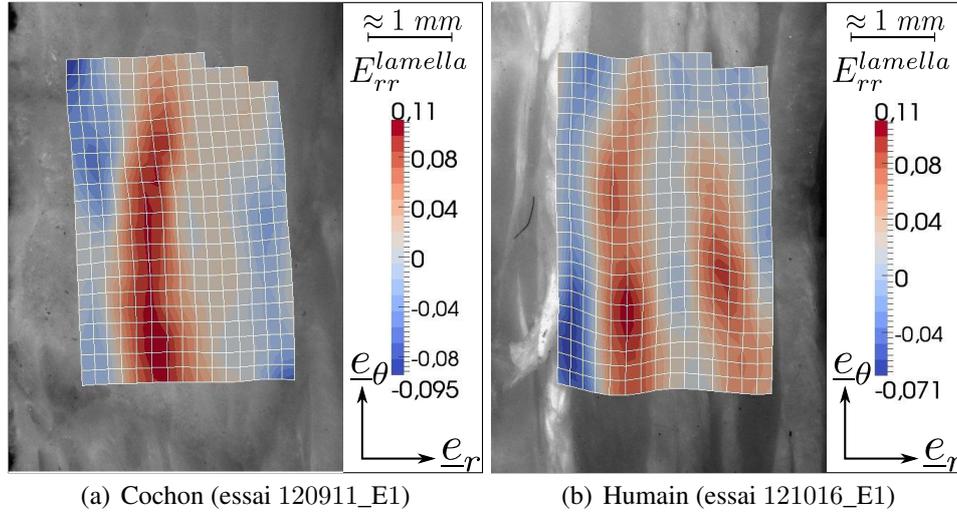


FIGURE 5 – Champs de déformations dans la direction radiale pour une déformation macroscopique imposée de 10%.

des bandes verticales de gonflement ou de moindre compression proches du centre de l'éprouvette chez le cochon et localisées sur des lamelles chez l'humain.

3.3 Contrainte d'origine ionique

Lors d'une sollicitations chimiques, le tissu contenant des charges fixes trouve un nouvel état d'équilibre électro-chimique. La matrice solide est alors sollicitée entraînant des variations de contraintes et de déformations. Les temps caractéristiques de ces phases de transition sont longs par rapport à ceux de la relaxation poro-mécanique et en accord avec les valeurs de la littérature (Frijns et al., 1997; Huyghe, 2010; Drost et al., 1995). On note un sensibilité accrue des tissus humains à ce type de sollicitation.

Sur la courbe de contrainte en fonction du temps (figure 6), il apparaît clairement que dans une solution hypotonique ($c_{ext} = 3 \text{ g.L}^{-1}$) la contrainte circonférentielle, $\sigma_{\theta\theta}$, augmente et diminue pour une solution hypertonique ($c_{ext} = 15 \text{ g.L}^{-1}$).

Les amplitudes de forces dues aux sollicitations chimiques sont de l'ordre de 22% de la contrainte d'origine mécanique maximale avec un intervalle de confiance de 7% sur les 10 spécimens de tissus humains. L'influence de l'environnement est perceptible aussi bien en contrainte qu'en déformations transverses. Pour des concentrations hypotoniques le tissu tend à gonfler dans le plan des lamelles et implique des déformations radiale E_{rr} de l'ordre de 0.5% pour le cochon et 5% pour les tissus humains.

