



**HAL**  
open science

# Caractérisation structurale multi-échelle de l'os à l'état précoce de l'ostéosarcome et modélisation de la morphologie tumorale à l'état avancé : observations de l'activation tumorale dans l'ostéogénèse

Arnaud Bardouil

► **To cite this version:**

Arnaud Bardouil. Caractérisation structurale multi-échelle de l'os à l'état précoce de l'ostéosarcome et modélisation de la morphologie tumorale à l'état avancé : observations de l'activation tumorale dans l'ostéogénèse. Autre. Université Rennes 1, 2021. Français. NNT : 2021REN1S061 . tel-03533921

**HAL Id: tel-03533921**

**<https://theses.hal.science/tel-03533921>**

Submitted on 19 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 596

*Matière, Molécules, Matériaux*

Spécialité : Physique

Par

**Arnaud BARDOUIL**

**Caractérisation structurale multi-échelle de l'os à l'état précoce de l'ostéosarcome et modélisation de la morphologie tumorale à l'état avancé : Observations de l'activation tumorale dans l'ostéogénèse**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 21 octobre 2021

Unité de recherche : Institut de Physique de Rennes – CNRS UMR 6251

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Emilie POUGET      Chargée de recherche au CNRS, CBMN  
Aurélien GOURRIER      Chargé de recherche au CNRS, LIPhy

## **Composition du Jury :**

Examineurs :	Emilie POUGET	Chargée de recherche au CNRS, CBMN
	Aurélien GOURRIER	Chargé de recherche au CNRS, LIPhy
	Françoise REDINI	Directrice de recherche à l'INSERM, Faculté de Médecine de Nantes
	Nadine NASSIF	Directrice de recherche au CNRS, LCMCP
	Thomas BIZIEN	Scientifique de Ligne de Lumière, Synchrotron SOLEIL
	Human REZAEI	Directeur de recherche à l'INRAE, université Paris-Saclay

Dir. de thèse : Franck ARTZNER

Directeur de recherche au CNRS, IPR



# Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier Franck Artzner, mon maître de thèse pendant ces 5 (!) années de thèse passées à travailler ensemble et à passer outre mes idiosyncrasies pendant que je polissais ma personnalité. Je n'ai jamais cessé d'être admiratif de sa capacité à travailler sur une telle diversité de sujets, sa capacité d'engagement et sa formidable intuition et capacité à dégager le cœur du problème. Travailler à ses côtés a été un plaisir, je ne peux que souhaiter trouver moitié aussi bien là où je poursuivrai.

Mes remerciements vont également à Pascal Panizza, dont ma première impression d'enseignant en microfluidique engageant persiste encore à ce jour. Sans lui et sa formidable capacité humaine et générosité, je n'aurais jamais eu les opportunités et rencontres qui ont mené à cette thèse.

Je voudrais également remercier mon jury, son président, Human Rezaei, ses membres, Françoise Rédini, Nadine Nassif, Emilie Pouget, Thomas Bizien et Aurélien Gourrier, pour avoir accepté de juger une thèse faite de tellement d'éléments disparates. Vos commentaires et appréciations m'ont vraiment aidé à valider en moi la portée de mon travail. Une pensée pour mes deux rapporteurs Emilie Pouget et Aurélien Gourrier, qui ont dû absorber la totalité d'un manuscrit étalé sur des années et trois sujets vastement différents. Merci beaucoup pour vos retours, ils m'ont fait chaud au cœur.

Un grand merci à Françoise Rédini, d'avoir crû en se projet et aidé à faire de cette thèse ce qu'elle est devenue. D'avoir permis d'ouvrir l'étude de l'ostéosarcome par un laboratoire de physique et participé au projet avec enthousiasme. Merci aux membres de son équipe qui nous ont aidés, Jérôme Amiaud et Séverine Battaglia, pour les échantillons et les images de tomographie qui ont formé les briques essentielles de cette thèse.

Merci à Alain Fautrel, qui a participé en réalisant les coupes des échantillons nécessaires à nos études.

Merci à Nadine Nassif et sa thésarde Elora Bessot pour la coopération et participation dans l'étude Polscope du collagène en solution. Travailler avec vous fut un plaisir.

Merci beaucoup à Thomas Bizien, pour son aide au synchrotron et ces longues nuits passées sur la ligne SWING, pour l'accueil toujours chaleureux qu'il nous fait et l'intérêt qu'il porte à nos études.

Merci à Patrick Chasles et Eric Gicquel, pour leur plaisante coopération à la mise en œuvre des systèmes d'acquisition Polscope et appareil photo.

Merci à Jean-Benoît Le Cam, l'autre membre de mon Comité de Suivi Individuel de Doctorat avec Françoise pour son soutien et la validation des extensions de ma thèse.

Merci beaucoup à Nadia Halzoun et Charlène Hubert, mes collègues doctorantes auprès de Franck, arrivées après parties plus tôt. Plus jamais nos conversations animées sur les tables extérieures de l'IPR ne feront fermer de fenêtres.

Merci aux stagiaires qui ont participé à cette thèse, Yoann Jegat, Iman Almarouk, Karl Bourumeau, Pauline Thiébaud et Vincent Messaoui, que ce soit moi qui les aie encadrés ou pas. L'expérience fut toujours enrichissante et plaisante.

Merci à Jean-Charles Potier, avec qui j'ai partagé un bureau jusqu'au confinement en bon humour et bonne humeur.

Merci à Cristelle Mériadec, pour l'amitié que tu m'as témoigné et l'aide que tu as pu m'apporter pendant cette thèse, converser avec toi fut un réel plaisir.

Merci Nathalie Gicquiaux pour des années passées ensemble le midi, en simple amitié, que ce soit à répondre à des quizz de culture générale, simple discussion ou pour ces cafés littéraires tellement engageants (et intimes, avec des pics de fréquentation à 7 participants XD). Tu seras toujours pour moi « la femme qui murmurait à l'oreille des auteurs bretons de polar ».

Merci aussi à Nathalie Mabic, Valérie Ferri, Amandine Poirier et Bénédicte Faure, pour votre bienveillance lors de mes demandes d'aide pour des paperasses diverses et votre franche camaraderie.

Merci à Nolwenn Delouche, pour avoir supporté mes longues séances photos de mes trop nombreux chats errants, le fait que tu ne m'aies jamais envoyé paître est tout à ton crédit.

Un nouveau merci en particulier à Franck, Cristelle, Jean-Charles et Nathalie G. pour leur soutien moral pendant un second confinement absolument déprimant.

Enfin des remerciements à ma famille, mon père et ma mère qui m'ont si longtemps supporté dans mes études, et dont l'amour, avec celui de mon frère et ma sœur, est une chose merveilleuse. Merci à mes grands-parents paternels, votre soutien est inestimable et très patatesque, mais non, je ne peux toujours rien pour vos douleurs, c'est en physique que je suis docteur. Merci à mes proches en dehors du laboratoire et de la famille, Florian et Allison Rogowski, toujours une partie de plus, Zell Howard, une amitié fabuleuse sans qui je ne saurais imaginer la personne que je suis aujourd'hui, et Cyrille Lis, une amitié à tous crins par-delà les décennies.

Une dernière pensée pour Paulette Dumas, ma grand-mère maternelle décédée en quelques mois d'une leucémie très mal venue. Ces longues années à t'occuper de moi pendant mon Master à Bordeaux ont fini de faire de moi un docteur, et je ne regrette que trop que tu n'aies pas été là pour le voir. Mais les souvenirs que j'aie de toi me donneront toujours le sourire plutôt que les larmes.

# Avant-Propos

L'ostéosarcome constitue la principale tumeur primaire de l'os, un cancer qui affecte en majorité les populations jeunes et possède encore aujourd'hui un taux de mortalité à long terme après traitement de l'ordre de 30%. La tumeur se caractérise par une production osseuse sous la forme d'un réseau d'os qui supporte la progression des cellules cancéreuses. L'os est un tissu vivant, organisé sur plusieurs échelles d'observation, en constant remodelage par un ensemble de cellules spécialisées que la pathologie va détourner à son avantage.

Le matériel osseux ainsi produit présente une possibilité d'analyse par les méthodes de la physique des matériaux, et une approche d'une autre branche scientifique ouvre des opportunités pour aborder la question suivant des angles différents. Cette thèse est séparée en quatre parties, une première partie introductrice, et trois parties relatant différentes démarches mises en œuvre pour mettre en évidence les mécanismes de l'ostéosarcome à différentes échelles.

La première partie introductrice présente l'os, comment le tissu osseux vit, se remodèle et comment ses constituants sont organisés et assemblés en un matériau hiérarchique remarquable. Cette partie traite également de l'ostéosarcome, des chiffres de son incidence à un survol des mécanismes de son développement.

La seconde partie porte sur l'observation en microscopie à lumière polarisée de l'organisation du collagène à l'échelle microscopique. L'ostéosarcome produisant de grandes quantités d'os et d'une qualité particulière, il est essentiel de comprendre les mécanismes de la mise en place de la phase organique de collagène avant minéralisation qui peuvent donner les structures observées. Aussi avons-nous observé les structures obtenues par auto-organisation du collagène libre, en milieu osseux de dépôt lors de la fabrication, et en milieu microtexturé.

La troisième partie traite de l'étude à l'échelle nanoscopique par diffraction des rayons X et en microscopie d'échantillons d'os infectés aux temps courts. Les premiers instant du développement de l'ostéosarcome est un domaine encore peu étudié, et devraient permettre de percevoir les premiers effets de l'ostéosarcome sur la structure osseuse. La diffraction des rayons X nous permet d'obtenir de nombreuses mesures relatives à l'organisation nanoscopique de l'os, et donc d'identifier les plus petites variations sous l'action des cellules tumorales.

La quatrième partie cherche à reproduire par un automate cellulaire la structure macroscopique du réseau d'os produit par l'ostéosarcome, analysé à partir de tomographies. Nous appliquons des lois de propagations à notre automate cellulaire, une forme de simulation, dans le but de reproduire la structure osseuse pathologique, en espérant pouvoir par les lois de propagation employées remonter à une potentielle cause de l'action ostéogénitrice.



# **Table des matières**

---

## **Chapitre 1 : Introduction**

I.	Structures osseuses.....	2
A.	Généralités des os .....	2
1)	La diaphyse.....	3
2)	L'épiphyse .....	3
3)	La métaphyse.....	4
B.	Structure hiérarchique .....	4
C.	Os cortical .....	5
D.	Os trabéculaire .....	6
II.	Dynamique de l'os .....	8
A.	Modelage de l'os.....	8
B.	Remodelage de l'os.....	9
1)	Ostéoclastes :la résorption osseuse.....	10
2)	Ostéoblastes : la formation osseuse.....	10
3)	Ostéocytes : déclencheurs du remodelage osseux .....	11
C.	Résorption de fractures .....	12
III.	Structure nanoscopique de l'os .....	13
A.	Composition de l'os .....	13
B.	Organisation du collagène.....	14
1)	Structure de la fibrille de collagène.....	14
2)	Assemblage des fibres de collagène dans l'os.....	16
a)	Os cortical .....	16
b)	Os trabéculaire .....	17
c)	Cartilage de croissance .....	17
C.	Cristaux d'apatite.....	18
IV.	Ostéosarcome.....	18
A.	Les sarcomes.....	19
B.	Chiffres, incidence, population.....	19
C.	La pathologie .....	20
V.	Objectifs.....	21
VI.	Bibliographie.....	22

## Chapitre 2 : Microscopie en lumière polarisée du collagène et de l'os

I.	La lumière polarisée : principes d'interaction avec la matière et mesure.....	29
A.	Principes théoriques .....	30
1)	Polarisation et biréfringence.....	30
a)	Polarisation de la lumière.....	30
b)	Biréfringence.....	31
2)	Vecteurs de Stokes et matrices de Muller .....	32
a)	Vecteurs de Stokes.....	32
b)	Matrices de Mueller : principe et cas remarquables. ....	33
c)	Effet de l'orientation sur la matrice de Mueller.....	35
B.	Principes des mesures de polarisation.....	36
1)	Mesure en polarisation croisée .....	36
2)	Mesure en polscope .....	38
II.	Mise en oeuvre expérimentale d'un microscope à polarisation.....	41
A.	Éléments techniques des microscopes à polarisation.....	41
1)	Montage optique.....	41
2)	Fonctionnement des compensateurs à Cristaux Liquides.....	42
a)	Principe des compensateurs à cristaux liquides.....	42
b)	Système de contrôle en tension des compensateurs.....	42
3)	Caractérisation du système à triple compensateur cristaux liquides .....	43
a)	Réponse en tension du système compensateur cristaux liquides.....	43
b)	Réalisation des états de mesure.....	44
B.	Microscopie en lumière polarisée Polscope.....	45
C.	Microscopie en lumière polarisée croisée.....	46
III.	Observation des structures du collagène dans différents milieux.....	48
A.	Collagène : observation de différentes phases en microscopie optique à lumière polarisée ....	48
1)	Solution de collagène et conditions expérimentales.....	48
2)	Observation de la phase nématique .....	49
3)	Structure de domaines d'orientation en bandes.....	49
4)	Déformation de l'interface.....	51
5)	Cylindres de double twist .....	54
6)	Déformation de l'interface à cylindres twistés .....	55
7)	Domaines de fibres orientées en bandes.....	56
8)	Discussion.....	58
B.	Étude de structure de collagène transparente d'origine biologique .....	58

C.	Séchage de solution de collagène en milieu microtexturé.....	59
1)	Matériel et méthode .....	59
a)	Fabrication des moules .....	59
b)	Moulage des chambres microfluidiques en PDMS.....	61
c)	Diffusion séchage à travers le PDMS .....	61
2)	Direction d'orientation imposée par le flux.....	62
3)	Réseaux de défauts d'organisation du collagène.....	64
a)	Réseaux carrés .....	64
b)	Réseau hexagonal.....	66
4)	Conclusion.....	68
IV.	Étude de l'os en microscopie à lumière polarisée.....	68
A.	Observation de tranches d'os long.....	68
1)	Tibia de souris modèle.....	68
2)	Échantillons de souris : tibias infectés à l'ostéosarcome.....	70
B.	Interface de construction de l'os .....	71
1)	Interface de la structure osseuse .....	71
2)	Observations polscope de l'interface.....	72
3)	Modélisation azimuth/retardance du collagène déposé en interface .....	74
V.	Conclusion .....	76
VI.	Bibliographie.....	77

### Chapitre 3 : Etude à l'échelle nanoscopique de l'ostéosarcome aux temps courts

I.	Introduction.....	82
II.	Production des échantillons .....	82
A.	Protocole d'infection des souris.....	83
B.	Réalisation des coupes et choix des échantillons pour analyse SAXS .....	84
1)	Coupe des échantillons .....	84
2)	Choix des échantillons pour SAXS .....	84
III.	Observation macroscopique des échantillons .....	85
IV.	Principe et état de l'art analyse SAXS de l'os .....	87
A.	Concept de la diffraction des rayons X.....	87
1)	Interaction rayonnement-matière.....	87
2)	Diffraction des rayons X.....	88
3)	Diffusion des rayons X.....	90
a)	Facteur de forme .....	90
b)	Facteur de structure.....	91

4)	Interprétation des figures de diffraction des rayons X .....	91
B.	Fonctionnement de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL.....	92
1)	Synchrotron .....	92
a)	Accélérateur linéaire .....	93
b)	Booster .....	93
c)	Anneau de stockage .....	94
2)	Ligne SWING.....	95
a)	Traitement du rayonnement incident .....	95
b)	Système de mesure.....	95
C.	Signal du collagène de tendon .....	96
1)	Pics à 67nm du collagène .....	96
2)	Pic d'organisation latérale du collagène.....	96
D.	Signaux de l'os.....	97
1)	Phase organique de la matrice osseuse : le collagène.....	97
a)	Pic à 67 nm du collagène .....	97
b)	Pics d'organisation latérale du collagène.....	98
2)	Phase minérale de la matrice osseuse : l'apatite.....	99
a)	Ordre orientationnel des cristaux observé par SAXS .....	99
b)	Forme et structure des cristaux observés par SAXS.....	99
c)	Structure cristalline observée par WAXS .....	101
V.	Analyse conventionnelle des spectres SAXS .....	102
A.	Introduction.....	102
B.	Analyse des spectres de diffusion 2D .....	102
1)	Localisation des données employées.....	102
2)	Visualisation des spectres 2D .....	104
3)	Epiphyse .....	105
4)	Cavité médullaire.....	107
5)	Os cortical.....	108
C.	Analyse des spectres de diffusion 1D .....	109
1)	Fit réalisé avec le programme Sasfit.....	109
2)	Résultats d'analyse Sasfit .....	110
3)	Résultats d'analyse individuelle : pics du collagène .....	112
4)	Conclusion.....	113
5)	Limites de la méthode et stratégie .....	113
VI.	Cartographies SAXS des échantillons .....	113

A.	Qualité de l'os .....	114
1)	Saturation du signal .....	115
a)	Principe et mesure.....	115
b)	Cartographies .....	116
2)	Intensité diffusée.....	116
a)	Principe et mesure.....	117
b)	Cartographies .....	117
3)	Orientation .....	120
a)	Principe et mesure.....	120
b)	Cartographies .....	121
4)	Anisotropie .....	122
a)	Principe et mesure.....	122
b)	Cartographies .....	122
5)	Conclusions .....	124
B.	Analyse du signal de l'apatite .....	124
1)	Zones de Fourier et Porod : mesure automatique des pentes .....	124
2)	Cartographies de la pente dans la zone de Fourier .....	125
3)	Cartographies de la pente dans la zone de Porod .....	126
4)	Intersection entre les pentes, périmètre des cristaux d'apatite .....	127
a)	Principe, mesure et validité.....	127
b)	Cartographies .....	128
5)	Structure cristalline des cristaux d'apatite par WAXS.....	129
a)	Pic de l'apatite 002.....	130
b)	Pic de l'apatite 211.....	131
C.	Analyse du signal de l'organisation latérale des fibrilles de collagène .....	131
1)	Pics de diffraction des fibrilles du collagène.....	131
a)	Méthode automatique de mesure .....	132
b)	Cartographies de la première bosse .....	133
c)	Cartographies de la seconde bosse.....	135
2)	Paramètre de maille .....	136
a)	Théorie et calcul.....	136
b)	Cartographies .....	137
3)	Pics de diffraction secondaires du collagène .....	138
a)	Méthode de mesure .....	139
b)	Cartographies .....	139

D.	Conclusions.....	140
1)	Différentes structures osseuses.....	140
2)	Vieillessement de l'os.....	141
3)	Ostéosarcome.....	143
VII.	Techniques de microscopie.....	144
A.	Microscopie optique.....	144
B.	Microscopie Electronique à Transmission.....	146
C.	Propriétés mécaniques.....	148
D.	Conclusions.....	149
VIII.	Conclusion.....	149
IX.	Bibliographie.....	152

## **Chapitre 4 : Analyse et modélisation de la structure osseuse macroscopique de l'ostéosarcome avancé**

I.	Introduction.....	158
II.	Données expérimentales obtenues par tomographie.....	158
A.	Données tomographiques d'ostéosarcome avancé.....	158
B.	Représentation 3D de la structure osseuse par logiciel Paraview.....	159
C.	Traitement des images et analyse particulière.....	161
D.	Méthodes d'analyse de structure des acquisitions en tomographie.....	161
1)	Analyse par spectre de puissance.....	161
2)	Analyse par fonction de corrélation de paire.....	162
E.	Résultats d'analyse d'images de tomographie.....	163
1)	Analyse 3D en spectre de puissance.....	163
2)	Analyse en spectres de puissance suivant trois axes orthogonaux.....	164
3)	Effets de localisation dans l'échantillon.....	165
4)	Eléments pour comparaison avec modélisation.....	167
III.	Principe de l'automate cellulaire.....	168
A.	Généralités de l'automate cellulaire.....	168
B.	Hypothèses du modèle.....	168
C.	Représentation de l'automate.....	169
D.	Changement d'état des cellules de l'automate.....	170
1)	Capacité de changement des cellules.....	170
2)	Fonctions d'influence à distance.....	171
3)	Modèle de transition d'état absolu.....	172
4)	Modèle de transition d'état probabiliste.....	172

a)	Etablir une probabilité de transition d'état.....	173
b)	Ajustement de la probabilité maximum $\alpha$ .....	173
c)	Seuil d'activation de la transition d'état $\beta$ .....	174
d)	Modulation de la probabilité de transition.....	175
5)	Traitement de la rugosité .....	175
IV.	Réalisation du programme .....	176
A.	Généralités de la structure du programme .....	177
B.	Amorçage.....	178
1)	Lecture image de départ .....	178
2)	Création des matrices de calcul .....	179
C.	Boucle itérative .....	180
1)	Préparation au calcul .....	180
2)	Fabrication des matrices d'autorisation de transition d'état.....	181
3)	Calcul et tirage au sort du changement d'état.....	182
4)	Modification des matrices de présence d'état et suppression des points isolés.....	183
D.	Acquisition de données .....	183
1)	Mesures.....	184
2)	Sauvegarde d'images .....	184
V.	Résultats de simulation .....	185
A.	Stratégie d'étude de l'automate pour l'optimisation des paramètres.....	185
B.	Comportements émergents du modèle.....	185
C.	Impact des paramètres.....	187
1)	Paramètre $\alpha$ , ajustement de vitesses relatives.....	187
2)	Paramètre $\beta$ , seuil d'activation de la transition d'état .....	189
3)	Paramètre $R_{état}$ , limite de l'influence à distance .....	190
D.	Effet de la fonction d'influence à distance sur la transition d'état .....	191
E.	Recherche de paramètres optimums .....	193
VI.	Evolutions récentes et perspectives .....	194
A.	Effets des images de départ.....	195
B.	Passage de la simulation à la 3D.....	195
C.	Perspectives.....	196
VII.	Conclusion .....	196
VIII.	Bibliographie.....	198

<u>Conclusions et perspectives</u> .....	199
--	-----

## Annexes

Annexe 1 : Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials.....	201
Annexe 2 : Echantillons.....	208
Annexe 3 : Propriétés mécaniques.....	217
Annexe 4 : Analyse de coupes tomographiques.....	241
Annexe 5 : Diagrammes de phase.....	255
Annexe 6 : Simulation d'ostéosarcome : Analyse et traitement d'image.....	259
Annexe 7 : An ultrastructural study of bone with cancer (osteosarcoma) during the tumor progression : Numerical simulation.....	280

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## Table des matières du Chapitre 1

I.	Structures osseuses.....	2
A.	Généralités des os .....	2
1)	La diaphyse.....	3
2)	L'épiphyse .....	3
3)	La métaphyse.....	4
B.	Structure hiérarchique.....	4
C.	Os cortical.....	5
D.	Os trabéculaire .....	6
II.	Dynamique de l'os .....	8
A.	Modelage de l'os.....	8
B.	Remodelage de l'os.....	9
1)	Ostéoclastes :la résorption osseuse.....	10
2)	Ostéoblastes : la formation osseuse.....	10
3)	Ostéocytes : déclencheurs du remodelage osseux.....	11
C.	Résorption de fractures .....	12
III.	Structure nanoscopique de l'os .....	13
A.	Composition de l'os .....	13
B.	Organisation du collagène.....	14
1)	Structure de la fibrille de collagène.....	14
2)	Assemblage des fibres de collagène dans l'os.....	16
a)	Os cortical .....	16
b)	Os trabéculaire .....	17
c)	Cartilage de croissance .....	17
C.	Cristaux d'apatite.....	18
IV.	Ostéosarcome.....	18
A.	Les sarcomes.....	19
B.	Chiffres, incidence, population.....	19
C.	La pathologie .....	20
V.	Objectifs.....	21
VI.	Bibliographie.....	22

L'ostéosarcome est une pathologie tumorale de l'os qui se caractérise par une croissance de matière osseuse incontrôlée. Il s'agit du cancer de l'os le plus fréquent, apparaissant principalement dans les os longs, avec une population touchée essentiellement âgée de moins de 25 ans. Cette pathologie reste cependant rarement détectée tôt dans son développement. Aussi, si le sujet est recherché avec une certaine assiduité, les études se sont pour l'instant principalement portées sur des ostéosarcomes pleinement formés, ou bien essentiellement à un niveau cellulaire. De ce fait, très peu d'études ont été effectuées aux temps courts sur le mode de fonctionnement et d'induction de l'ostéosarcome, et sur ses vecteurs d'action sur le processus de remodelage de l'os.