4 CONCLUSION

Les phénomènes de couplage hydro-chimio-mécanique observés apparaissent dans la plupart des tissus biologiques lorsque le protocole expérimental tient compte de la phase fluide. C'est à dire que les taux de déformation appliqués aux échantillons permettent au fluide de se situer entre une situation drainée et non drainée (Coussy, 2004). Ainsi,

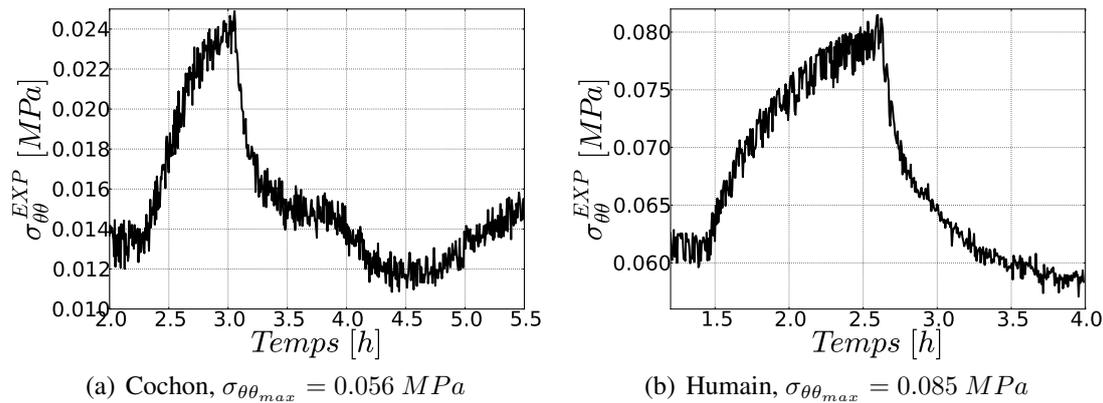


FIGURE 6 – Contrainte circonférentielle en fonction du temps au cours des variations d’environnement hypotonique ($c_{ext} = 3 \text{ g.L}^{-1}$).

des tissus tels que les cartilages, les ligaments, les anévrismes, le tissu du col de l’utérus (Ambard and Cherblanc, 2009; Baldit et al., 2012; Tower et al., 2002; Andarawis-Puri et al., 2012; Costalat et al., 2011; Myers et al., 2010) présentent ce type de comportement qui n’est pas directement lié à la fonction du matériau dans l’organisme mais plutôt à sa constitution même qui contient au moins 50% de fluide.

Ces observations signifient que, dans le cadre expérimental de caractérisation des propriétés des tissus biologiques utilisant classiquement les données de contraintes associé à une méthode inverse, les variabilités intrinsèques des paramètres matériaux peuvent être artificiellement augmenté. Dans ce cadre, la moyenne des déformations transverses du plan des lamelles représente une alternative pour identifier, par une méthode inverse, les paramètres matériaux de la structure fibreuse dans une situation proche d’une situation physiologique sur un essai mécanique relativement simple à mettre en place comparativement à un essai mécanique multi-axial.

RÉFÉRENCES

- E.R. Acaroglu, J.C. Iatridis, L.A. Setton, R.J. Foster, V.C. Mow, and M. Weidenbaum. Degeneration and Aging Affect the Tensile Behavior of Human Lumbar Anulus Fibrosus. *Spine*, 20(24) :2690–2701, 1995.
- Franck Accadbled, Dominique Ambard, Jérôme Sales de Gauzy, and Pascal Swider. A measurement technique to evaluate the macroscopic permeability of the vertebral end-plate. *Med Eng Phys*, 30(1) :116–122, Jan 2008.
- D. Ambard and F. Cherblanc. Mechanical behavior of annulus fibrosus : a microstructural model of fibers reorientation. *Ann Biomed Eng*, 37(11) :2256–2265, Nov 2009.
- N. Andarawis-Puri, J.B. Sereysky, K.J. Jepsen, and E.L. Flatow. The relationships between cyclic fatigue loading, changes in initial mechanical properties, and the in vivo temporal mechanical response of the rat patellar tendon. *Journal of Biomechanics*, 45(1) :59 – 65, 2012.
- M. Argoubi and A. Shirazi-Adl. Poroelastic creep response analysis of a lumbar motion segment in compression. *Journal of Biomechanics*, 29(10) :1331 – 1339, 1996.

- A. Baldit, D. Ambard, F. Cherblanc, and P. Royer. Chemo-hydro-mechanical coupling in annulus fibrosus tissue. *Journal of Biomechanics*, 45, Supplement 1(0) :S155, 2012. Proceedings of ESB2012 - 18th Congress of the European Society of Biomechanics.
- E. Bass, N. A. Duncan, J. S. Hariharan, J. B. Dusick, and U. H. Bueff and J. C. Lotz. Frozen storage affects the compressive creep behavior of the porcine intervertebral disc. *Spine*, 22(24) :2867–2876, 1997.
- S.R.S. Bibby, D.A. Jones, R.B. Lee, J. Yu, and J.P.G. Urban. Biochimie, biologie et physiologie du disque intervertébral. *Rev Rhum [Éd Fr]*, 68 :903–907, 2001.
- F. Cacho, P.J. Elbischger, J.F. Rodríguez, M. Doblaré, and G.A. Holzapfel. A constitutive model for fibrous tissues considering collagen fiber crimp. *International Journal of Non-Linear Mechanics*, 42(2) :391 – 402, 2007.
- V. Costalat, M. Sanchez, D. Ambard, L. Thines, N. Lonjon, F. Nicoud, H. Brunel, J.P. Lejeune, H. Dufour, P. Bouillot, J.P. Lhaldky, K. Kouri, F. Segnarbieux, C.A. Maurage, K. Lobotesis, M.C. Villa-Uriol, C. Zhang, A.F. Frangi, G. Mercier, A. Bonafé, L. Sarry, and F. Jourdan. Biomechanical wall properties of human intracranial aneurysms resected following surgical clipping (irras project). *Journal of Biomechanics*, 44(15) :2685 – 2691, 2011.
- J.J. Costi, I.A. Stokes, M. Gardner-Morse, J.P. Laible, H.M. Scoffone, and J.C. Iatridis. Direct measurement of intervertebral disc maximum shear strain in six degrees of freedom : motions that place disc tissue at risk of injury. *J Biomech*, 40(11) :2457–2466, 2007.
- O. Coussy. *Poromechanics*. John Wiley & Sons, 2004.
- M.R. Drost, P. Willems, H. Snijders, J.M. Huyghe, J.D. Janssen, and A. Huson. Confined compression of canine annulus fibrosus under chemical and mechanical loading. *Journal of biomechanical engineering*, Nov 1995.
- R. Eberlein, G.A. Holzapfel, and C.A.J. Schulze-Bauer. An anisotropic model for annulus tissue and enhanced finite element analyses of intact lumbar disc bodies. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 4(3) :209–229, 2001.
- D.M. Elliott and L.A. Setton. Anisotropic and inhomogeneous tensile behavior of the human annulus fibrosus : experimental measurement and material model predictions. *Journal of Biomechanical Engineering*, 123 :256–63, 2001.
- S.J. Ferguson, K. Ito, and L.P. Nolte. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc. *J Biomech*, 37(2) :213–221, Feb 2004.
- H. Follet, S. Viguier-Carrin, B. Burt-Pichat, B. Dépalle, Y. Bala, E. Gineyts, F. Munoz, M. Arlot, G. Boivin, R.D. Chapurlat, P.D. Delmas, and M.L. Bouxsein. Effects of preexisting microdamage, collagen cross-links, degree of mineralization, age, and architecture on compressive mechanical properties of elderly human vertebral trabecular bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(4) :481–488, 2011.
- A.J.H. Frijns, J.M. Huyghe, and J.D. Janssen. A validation of the quadriphasic mixture theory for intervertebral disc tissue. *International Journal of Engineering Science*, 35(15) :1419–1429, 1997.
- Y. Fujita, N.A. Duncan, and J.C. Lotz. Radial tensile properties of the lumbar annulus fibrosus are site and degeneration dependent. *Journal of Orthopaedic Research*, 15 : 814–819, 1997.
- Y. Fujita, D.R. Wagner, A.A. Biviji, N.A. Duncan, and J.C. Lotz. Anisotropic shear behavior of the annulus fibrosus : effect of harvest site and tissue prestrain. *Medical Engineering & Physics*, 22(5) :349 – 357, 2000.
- V. Gleizes, E. Viguier, J.M. Féron, S. Canivet, and F. Lavaste. Effects of freezing on the biomechanics of the intervertebral disc. *Surg Radiol Anat*, 20 :403–407, 1998.