L'os est un matériau biologique important et fortement étudié, dans ses mécanismes de formation comme dans sa composition. D'un point de vue de physicien, dans le cadre de la science des matériaux, cela offre une opportunité d'étude importante. La possibilité d'identifier les structures au niveau nanométrique des différents types d'os, et conséquemment de déterminer les déviations et modifications de celles-ci. L'opportunité est d'identifier dès les premiers jours les modifications de la structure osseuse induites par les cellules tumorales.

## **I. Structures osseuses**

L'os est un tissu biologique présent chez la totalité des vertébrés terrestres et un nombre important de vertébrés marins. Il constitue chez les espèces le présentant le matériau de base du squelette avec le cartilage. Il s'agit d'un tissu résistant qui remplit plusieurs fonctions dans l'organisme, la fonction la plus évidente est la fonction mécanique de soutien du corps et de protection des organes, avec une adaptation dynamique de la densité du tissu pour s'adapter aux contraintes subies.

Il participe à la locomotion en offrant un bras de levier de transmission des forces issues de la contraction musculaire, une réserve de sels minéraux et en participant au contrôle du métabolisme phosphocalcique, et sert de réservoir à la moelle qui produit les globules rouges, plaquettes ainsi qu'une partie des globules blancs.

Il s'agit d'un matériau hybride constitué d'une phase organique essentiellement constituée de molécules de **collagène** de type I et d'une phase minérale d'**hydroxyapatite** cristalline. Cette association complexe résulte sur une organisation hiérarchique depuis l'échelle nanoscopique jusqu'à l'échelle macroscopique.

### **A. Généralités des os**

Une certaine différenciation doit être faite entre l'os, qui correspond au tissu ou matériel osseux, et les os, que nous employons comme désignations pour les pièces individuelles du squelette. Les éléments du squelette sont regroupés en trois catégories anatomiques : les os longs, les os courts et les os plats. L'objet de cette thèse étant principalement actif sur les os longs, nous allons nous concentrer sur la structure de ceux-ci.

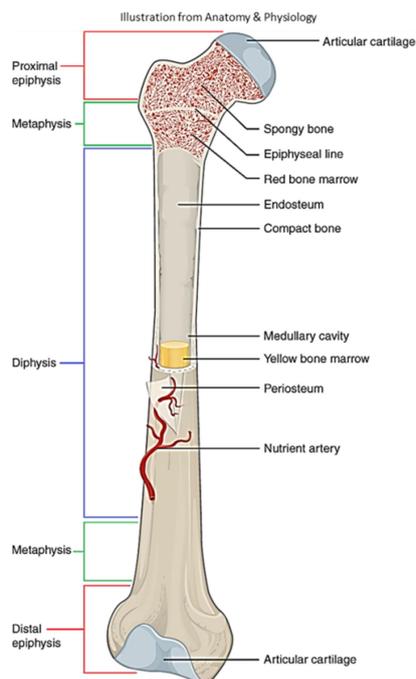


Figure 1.: Organisation structurale d'os long. Image tirée de *Anatomy & Physiology*<sup>1</sup>.

Les os longs (Fig.1) sont composés d'une partie centrale cylindrique, **la diaphyse**, et deux extrémités, les "têtes" élargies de formes arrondies, **les épiphyses**. Ces deux éléments sont séparés par un espace intermédiaire, **la métaphyse**, qui chez l'individu immature présente du cartilage : le cartilage de conjugaison ou **cartilage de croissance**.

### 1) La diaphyse

La diaphyse est le corps de l'os long, un cylindre creux formé d'os dense, l'**os cortical**. La partie creuse centrale est appelée la **cavité médullaire**, remplie de moelle osseuse jaune, ou occupé par de l'os spongieux, l'**os trabéculaire**, dont les interstices sont occupés par de la moelle rouge.

L'os cortical de la diaphyse est couvert à l'extérieur par une membrane, le **périoste**, richement vascularisée et innervée. Il s'agit d'un tissu conjonctif composé d'une couche externe fibreuse et d'une couche interne ostéogénique, qui assure l'insertion des tendons sur l'os et participe à la croissance circonférentielle et la réparation de fracture de l'os. Le remodelage osseux localisé au niveau du périoste est avantageux suivant le mécanisme de formation osseuse, entraînant la croissance de l'os en diamètre avec le temps chez l'individu en maturation.

Une couche similaire se trouve en bordure interne de la diaphyse, l'**endoste**, mais dont le fonctionnement dans le remodelage osseux est avantageux dans la résorption, ce qui permet d'assurer la croissance de la cavité médullaire de concert avec le diamètre de la diaphyse.

### 2) L'épiphyse

La partie externe de l'épiphyse est essentiellement couverte de cartilage articulaire qui minimise les frictions entre os liées au mouvement. Celui-ci repose sur une couche d'os cortical notablement plus mince que dans la diaphyse. Les parties externes de l'épiphyse non-couvertes par le cartilage articulaire possèdent également un périoste, mais la face interne est entièrement occupée par de l'os trabéculaire et de la moelle rouge.

### 3) La métaphyse

La métaphyse sépare l'épiphyse de la diaphyse, et chez l'individu immature est le site du cartilage de croissance. Celui-ci possède une fonction de production osseuse par division intense des **chondrocytes**, l'ossification endochondrale. Ce processus de fabrication d'os participe à la croissance en assurant l'essentiel de la croissance osseuse longitudinale suivant un mécanisme d'ossification du cartilage très différent des processus de l'endoste et du périoste.

A l'âge adulte, le cartilage de croissance se résorbe jusqu'à être complètement remplacé par de l'os trabéculaire, connectant l'os trabéculaire diaphysal et épiphysal. On appelle ce phénomène la soudure des plaques de croissance.

### B. Structure hiérarchique

Les propriétés mécaniques de l'os sont la conséquence d'une structure hiérarchique, chaque échelle de l'os présente une structure distincte et complexe. Ces différentes structures commencent à l'échelle moléculaire, et se retrouvent assemblées après assemblages jusqu'à l'os macroscopique. Les études les plus récentes établissent le nombre de niveaux structurels différents dans la structure à  $12^{2-4}$  avec des nanostructures fractales<sup>2</sup>. Mais dans le cadre de cette introduction, nous nous en tenons à une version plus simple.

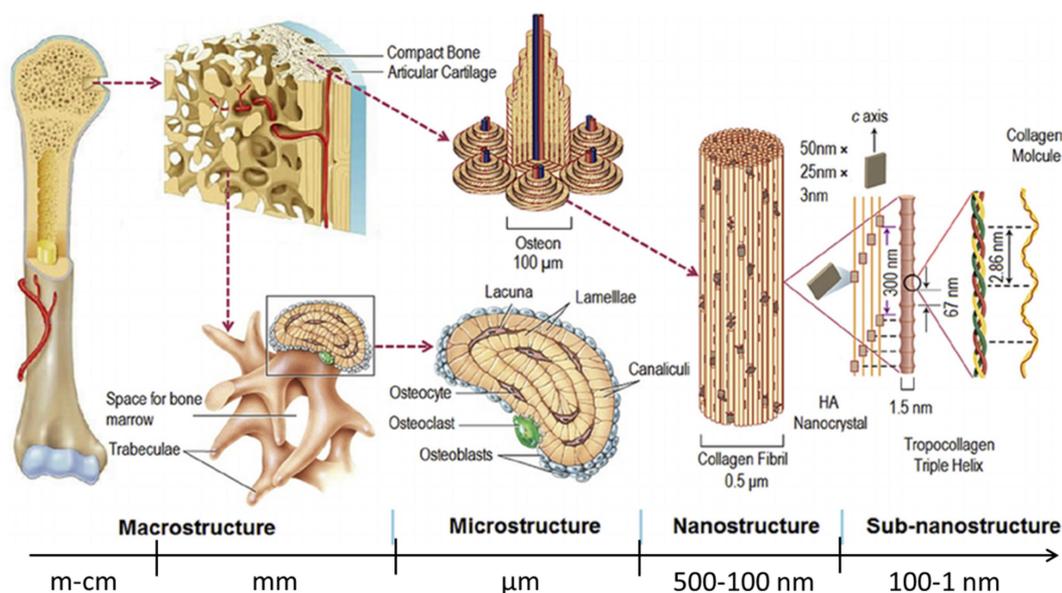


Figure 2.: Structure hiérarchique de l'os<sup>5</sup>.

Nous avons vu que l'os macroscopique est composé de deux structures osseuses distinctes, l'os cortical et l'os trabéculaire (Fig. 2). La différence de densité des deux structures est telle que l'os cortical représente 80% de la masse osseuse totale chez l'humain, bien que ce ratio varie suivant les os. La classification d'os cortical ou trabéculaire est généralement suivant le degré de porosité du matériau, avec une porosité comprise entre 5 et 15% pour l'os cortical et 75 et 95% pour l'os trabéculaire<sup>6,7</sup>.

Outre leurs densités respectives, les deux structures osseuses se distinguent par leur forme. L'os cortical se présente en une couche composée d'**ostéons**, des sous-structures composées de lamelles concentriques. L'os trabéculaire présente en revanche une structure spongieuse faite d'un réseau de bâtonnets et de plaquettes, les **trabécules**, composées de lamelles osseuses assemblées suivant une direction donnée.

Les lamelles osseuses qui composent les deux structures différentes sont typiquement entre 3 et 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur<sup>8</sup>, et sont le résultat d'un assemblage de fibres de collagène minéralisées. L'assemblage de ces fibres peut s'effectuer de deux manières différentes, unidirectionnelle ou suivant un effet de contreplaqué.

Les fibres de collagènes minéralisées sont composées pour leur part d'un ensemble de fibrilles de collagène au sein duquel des cristaux d'hydroxyapatite se sont formés. Les fibrilles de collagène sont des structures qui sont quant à elles composées d'un agencement en décalé de tropocollagènes, des assemblages triples des molécules de collagène de type I.

Dans tout cela, le cartilage de croissance tient une place un peu particulière, puisqu'il ne s'agit pas d'os mais de cartilage impliqué dans le processus de production d'os. Nous aborderons donc sa structure et son fonctionnement dans la partie relative au remodelage de l'os.

### C. Os cortical

L'os cortical est une structure dense qui forme la paroi extérieure de l'os, et représente l'essentiel de la masse osseuse. Sa croissance radiale est assurée par l'action conjointe de l'endoste et du périoste, tandis que sa croissance longitudinale s'opère au niveau du cartilage de croissance.

Cette matrice osseuse est composée des structures concentriques, les ostéons. Ceux-ci sont de forme cylindrique orientés suivant la surface, composés de 6 à 15 couches consécutives de lamelles osseuses centrées sur un canal contenant des capillaires sanguins et des fibres nerveuses, le canal de Havers. Ceux-ci sont connectés entre eux par des canaux transversaux ou obliques, les canaux de Volkmann.

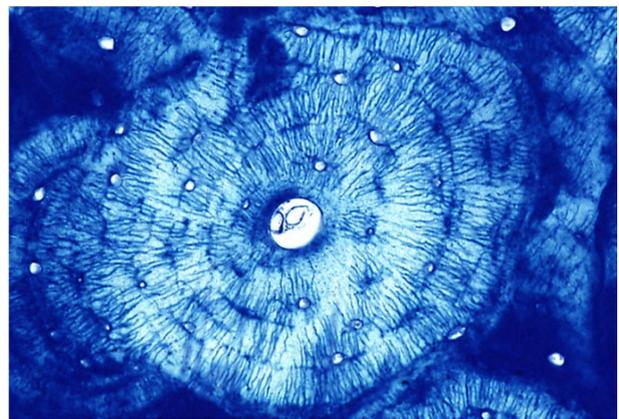
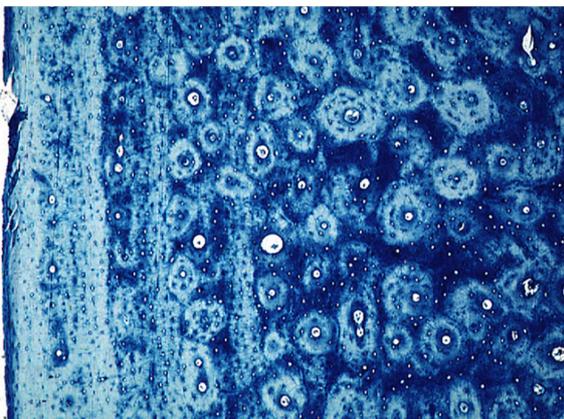


Figure 3.: Os cortical de diaphyse tibiale de chien. A droite, détail d'un ostéon<sup>9</sup>.

L'os cortical est donc constitué d'un réseau d'ostéons (Fig.3 gauche), avec des restes d'ostéons remodelés parfois présents entre les structures cylindriques. Ces structures cylindriques sont formées de couches successives de lamelles d'os dont les fibres se présentent suivant deux types d'organisations coexistantes, une structure de contreplaqué orthogonal, et une structure de contreplaqué torsadé<sup>8,10,11</sup>.

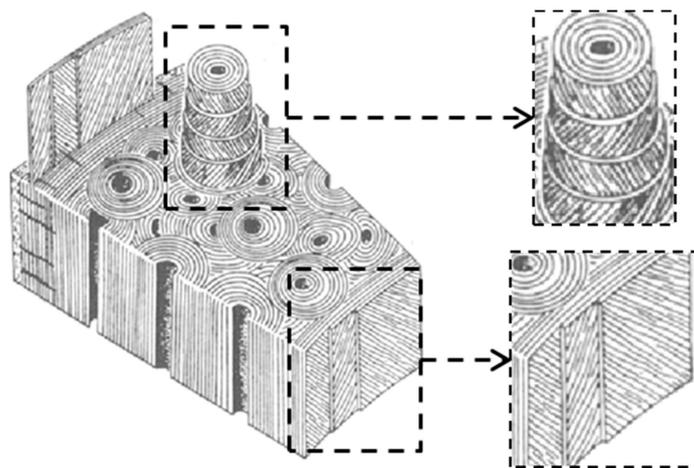


Figure 4.: Diagramme de la structure en contreplaqué des lamelles de l'ostéon<sup>8</sup>. En haut à droite, structure torsadée, en bas orthogonale.

La structure de contreplaqué orthogonal (Fig. 4) se présente sous la forme de lamelles composées de fibres de collagène d'orientation interne homogène, mais de direction changée d'environ 90° d'une lamelle à l'autre. La structure de contreplaqué torsadé (Fig. 4) est celle d'une organisation cholestérique, une géométrie souvent adoptée par des molécules asymétriques en phase cristal liquide.

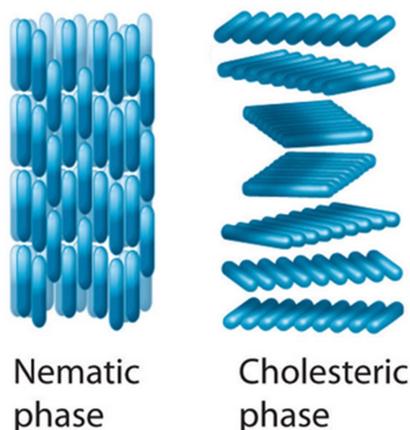


Figure 5.: Représentation de l'organisation des objets dans une phase nématique et cholestérique<sup>12</sup>

L'organisation cholestérique est un cas particulier d'organisation nématique des cristaux liquides. La phase nématique est le cas de figure où l'ensemble des objets d'une phase cristal liquide sont orientés suivant la même direction mais sans ordre positionnel. Le cas de la phase cholestérique se présente en plans d'objets de même orientations avec un léger décalage d'angle plan après plan (Fig.5 droite), suivant une hélicoïdale autour de l'axe de rotation. La phase cholestérique des fibres de collagène dans l'os suit le modèle d'une succession de plans uniformément orientés dont les fibres tournent d'un angle donné d'un plan à l'autre, ce qui peut donner l'apparence d'arceaux suivant une coupe oblique<sup>8,10,13</sup>.

#### D. Os trabéculaire

L'os trabéculaire est un réseau tridimensionnel de trabécules sous la forme de bâtonnets et de plaquettes osseux délimitant un espace interconnecté de moelle rouge et de vaisseaux sanguins. Les travées osseuses ainsi formées vont de 0,1 à 0,5mm, la taille et la direction s'adaptant aux contraintes mécaniques subies par l'os, et délimitent des pores qui vont du  $\mu\text{m}$  au mm. L'os

trabéculaire remplit l'essentiel des fonctions de l'os dans le métabolisme phosphocalcique grâce à sa surface d'échange très importante.

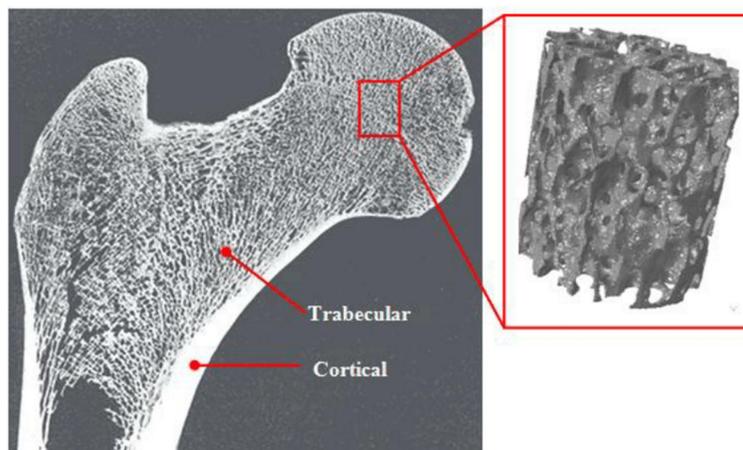


Figure 6.: Section transversale d'un fémur humain montrant la structure de l'os trabéculaire<sup>14</sup>.

Les trabécules sont constituées de lamelles osseuses sans forme définie mais avec une orientation générale suivant les lignes de force dissipant les contraintes mécaniques s'appliquant sur l'élément du squelette (Fig.6). Lesdites lamelles reprennent les formes d'organisation lamellaires vues pour l'os cortical en interne, avec des couches bien définies dans lesquelles les contreplaqués de collagène sont observables<sup>15</sup>.

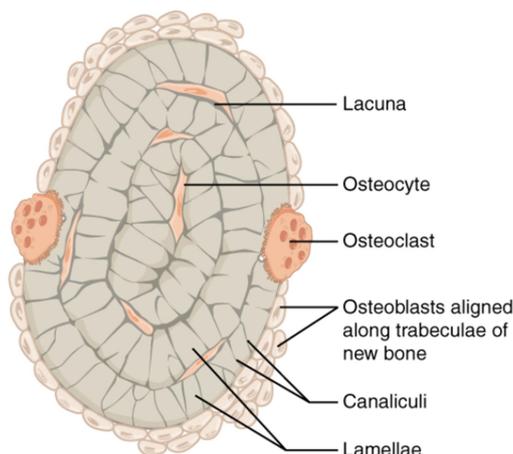


Figure 7.: Schéma de coupe de trabécule<sup>16</sup>.

Les trabécules pourraient être comparées à des formes plus désorganisées des ostéons (Fig.7), sans canal central avec un alignement des lamelles osseuses sur la direction des trabécules, avec une complexité plus prononcée due à l'interconnectivité des différentes trabécules d'orientations différentes.

Ces structures osseuses ne sont cependant pas inertes, que ce soit du fait de la croissance d'un individu ou de la réponse à des stress extérieurs sur la structure osseuse.

## II. Dynamique de l'os

Loin d'être inerte, le tissu osseux est un tissu dynamique, depuis sa croissance avec le reste de l'organisme lors de la maturation, au remodelage constant toujours présent chez l'individu adulte dans l'adaptation de l'os aux contraintes subies et la correction des défauts, jusqu'au mécanisme de résorption des fractures. Ces mécanismes se basent sur l'action de cellules spécialisées qui vont produire et détruire la matière osseuse suivant différents processus.

### A. **Modelage de l'os**

Lors de la maturation de tout vertébré, le squelette grandit avec l'âge jusqu'à atteindre une taille définitive. Dans le cas qui nous intéresse des os longs, cette croissance s'effectue de manière radiale dans le diamètre, et est assurée par le périoste et l'endoste suivant un mécanisme très proche du remodelage osseux vu plus bas, et de manière longitudinale.

Cette croissance longitudinale s'effectue à partir d'une plaque de cartilage dit de croissance (Fig.8) située entre l'épiphyse et la diaphyse. Le mécanisme de production d'os en application ici est appelé ossification endochondrale<sup>17,18</sup>, qui pourrait être résumé comme une production de cartilage dans le but d'être remplacé par de l'os.

Le cartilage sain est une matrice vitreuse essentiellement composée de collagène de type II et de protéoglycanes, dans laquelle se trouve sous forme d'inclusions (chondroplastes) des cellules dont le rôle est de produire et maintenir la matrice cartilagineuse, les chondrocytes. L'ossification endochondrale passe par un mécanisme de production de cartilage qui est ensuite utilisé comme base pour l'ossification.

Le cartilage de croissance est séparé en quatre couches distinctes à partir d'une couche de cartilage hyalin au repos. La première est la zone de prolifération des chondrocytes, où les chondrocytes se divisent rapidement pour former des chondroplastes longitudinaux organisés en colonnes abritant de multiples chondrocytes. Du fait de la forme des chondroplastes dans cette zone, on parle de cartilage sérié.

La seconde couche est caractérisée par une augmentation drastique de la taille des chondrocytes, il s'agit du cartilage hypertrophié. Ces chondrocytes grossissent suite à un apport augmenté d'eau, et entraîne une production importante de matrice cartilagineuse, l'étape de croissance même de l'os. Les chondrocytes hypertrophiés entraînent une minéralisation du cartilage en cartilage calcifié.

Les chondrocytes hypertrophiés commencent ensuite à mourir, formant la zone de dégénérescence des chondrocytes. Les fines travées cartilagineuses situées entre chondrocytes d'une même strie sont alors résorbées par des cellules spécialisées, les chondroclastes.

La dernière couche voit l'invasion par des capillaires sanguins et les différentes cellules du remodelage osseux, qui vont utiliser le cartilage calcifié comme d'un échafaud et matériel pour produire la phase osseuse trabéculaire ou corticale.

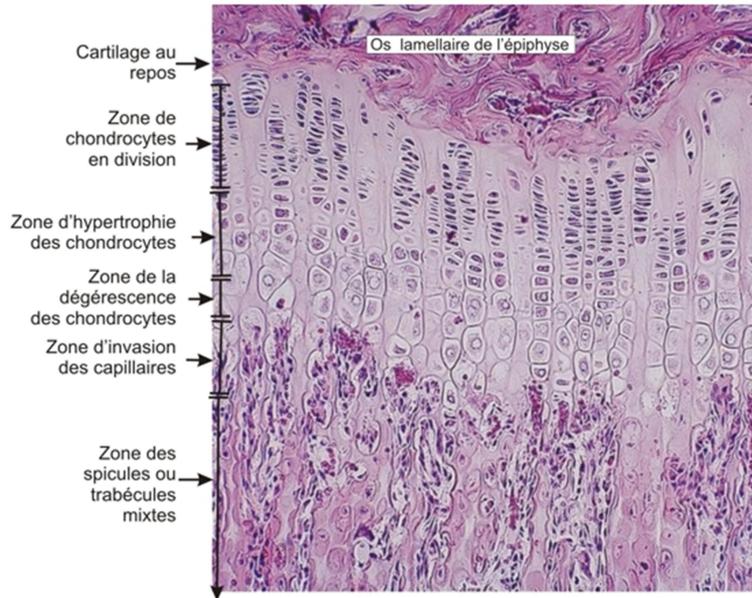


Figure 8.: Structure en couche du cartilage de croissance<sup>18</sup>.

L'os est alors fabriqué suivant le modèle du remodelage osseux, en résorbant le cartilage calcifié et par production de tissu osseux en remplacement. Ce procédé implique un ensemble de cellules spécialisées et de mécanismes complètement différents de la production de cartilage.

## B. Remodelage de l'os

Nous l'avons dit, l'os est un tissu dynamique en constant renouvellement. Il est estimé que chez l'adulte, 10% du tissu osseux total est renouvelé chaque année. Ce remodelage est le fait des trois types principaux de cellules spécialisées, les **ostéocytes**, les **ostéoclastes** et les **ostéoblastes**.

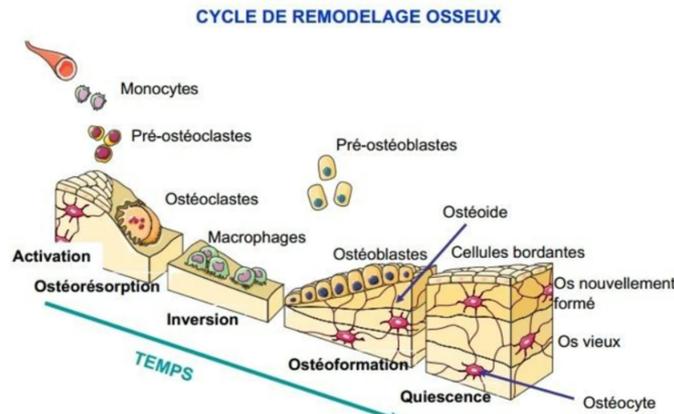


Figure 9.: Schéma du cycle de remodelage osseux<sup>19</sup>.

Le remodelage de l'os est d'abord activé par les ostéocytes, ce qui entraîne la résorption osseuse par les ostéoclastes. Des cellules dites macrophages passent ensuite après le départ ou l'apoptose (mort) des ostéoclastes dans la phase d'inversion et réduisent les rugosités de la surface de la lacune ainsi créée, avant qu'une couche d'ostéoblaste se forme sur la surface et entame la phase de production osseuse.

## 1) Ostéoclastes : la résorption osseuse

Les ostéoclastes (Fig.10) sont les cellules responsables de la résorption osseuse<sup>20</sup>. Il s'agit de cellules géantes (50-100 $\mu$ m) multinucléées issues de plusieurs cellules précurseuses créées au sein de la moelle qui fument entre elles après migration sur les sites de remodelage. Les ostéoclastes une fois localisés sur la surface à résorber vont ensuite s'y attacher et sceller la zone concernée avec un anneau d'actine afin de circonscrire le processus de résorption localisé.

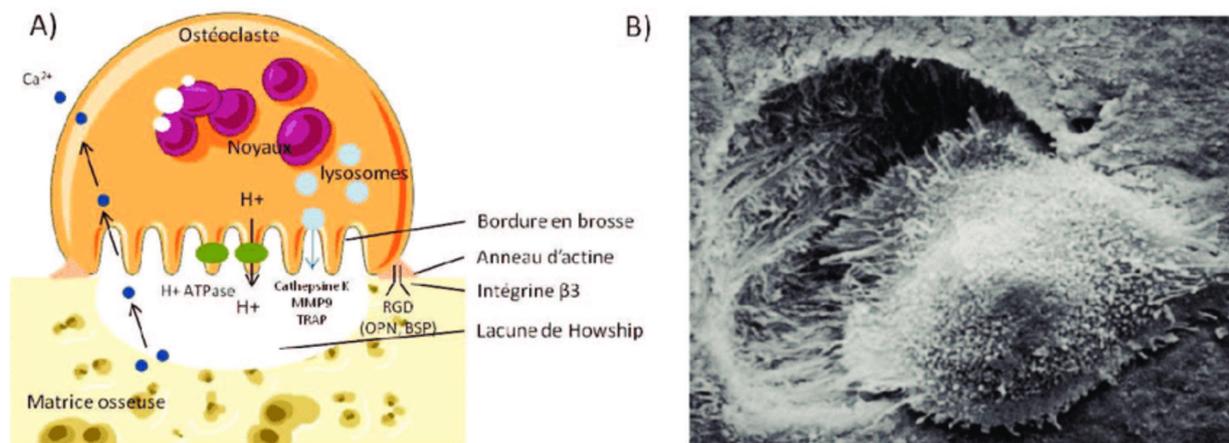


Figure 10.: A) Représentation de l'ostéoclaste mature<sup>21</sup>. B) Ostéoclaste cultivé sur lamelle.

L'ostéoclaste se présente au contact avec la matrice osseuse sous la forme d'une brosse au niveau de laquelle sont synthétisés des enzymes et des protons qui vont acidifier le milieu. L'acidification du milieu va agir sur la phase minérale de la matrice osseuse en l'ionisant, tandis que les enzymes relâchées vont dégrader la matrice collagénique de la phase organique de l'os. Ce processus de dégradation de l'os s'effectue avec une vitesse de 20-40  $\mu$ m par jour<sup>22</sup>.

Une fois la résorption osseuse achevée, les ostéoclastes vont migrer ou subir une apoptose, laissant la place aux cellules macrophages qui vont lisser la lacune ainsi créée en éliminant les débris matriciels restant. Dans le cadre de l'ossification endochondrale, les ostéoclastes remplissent le même rôle envers le cartilage calcifié après la dégénérescence des chondrocytes que sur de l'os en remodelage.

## 2) Ostéoblastes : la formation osseuse

Les ostéoblastes sont les cellules de la construction osseuse, les cellules bordantes qui couvrent le tissu osseux sont de fait des ostéoblastes au repos, en attente d'activation. Les cellules bordantes, qui jusque-là étaient perméables à la migration des ostéoblastes puis macrophages, vont être activées et se diviser en ostéoblastes actifs.

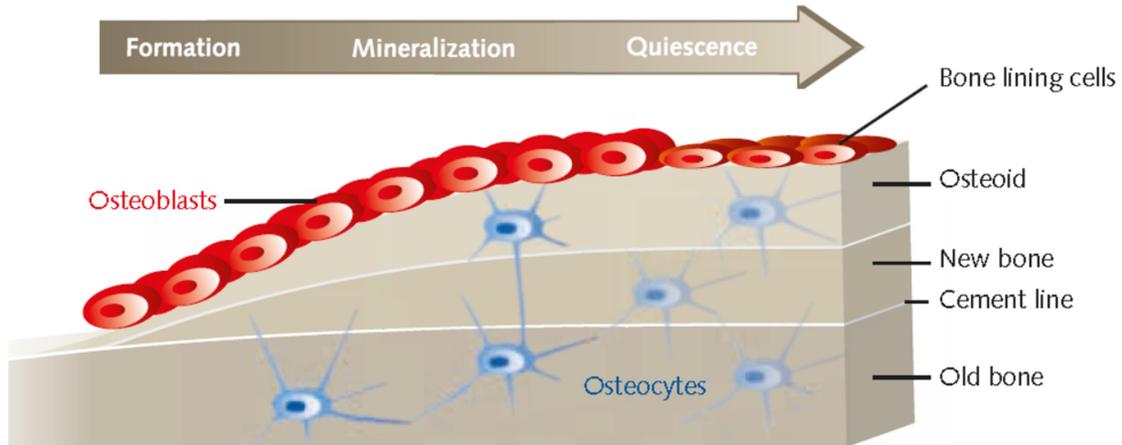


Figure 11.: Activité ostéoblastique lors de la phase de formation osseuse<sup>23</sup>.

Ceux-ci vont synthétiser du collagène dans une nouvelle matrice osseuse encore non minéralisée, la substance pré-osseuse ou ostéoïde. Cette phase de collagène va connaître une phase de maturation d'environ 15 jours pendant laquelle les molécules de collagène vont s'organiser dans le format des structures hiérarchiques de la phase organique de l'os, avant de commencer la minéralisation.

La minéralisation, favorisée par des vésicules matricielles produites par les ostéoblastes qui forment de facto des réservoirs d'ions nécessaires, s'effectue dans un front de minéralisation situé à l'interface entre tissu osseux mature et substance ostéoïde. Une ligne de matériel dit cimentante (Fig.11 cement line) se forme à l'interface entre la matrice mature et l'os en formation, composée de collagène désorganisé calcifié<sup>24</sup>. Cette étape va achever la transition de la substance ostéoïde en os.

Le processus complet est beaucoup plus lent que la résorption osseuse effectuée par les ostéoclastes, s'étalant sur 3 à 4 mois pour une vitesse approximative de 0,3-0,8  $\mu\text{m}$  par jour<sup>25,26</sup>. Lors de la phase de synthèse de matrice collagénique de la production osseuse, des ostéoblastes vont se trouver pris dans la matrice. Ceux-ci vont ensuite subir une transformation en cellules ostéocytes, assurant la continuité du réseau ostéocytes. Les cellules restantes après la fin de la formation osseuse vont soit entrer en apoptose, soit entrer en quiescence en formant la nouvelle couche de cellules bordantes de l'os.

### 3) Ostéocytes : déclencheurs du remodelage osseux

Les ostéocytes sont des cellules que l'on trouve directement dans la matrice osseuse au sein de petites cavités propres, les ostéoplastes (Fig.12). A partir de cette lacune dans la matrice osseuse, les ostéocytes forment un réseau dendritique de prolongements à travers des canalicules qui permettent la communication par contact entre ostéocytes jusqu'aux cellules bordantes de l'os.

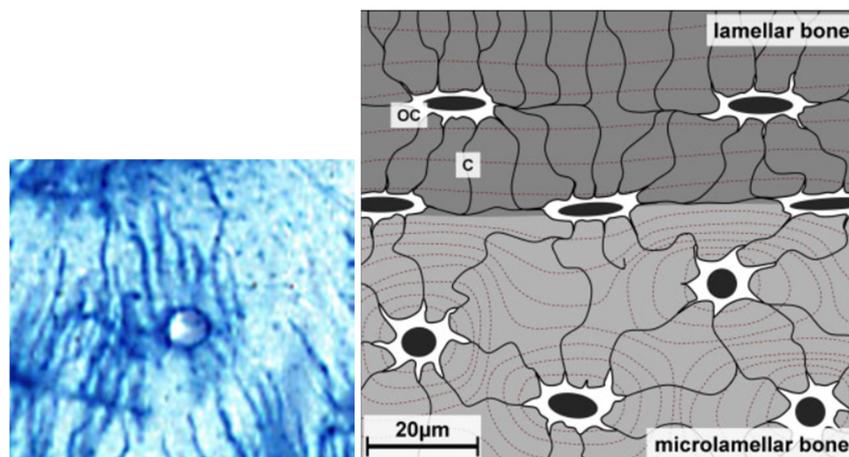


Figure 12.: A gauche, lacune ostéoplaste de la matrice d'un ostéon avec les canalicules de l'ostéocyte<sup>9</sup>. A droite, schéma du réseau des ostéocytes<sup>27</sup>.

Les dendrites des ostéocytes font également offices de mécanorécepteurs qui vont percevoir la pression et l'activité mécanique exercées sur l'os. Le rôle des ostéocytes au sein de l'os est de servir de signaleurs et de déclencheurs du mécanisme de remodelage osseux pour répondre à un besoin. Les différents besoins possibles sont nombreux : le renforcement de la matrice osseuse pour répondre à une pression augmentée, ou la résorption dans le cas inverse, le remplacement ou réparation suite à une lésion microscopique ou fracture par activation des cellules bordantes.

### C. Résorption de fractures

L'os est un matériau combinant une solidité et une élasticité remarquable, il arrive cependant que suite à des traumatismes dépassant les capacités élastiques du tissu osseux, celui-ci se brise. L'organisme est tout à fait capable de réparer les fractures de l'os, via un mécanisme appelé ostéogénèse de réparation.

Il est possible de distinguer deux types de fractures, qui vont induire des réponses différentes de l'organisme. Le premier cas est celui où les morceaux d'os restent ou sont forcés en contact, ce qui induit une réponse par les ostéoclastes et ostéoblastes, qui vont réduire la fracture par mécanisme de remodelage osseux (**II.B**). Le second cas, plus complexe est appelé guérison indirecte, et passe par la formation de ce qui s'appelle un cal osseux<sup>28</sup>.

Dans le cas d'une telle fracture, la réponse de l'organisme est de peupler l'hématome résultant (Fig.13) de cellules macrophages et de cellules mésenchymateuses qui vont se diviser avant de se spécialiser en cellules cartilagineuses ou ostéogéniques. Les chondrocytes ainsi formés vont produire par hypertrophie une structure cartilagineuse suivant un modèle similaire à celui de l'ossification endochondrale vue en **A**) appelée cal osseux. Celui-ci se voit ensuite résorbé en tissu osseux approprié (cortical ou trabéculaire) par le processus de remodelage **B**).

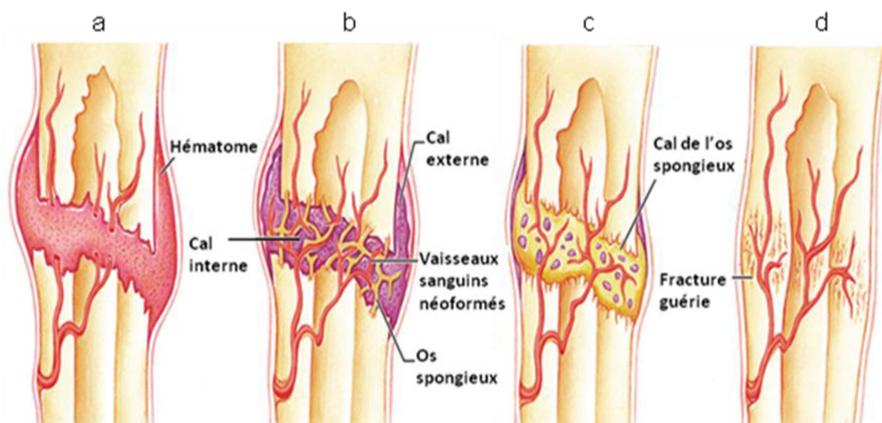


Figure 13.: Différentes étapes de la guérison de l'os par formation d'un cal osseux, tiré de Adil, A. Conception et validation d'un biomatériau hybride pour la régénération osseuse<sup>28</sup>. a) Formation d'un hématome. b) Formation d'un cal réparateur mou. c) Durcissement et calcification du cal osseux. d) Remodelage osseux.

Du début de l'étape de fabrication du cal osseux mou jusqu'à la fin de son ossification endochondrale, un temps d'environ trois semaines s'est écoulé, pendant lequel suffisamment de tissu ostéoïde est formé pour consolider l'ensemble de la structure squelettique. Suivant la fracture, cela représente une quantité variable mais non négligeable de cartilage calcifié produit dans cet intervalle de temps, le procédé ayant lieu de manière simultanée et rapide sur l'ensemble de la lésion.

Nous avons vu ici le principal des mécanismes de production de l'os par l'organisme, et survolé sa composition. Afin de comprendre l'ostéosarcome, nous avons cependant besoin d'une meilleure compréhension de la nature même du matériau en question.

### III. Structure nanoscopique de l'os

Nous avons vu plus tôt que l'os est une structure hiérarchique et en partie l'organisation de ses différents niveaux. Nous avons dans le chapitre I détaillé un peu mieux la microstructure et macrostructure des différents types d'os, mais jusque-là sans aborder la structure de l'os au niveau des fibrilles et inférieur.

Nous allons donc détailler la composition de l'os, et comment s'organisent le collagène et les cristaux d'hydroxyapatite pour former la base de la structure du tissu osseux.

#### A. Composition de l'os

L'os est un matériau hybride composé d'une matrice extracellulaire et de cellules osseuses, les ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes vus précédemment. La matrice extracellulaire est principalement formée de deux phases, une phase organique de molécules de collagène et une phase minérale de nanocristaux d'hydroxyapatite. La matrice extracellulaire est une structure hydratée, avec l'eau représentant environ 9% de la masse totale de l'os, là où la phase organique représente 22% et la phase minérale 69%.

La phase organique qui forme la structure fibrillaire de l'os est composée à 90% de collagène de type I, le collagène le plus abondant au sein des tissus conjonctifs humains, que l'on retrouve dans la cornée, le derme et les tendons. Il s'agit d'une molécule capable d'auto-assemblage, selon

des structures complexes qui sont responsables de la rigidité et la résistance aux forces de traction et torsion de l'os.

Les 10% restant de la phase organique sont composés d'élastine pour les éléments structurant, de fibronectine pour élément adhésif, et de substances inter-fibrillaires comme les protéoglycanes et des lipides<sup>29</sup>.

La phase minérale de l'os représente environ 70% de sa masse totale, et est responsable principalement de la résistance mécanique de l'os. Il s'agit également de la plus grande réserve de calcium de l'organisme (99%), de phosphore (85%), de sodium et de magnésium (40-60%). Cette phase apparaît lors de la minéralisation de la substance ostéoïde du remodelage, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ).

Ces cristaux d'hydroxyapatite se forment au sein des fibres de collagène, suivant des positions et des structures qui font encore débat aujourd'hui et dont la compréhension évolue constamment avec l'évolution des techniques d'analyse.

### **B. Organisation du collagène**

Le collagène est un élément très présent dans l'organisme, à l'origine de nombreuses structures extracellulaires en dehors de l'os, telles que les tendons ou la cornée<sup>30</sup>. Suivant ses agencements, celui-ci est en cause dans les propriétés d'élasticité et de résistance au cisaillement de l'os, l'élasticité et force en tension des tendons et même la transparence de la cornée.

Le collagène composant l'os est essentiellement du collagène de type I, un polypeptide qui s'associe en paquets de trois molécules pour former du tropocollagène, un ensemble d'une longueur de 300 nm pour 1,5 nm de diamètre. Cet assemblage peut être assimilé à un enroulement des molécules ensemble, d'où des dimensions spatiales similaires entre les molécules de collagène individuelles et l'ensemble tropocollagène. Ces tropocollagènes s'assemblent en structures répétibles que l'on considère comme des fibrilles, qui constituent un élément essentiel de la structure osseuse, qui eux-mêmes associent pour former les structures de l'os, que ce soit les ostéons ou les lamelles de l'os trabéculaire.

#### **1) Structure de la fibrille de collagène**

Les propriétés physiques du collagène résultent de son organisation hiérarchique<sup>31</sup>, qui s'effectue depuis l'échelle nanométrique à partir des tropocollagènes. Cette structure présente une périodicité **D** de 67nm<sup>32</sup> observable au microscope à transmission électronique (MET) (Fig.14) au niveau de la superstructure de fibrilles, la fibre de collagène.

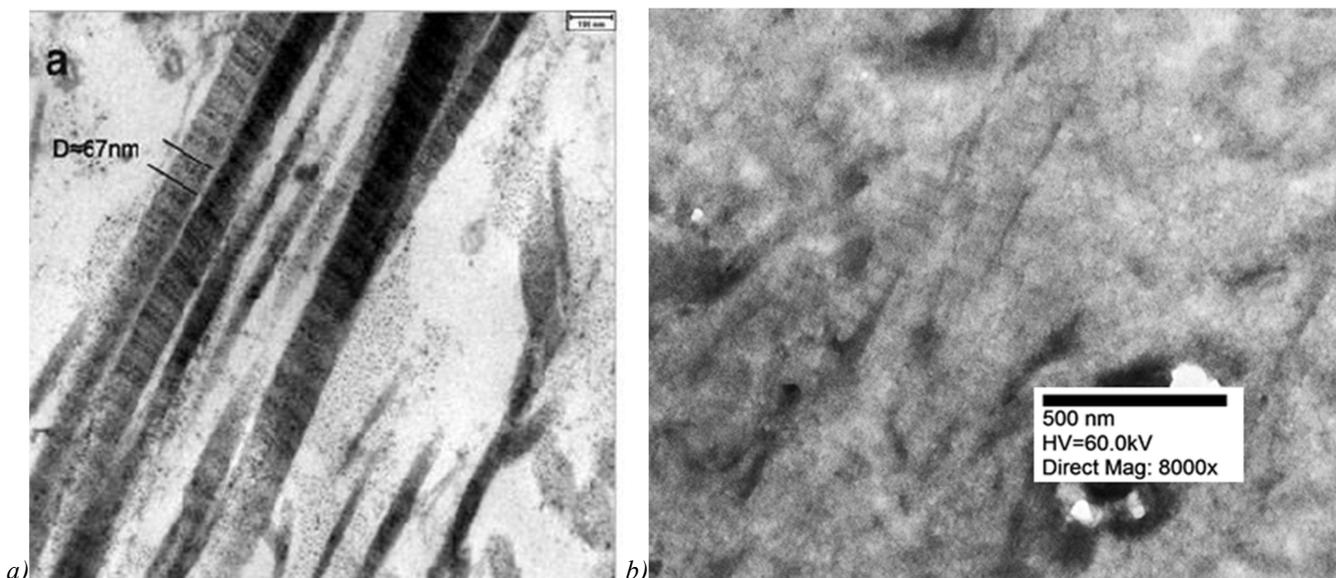


Figure 14.: a) Image de l'effet de bandes du collagène en MET issue de SCHWARZ et al. 2012<sup>33</sup> b) Image en MET d'os de souris, produite par l'équipe de Nadine NASSIF. Les effets de bandes sont moins bien définis mais toujours observables.

Cette périodicité ne correspond pas à un multiple ou une fraction identifiable de la longueur du tropocollagène constitutif, et est le résultat de la manière dont ils sont agencés les uns par rapport aux autres en auto-assemblage (Fig.15). Si les tropocollagènes s'assemblent en paquet suivant leur longueur, ils le font de telle manière que leurs extrémités ne correspondent pas avec celles de leurs voisins. Il existe entre deux tropocollagènes alignés dans leur longueur un espace qui a été déterminé comme mesurant 36 nm, et c'est cet espace intermédiaire entre tropocollagènes qui est à l'origine de notre période **D**.

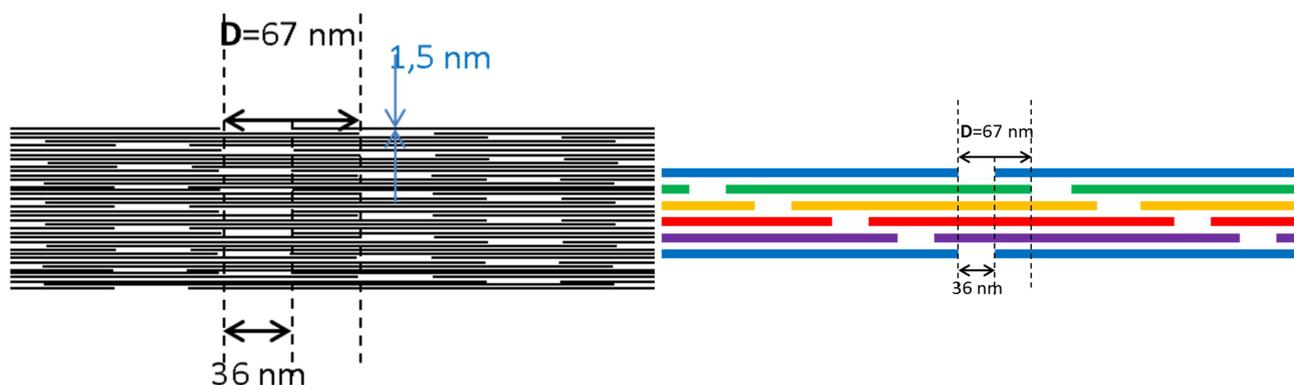


Figure 15.: A gauche, modèle grande échelle de l'organisation en décalage des tropocollagènes. A droite, organisation en décalage locale des tropocollagènes.

Avec un espace de 36 nm entre tropocollagènes, nous avons alors une périodicité longitudinale de la structure de 336 nm, soit 5 fois la période **D**. Or cet espace intermédiaire entre tropocollagènes se traduit localement et périodiquement comme une densité de matériel plus faible par rapport au reste de la fibrille de collagène, résultant sur l'observation au MET de bandes de contraste périodiques dans la structure.

Il est donc possible de considérer les tropocollagènes assemblés comme des ensembles de cinq éléments décalés 67 nm formant les briques élémentaires de nos fibres<sup>34</sup>, les fibrilles. Si l'agencement général de ces briques pour former les fibres est encore sujet à débat au niveau de la formation d'un ensemble pseudo-cylindrique, l'analyse aux rayons X cristallographique de la structure sèche permet de dégager des distances entre éléments et un ordre local assez précis<sup>35</sup>.

Nous avons donc une structure cristalline quasi-hexagonale dont les éléments en termes de cristallographie sont :

$PI$	$a \approx 40,0 \text{ \AA}$	$b \approx 27,0 \text{ \AA}$	$c \approx 678 \text{ \AA}$	$\alpha \approx 89,2^\circ$	$\beta \approx 94,6^\circ$	$\gamma \approx 105,6^\circ$
------	------------------------------	------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------	------------------------------

A noter que les espaces entre tropocollagène peuvent varier en fonction du degré d'hydratation, avec des degrés d'organisation différents<sup>36</sup>, mais ces valeurs nous donnent un point de départ auquel comparer nos résultats.

La structure totale de la fibre présente donc des éléments cristallins, associés à un certain niveau de désordre liquide permettant une interprétation cristal-liquide du collagène osseux<sup>36</sup> et des fibrilles. L'interprétation cristallographique indique également que le packing du tropocollagène résulte en une hélice de supertwist à pas droit<sup>37</sup> et un entremêlement des fibrilles, et les cartographies en densité d'électrons indiquent des changements de direction entre les plans comportant les lacunes de 36 nm entre tropocollagènes et les 31 nm de packing de collagène sans espace libre.

Tout cela se passe dans le cadre d'une unique fibrille, dont les règles d'agencement exact pour former la fibre complète de 50 à 500 nm de diamètre ne font pas encore consensus<sup>34,36,38,39</sup>, les modes d'auto-assemblage des molécules et les aspects de désordre de la structure générale offrant de nombreuses questions auxquelles il est pour l'instant difficile d'apporter une réponse unique.