- W.Y. Gu, W.M. Lai, and V.C. Mow. A mixture theory for charged-hydrated soft tissues containing multi-electrolytes : passive transport and swelling behaviors. *Journal of Biomechanical Engineering*, 120 :169–180, 1998.
- H.A.L. Guerin and D.M. Elliott. Degeneration affects the fiber reorientation of human annulus fibrosus under tensile load. *Journal of Biomechanics*, 39 :1410–1418, 2006.
- H.A.L. Guerin and D.M. Elliott. Quantifying the Contributions of Structure to Annulus Fibrosus Mechanical Function Using a Nonlinear, Anisotropic, Hyperelastic Model. *Journal Orthopaedic Research*, 25 :508–516, 2007.
- W. Han, N. Nerurkar, L. Smith, N. Jacobs, R. Mauck, and D. Elliott. Multi-scale structural and tensile mechanical response of annulus fibrosus to osmotic loading. *Annals of Biomedical Engineering*, 40 :1610–1621, 2012.
- D. S. Hickey and D. W. L. Hukinsa. Effect of Methods of Preservation on the Arrangement of Collagen Fibrils in Connective Tissue Matrices : An X-Ray Diffraction Study of Annulus Fibrosus. *Connective Tissue Research*, 6 :223–228, 1979.
- G.A. Holzapfel. Determination of material models for arterial walls from uniaxial extension tests and histological structure. *Journal of Theoretical Biology*, 238(2) : 290–302, 2006.
- G.A. Holzapfel, C.A.J. Schulze-Bauer, G. Feigl, and P. Regitnig. Single lamellar mechanics of the human lumbar anulus fibrosus. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 3 :125–140, 2005. ISSN 1617-7959.
- J. M. Huyghe and J. D. Janssen. Quadriphasic mechanics of swelling incompressible porous media. *International Journal of Engineering Science*, 35(8) :793 – 802, 1997.
- J.M.R.J. Huyghe. Biaxial testing of canine annulus fibrosus tissue under changing salt concentration. *Ann. Braz. Ac. Sci.*, 82(1) :1–7, 2010.
- J.M.R.J. Huyghe and M. Drost. Uniaxial tensile testing of canine annulus fibrosus tissue under changing salt concentrations. *Biorheology*, 41 :255–261, 2004.
- H. Inoue. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*, 6(2) :139–146, 1981.
- J. Kraemer. *Intervertebral Disk Diseases : Causes, Diagnosis, Treatment and Prophylaxis*. Thieme, 3 edition, 2009.
- C. Magnier, O. Boiron, S. Wendling-Mansuy, P. Chabrand, and V. Deplano. Nutrient distribution and metabolism in the intervertebral disc in the unloaded state : a parametric study. *J Biomech*, 42(2) :100–108, Jan 2009.
- A. Maroudas, R.A. Stockwell, A. Nachemson, and J. Urban. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc : cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat*, 120(Pt 1) :113–130, Sep 1975.
- A.J. Michalek, M.R. Buckley, L.J. Bonassar, I. Cohen, and J.C. Iatridis. Measurement of local strains in intervertebral disc anulus fibrosus tissue under dynamic shear : Contributions of matrix fiber orientation and elastin content. *Journal of Biomechanics*, 42(14) :2279 – 2285, 2009.
- A.J. Michalek, M.R. Buckley, L.J. Bonassar, I. Cohen, and J.C. Iatridis. The effects of needle puncture injury on microscale shear strain in the intervertebral disc annulus fibrosus. *The Spine Journal*, 10(12) :1098 – 1105, 2010.
- V.C. Mow, G.A. Ateshian, W.M. Lai, and W.Y. Gu. Effects of fixed charges on the stress relaxation behavior of hydrated soft tissues in a confined compression problem. *International Journal of Solids and Structures*, 35(34-35) :4945 – 4962, 1998.
- K.M. Myers, S. Socrate, A. Paskaleva, and M. House. A study of the anisotropy and tension/compression behavior of human cervical tissue. *Journal of biomechanical engineering*, 132(2) :021003, Feb 2010.