## 2) Assemblage des fibres de collagène dans l'os

Les fibres de collagène sont les éléments à partir desquels les superstructures osseuses vont se former, que ce soit les ostéons<sup>8</sup>, les lamelles<sup>3,40</sup> ou encore les différents cartilages<sup>41,42</sup>. L'association des fibres en twist à pas droit reste un paramètre prévalent à l'échelle supérieure, qui a une influence notable sur les règles de packing des fibres<sup>43</sup>. Cela se traduit par un comportement des fibres de collagène sur le modèle d'un cholestérique<sup>44</sup> dans un certain nombre de cas, notamment les ostéons, avec une expression selon le contact entre fibres soit avec un décalage d'angle, soit un contact orthogonal.

### a) Os cortical

L'os compact ou cortical se distingue en deux formes de structures, les ostéons et les lamelles circonférentielles. Les lamelles circonférentielles délimitent un espace dans lequel les ostéons se forment, il s'agit des interfaces internes et externes de l'os cortical, les ostéons sont des structures concentriques formées autour du système de vascularisation de l'os, les canaux de Havers. Tous deux partagent une structure de couches successives de collagène de 3 à 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, dont l'orientation est à proche de  $90^\circ$  l'une de l'autre, avec des basculements brutaux. L'orientation des fibrilles dans les couches est en revanche à un angle par rapport à la direction prise par l'ostéon.

Suivant la coupe selon laquelle la structure du collagène est observée dans le cas de ces deux types de structures, plusieurs figures de structure du collagène peuvent apparaître comme résultat de l'alternance d'orientation, que ce soit une alternance franche entre éléments longitudinaux (L) et transverses (T) dans le cas d'une coupe orthogonale à une direction d'assemblage des fibrilles, ou bien des figures en arceaux plus ou moins prononcées en fonction de l'angle de coupe, avec une transition des fibres L et T intercalée par des fibres alignées obliquement (O) par rapport à la coupe (voir figure 16).

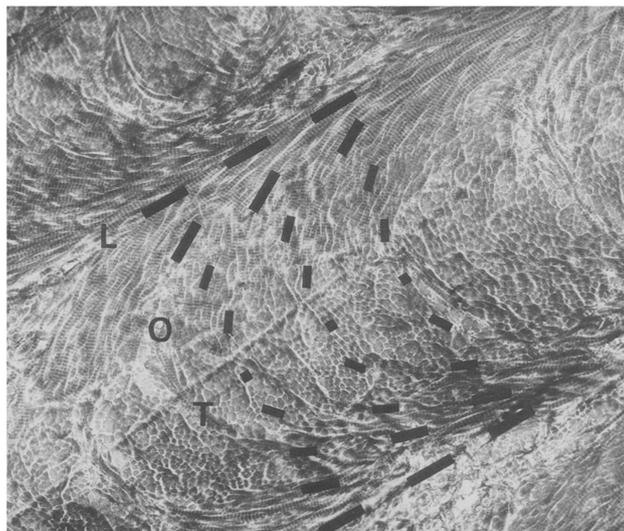


Figure 16.: Image MET d'une coupe à 30° de lamelles successives d'os cortical, tirée de Giraud-Guille, *Calcif. Tissue* 1988<sup>8</sup>.

Comme nous pouvons le voir sur l'image précédente, outre le phénomène de cholestérisation des fibrilles de collagène qui se traduit ici par une rotation de la direction longitudinale de l'organisation des fibrilles (Fig.16 traits noirs), nous avons également un certain degré de désordre positionnel les unes vis-à-vis des autres. Une certaine forme d'entremêlement apparaît également au niveau des fibres, ce qui est un facteur important dans les propriétés de cohésion et de résistance de l'ensemble. Cela se traduit donc par un ordre positionnel limité, ainsi qu'une orientation moyenne fermement dans la direction des canaux de Havers, résultant du moyennage de couches successives orthogonales l'une par rapport à l'autre mais avec une direction des fibres à un tilt par rapport à la direction du canal.

### b) Os trabéculaire

L'os trabéculaire, ou spongieux, est une structure osseuse composée elle aussi de lamelles, mais dans un cadre qui apparaît beaucoup moins organisé. Ces lamelles se forment en trabécules, soit un ensemble tridimensionnel de plaques et tiges d'os. Les lamelles des trabécules s'organisent en paquets avec un même alignement, et différents paquets à différentes orientations<sup>3,45</sup>. L'os trabéculaire est particulièrement sensible au remodelage osseux, et les nouveaux paquets de lamelles branchent souvent à un angle de 20-30°. Chaque paquet de lamelles est le fruit d'un unique événement de déposition ininterrompu, et séparé de ses voisins par une ligne cimentante.

La structure même des lamelles reste approximativement la même que celle des ostéons, avec une épaisseur moyenne de 6  $\mu\text{m}$ , mais leur organisation relative diffère. Les lamelles présentent en effet deux orientations prédominantes, selon l'axe long de la trabécule, et oblique à celui-ci. L'orientation des lamelles est complètement indépendante d'un quelconque alignement suivant l'axe long d'un os tel que le fémur. Les lignes de ciments quant à elle, sont formées de matrices de collagène désorganisé de 0,25 à 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

### c) Cartilage de croissance

Bien que le cartilage de croissance prenne une certaine importance dans notre modèle de développement de l'ostéosarcome, la structure précise des fibres de collagène dans ce médium semble assez peu étudiée. Le signal assez faible obtenu en SAXS et biréfringence semble indiquer un ordre de l'assemblage des fibres plutôt faible. Sa composition est celle d'un cartilage

hyalin, qui comporte une plus forte quantité de collagène de type II que dans les structures osseuses.

C'est la minéralisation de cette matrice cartilagineuse par l'ossification endochondrale qui résulte sur la production d'os induite depuis le cartilage de croissance. Le processus de minéralisation en hydroxyapatite est entièrement lié à l'action des ostéoblastes et ostéoclastes<sup>17</sup> qui vont résorber le cartilage, minéraliser et refunctionaliser les éléments collagéniques et minéraux sous la forme de l'os trabéculaire ou cortical. La présence de collagène de type I et d'apatite dans le milieu du cartilage de croissance et leur organisation doit donc présenter un signal très inférieur à celui de l'os lamellaire.

### C. Cristaux d'apatite

Le second constituant principal de la structure osseuse est l'hydroxyapatite, qui est identifiée essentiellement par les méthodes d'analyse employées sous la forme de cristaux<sup>46</sup>. La partie minérale de l'os est responsable en grande partie pour sa résistance là où le collagène est considéré comme responsable de ses propriétés de dureté.

La structure et forme des cristaux d'apatite est une question complexe, puisque celles-ci dépendent d'une multitude de paramètres, de l'état d'avancement de la minéralisation dans un processus dynamique, à l'âge et sexe du spécimen<sup>47</sup>. Les changements de distances de mailles cristallines sont imputables à la présence d'ions qui apparemment diffèrent selon les cas. La forme cristalline de plus ou moins bonne qualité est considérée par certains comme des bâtonnets<sup>48</sup>, par d'autres comme des plaquettes<sup>49</sup>.

Leur organisation relative fait également encore débat, avec des résultats récents allant dans le sens d'une distribution dite "en paquets de cartes" avec des intervalles entre cristaux et des épaisseurs de cristaux variables<sup>50,51</sup>. Toujours est-il que l'hydroxyapatite se présente comme une structure plus ou moins bien cristallisée, dont une des fonctions serait l'adsorption en surface d'ions divers afin de fonctionner comme une réserve de ceux-ci<sup>52</sup>. Avec quantité de modèles différents quant à la forme que ceux-ci prennent, et considérant un évolution de celle-ci en fonction du vieillissement<sup>49</sup>, tout ce que nous pouvons faire est être conscients des possibilités et les confronter plus tard aux résultats que nous obtenons, à partir des échantillons infectés par ostéosarcome.

Gardons à l'esprit que l'action de l'ostéosarcome sur la minéralisation de l'os induit par la pathologie est encore plus méconnu, et pourrait donner des résultats ne répondant à aucune observation ou modèle précédent.

## IV. Ostéosarcome

L'ostéosarcome est la tumeur primaire de l'os la plus fréquente chez l'être humain. Comme tous les cancers, il s'agit d'une croissance cellulaire incontrôlée formant une masse anarchique de cellules. Il fait partie d'une famille entière de cancers complexes, les sarcomes, et touche une population essentiellement jeune. Une caractéristique essentielle de l'ostéosarcome est la production osseuse qu'il induit, suivant une structure désordonnée. Les mécanismes par lesquels ce tissu osseux est produit restent encore imparfaitement compris.

## A. Les sarcomes

Les sarcomes constituent une classe entière de tumeurs au trois-quarts hautement malignes, affectant les tissus mous ou durs. Ils apparaissent dans le dérèglement de cellules d'origine mésenchymateuses, comme celles précurseuses des ostéoblastes et chondrocytes. Si globalement les sarcomes représentent environ 1% des cancers chez l'adulte, ils représentent en revanche 15% des cancers chez l'enfant<sup>53</sup>. Au final, un minimum d'un tiers des patients diagnostiqués avec un sarcome meurent des conséquences de la tumeur, la plupart de métastases aux poumons<sup>54</sup>.

Les causes des sarcomes sont largement obscures, avec des résultats d'incidence plus élevés en lien avec les différents cancérigènes, absorption de produits chimiques tels que les herbicides, les radiations, infections virales en situations d'immunodéficience et susceptibilité génétique.

Le développement des sarcomes se fait souvent de manière indolore et n'impacte pas la fonction des organes touchés ou la santé générale de l'individu. Cette apparente innocuité des tumeurs en conjonction avec leur rareté entraîne souvent un faux diagnostic comme un phénomène bénin ou une absence d'identification avant les phases avancées de la pathologie. L'identification des sarcomes nécessite le plus souvent une biopsie.

Le traitement des sarcomes implique principalement une excision chirurgicale de la tumeur. Afin de limiter les risques de récurrence, les marges de prélèvement sont généralement généreuses, sauf dans le cas où la zone touchée présente un risque neurovasculaire important.

## B. Chiffres, incidence, population

Comme nous l'avons dit plus tôt, l'ostéosarcome est la tumeur primaire de l'os la plus courante avec une population importante d'enfants, l'essentiel des cas recensés apparaissant chez les 10-14 ans. L'autre pic de fréquence de l'ostéosarcome apparaît chez les plus de 60 ans, avec une incidence de 1,35/1 dans le ratio homme/femme.

Les taux d'incidence annuels restent faibles, à 4,4 cas pour un million dans la tranche d'âge des 0-24 ans, 1,7 pour un million chez les 25-59 ans, et 4,2 pour un million chez les plus de 60 ans. Cependant, la mortalité post traitement de l'ostéosarcome reste élevée. Dans la période pré-chimiothérapie, 80% des patients traités par chirurgie résultaient en un décès du patient. Ce taux est tombé avec la chimiothérapie, avec environ 70% des patients survivant sur le long terme. Dans les cas métastatiques ou encore de récurrences, le taux de survie passe en revanche en-dessous des 20%.

Si les ostéosarcomes primaires peuvent apparaître sur n'importe quel os, la vaste majorité apparaît dans les os longs des membres, avec un total approximatif de 60% dans les os longs des jambes. Il s'agit des os avec les cartilages de croissance les plus actifs, or le site de développement initial de la tumeur est à 90% dans la métaphyse, pour 9% dans la diaphyse et rarement dans l'épiphyse<sup>54</sup>.

Le traitement de l'ostéosarcome passe par la chirurgie et la chimiothérapie, avec pour certains cas de la radiothérapie. La part de chirurgie impliquée est l'excision de la partie affectée avec des marges importantes afin de garantir l'absence de résidus. Cela se traduit en termes pratiques par une marge d'environ 2 cm<sup>55</sup>, sur des tumeurs déjà de l'ordre de 5 à 10 cm. Les conséquences d'une telle excision, lorsque le cas ne pousse pas jusqu'à l'amputation de la zone affectée, sont donc au minimum une chirurgie reconstructrice très lourde, et une rééducation physique importante. Le rôle de la chimiothérapie avant chirurgie est essentiellement de réduire au minimum la zone à exciser, et après chirurgie pour détruire toute cellule tumorale restante.

## C. La pathologie

L'ostéosarcome se caractérise par la production de matériel osseux de manière incontrôlée. La tumeur se présente sous la forme d'une masse assez large causant l'apparition progressive de douleurs profondes. La masse en question se développe aussi bien dans la cavité médullaire que dans les tissus mous externes. A partir d'un certain stade, le développement de la tumeur cause une diminution de la fonction musculo-squelettique, restreint les mouvements et épanchement articulaire, et dans les cas avancés une perte de poids et cachexie.



Figure 17.: Photo d'un tibia atteint d'ostéosarcome retrouvé sur une momie péruvienne datant de l'an - 800<sup>56</sup>.

L'ostéosarcome présente un spectre de morphologies assez large, mais présente toujours une large production de tissus osseux. La cavité médullaire est le plus souvent envahie, remplaçant l'espace de la moelle, avec l'os trabéculaire initial érodé et les canaux de Havers de l'os cortical remplis ou étendus. Une autre forme d'expression de l'ostéosarcome entraîne la dégradation des structures osseuses saines, ce qui cause la détection de 5 à 10% des cas, suite à une fracture d'origine pathologique.

Les tissus osseux produits sont intimement liés aux cellules tumorales selon des quantités variables dans une structure entrelacée. Le tissu est déposé suivant une structure ressemblant à de l'os trabéculaire désorganisé, avec les fibrilles de collagène bien définies, compressé entre les cellules et en dépôts larges. Les extrémités de la structure sont en général moins bien minéralisées, et dans certains cas on voit apparaître des structures osseuses plus proches du cortical. Le tout comporte des lignes cémentantes de manière désorganisée, et les différentes matrices extracellulaires présentes sont difficiles à distinguer de la substance ostéoïde non minéralisée. La matrice osseuse sarcomateuse est généralement considérée comme une forme de tissu osseux immature, avec une organisation du collagène imparfaite et une minéralisation incomplète, c'est pourquoi afin de faciliter la distinction, l'os produit par l'ostéosarcome est désigné sous le terme de **substance ostéoïde** par la suite.

La fabrication de cette matrice osseuse et la propagation de la tumeur dans l'organisme est le fait de l'action des cellules tumorales sur le mécanisme de remodelage osseux, suivant un mécanisme identifié sous le terme de "cerceau vicieux"<sup>57,58</sup>.

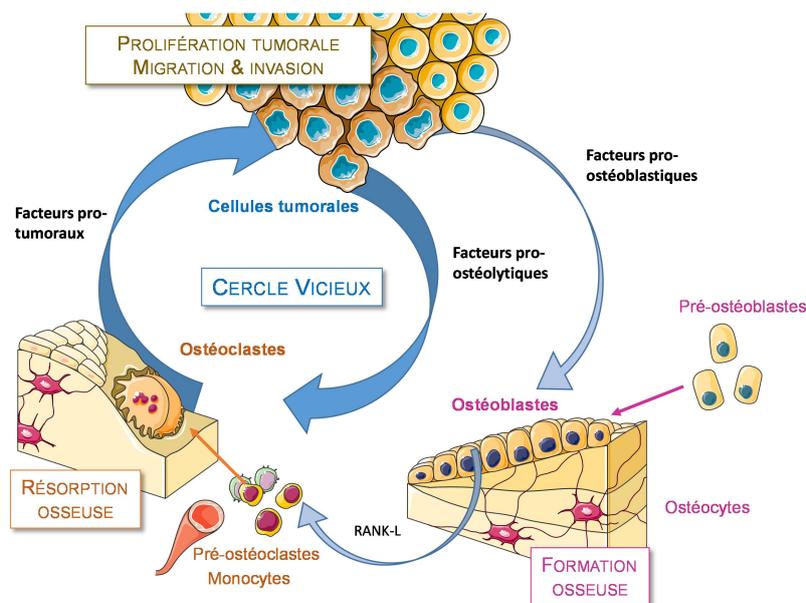


Figure 18.: Cercle vicieux de prolifération de l'ostéosarcome par le mécanisme de remodelage osseux. Propriété de F.Rédini.

Les cellules tumorales agissent sur la production d'ostéoclastes et leur activation par le biais de la libération d'un certain nombre de molécules. La résorption osseuse ainsi générée libère de la matrice osseuse des facteurs qui vont favoriser la prolifération des cellules tumorales. D'autre part, les cellules tumorales activent la production d'os à travers les ostéoblastes, même si les mécanismes exacts de cette activation restent incertains<sup>59,60</sup>.

## V. Objectifs

En tant que physicien, l'étude de l'ostéosarcome passe essentiellement par celle du tissu osseux, le matériau qui se prête le plus aux techniques d'analyse des matériaux à notre disposition. Cependant, l'objectif principal de cette thèse n'est pas seulement l'étude du tissu osseux produit par l'ostéosarcome, mais aussi la recherche des mécanismes de propagation et d'activation de l'activité ostéogénitrice par la tumeur.

Dans ce cadre, nous avons travaillé sur trois axes à des échelles structurales différentes :

**Chapitre 2 :** Nous nous sommes intéressés à l'organisation du collagène à l'échelle microscopique. Nous avons employé des techniques de microscopie en lumière polarisée, dont le système Polscope développé et mis au point lors de cette thèse, pour observer l'orientation et la structure du collagène en auto-organisation et dans le tissu osseux. L'objectif est de comprendre les mécanismes d'organisation du collagène lors du dépôt par les cellules productrices et d'auto-assemblage, afin de mieux appréhender comment celui-ci résulte sur la substance ostéoïde produite par la tumeur.

**Chapitre 3 :** Nous avons étudié les temps courts de développement de l'ostéosarcome, principalement l'échelle nanoscopique par diffraction des rayons X. Les premiers instants de développement de la tumeur sont un aspect encore peu étudié de la pathologie, et l'analyse par diffraction des rayons X nous permet une analyse en profondeur des structures du collagène et de la phase minérale de l'os et l'impact que les cellules tumorales peuvent avoir dessus avec une grande précision. L'objectif est d'identifier les premiers impacts de l'ostéosarcome sur la structure osseuse et leur localisation.

**Chapitre 4 :** Enfin nous étudions la structure macroscopique du réseau d'ostéoïde sarcomateux dans le cadre de la reproduire par des lois de propagation d'un automate cellulaire. Le but est d'employer ces lois comme un guide pour déterminer l'activateur responsable de la production osseuse de la pathologie, ce qui permettrait en aval d'offrir des pistes d'étude sur les méthodes d'inhibition de la propagation de la tumeur dans le cadre du traitement de la pathologie.

## VI. Bibliographie

1. Anatomy and Physiology - OpenStax. <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>.
2. Reznikov, N., Bilton, M., Lari, L., Stevens, M. M. & Kröger, R. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. *Science* **360**, (2018).
3. Reznikov, N., Chase, H., Brumfeld, V., Shahar, R. & Weiner, S. The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone* **71**, 189–195 (2015).
4. Bone hierarchical structure in three dimensions - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706114002360>.
5. Wang, X. *et al.* Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials* **83**, 127–141 (2016).
6. Schaffler, M. B. & Burr, D. B. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. *Journal of Biomechanics* **21**, 13–16 (1988).
7. McCalden, R. W., McGeough, J. A., Barker, M. B. & Court-Brown, C. M. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am* **75**, 1193–1205 (1993).
8. Giraud-Guille, M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 167–180 (1988).
9. LIGHT-MICROSCOPIC HISTOLOGY ATLAS (Yves Clermont, Michael Lalli, Zsuzsanna Bencsath-Makkai). <http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/>.
10. Bouligand, Y., Deneffe, J. P., Lechaire, J. P. & Maillard, M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures. *Biology of the Cell* **54**, 143–162 (1985).
11. Marotti, G. A new theory of bone lamellation. *Calcif Tissue Int* **53**, S47–S56 (1993).
12. 23.3: Liquid Crystals. *Chemistry LibreTexts* [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General\\_Chemistry/Map%3A\\_Principles\\_of\\_Modern\\_Chemistry\\_\(Oxtoby\\_et\\_al.\)/Unit\\_6%3A\\_Materials/23%3A\\_Polymeric\\_Materials\\_and\\_Soft\\_Condensed\\_Matter/23.3%3A\\_Liquid\\_Crystals](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3A_Principles_of_Modern_Chemistry_(Oxtoby_et_al.)/Unit_6%3A_Materials/23%3A_Polymeric_Materials_and_Soft_Condensed_Matter/23.3%3A_Liquid_Crystals) (2015).
13. Besseau, L. & Bouligand, Y. The twisted collagen network of the box-fish scutes. *Tissue and Cell* **30**, 251–260 (1998).
14. Hambli, R. & Hattab, N. Application of Neural Network and Finite Element Method for Multiscale Prediction of Bone Fatigue Crack Growth in Cancellous Bone. in (2013). doi:10.1007/8415\_2012\_146.
15. Rubin, M. A. & Jasiuk, I. The TEM characterization of the lamellar structure of osteoporotic human trabecular bone. *Micron* **36**, 653–664 (2005).

16. Compact Bone, Spongy Bone, and Other Bone Components | Human Anatomy and Physiology Lab (BSB 141). <https://courses.lumenlearning.com/ap1x94x1/chapter/compact-bone-spongy-bone-and-other-bone-components/>.
17. White, A. & Wallis, G. Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation. *Curr. Biol.* **11**, R589-591 (2001).
18. Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S. & Mirams, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 46–62 (2008).
19. Boyer, A. Synthesis, characterization and biological evaluation of silicated and carbonated hydroxyapatites. (2014).
20. Baron, R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Med Sci (Paris)* **17**, 1260–1269 (2001).
21. David, M. Involvement of the Autotaxin (ATX)-Lysophosphatidic acid (LPA)- LPA1 receptor axe in breast cancer metastatic dissemination. (2010).
22. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1092**, 385–396 (2006).
23. Mammalian Cell Culture. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-by-cell-type/mammalian-cell-culture>.
24. Okada, H. *et al.* Ultrastructure of Cement Lines. *Journal of Hard Tissue Biology* **22**, 445–450 (2013).
25. Eriksen, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* **11**, 219–227 (2010).
26. Jones, S. J. Secretory territories and rate of matrix production of osteoblasts. *Calcif Tissue Res* **14**, 309–315 (1974).
27. Kerschnitzki, M. *et al.* The organization of the osteocyte network mirrors the extracellular matrix orientation in bone. *Journal of Structural Biology* **173**, 303–311 (2011).
28. Adil, A. Conception et validation d'un biomatériau hybride pour la régénération osseuse. (2012).
29. Lamora, A. Évaluation du potentiel anti-tumoral des inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  dans l'ostéosarcome. (Nantes, 2015).
30. Peter Fratzl. *Collagen, Structure and Mechanics*. (Springer, 2008).
31. Gautieri, A., Vesentini, S., Redaelli, A. & Buehler, M. J. Hierarchical Structure and Nanomechanics of Collagen Microfibrils from the Atomistic Scale Up. *Nano Lett.* **11**, 757–766 (2011).
32. Petruska, J. A. & Hodge, A. J. A SUBUNIT MODEL FOR THE TROPOCOLLAGEN MACROMOLECULE\*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 871–876 (1964).
33. Schwarz, S. *et al.* Decellularized Cartilage Matrix as a Novel Biomatrix for Cartilage Tissue-Engineering Applications. *Tissue engineering. Part A* **18**, (2012).
34. Hulmes, D. J. S. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *Journal of Structural Biology* **137**, 2–10 (2002).
35. Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A. & Wess, T. J. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *PNAS* **103**, 9001–9005 (2006).

36. Hulmes, D. J., Wess, T. J., Prockop, D. J. & Fratzl, P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils. *Biophysical Journal* **68**, 1661–1670 (1995).
37. Different architectures of the collagen fibril: morphological aspects and functional implications - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141813089900093?via%3Dihub>.
38. Brown, A. I., Kreplak, L. & Rutenberg, A. D. An equilibrium double-twist model for the radial structure of collagen fibrils. *Soft Matter* **10**, 8500–8511.
39. Charvolin, J. & Sadoc, J.-F. Conjecture on the Lateral Growth of Type I Collagen Fibrils. *Biophys. Rev. Lett.* **09**, 225–238 (2014).
40. Hassenkam, T. *et al.* High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. *Bone* **35**, 4–10 (2004).
41. Jeffery, A., Blunn, G., Archer, C. & Bentley, G. Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* **73-B**, 795–801 (1991).
42. Clark, J. M. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat* **171**, 117–130 (1990).
43. Lepescheux, L. Spatial organization of collagen in annelid cuticle: order and defects. *Biology of the Cell* **62**, 17–31 (1988).
44. Liquid crystalline order of biopolymers in cuticles and bones - Giraud-Guille - 1994 - Microscopy Research and Technique - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.1070270508>.
45. Fratzl, P. & Weinkamer, R. Nature’s hierarchical materials. *Progress in Materials Science* **52**, 1263–1334 (2007).
46. Katz, E. P. & Li, S.-T. Structure and function of bone collagen fibrils. *Journal of Molecular Biology* **80**, 1–15 (1973).
47. Smith, C. B. & Smith, D. A. An x-ray diffraction investigation of age-related changes in the crystal structure of bone apatite. *Calc. Tis Res.* **22**, 219–226 (1977).
48. Vetter, U., Eanes, E. D., Kopp, J. B., Termine, J. D. & Robey, P. G. Changes in apatite crystal size in bones of patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int* **49**, 248–250 (1991).
49. Lotsari, A., Rajasekharan, A. K., Halvarsson, M. & Andersson, M. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite. *Nature Communications* **9**, 4170 (2018).
50. Fratzl, P. *et al.* Diffracting “stacks of cards” - some thoughts about small-angle scattering from bone. (2005) doi:10.1007/B107343.
51. Gourrier, A. *et al.* Scanning small-angle X-ray scattering analysis of the size and organization of the mineral nanoparticles in fluorotic bone using a stack of cards model. *Journal of Applied Crystallography* **43**, 1385–1392 (2010).
52. Posner, A. S. The structure of bone apatite surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **19**, 241–250 (1985).
53. Sarcomas, Soft Tissue - Introduction. *Cancer.Net* <https://www.cancer.net/cancer-types/sarcomas-soft-tissue/introduction> (2012).
54. CDM, F., JA, B., PCW, H. & F, M. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*.

55. Li, X., Moretti, V. M., Ashana, A. O. & Lackman, R. D. Impact of close surgical margin on local recurrence and survival in osteosarcoma. *Int Orthop* **36**, 131–137 (2012).
56. Capasso, L. Antiquity of cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **113**, 2–13 (2005).
57. Wittrant, Y. *et al.* RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* **1704**, 49–57 (2004).
58. Lamora, A. *et al.* TGF- $\beta$  Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J Clin Med* **5**, E96 (2016).
59. Bone deposition, bone resorption, and osteosarcoma - Toledo - 2010 - Journal of Orthopaedic Research - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.21120>.
60. Corre, I., Verrecchia, F., Crenn, V., Redini, F. & Trichet, V. The Osteosarcoma Microenvironment: A Complex but Targetable Ecosystem. *Cells* **9**, 976 (2020).

CHAPITRE 2 :  
MICROSCOPIE EN LUMIERE POLARISEE DU  
COLLAGENE ET DE L'OS

## Table des matières du Chapitre 2

I.	La lumière polarisée : principes d'interaction avec la matière et mesure.....	29
A.	Principes théoriques .....	30
1)	Polarisation et biréfringence.....	30
a)	Polarisation de la lumière.....	30
b)	Biréfringence.....	31
2)	Vecteurs de Stokes et matrices de Muller .....	32
a)	Vecteurs de Stokes.....	32
b)	Matrices de Mueller : principe et cas remarquables. ....	33
c)	Effet de l'orientation sur la matrice de Mueller.....	35
B.	Principes des mesures de polarisation.....	36
1)	Mesure en polarisation croisée .....	36
2)	Mesure en polscope .....	38
II.	Mise en oeuvre expérimentale d'un microscope à polarisation.....	41
A.	Éléments techniques des microscopes à polarisation.....	41
1)	Montage optique.....	41
2)	Fonctionnement des compensateurs à Cristaux Liquides.....	42
a)	Principe des compensateurs à cristaux liquides .....	42
b)	Système de contrôle en tension des compensateurs.....	42
3)	Caractérisation du système à triple compensateur cristaux liquides .....	43
a)	Réponse en tension du système compensateur cristaux liquides.....	43
b)	Réalisation des états de mesure.....	44
B.	Microscopie en lumière polarisée Polscope.....	45
C.	Microscopie en lumière polarisée croisée.....	46
III.	Observation des structures du collagène dans différents milieux.....	48
A.	Collagène : observation de différentes phases en microscopie optique à lumière polarisée.....	48
1)	Solution de collagène et conditions expérimentales.....	48
2)	Observation de la phase nématique .....	49
3)	Structure de domaines d'orientation en bandes .....	49
4)	Déformation de l'interface.....	51
5)	Cylindres de double twist .....	54
6)	Déformation de l'interface à cylindres twistés .....	55

7)	Domaines de fibres orientées en bandes.....	56
8)	Discussion.....	58
B.	Étude de structure de collagène transparente d'origine biologique.....	58
C.	Séchage de solution de collagène en milieu microtexturé.....	59
1)	Matériel et méthode.....	59
a)	Fabrication des moules.....	59
b)	Moulage des chambres microfluidiques en PDMS.....	61
c)	Diffusion séchage à travers le PDMS.....	61
2)	Direction d'orientation imposée par le flux.....	62
3)	Réseaux de défauts d'organisation du collagène.....	64
a)	Réseaux carrés.....	64
b)	Réseau hexagonal.....	66
4)	Conclusion.....	68
IV.	Étude de l'os en microscopie à lumière polarisée.....	68
A.	Observation de tranches d'os long.....	68
1)	Tibia de souris modèle.....	68
2)	Échantillons de souris : tibias infectés à l'ostéosarcome.....	70
B.	Interface de construction de l'os.....	71
1)	Interface de la structure osseuse.....	71
2)	Observations polscope de l'interface.....	72
3)	Modélisation azimuth/retardance du collagène déposé en interface.....	74
V.	Conclusion.....	76
VI.	Bibliographie.....	77

GLOSSAIRE :

$E_x, E_y$  : composantes suivant les axes x et y de l'onde électromagnétique

$\omega$  : pulsation de l'onde,  $2\pi$  fois la fréquence

$t$  : variable temporelle

$\varphi$  : déphasage de la pulsation de l'onde entre ses composantes

$\theta$  : angle de l'axe principal de l'ellipse de la polarisation

$n$  : indice de réfraction de la matière

$n_x, n_y$  : indices de réfraction suivant x et y d'un matériau biréfringent

$n_L$  et  $n_R$  : indices de réfraction des polarisations circulaires respectivement gauche (Left) et droite (Right)

$c$  : célérité de la lumière,  $\approx 3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$

$v$  : vitesse de la lumière dans un matériau d'indice de réfraction  $n$

$\lambda$  : longueur d'onde de la lumière

$d$  : épaisseur de l'échantillon

$\delta$  : retardance

$\theta_i$  : rotation de  $\theta$  induite par un matériau cholestérique

$S_{0^\circ}, S_{45^\circ}, S_{90^\circ}, S_{145^\circ}, S_L, S_R$  : vecteurs de Stokes de la lumière polarisée linéairement suivant un angle de  $0, 45, 90$  ou  $145^\circ$  et des polarisations circulaires gauche et droite

$P_{0^\circ}, P_{45^\circ}, P_{90^\circ}, P_{145^\circ}, P_L, P_R$  : composantes de la lumière polarisée suivant les polarisations linéaires et circulaires.

$k$  : direction de propagation de l'onde électromagnétique

$M$  : matrice de Mueller d'un matériau

$R_m(\theta)$  : matrice de Mueller de la rotation d'un élément d'un angle  $\theta$ , à combiner avec l'élément à  $-\theta$  pour générer la nouvelle matrice de Mueller du matériau ayant subi la rotation

$M(\theta, \delta)$  : Matrice de Mueller d'un matériau biréfringent d'orientation  $\theta$  et de retardance  $\delta$

$\Sigma_0, \Sigma_1, \Sigma_2, \Sigma_3, \Sigma_4$  : configurations de l'analyseur du système polscope

$\chi$  : angle de déphasage des configurations  $\Sigma_1, \Sigma_2, \Sigma_3, \Sigma_4$  par rapport à la configuration  $\Sigma_0$ , parfois exprimé en terme de retardance par rapport à la longueur d'onde, soit  $\lambda/2 = 273\text{nm}$ , etc.

La microscopie optique en lumière polarisée est une technique d'observation qui consiste à envoyer de la lumière polarisée à travers un échantillon afin d'observer les structures 3D de matériaux anisotropes. Celle-ci permet de contraster les dits matériaux anisotropes avec leur pendant dits isotropes, de déterminer les différences de configuration et de composition des échantillons. Il s'agit d'une technique principalement utilisée en géologie, dans le cadre de l'observation de structures cristallines, mais qui peut s'appliquer à de très nombreux matériaux, biologiques et inorganiques, aux organisations de polymères ou de cristaux liquides. Or l'un des composants essentiels de l'os, le collagène, possède in vitro des propriétés de cristaux liquides.

Les intérêts de cette technique comportent une facilité de mise en œuvre, fournissant rapidement des informations sur la nature biréfringente des matériaux, leur orientation et leur organisation. Toutes ces raisons, additionnées de la disponibilité d'un dispositif de microscopie à lumière polarisée en transmission, nous ont amené à employer cette technique, en tant qu'analyse préliminaire de la structure de l'os.

L'objectif de cette partie est de déterminer s'il est possible d'effectuer une étude histopathologique, ici dans le cadre de l'ostéosarcome, en utilisant les techniques de microscopie en lumière polarisée. Dans une première partie, nous allons voir les principes physiques et les calculs sur lesquels se base la microscopie optique en lumière polarisée, et comment ceux-ci sont mis en œuvre pour réaliser des mesures. Dans une seconde partie, nous présentons les différents systèmes de microscopie en lumière polarisée employés et comment un système polscope a été recréé et mis en œuvre.

Dans une troisième partie, nous abordons la question du collagène et de son organisation. Nous décrivons les différentes structures observées lors de l'évolution de la concentration de collagène sous l'effet du séchage de solution. Nous référençons la publication réalisée en partenariat avec Nadine Nassif et son équipe sur la structure du collagène transparent d'origine biologique. Et enfin, dans un autre partenariat avec Nadine Nassif et Elora Bessot, présentons les observations obtenues sur l'organisation du collagène en séchage dans des milieux microtexturés, dans le cadre de la reproduction de la structure du collagène dans les ostéons.

Enfin dans une quatrième partie, nous observons des échantillons d'os sains et infectés d'ostéosarcome d'une part, et la phase de collagène à l'interface de construction de l'os d'autre part.

## **I. La lumière polarisée : principes d'interaction avec la matière et mesure**

La microscopie en lumière polarisée se base sur les propriétés de polarisation de la lumière et son interaction avec la matière. Cette partie a pour objectif de décrire les propriétés de la lumière dont la microscopie en lumière polarisée tire parti, et les propriétés de la matière à même de les changer. A partir de ces éléments, il est ensuite redémontré comment ces propriétés et les calculs qui en découlent sont utilisés dans le cadre des techniques de microscopie en lumière polarisée employées au cours de cette thèse.

## A. Principes théoriques

La lumière possède des propriétés à la fois orientationnelles  $\theta$  et de phase entre ses composantes électriques et magnétiques. Ce sont ces propriétés qui résultent sur une interaction entre rayonnement et matière en fonction de l'organisation de la matière.

### 1) Polarisation et biréfringence

La polarisation se définit comme la réorganisation simplifiée d'un corps ou de la lumière sous l'effet d'un champ électromagnétique ou d'un filtre. La biréfringence quant à elle se définit comme la propriété de certains corps transparents (quartz) de diviser en deux le rayon lumineux qui les pénètre, soit d'interagir différemment avec la lumière en fonction de sa polarisation.

#### a) Polarisation de la lumière

La lumière est une onde électromagnétique (EM), qui peut être représentée comme la superposition d'un champ électrique avec un champ magnétique, perpendiculaires entre eux, ainsi qu'à la direction de propagation de la lumière. La polarisation de la lumière est un élément qui dépend du champ électrique. Celui-ci peut-être décomposé en deux composantes  $x$  et  $y$  dont la pulsation est déphasée d'un angle  $\varphi$ :

$$E_x = E_{0x} \cos(\omega t) \quad E_y = E_{0y} \cos(\omega t + \varphi) \quad (1)$$

La valeur du déphasage  $\varphi$  détermine le caractère d'ellipticité de l'onde lumineuse, parmi toutes les solutions possibles entre les solutions linéaire et circulaires (Fig. 1.a). En plus du déphasage déterminant l'ellipticité et le sens de rotation le cas échéant, un autre paramètre entre en compte, l'orientation  $\theta$  de l'axe principal de l'ellipse.

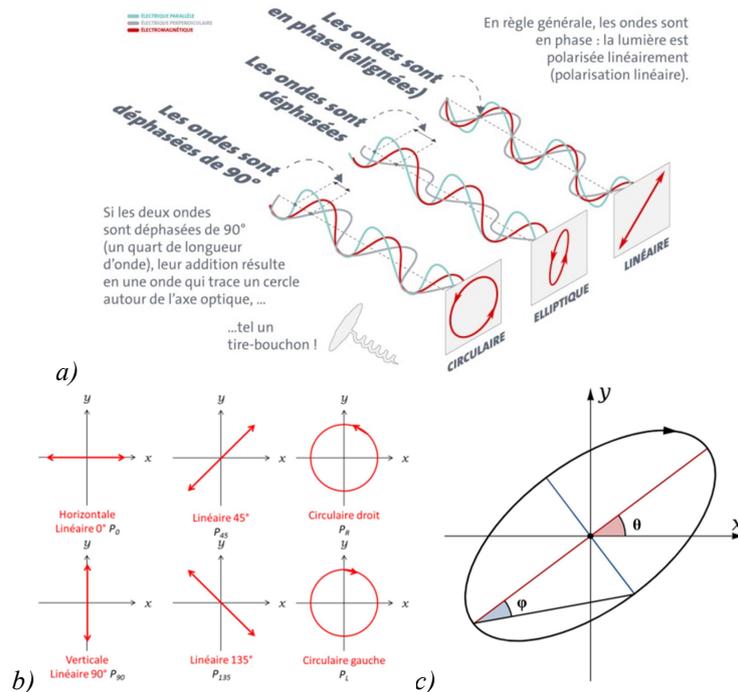


Figure 1.: a) Lien entre déphasage et figure de polarisation de la lumière. b) Liste et représentations des polarisations remarquables. c) Paramètres  $\varphi$  et  $\theta$  dans l'ellipse.

La polarisation dépend du déphasage  $\varphi$ , mais également de l'orientation  $\theta$ . L'ensemble des polarisations possibles dépend donc de deux angles, et ainsi peut être représenté selon une sphère appelée sphère de Poincaré, dont le centre représente la lumière sans polarisation.

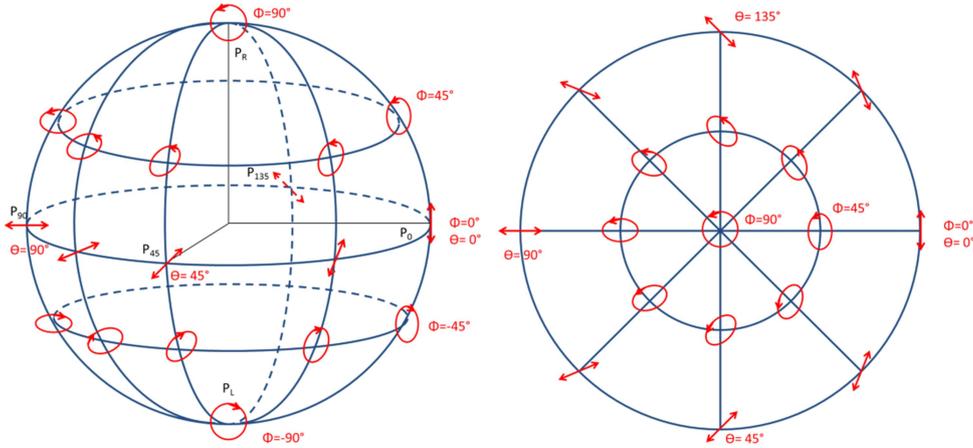


Figure 2.: Sphère de Poincaré des polarisations et vue du dessus

Modifier les états de polarisation et d'orientation de la lumière revient donc à se déplacer le long des méridiens et des parallèles de la sphère de Poincaré. Certains matériaux possèdent des propriétés optiques à même de générer de tels déplacements.

### b) Biréfringence

La lumière ne se propage pas à la même vitesse à travers la matière qu'à travers le vide, mais à une vitesse  $v$  telle que :

$$v = \frac{c}{n}$$

où  $c$  est la constante de célérité de la lumière, et  $n$  un indice propre à la matière appelé indice de réfraction. A noter que cet indice dépend souvent de la fréquence de l'onde lumineuse.

Un matériau dont l'indice de réfraction  $n$  est indifférent à la polarisation de la lumière est dit **isotrope**. La plupart de ces matériaux correspondent à des milieux désordonnés ou des réseaux cristallins cubiques. Les matériaux **anisotropes** présentent en revanche un indice de réfraction différent en fonction de la direction, souvent lié à l'organisation de leur structure. Ils sont alors dits **biréfringents**. Ces indices de réfraction  $n_x$  et  $n_y$  agissent sur la vitesse de propagation des composantes  $x$  et  $y$  du champ électrique (1) de l'onde. Cette différence de vitesse de propagation induit un retard entre les deux composantes, en fonction de l'épaisseur de l'échantillon, qui se traduit par une modification du déphasage  $\varphi$ , soit un changement de polarisation. Cela équivaut à un déplacement le long d'un des méridiens de la sphère de Poincaré (Fig. 2).

Le déphasage induit par un échantillon est aussi appelé 'retardance'. Il s'agit donc d'une valeur en radians que nous notons  $\delta$ , et dont l'expression peut s'écrire :

$$\delta = \frac{2\pi(n_x - n_y)d}{\lambda}$$

où  $n_x$  et  $n_y$  sont les indices de réfraction suivant les deux axes du repère cartésien dans le plan,  $d$  l'épaisseur de l'échantillon et  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière.

Certains matériaux présentent également une biréfringence dite circulaire, associée aux matériaux chiraux, qui s'exprime par une différence de réponse aux lumières polarisées droite et gauche due au sens de rotation des éléments composant le matériau considéré. Si les molécules composant un matériau biréfringent expriment leur chiralité par une rotation, alors le matériau aura des indices de réfraction à la lumière polarisée circulaire  $n_L$  et  $n_R$ . Un tel milieu agit sur une lumière polarisée droite en agissant sur l'orientation  $\theta$  d'une valeur induite  $\theta_i$  telle que :

$$\theta_i = \frac{2\pi(n_L - n_R)d}{\lambda}$$

## 2) Vecteurs de Stokes et matrices de Muller

Nous avons vu le phénomène de biréfringence et les principes physiques qui y sous-tendent. Si cela nous permet de comprendre ce que nous observerions sous lumière polarisée, il est nécessaire de comprendre l'aspect mathématique de la chose pour pouvoir en tirer des mesures, de l'angle d'orientation de la matière, ainsi que de la retardance.

### a) Vecteurs de Stokes

Afin de définir mathématiquement les phénomènes de polarisation et les changements opérés sur celle-ci par les phénomènes de biréfringences, nous utilisons les calculs de Mueller<sup>1</sup>. Dans ceux-ci, le vecteur de Stokes  $\mathbf{S}$  est employé pour décrire l'état de polarisation d'un rayonnement lumineux et les matrices de Mueller  $\mathbf{M}$  pour décrire les propriétés de modification de la polarisation d'un objet.

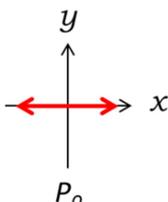
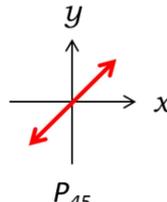
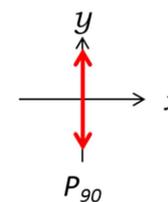
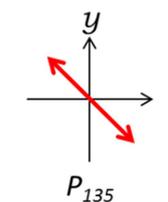
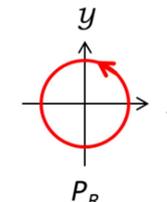
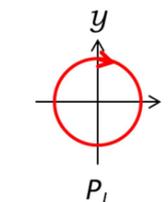
Le vecteur de Stokes est défini suivant les polarisations particulières établies plus tôt,  $P_R, P_L, P_{0^\circ}, P_{45^\circ}, P_{90^\circ}$  et  $P_{135^\circ}$ .

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I \\ P_{0^\circ} - P_{90^\circ} \\ P_{45^\circ} - P_{135^\circ} \\ P_R - P_L \end{bmatrix} \quad (2)$$

$$I = P_{0^\circ} + P_{90^\circ} = P_{45^\circ} + P_{135^\circ} = P_R + P_L \quad (3)$$

A noter que  $s_0$  est le terme d'intensité totale  $I$ , et est égal aux autres sommes de polarisations orthogonales.

En conséquence de quoi les vecteurs de Stokes des polarisations remarquables s'écrivent :

$S_{0^\circ} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$	$S_{45^\circ} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}$	$S_{90^\circ} = \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$	$S_{135^\circ} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{bmatrix}$	$S_R = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}$	$S_L = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix}$
					
$P_0$	$P_{45}$	$P_{90}$	$P_{135}$	$P_R$	$P_L$

**b) Matrices de Mueller : principe et cas remarquables.**

Une matrice de Mueller  $M$  d'un objet altérant la polarisation de la lumière est définie comme la matrice qui transforme le vecteur de Stokes incident en sa forme de sortie.

$$S' = \begin{bmatrix} S'_0 \\ S'_1 \\ S'_2 \\ S'_3 \end{bmatrix} = MS = \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix} \quad (4)$$

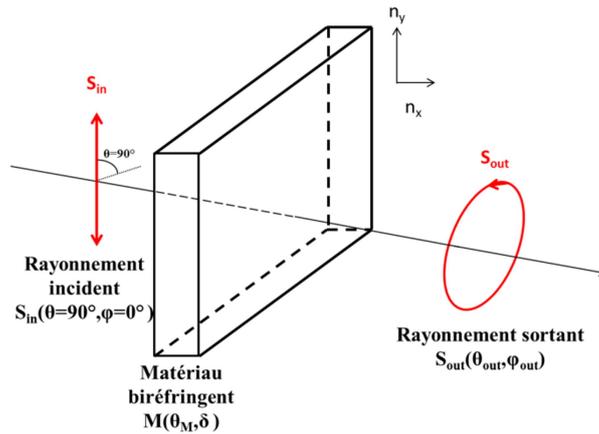


Figure 3.: Schéma d'effet d'un matériau biréfringent sur la polarisation, vecteurs de Stokes et matrice de Mueller

Dans cette approche de la lumière, il est possible de rapprocher des différents termes de la matrice de Mueller à certains types de polarisation. Les termes en 0 étant les composantes en intensité,  $m_{00}$  étant l'intensité totale, les termes en 1 et 2 les termes en polarisation linéaires tels  $P_{0^\circ}$  et  $P_{45^\circ}$ , et les termes en 3 étant lié aux interactions de polarisation circulaire  $P_L$  et  $P_R$ . Les différents termes de la matrice étant les interactions entre les différentes polarisations.

La microscopie en lumière polarisée requiert un ensemble d'outils optiques, de polariseurs linéaires, de lames quart d'onde. Les lames quart (Q) et demi ondes (H) sont des éléments qui entraînent un changement du déphasage  $\varphi$  de respectivement  $90^\circ$  et  $180^\circ$ , soit de retardance  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{1}{2}$ . A noter que dans le cas de la lame quart d'onde, l'orientation de celle-ci influence sur

l'angle  $\theta$  de l'orientation linéaire lors d'un passage d'une orientation circulaire à linéaire. Chacun de ces éléments que nous avons employés possède sa propre matrice de Mueller  $\mathbf{M}(\theta, \delta)$ , obtenue à partir de la formule générale des éléments biréfringents :

$$\mathbf{M}(\theta; \delta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2 2\theta + \sin^2 2\theta \cos \delta & \sin 2\theta \cos 2\theta (1 - \cos \delta) & -\sin 2\theta \sin \delta \\ 0 & \sin 2\theta \cos 2\theta (1 - \cos \delta) & \sin^2 2\theta + \cos^2 2\theta \cos \delta & \cos 2\theta \sin \delta \\ 0 & \sin 2\theta \sin \delta & -\cos 2\theta \sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix} \quad (5)$$

Avec pour rappel  $\delta = \frac{2\pi(n_x - n_y)d}{\lambda}$  la retardance, soit l'action du matériau sur le déphasage  $\varphi$ , et  $\theta$  l'orientation des éléments. Soit celle de l'objet biréfringent dans la matrice de Mueller, et celle de la lumière polarisée dans les vecteurs de Stokes.