- N. L. Nerurkar, D. M. Elliott, and R. L. Mauck. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *J Biomech*, 43(6) :1017–1030, Apr 2010.
- J. Noailly, D. Lacroix, and J.A. Planell. Finite element study of a novel intervertebral disc substitute. *Spine*, 30(20), 2005.
- G. OConnell, S. Sen, and D. Elliott. Human annulus fibrosus material properties from biaxial testing and constitutive modeling are altered with degeneration. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11 :493–503, 2012. ISSN 1617-7959.
- C. A. Pezowicz, P. A. Robertson, and N. D. Broom. Intralamellar relationships within the collagenous architecture of the annulus fibrosus imaged in its fully hydrated state. *Journal of Anatomy*, 207 :299 – 312, 2005.
- F. Rannou, S. Poiraudeau, M. Corvol, and M. Revel. Biochimie et biologie du disque intervertébral. *Rev Rhum [Éd Fr]*, 67suppl4 :214–216, 2000.
- F. Rannou, M.-A. Mayoux-Benhamou, S. Poiraudeau, and M. Revel. Anatomy, biology, physiology, and biomechanics of intervertebral disk and other anatomical structures of the lumbar spine. *EMC-Rhumathologie Orthopdie*, 1 :487–507, 2004.
- S. Roberts, M.-A. Mayoux-Benhamou, S. Poiraudeau, and M. Revel. Innervation du disque intervertébral et lombalgie discale. *Revue du rhumatisme*, 67 :225–231, 2000.
- A. Shirazi-Adl. Strain in fibers of a lumbar disc. analysis of the role of lifting in producing disc prolapse. *Spine (Phila Pa 1976)*, 14(1) :96–103, Jan 1989.
- A. Shirazi-Adl, A.M. Ahmed, and S.C. Shrivastava. Mechanical response of a lumbar motion segment in axial torque alone and combined with compression. *Spine*, 11 (9), sep 1986.
- A. Shirazi-Adl, M. Taheri, and J. P G Urban. Analysis of cell viability in intervertebral disc : Effect of endplate permeability on cell population. *J Biomech*, 43(7) :1330–1336, May 2010.
- D.L. Skaggs, M. Weidenbaum, J.C. Iatridis, A. Ratcliffe, and V.C. Mow. Regional variation in tensile properties and biochemical composition of the human lumbar annulus fibrosus. *Spine*, 19(12) :1310–1319, 1994.
- W. W. Tomford, G. R. Fredericks, and H. J. Mankin. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. *Journal of bone and joint surgery*, 66 :253–259, 1984.
- W. W. Tomford, G. P. Duff, and H. J. Mankin. Experimental freeze-preservation of chondrocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 197 :11–14, 1985.
- T. T. Tower, M. R. Neidert, and R. T. Tranquillo. Fiber alignment imaging during mechanical testing of soft tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 30 :1221–1233, 2002.
- W. Wilson, C. C. van Donkelaar, and J. M. Huyghe. A comparison between mechano-electrochemical and biphasic swelling theories for soft hydrated tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(1) :158–165, 2005.
- H. Yao, M.A. Justiz, D. Flagler, and W.Y Gu. Effects of Swelling Pressure and Hydraulic Permeability on Dynamic Compressive Behavior of Lumbar Annulus Fibrosus. *Annals of Biomedical Engineering*, 30 :1234–1241, 2002.
- L. Yin and D.M. Elliott. A homogenization model of the annulus fibrosus. *Journal of Biomechanics*, 38 :1674–1684, 2005.