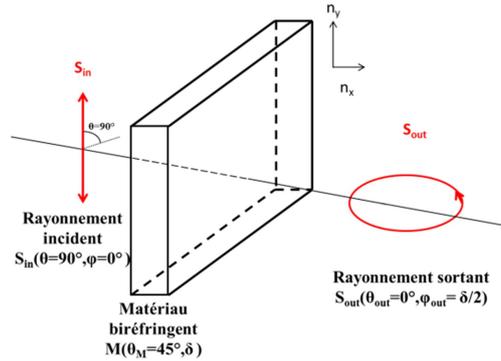


Figure 4.: Schéma exemple d'effet d'un matériau biréfringent sur la polarisation de la lumière.

L'ensemble des lames retardatrices représente des cas particuliers de cette matrice de Muller, tels que pour les lames quart d'onde  $\mathbf{Q}_\theta$  aux différentes orientations :

$$\begin{aligned} \mathbf{Q}_{0^\circ} = \mathbf{M}(0; 90) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} & \mathbf{Q}_{45^\circ} = \mathbf{M}(45; 90) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \\ \mathbf{Q}_{90^\circ} = \mathbf{M}(90; 90) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} & \mathbf{Q}_{135^\circ} = \mathbf{M}(135; 90) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

Lames demi-onde  $\mathbf{H}_\theta$  :

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_{0^\circ} = \mathbf{M}(0; 180) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} = \mathbf{H}_{90^\circ} \\ \mathbf{H}_{45^\circ} = \mathbf{M}(45; 180) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} = \mathbf{H}_{135^\circ} \end{aligned}$$

Les polariseurs droits aux différentes orientations  $\mathbf{A}_\theta$  en revanche suivent des règles différentes :

$$\mathbf{A}_{0^\circ} = \begin{bmatrix} 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad \mathbf{A}_{45^\circ} = \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{A}_{90^\circ} = \begin{bmatrix} 1/2 & -1/2 & 0 & 0 \\ -1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad \mathbf{A}_{135^\circ} = \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & -1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Les polariseurs circulaires  $\mathbf{A}_L$  et  $\mathbf{A}_R$  pour leur part sont le fruit du couplage d'un polariseur linéaire entre deux lames quart d'onde orientées de  $\pm 45^\circ$ :

$$\mathbf{A}_L = \mathbf{Q}_{135^\circ} \mathbf{A}_{0^\circ} \mathbf{Q}_{135^\circ} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & 0 & -1/2 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1/2 & 0 & 0 & 1/2 \end{bmatrix} \quad \mathbf{A}_R = \mathbf{Q}_{45^\circ} \mathbf{A}_{0^\circ} \mathbf{Q}_{45^\circ} = \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & 0 & 1/2 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1/2 & 0 & 0 & 1/2 \end{bmatrix}$$

Ces éléments forment les outils avec lesquels nous pouvons expliquer le principe des mesures en lumière polarisée.

### c) Effet de l'orientation sur la matrice de Mueller

Le passage à travers une série d'éléments altérant la polarisation revient à effectuer le calcul avec de multiples matrices de Mueller. De plus, la matrice de Mueller d'un élément est dépendant à la fois de la direction de propagation  $\mathbf{k}$  et de la longueur d'onde  $\lambda$  de la lumière. Dans le montage d'un microscope à lumière polarisée, la direction de propagation est fixée par le montage. En revanche, une rotation de l'élément auquel réfère la matrice de Mueller induit des changements liés à l'orientation tels que :

$$\mathbf{M}(\theta) = \mathbf{R}_m(\theta) \mathbf{M} \mathbf{R}_m(-\theta) =$$

$$\begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(2\theta) & -\sin(2\theta) & 0 \\ 0 & \sin(2\theta) & \cos(2\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(2\theta) & \sin(2\theta) & 0 \\ 0 & -\sin(2\theta) & \cos(2\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

Démontrons le fonctionnement sur la matrice de Mueller d'un polariseur linéaire à  $0^\circ$   $\mathbf{A}_{0^\circ}$  tourné de  $45^\circ$ :

$$\mathbf{R}_m(45^\circ) \mathbf{A}_{0^\circ} \mathbf{R}_m(145^\circ) = \mathbf{R}_m(45^\circ) \begin{bmatrix} 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \mathbf{R}_m(145^\circ)$$

$$= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 1/2 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$= \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} = \mathbf{M}_{45^\circ} \quad (7)$$

$$\text{et } \mathbf{A}_{45^\circ} \mathbf{S}_{\text{dépolarisé}} = \begin{bmatrix} 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1/2 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} = \mathbf{S}_{45} \quad (8)$$

Ce qui confirme que tourner un polariseur linéaire à  $0^\circ$  de  $45^\circ$  le transforme bien en polariseur à  $45^\circ$ . A partir de ces éléments, nous pouvons définir les matrices de Mueller des outils que nous avons utilisés en microscopie à polarisation ainsi que les configurations des polariseurs à cristaux liquides (CL) que nous avons caractérisé.

## B. Principes des mesures de polarisation

Le principe même d'une mesure en lumière polarisée est l'effet de l'échantillon sur la polarisation de la lumière en sortie. Quoiqu'il soit possible de déterminer cet effet, la mesure en elle-même ne se fait que sur l'intensité lumineuse  $I$  reçue en fin de parcours, pixel par pixel. Nous allons ici voir par le calcul comment fonctionne les méthodes d'observation de microscopie en lumière polarisée à partir des éléments discutés précédemment.

### 1) Mesure en polarisation croisée

Une des mesures de polarisation les plus courantes est la mesure en polarisation dite croisée. Elle consiste à envoyer de la lumière à travers un polariseur linéaire, afin d'obtenir de la lumière polarisée linéairement, puis après que cette lumière soit passée à travers l'échantillon, de faire passer le chemin optique par un nouveau polariseur linéaire, appelé ici 'analyseur' orienté à  $90^\circ$  du précédent. De cette manière, la seule intensité observable est celle dont la polarisation a été modifiée par l'échantillon.

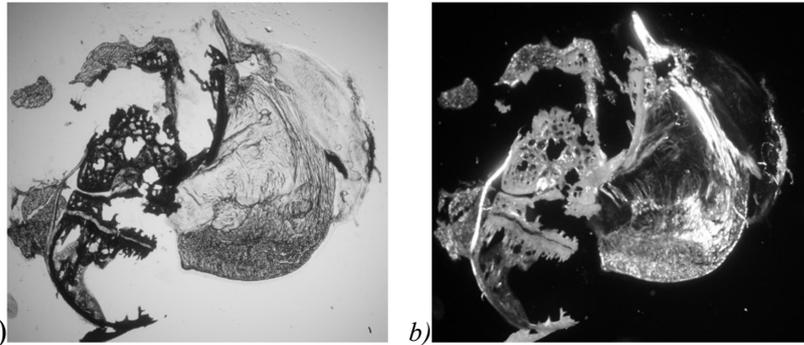


Figure 5.: a) Image en microscopie d'une tranche de patte de souris au niveau de l'articulation fémur/tibia. b) Image en polarisation croisée.

Le processus prend, pour la lumière en sortie de l'échantillon, la forme :

$$\mathbf{MS}_{0^\circ} = \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} m_{00} + m_{01} \\ m_{10} + m_{11} \\ m_{20} + m_{21} \\ m_{30} + m_{31} \end{bmatrix} = \mathbf{S}'_{0^\circ} \quad (9)$$

Ce qui donne après passage à travers l'analyseur :

$$\mathbf{A}_{90^\circ} \mathbf{S}'_{0^\circ} = \begin{bmatrix} \frac{1}{2} & -\frac{1}{2} & 0 & 0 \\ -\frac{1}{2} & \frac{1}{2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} m_{00} + m_{01} \\ m_{10} + m_{11} \\ m_{20} + m_{21} \\ m_{30} + m_{31} \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} + m_{01} - m_{10} - m_{11} \\ m_{10} + m_{11} - m_{00} - m_{01} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (10)$$

Or, la partie mesurable est l'intensité lumineuse  $I$ , qui correspond au premier terme du vecteur de Stokes, ce qui donne une intensité en polarisation croisée  $I^{croix}$  :

$$I_{0^\circ}^{croix} = I[\mathbf{A}_{90^\circ} \mathbf{M}(\theta; \delta) \mathbf{S}_{0^\circ}] = \frac{m_{00} + m_{01} - m_{10} - m_{11}}{2} \quad (11)$$

De même pour une configuration tournée à  $45^\circ$  :

$$\begin{aligned} \mathbf{A}_{135^\circ} \mathbf{M} \mathbf{S}_{45^\circ} &= \mathbf{A}_{135^\circ} \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & m_{03} \\ m_{10} & m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{20} & m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{30} & m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} \frac{1}{2} & 0 & -\frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} m_{00} + m_{02} \\ m_{10} + m_{12} \\ m_{20} + m_{22} \\ m_{30} + m_{32} \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} + m_{02} - m_{20} - m_{22} \\ 0 \\ m_{20} + m_{22} - m_{00} - m_{02} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (12) \end{aligned}$$

$$\text{avec } I_{45^\circ}^{croix} = I[\mathbf{A}_{135^\circ} \mathbf{M}(\theta; \delta) \mathbf{S}_{45^\circ}] = \frac{m_{00} + m_{02} - m_{20} - m_{22}}{2} \quad (13)$$

Les termes mesurés de la matrice de Mueller par ce système sont donc :

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} m_{00} & m_{01} & m_{02} & \cdot \\ m_{10} & m_{11} & \cdot & \cdot \\ m_{20} & \cdot & m_{22} & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \end{bmatrix}$$

Or, d'après la matrice de Mueller générale pour un matériau biréfringent, les termes  $m_{01}$ ,  $m_{10}$ ,  $m_{02}$ ,  $m_{20}$ ,  $m_{03}$ ,  $m_{30}$ , sont nuls. Ce qui nous donne donc une mesure des termes purement linéaires  $m_{11}$ , et  $m_{22}$ . La réponse d'un échantillon biréfringent  $\mathbf{M}(\theta; \delta)$  à une analyse en polarisation croisée est donc d'après les formules (5), (11) et (13) :

$$I_{0^\circ}^{croix} = \frac{m_{00} - m_{11}}{2} = \frac{1}{2} [\sin^2 2\theta (1 - \cos \delta)] \quad (14)$$

$$I_{45^\circ}^{croix} = \frac{m_{00} - m_{22}}{2} = \frac{1}{2} [\cos^2 2\theta (1 - \cos \delta)] \quad (15)$$

Ce qui permet alors, à partir de ces deux résultats décalés de  $\theta=45^\circ$ , de déterminer la retardance et l'orientation à  $90^\circ$  près de l'échantillon :

$$I_{0^\circ}^{croix} + I_{45^\circ}^{croix} = \frac{1 - \cos \delta}{2} \quad (16)$$

$$\tan 2\theta = \sqrt{\frac{I_{0^\circ}^{croix}}{I_{45^\circ}^{croix}}} \quad (17)$$

Cette méthode permet donc une mesure de la retardance, ainsi qu'une mesure de l'orientation à  $90^\circ$  près.

2) Mesure en polscope

S'il est possible de déterminer la retardance d'un échantillon à partir de la méthode en polarisation linéaire croisée, les limitations à  $90^\circ$  près de la mesure d'orientation peut s'avérer limitante dans l'observation de certains matériaux.

Il est en revanche possible à partir de plus nombreuses mesures de déterminer l'angle  $\theta$  d'orientation des structures du matériau<sup>2</sup> avec une précision à  $180^\circ$ . Le principe consiste à envoyer une lumière polarisée circulaire gauche  $S_L$  sur l'échantillon, puis de réaliser l'acquisition de cinq images avec l'analyseur en configuration polariseur circulaire droit  $\Sigma_0$ , puis 4 images avec un analyseur en configurations elliptiques décalées d'une retardance  $\chi$  suivant les axes  $\theta=0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$  et  $135^\circ$ , respectivement  $\Sigma_1, \Sigma_3, \Sigma_2$  et  $\Sigma_4$ . La valeur de  $\chi$  dépend du niveau de retardance escompté de l'échantillon. Plus la retardance de l'échantillon est élevée, plus l'angle  $\chi$  est petit afin de compenser la force du signal. Ce système permet, en jouant sur la valeur de  $\chi$ , d'observer différents niveaux de retardance.

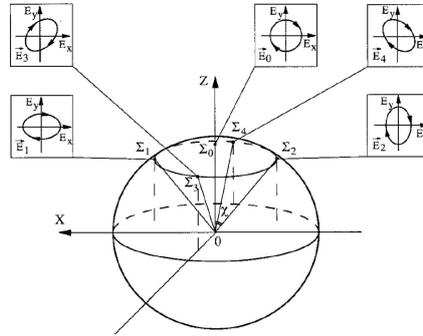


Figure 6.: Positions des configurations analyseur dans la sphère de Poincaré.

L'image  $\Sigma_0$  consiste à mesurer l'intensité  $I_0$  suivant la configuration :

$$\Sigma_0 = A_R M S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} + m_{30} - m_{03} - m_{33} \\ 0 \\ 0 \\ m_{00} + m_{30} - m_{03} - m_{33} \end{bmatrix} \quad I_0 = \frac{m_{00} + m_{30} - m_{03} - m_{33}}{2} \quad (18)$$

Pour leur part, les autres termes  $\Sigma_i$  et  $I_i$  sont les résultats des produits :

$$\begin{aligned} \Sigma_1 &= A_{0^\circ} M(135^\circ; \chi) M S_L = A_{0^\circ} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\chi & 0 & \sin\chi \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -\sin\chi & 0 & \cos\chi \end{bmatrix} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} \\ m_{10} - m_{13} \\ m_{20} - m_{23} \\ m_{30} - m_{33} \end{bmatrix} \\ &= A_{0^\circ} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} \\ \cos\chi(m_{10} - m_{13}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ m_{20} - m_{23} \\ -\sin\chi(m_{10} - m_{13}) + \cos\chi(m_{30} - m_{33}) \end{bmatrix} \\ &= \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{10} - m_{13}) - \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{10} - m_{13}) - \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

$$\text{Soit } I_1 = \frac{m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{10} - m_{13}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33})}{2} \quad (19)$$

De même:

$$\Sigma_2 = A_{90^\circ} M(45^\circ; \chi) M S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} - \cos\chi(m_{10} - m_{13}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ -m_{00} + m_{03} + \cos\chi(m_{10} - m_{13}) - \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$I_2 = \frac{m_{00} - m_{03} - \cos\chi(m_{10} - m_{13}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33})}{2} \quad (20)$$

$$\Sigma_3 = A_{45^\circ} M(0^\circ; \chi) M S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{20} - m_{23}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \\ m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{20} - m_{23}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$I_3 = \frac{m_{00} - m_{03} + \cos\chi(m_{20} - m_{23}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33})}{2} \quad (21)$$

$$\Sigma_4 = A_{135^\circ} M(90^\circ; \chi) M S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} m_{00} - m_{03} - \cos\chi(m_{20} - m_{23}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \\ -m_{00} + m_{03} + \cos\chi(m_{20} - m_{23}) - \sin\chi(m_{30} - m_{33}) \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$I_4 = \frac{m_{00} - m_{03} - \cos\chi(m_{20} - m_{23}) + \sin\chi(m_{30} - m_{33})}{2} \quad (22)$$

L'ensemble de ces mesures permettent la mesure d'un ensemble plus complet des éléments de la matrice de Mueller, impliquant des termes en lien avec les interactions de la lumière polarisée en circulaire :

$$M = \begin{bmatrix} m_{00} & \cdot & \cdot & m_{03} \\ m_{10} & \cdot & \cdot & m_{13} \\ m_{20} & \cdot & \cdot & m_{23} \\ m_{30} & \cdot & \cdot & m_{33} \end{bmatrix}$$

Or, ces formules sont employées dans le cadre d'échantillons localement biréfringents, de biréfringences et d'orientations inconnues, soit pour rappel notre formule générale (5) :

$$M(\theta; \delta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2 2\theta + \sin^2 2\theta \cos\delta & \sin 2\theta \cos 2\theta (1 - \cos\delta) & -\sin 2\theta \sin\delta \\ 0 & \sin 2\theta \cos 2\theta (1 - \cos\delta) & \sin^2 2\theta + \cos^2 2\theta \cos\delta & \cos 2\theta \sin\delta \\ 0 & \sin 2\theta \sin\delta & -\cos 2\theta \sin\delta & \cos\delta \end{bmatrix} \quad (5)$$

Ce qui nous permet alors de déterminer les termes  $\Sigma_i$  et  $I_i$  de notre calcul polscope à partir des formules 13 à 18, grandement simplifiés par les termes en  $m_{10}$ ,  $m_{20}$ ,  $m_{30}$  et  $m_{03}$  qui se trouvent être nuls :

$$\Sigma_0 = A_R M(\theta; \delta) S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 - \cos\delta \\ 1 - \cos\delta \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_0 = \frac{1 - \cos\delta}{2} \quad (23)$$

$$\Sigma_1 = A_{0^\circ} M(135^\circ; \chi) M(\theta; \delta) S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 + \sin 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi \\ 1 - \sin 2\theta \sin \delta \cos \chi + \cos \delta \sin \chi \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_1 = \frac{1 - \sin 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi}{2} \quad (24)$$

$$\Sigma_2 = A_{90^\circ} M(45^\circ; \chi) M(\theta; \delta) S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 - \sin 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi \\ -1 + \sin 2\theta \sin \delta \cos \chi + \cos \delta \sin \chi \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_2 = \frac{1 + \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi}{2} \quad (25)$$

$$\Sigma_3 = A_{45^\circ} M(0^\circ; \chi) M(\theta; \delta) S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 - \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi \\ 0 \\ -1 + \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi + \cos \delta \sin \chi \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_3 = \frac{1 - \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi}{2} \quad (26)$$

$$\Sigma_4 = A_{135^\circ} M(90^\circ; \chi) M(\theta; \delta) S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 + \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi \\ 0 \\ -1 - \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi + \cos \delta \sin \chi \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_4 = \frac{1 + \cos 2\theta \sin \delta \cos \chi - \cos \delta \sin \chi}{2} \quad (27)$$

A partir de ces images, il est alors possible de calculer :

$$A \equiv \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} = \sin 2\theta \tan \delta \quad B \equiv \frac{I_4 - I_3}{I_3 + I_4 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} = \cos 2\theta \tan \delta \quad (28)$$

Ce qui permet de déterminer la retardance  $\delta$  et l'azimut  $\theta$  de l'échantillon :

$$\delta = \arctan(\sqrt{A^2 + B^2}) \text{ si } I_1 + I_2 - 2I_0 \geq 0$$

$$\text{ou } \delta = 180^\circ - \arctan(\sqrt{A^2 + B^2}) \text{ si } I_1 + I_2 - 2I_0 < 0 \quad (29)$$

$$\theta = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{A}{B}\right) \quad (30)$$

Il est intéressant de noter que la retardance  $\chi$  employée pour l'acquisition permet de jouer sur l'intensité lumineuse mesurée mais n'affecte pas la mesure de la retardance et de l'angle de l'échantillon. Il s'agit ni plus ni moins que d'un outil de réglage de l'échelle de mesure sur  $\delta$ .

Afin de corriger les disparités en positions de  $\chi$  et le bruit, il est possible d'effectuer une acquisition au niveau d'un espace vide qui permette de calculer les valeurs  $A_0$  et  $B_0$ , telles que :

$$A \equiv \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} - A_0 = \sin 2\theta \tan \delta \quad B \equiv \frac{I_4 - I_3}{I_3 + I_4 - 2I_0} \tan \frac{\chi}{2} - B_0 = \cos 2\theta \tan \delta \quad (31)$$

Si cette méthode permet une plus grande efficacité de mesure de l'orientation et de la retardance, elle est malgré tout soumise à ses propres limites. Il est difficile d'observer les plus petites retardances sans avoir une très forte luminosité au niveau des plus fortes, entraînant un phénomène de saturation des moyens de capture optique de l'image résultante. Or, si les

calculs de mesure fonctionnent par soustraction, la fiabilité des mesures d'intensité n'est valable que dans le cadre où la réponse à la lumière est linéaire.

## II. Mise en oeuvre expérimentale d'un microscope à polarisation

Afin d'observer des échantillons biréfringents et d'en obtenir la valeur de biréfringence autant que l'orientation, nous avons été amenés à utiliser trois systèmes différents, diversité motivée par la panne définitive de notre système originel. Tous fonctionnent suivant les principes de mesure polscope décrits ci-avant. Deux modèles sont d'origine commerciale, le dernier est le résultat d'un montage caractérisé et mis en place au laboratoire.

### A. Éléments techniques des microscopes à polarisation

#### 1) Montage optique

Le microscope employé sur les trois modèles est un microscope inversé modèle IX70 Olympus (Fig. 7). Sur ce système, nous avons effectué le montage optique à même de réaliser la mesure polscope décrite par Shribak, M. & Oldenbourg, R<sup>2</sup> (Fig. 7.c).

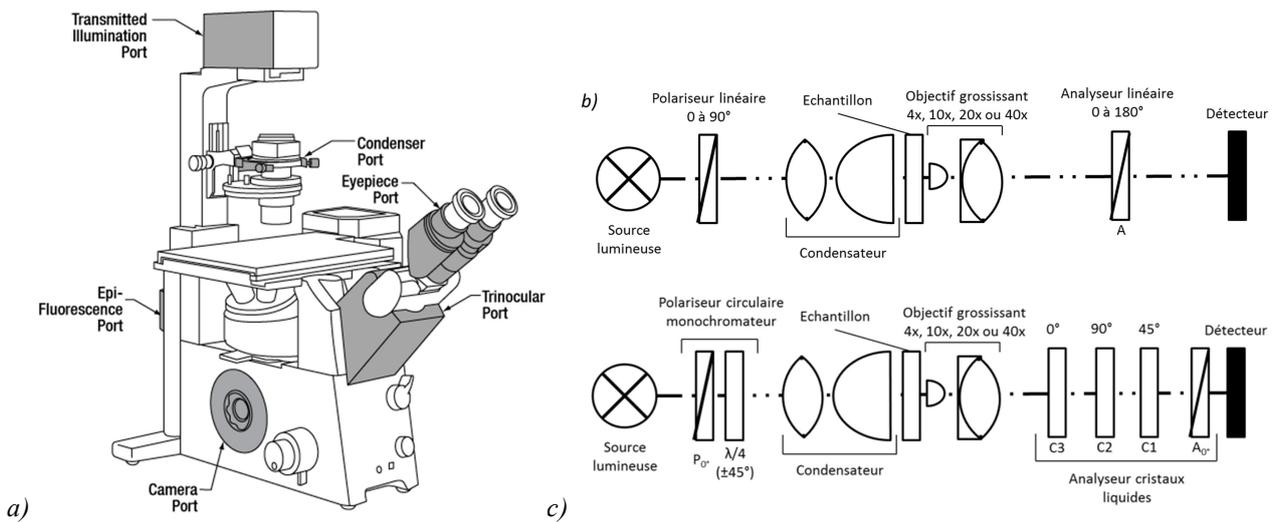


Figure 7.: a) Schéma du microscope inversé utilisé pour la configuration polscope. b) Montage optique du système en polarisation croisée. c) Montage optique de mesure polscope. C1, C2 et C3 compensateurs à cristaux liquides de retardances modulables.

Dans la configuration microscopie en lumière polarisée croisée (Fig 7.b), la lumière passe simplement par un polariseur linéaire dont l'orientation est ajustable sur une plage de 90°. La lumière passe ensuite par l'échantillon, puis par un autre polariseur analyseur d'orientation entièrement contrôlable. L'orientation de l'analyseur est toujours ajustée de manière à obtenir une extinction maximale de la lumière de fond.

Dans la configuration polscope, le chemin optique passe d'abord par le polariseur circulaire gauche d'entrée qui fait également office de monochromateur à 546nm, car les effets de lame retardatrice comme la lame quart d'onde dépendent de la longueur d'onde de l'onde lumineuse qui la traverse. Si de la lumière polychromatique est envoyée à travers le système, un effet de

frise chromatique apparaît. En sortie de l'objectif grossissant, l'analyseur elliptique, composé des trois compensateurs à la suite décalés de  $45^\circ$  en orientation suivis d'un polariseur linéaire alignés sur le deuxième compensateur, qui est considéré comme l'orientation  $0^\circ$ .

L'image de sortie est ensuite envoyée par le port caméra vers une caméra CCD USB un demi pouce de diagonale monochrome modèle EO-23122M de résolution  $1920 \times 1200$  pixels, avec une profondeur de pixel de 12-bits.

## 2) Fonctionnement des compensateurs à Cristaux Liquides

### a) Principe des compensateurs à cristaux liquides

Les compensateurs CL sont des appareils contrôlés en tension. Le milieu cristaux liquides est situé entre deux électrodes qui lors de leur mise sous tension vont générer un champ électrique. Les cristaux liquides vont tendre à s'aligner avec le champ électrique ainsi généré, celui-ci étant proportionnel à la tension appliquée. Aussi, le niveau d'alignement des cristaux liquides est dépendant de la tension appliquée au système, ce qui entraîne une différence de comportement optique du système. Plus la tension est élevée, plus la retardance du compensateur CL est importante. Nous pouvons ainsi contrôler à loisir les retardance afin d'obtenir les différentes configurations elliptiques  $\Sigma_n$  d'analyseur requises. L'orientation relative des différents compensateurs permettant de manipuler à la fois les angles  $\varphi$  et  $\theta$  du signal sur la sphère de Poincaré (Fig.2 et 6).

Les cristaux liquides sont contrôlés en tension individuellement par ordinateur, alimentés par un signal carré à 1kHz de tension maximale crête à crête  $\pm 5V$ . La tension appliquée agit sur la retardance de chaque système CL, ce qui permet de générer des configurations quart d'onde, demi-onde et trois quarts d'onde ainsi que l'ensemble des possibilités entre pour générer les différentes analyses de polarisation elliptiques  $\Sigma_n$  nécessaires à une analyse de la retardance et de l'orientation des échantillons.

A noter que la réponse des cristaux est sujette à une tension seuil en-dessous de laquelle les cristaux restent dans leur position de repos. Position à laquelle ils retournent lentement lorsque le système n'est plus sous tension.

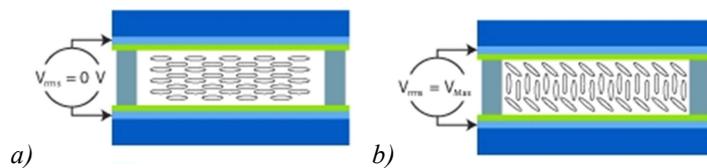


Figure 8.: a) Système au repos b) Système sous champ électrique

### b) Système de contrôle en tension des compensateurs

Afin de contrôler la tension appliquée aux trois compensateurs CL, nous utilisons le système schématisé ci-après, mis en place et fourni par Patrick CHASLES, en configuration 1kHz et une tension d'entrée à  $\pm 5V$ , la tension étant l'élément modulé.

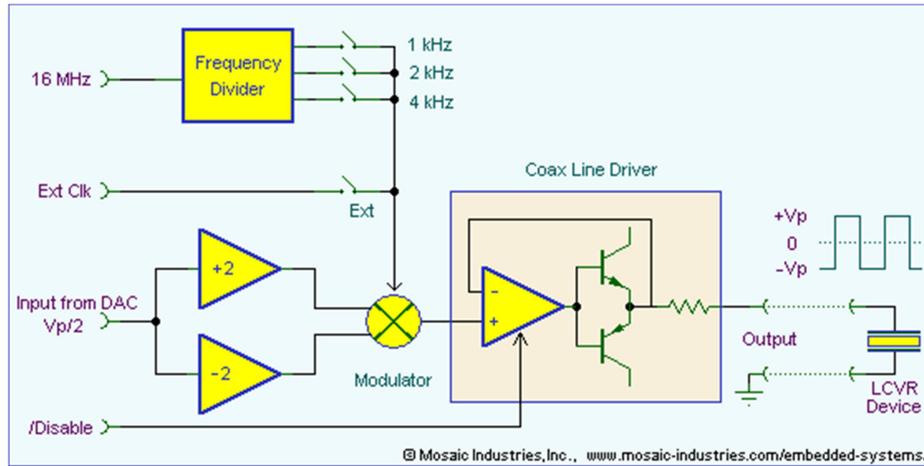


Figure 9.: Montage générateur de tensions

Nous désignons comme  $V_1$ ,  $V_2$  et  $V_3$  les tensions individuelles appliquées aux différents compensateurs C1, C2 et C3.

### 3) Caractérisation du système à triple compensateur cristaux liquides

#### a) Réponse en tension du système compensateur cristaux liquides

Afin de caractériser notre système polscope, nous nous sommes basés sur une mesure totale de la luminosité perçue par la caméra en l'absence d'échantillon. Afin d'aider la détermination empirique de l'orientation  $\theta$  des configurations obtenues, nous utilisons une lame quart d'onde adaptée.

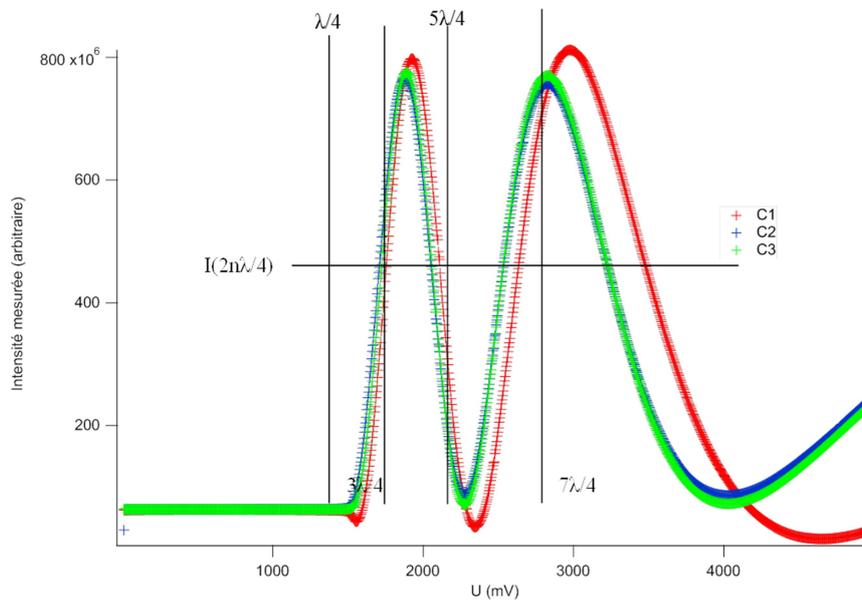


Figure 10.: Réponse en tension individuelle des compensateurs à cristaux liquides, les extremas correspondent à des déphasages de la retardance multiples de  $\lambda/4$ .

La réponse en tension des différents systèmes à cristaux liquides est similaire dans son comportement, avec des extinctions et des maxima qui correspondent sensiblement aux mêmes tensions appliquées. Nous identifions ici comme C2 et C3 les compensateurs

respectivement à 90° l'un de l'autre, et C1 comme celui orienté à 45° de celui-ci, les comportements des deux compensateurs C2 et C3 se correspondant de manière bien plus marquée, aux imprécisions sur la tension délivrée près. Le système avec les compensateurs orientés à 90° l'un de l'autre offre une plus grande précision sur les différentes orientations de  $\chi$  nécessaires pour la mesure en polscope, de faibles variations sur C2 autour de  $5\lambda/4$  pouvant améliorer la précision d'une configuration  $3\lambda/2$  de C3 où les réponses en tension sont beaucoup plus fortes. La réponse en tension de C1 quant à elle est plus étalée et donc moins susceptible aux besoins de correction.

Les différents maxima et minima correspondent à des configurations multiples de quart d'onde, transformant la polarisation circulaire d'entrée en des polarisations linéaires alignées ou non avec l'analyseur linéaire de sortie. Aussi les extremas ne peuvent être que des multiples impairs d'un déphasage de  $\lambda/4$  de la retardance, les configurations en  $\lambda/2$  correspondant aux valeurs de moitié de l'intensité maximale mesurable, puisque la polarisation de la lumière en sortie est alors circulaire et déphasée de  $\lambda/4$  par rapport à l'analyseur linéaire de sortie.

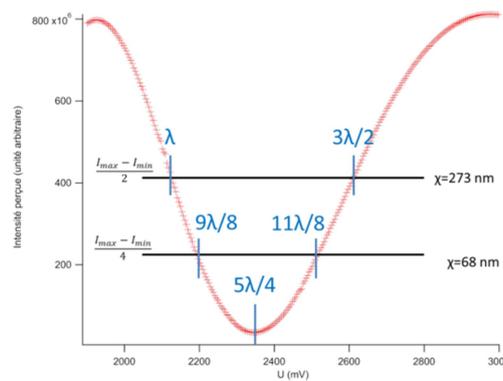


Figure 11.: Etalonnage des valeurs en tension des différentes configurations suivant  $\chi$

L'objectif étant dans le cadre du polscope de générer un déphasage  $\chi$  autour d'une situation d'extinction de la lumière incidente sortie du polariseur circulaire, soit un équivalent total de retardance  $5\lambda/4$  pour une extinction avec l'analyseur linéaire en sortie. Une fois l'extinction optimale obtenue en faisant varier les tensions contrôlant les compensateurs autour de leur configuration propre en  $5\lambda/4$ , soit C2 et C3 se contrebalançant et C1 effectuant l'extinction, il est alors possible de rechercher les différentes valeurs de tension des états  $\Sigma_n$ .

## b) Réalisation des états de mesure

A partir de ces réponses, nous pouvons alors déterminer les configurations en tension des compensateurs qui nous permettent d'analyser la composante circulaire droite. Celle-ci s'identifie comme, en l'absence d'échantillon, le minimum d'intensité lumineuse, puisque la lumière d'entrée est circulaire gauche. A partir de là, les configurations d'analyse en polarisation linéaire, donc pour une étude sur un échantillon de haute biréfringence, correspondent à une valeur d'intensité à 50% du maximum. Exemple:

$$M_{0^\circ} S_L = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \frac{1}{2} S_{0^\circ}$$

Cependant, l'intensité seule ne nous permet pas de déterminer l'orientation  $\theta$  des polarisations linéaires analysées. Aussi pour cela nous utilisons une lame quart d'onde que nous utilisons comme échantillon. Suivant l'orientation  $\theta$  de celle-ci, nous pouvons modifier la polarisation incidente en la gamme des orientations linéaires possibles.

$$\mathbf{Q}_{0^\circ} \mathbf{S}_L = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{bmatrix} = \mathbf{S}_{135^\circ}$$

$$\mathbf{Q}_{45^\circ} \mathbf{S}_L = \mathbf{S}_{0^\circ} \quad \mathbf{Q}_{90^\circ} \mathbf{S}_L = \mathbf{S}_{45^\circ} \quad \mathbf{Q}_{135^\circ} \mathbf{S}_L = \mathbf{S}_{90^\circ}$$

A partir de l'analyse des minimas et maximas obtenus en fonction de l'orientation de la lame quart d'onde, il est alors possible de déterminer quelles configurations des compensateurs permettent l'analyse dans ces orientations. Un maximum pour la lame quart d'onde en position  $0^\circ$  correspond à une configuration de  $\chi$  suivant l'axe 45-135°, une simple recherche de la réponse en tension située en vis-à-vis par rapport à la valeur correspondant à  $5\lambda/4$  nous permettant alors de trouver la configuration de  $\chi$  pour l'orientation à  $90^\circ$  de celle obtenue.

A partir de l'extinction de départ, les différents états  $\Sigma_n$  sont alors obtenus en faisant varier C1 en tension supérieure et inférieure jusqu'à obtenir les intensités à échantillon vide correspondant au déphasages  $\chi$ , puis de répéter l'opération sur C2 et C3 en tension supérieure.

## B. Microscopie en lumière polarisée Polscope

Les calculs présentés plus tôt en **I.B.2)** pour obtenir les valeurs d'azimuth et de retardance à partir de mesure en intensité lumineuse sont appliqués à des ensembles complets de valeurs, les images acquises avec la caméra montée en sortie du système optique. Cela requiert cinq mesures d'intensité en configurations  $\Sigma_n$  pour un même degré d'ellipticité. A partir des cinq images obtenues pour un décalage  $\chi$  donné, il est possible d'appliquer l'ensemble des formules (16) à (18) pour obtenir des images de l'échantillon observé en mesure d'azimuth et de retardance.

Les mesures d'azimuth sont représentées graphiquement par la couleur selon un cercle chromatique à fréquence 2, puisqu'il n'y a pas de discrimination possible d'orientation d'un objet à  $180^\circ$  près. La retardance mesurée est représentée quant à elle par l'intensité de la couleur en question, permettant une visualisation directe et graphique des deux paramètres sur une seule et même image.

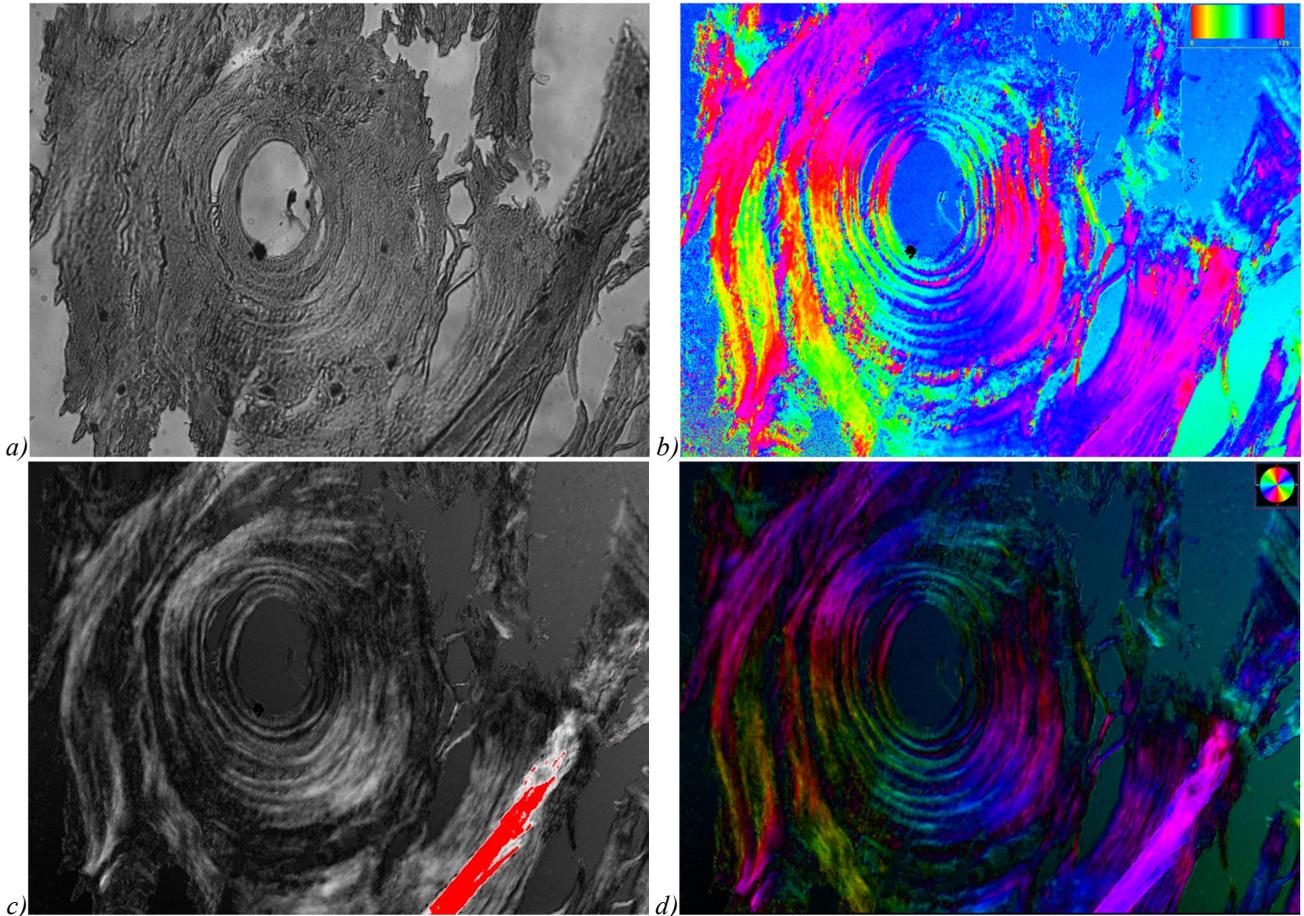


Figure 12.: a) Ostéon de brebis en microscopie optique. b) Image couleur de l'azimuth mesuré en polscope. c) Image en niveaux de gris de la retardance mesurée en polscope. d) Image polscope en combinaison de la retardance et de l'azimuth.

L'un des défauts inhérents à la mesure de biréfringence est l'incapacité à observer les structures orientées suivant la ligne de vue. Cela peut rendre l'identification d'une continuité d'une structure difficile puisque l'absence de biréfringence est impossible à distinguer d'une structure biréfringente orientée vers l'observateur. Pour exemple la Fig.12 avec l'ostéon gardant la même composition sur son ensemble, mais des zones d'extinction (sombres) apparaissent au polscope dans la structure là où la microscopie optique indique clairement une continuité dans la présence de matériel. De même que les mesures de retardance sont impactées par le niveau d'obliquité des structures avec le plan d'observation. Ces paramètres sont à garder à l'esprit lors de l'interprétation des différentes images polscope, ainsi que la connaissance établie de l'échantillon observé, tel ses circonstances dans le cas d'un élément visqueux confiné entre lame et lamelle et étalé.

### C. Microscopie en lumière polarisée croisée

Le système de mesure en microscopie à lumière polarisée croisée est simple de mise en œuvre. La lumière passant par un polariseur linéaire d'orientation quelconque est déterminé comme le  $0^\circ$ , et une fois la zone d'observation désirée obtenue, la mise au point est effectuée manuellement de l'analyseur en le faisant tourner jusqu'à obtenir l'extinction maximale de la

lumière de fond. Une fois cette configuration obtenue, une simple acquisition de l'image est nécessaire.

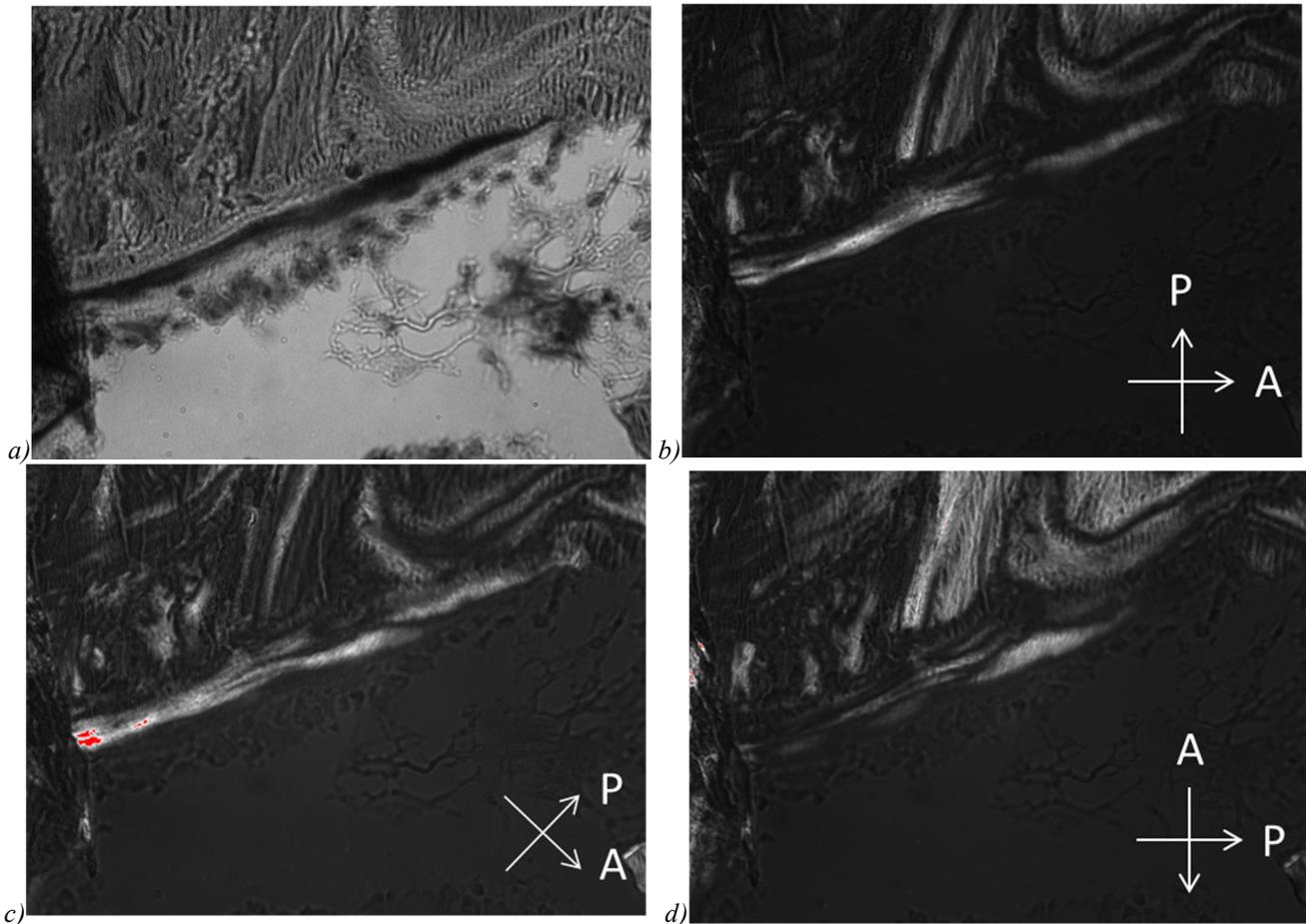


Figure 13.: Interface de construction de l'os chez la brebis, full scale  $211 \times 169 \mu\text{m}$ . a) Image en microscopie classique b) Image en polarisation croisée à  $0^\circ$ . P indique la direction c) Image en polarisation croisée à  $45^\circ$ . d) Image en polarisation croisée à  $90^\circ$ .

On peut observer ici que les différentes orientations de polariseur et d'analyseur font apparaître les biréfringences suivant différentes directions des structures de l'interface osseuse. Une bonne partie de l'os minéralisé en haut à gauche de l'image ne semble pas présenter de biréfringence forte dans le plan d'observation, en revanche l'interface elle-même présente une forte retardance quelle que soit l'orientation donnée. Il est également évident ici qu'il est très difficile de résoudre les structures complexes juste à partir de la méthode de microscopie en polarisation croisée. En effet, les zones présentant une biréfringence forte à  $0^\circ$  ne sont pas nécessairement en extinction à  $90^\circ$ , et le caractère manuel et personnel d'observation du minimum d'intensité du fond lumineux n'offre pas la meilleure précision de mesure. Cette méthode permet cependant d'effectuer une observation rapide des échantillons, ainsi qu'une méthode efficace d'identification des zones d'intérêt.

### **III. Observation des structures du collagène dans différents milieux**

Nous avons employé ces méthodes afin d'observer, d'étudier et d'analyser un ensemble de matériaux, principalement l'os et le collagène principalement. L'objectif est d'étudier la structure du collagène dans ces structures hiérarchiques afin de mieux comprendre l'organisation du collagène, spécialement dans l'os sain, afin de pouvoir caractériser les différences avec l'os sarcomateux. Nous allons présenter nos résultats suivant une organisation « bottom-up » des différentes échelles étudiées.

#### **A. Collagène : observation de différentes phases en microscopie optique à lumière polarisée**

Comme il est connu que la minéralisation est une étape postérieure à l'organisation du collagène dans la formation de l'os, le processus d'organisation structurelle de l'os repose essentiellement sur la structure hiérarchique du collagène formée lors de l'ostéogénèse. Dans le but de mieux comprendre les comportements du collagène de type I qui constitue essentiellement l'os, nous avons voulu étudier comment celui-ci s'organisait dans le cadre d'un partenariat avec Nadine Nassif, dont le travail portait essentiellement sur la structure du collagène dans le cadre de matériaux biomimétiques.

Le collagène en solution se comporte comme un cristal liquide, et l'organisation des structures prises par celui-ci va dépendre de la concentration de celui-ci, concentration que nous avons fait varier par séchage. Pour la compréhension de nos observations, nous nous sommes beaucoup intéressés aux publications de Yves Bouligand<sup>3-5</sup>.

##### **1) Solution de collagène et conditions expérimentales**

La solution de collagène employée dans l'ensemble de cette partie a été réalisée par l'axe Biominéralisation de Nadine Nassif au Laboratoire de Chimie Condensée de Paris de la Sorbonne.

Le collagène employé lors des expériences est issu de queue de rat. Le collagène de type I est extrait de tendon de queue de rat frais préalablement lavé avec une solution tampon de phosphate, puis solubilisé dans de l'acide acétique pur à 99,8%. La solution est ensuite centrifugée, puis le surnageant précipité avec une solution saline. Le précipité de collagène de type I est ensuite à nouveau solubilisé dans de l'acide acétique et désalinisé par dialyse. La concentration de la solution résultante a été calculée par titration hydroxyproline pour une valeur d'environ 2mg/mL.

Afin d'observer l'organisation du collagène à concentration critique d'organisation structurelle, une goutte est posée sur une lame de verre avant d'être confinée avec une lamelle. Cette configuration permet un séchage qui s'effectue à l'interface, entraînant un gradient de concentration. L'absence de liberté en hauteur limitée par les lames de verre permet également une observation au microscope mieux résolue, en plus de la contrainte dans le plan du gradient de concentration qui permet de simplifier la problématique.

Une seconde configuration d'observation consiste à mettre la lamelle de verre en appui sur une autre sur un côté afin de générer également un gradient d'épaisseur dans l'échantillon. Cela génère une pente depuis une épaisseur maximale de 100 $\mu\text{m}$  jusqu'à 0, qui permettrait de déterminer si certaines structures sont l'effet de la contrainte imposée d'une épaisseur spécifique par confinement.

## 2) Observation de la phase nématique

La première structure observée lors du séchage est l'apparition d'une phase nématique, soit l'ensemble des molécules de collagène qui s'alignent suivant la même direction. Sur l'exemple ci-dessous, la couleur indicatrice de la direction des molécules est relativement homogène, les variations correspondant avec l'orientation même de l'interface solution/air.

En effet, l'orientation observée correspond à un alignement sur l'interface des molécules de collagène, et il semble que cette organisation à l'interface ait forcé le comportement plus en profondeur de la phase. Les stries parallèles vaguement observables dans la structure sont possiblement l'expression de la chiralité des molécules de collagène, se présentant donc sous la forme d'un nématique chiral<sup>6</sup>, cependant les mesures plus poussées sur l'échantillon ne semble pas indiquer de variation mesurable de la retardance ou de l'orientation.

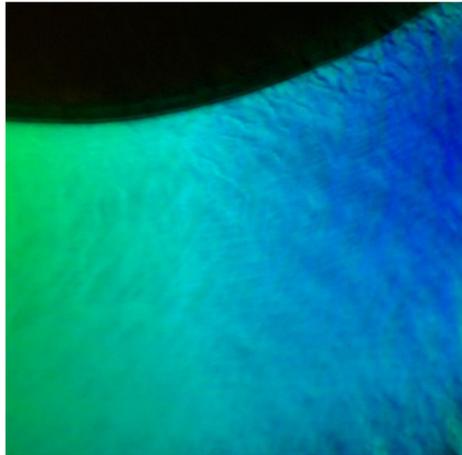


Figure 14.: Phase nématique du collagène, full scale 121x112 $\mu\text{m}$ .

Nous pouvons également observer que la poursuite du séchage va entraîner une complexification de la structure apparente du collagène avec l'apparence « craquelures » au niveau de l'interface, sans doute les prémices d'une des structures discutées plus loin. Cette phase qui apparait essentiellement au début du séchage et dans des conditions de contraintes assez modérées est ici considérée comme la première organisation du collagène entraînée par le séchage.

## 3) Structure de domaines d'orientation en bandes

Un autre phénomène observé dans l'organisation du collagène en séchage est l'apparition de domaines d'orientation organisés en bandes consécutives à l'interface. Ce phénomène n'est pas apparu aux plus petites épaisseurs. La figure suivante est réalisée à une interface proche de 100 $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Selon toute vraisemblance Cette figure de retrait est la conséquence de

conditions limites en épaisseur imposées, les structures apparaissant du côté air de l'interface, formant une à la base d'un ménisque asymétrique.

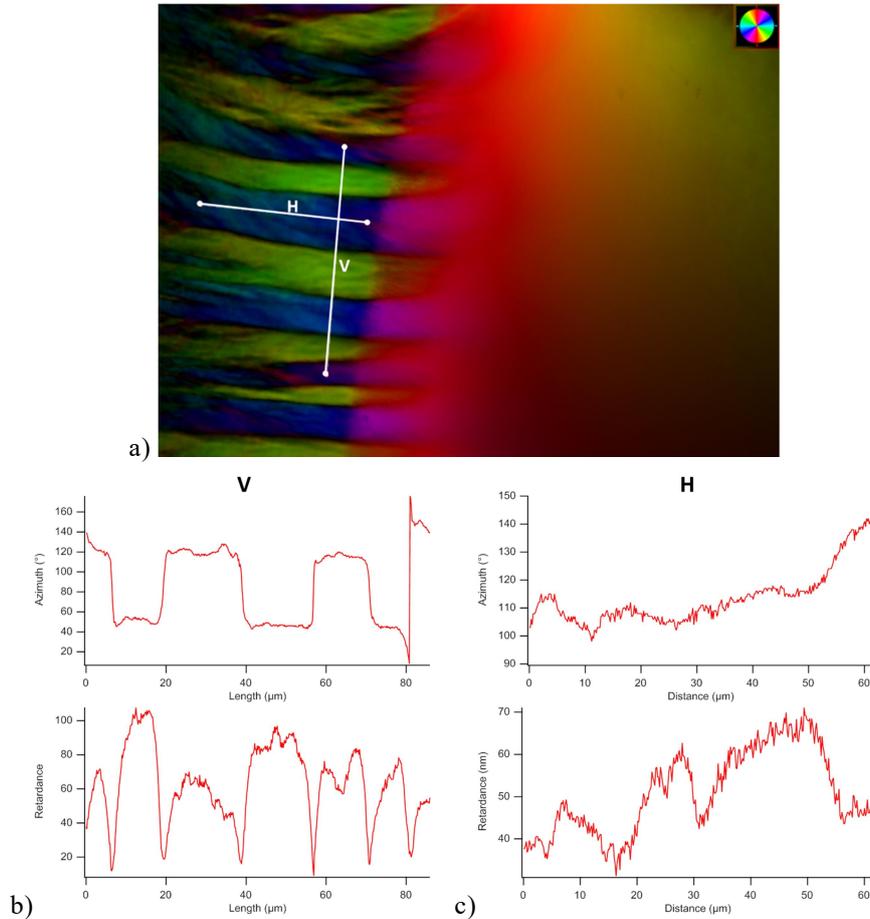


Figure 15.: a) Phénomène de domaines orientationnel en bandes à l'interface, full scale  $211 \times 169 \mu\text{m}$ .  
 Ligne de mesure des valeurs de retardance et d'azimuth. b) Graphes de l'évolution de l'azimuth et de la retardance à travers les domaines suivant la ligne V (verticale), du haut vers le bas. c) Graphes de l'évolution de l'azimuth et de la retardance dans la longueur d'un domaine suivant la ligne H (horizontale), de gauche à droite.

Le retrait de la phase CL de collagène laisse derrière une structure en bandes d'orientation à  $30^\circ$  du front de retrait. Chaque bande présente une orientation à  $60^\circ$  de ses voisines, comme vu sur le graphe de l'azimuth de la ligne V. L'orientation du collagène dans ces domaines semble plutôt homogène dans la largeur, ce malgré des variations de la retardance interne à chaque domaine autant qu'entre eux. Comme nous pouvons l'observer ici, la différenciation des domaines s'effectue déjà dans la phase CL, partie floue à droite de l'interface air/solution, l'organisation des molécules de collagène en deux structures similaires mais d'orientation différente.

La mesure de retardance le long de la ligne V présente des chutes de retardances qui correspondent avec les changements d'orientation, ce qui semble indiquer un joint de grain entre domaines.

La ligne H est une mesure prise dans la longueur d'un domaine unique qui apparaît être parmi les plus homogènes en matière d'orientation. Cependant, la mesure indique des

variations dans une bande de  $20^\circ$  entre 0 et  $50 \mu\text{m}$ , puis une large variation. Cette dernière peut sans doute être attribuée à une part de collagène toujours orienté suivant la phase colorée en rouge de l'interface. La retardance en revanche présente des variations qui peuvent rappeler un début d'alternance similaire à ce qui a été observé sur la ligne V, pour des valeurs comprises entre 35 et 70 nm, soit du simple au double. A noter que la chute de retardance passé  $50 \mu\text{m}$  pourrait appuyer l'hypothèse d'une influence ou couche de collagène encore orienté suivant la phase à l'interface.

Bien que de nouvelles observations n'aient pas été effectuées sur cette zone plus avant dans le processus de séchage, au vu de plus amples observations générales (III A 5-7), il est possible de supposer une continuation du processus de séchage. Le processus aurait pour résultat en une plus grande complexification des structures, avec une différenciation plus poussée des domaines suivant les chutes de retardance observées sur H.

#### 4) Déformation de l'interface

La structure la plus observée quelle que soit la configuration de l'expérience est une sorte de repli qui s'effectue en lien avec la déformation de l'interface. Celle-ci se forme graduellement lors du retrait de matière induit par le séchage, avec un point sans trait distinctif où un ancrage apparaît s'effectuer, formant une structure qui subsiste jusqu'à séchage complet de la solution.

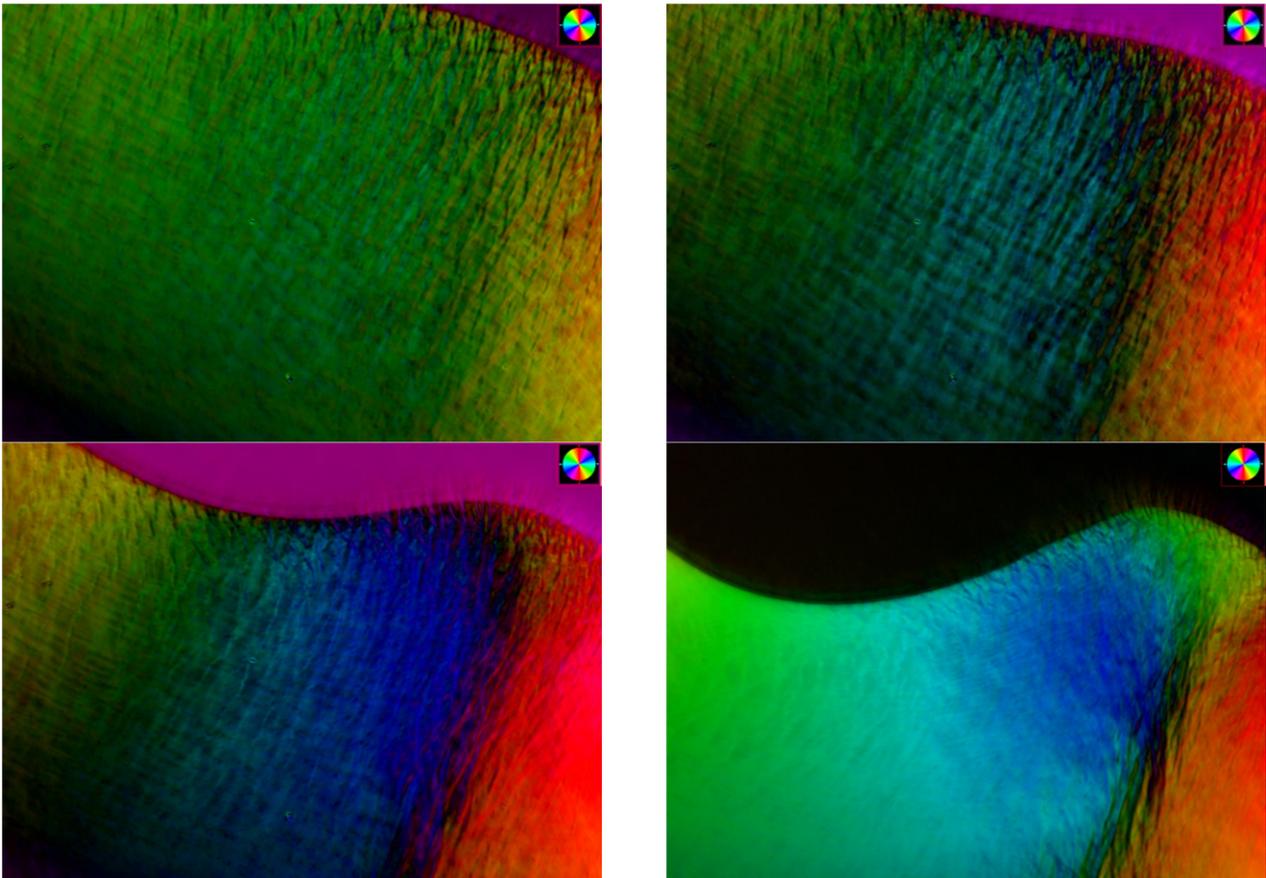


Figure 16.: Dynamique de déformation et de formation d'un repli lors du séchage, full scale  $317 \times 252 \mu\text{m}$ .

Dans le cadre de l'expérience en gradient d'épaisseur, cette structure n'apparaît pas aux plus basses épaisseurs, une forme de structure dendritique apparaissant à la place lors du retrait de matière induit par le séchage.

La solution de collagène initiale est isotrope, et à ce titre ne possède pas de biréfringence observable au polscope. Au fur et à mesure que la solution sèche et se concentre à l'interface, les molécules de collagène vont commencer à s'organiser d'un point de vue orientationnel, formant ainsi une phase cristal liquide (CL) nématique. Cette orientation se forme avec l'alignement parallèle des molécules de collagène avec l'interface solution/air. Le séchage de la solution est susceptible d'entraîner un retrait de la ligne d'interface autour de la structure, ce qui crée une protubérance de plus en plus marquée de notre structure.

L'évolution de la forme de l'interface est à même d'expliquer en partie la structure interne de l'orientation, avec un certain décalage de l'orientation verticale (bleu clair). Cependant, cela laisse deux questions en suspens : qu'est-ce qui a entraîné l'ancrage de ce point en particulier, et l'interprétation de ligne de division entre les deux domaines à  $90^\circ$ .

L'ancrage de ce point est le plus vraisemblablement à attribuer aux propriétés visqueuses de la solution de collagène. Au fur et à mesure que le séchage opère, la concentration à l'interface du collagène augmente. Or si l'évolution de la concentration locale en collagène entraîne un changement de phase, elle entraîne également un changement des propriétés visqueuses. Selon toute probabilité, la concentration locale a atteint un tel point que la viscosité a augmenté jusqu'à ce que le retrait de l'interface due au séchage soit favorisé dans les autres zones. A cela s'ajoute sans doute le problème de l'organisation des molécules de collagène vis-à-vis des unes des autres, l'énergie nécessaire pour réorienter la phase CL et ses interactions avec les domaines orientés différemment au contact créant probablement une contrainte supplémentaire.

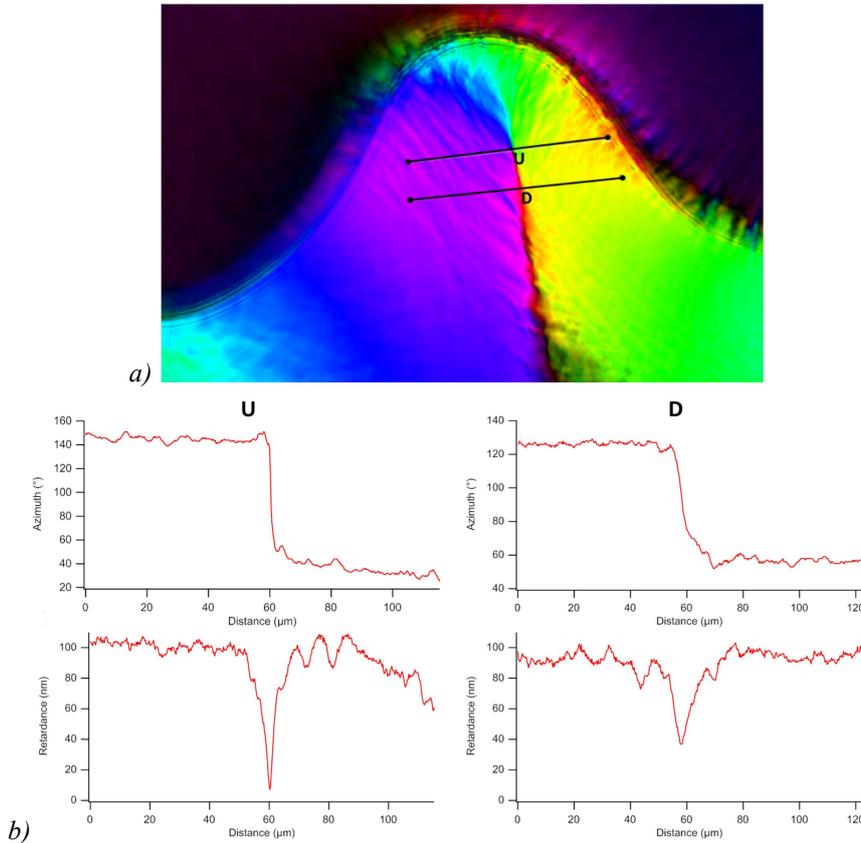


Figure 17.: a) Image polscope de la déformation de l'interface, full scale 317x252µm b) Graphes de l'azimuth et de la retardance selon les lignes U (up) et D (down), de gauche à droite.

La ligne de démarcation entre les deux domaines bleu-violet et vert-jaune est indicatrice d'un changement rapide de l'orientation de la structure d'un angle compris entre 60 et 80° suivant la position sur la ligne. Deux comportements distincts sont observés, entre la pointe supérieure de la ligne sur laquelle passe la ligne de mesure U, et le reste. l'azimuth de la ligne D se voit appliquer un modulo de 90° afin de préserver la continuité de la mesure sur le graphe.

On observe sur les graphes de U que le point de contact entre les différentes orientations de la courbure de la déformation se caractérise par une retardance très faible, inférieure à 10nm. Selon toute probabilité, ce point de défaut dans la structure du collagène est soumis à des contraintes exercées par l'ensemble des domaines de collagène orienté. Ces contraintes d'orientation peuvent soit être accommodées selon une figure de rotation rapide passant par un alignement avec l'axe d'observation, soit entraînent un joint de grain fait de collagène majoritairement isotrope.

La ligne de démarcation au niveau de la ligne D présente une chute de retardance moins prononcée ainsi qu'une variation de l'orientation s'effectuant sur environ 15µm plutôt que 8. Le fait qu'il y ait une chute de retardance pourrait indiquer une présence partielle de la solution de contact vue sur la ligne U, ce qui assurerait la continuité de la phase située en bout de ligne de démarcation. Une solution possible serait un recouvrement des deux domaines, séparés par un joint de grain rotationnel ou isotrope dans l'épaisseur, probablement en continuation du point de défaut.

### 5) Cylindres de double twist

Au fur et à mesure du séchage, l'image en polscope du collagène va révéler une complexification des structures préexistantes. L'une des plus impressionnantes visuellement est la forme que nous avons identifiée comme un cylindre de double twist (Fig. 18). Il s'agit d'un type de structure du collagène déjà observée dans des organismes, comme le cuticule d'annélides<sup>7</sup>. Le caractère hélicoïdal de la structure du collagène est quelque chose d'observé à plusieurs échelles, moléculaire, supramoléculaire et dans des assemblages à plus grande échelle. Ici (Fig. 18a), nous avons ce qui pourrait bien être une organisation du collagène en solution en enroulement, qui aurait une tendance à s'assembler et se dissocier de manière plus ou moins aléatoire.

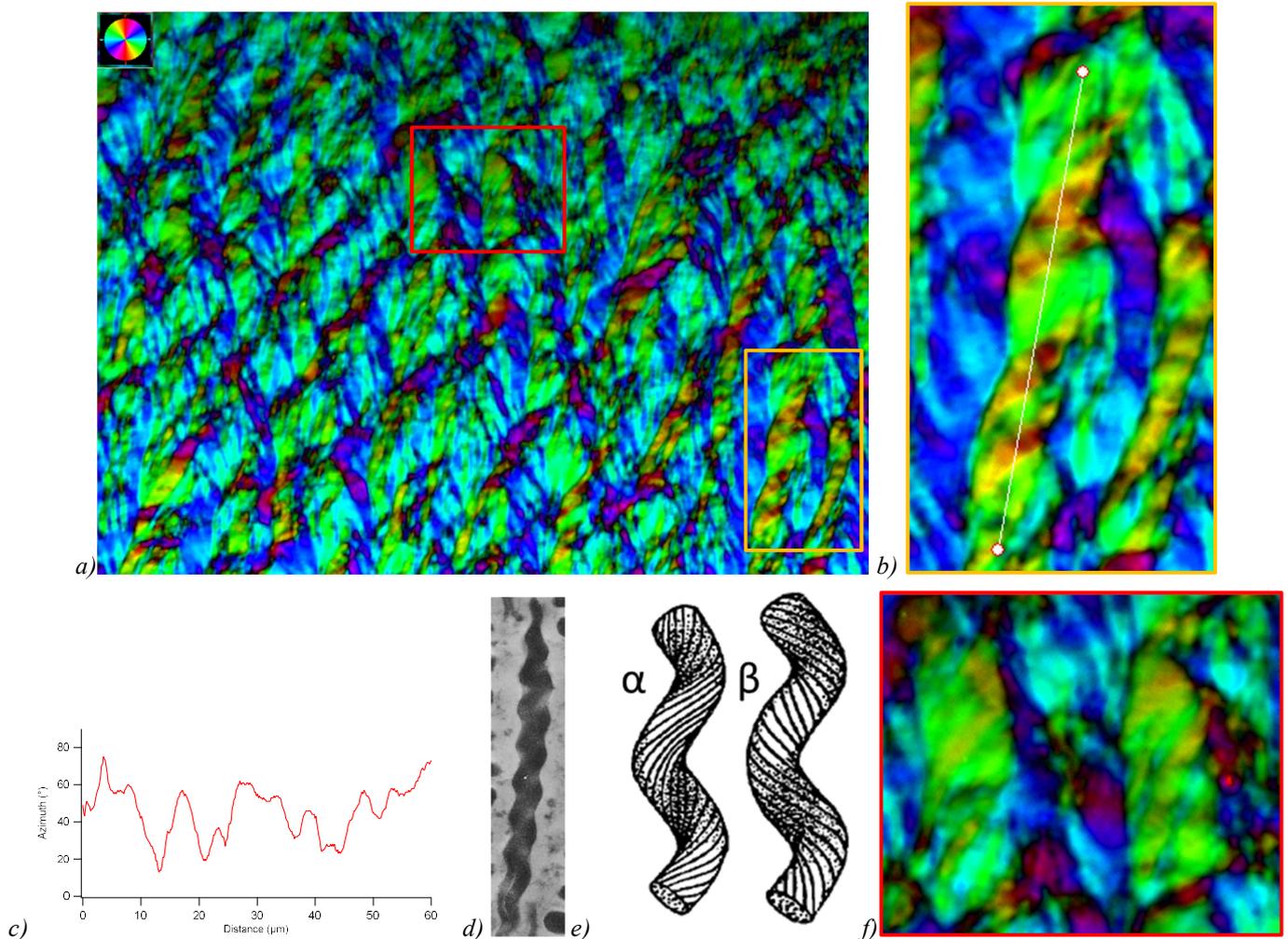


Figure 18.: a) Structure de fibrilles, en mélange de doubles twists et de réseau depuis une interface air/solution située en bas de l'image, full scale 3,8x2,5mm. b) Zoom d'un exemple de cylindre de double twist. c) Graphe de la variation de l'azimuth suivant la ligne blanche de b) depuis le bas vers le haut. d) Coupe de fibre de collagène, tirée de LEPESCHEUX<sup>7</sup>. Les ondulations, similaires à ce qui peut être observé sur notre échantillon de collagène en séchage, sont indicatives du twist de la fibre. e) Modèles de cylindre de double twist observé en b), avec l'orientation des fibrilles représentée par les lignes de surface<sup>7</sup>. f) Structure secondaire observée, supposée enroulement de plusieurs cylindres de double-twist.

Si l'on observe une structure d'enroulement (Fig. 18.b), il est facile de constater que le diamètre de la partie vert/jaune oscille d'une manière fortement similaire à une fibre de collagène twistée (Fig.18.d). Ce phénomène peut être observé à différents degrés, bien que souvent moins prononcé, à plusieurs endroits du cliché 18.a). Le terme de 'double-twist' vient de la structure des cylindres de collagène, avec un enroulement sur soi-même de cylindres faits de tropocollagènes associés selon un angle par rapport à la direction de la structure. Considérons la figure 18.b) et le graphe de l'azimut selon la ligne en 18.c). Les deux figures nous montrent l'orientation des structures, qui semble-t-il varie suivant deux orientations principales.

Le basculement rapide d'environ  $30^\circ$  est celui du cylindre de double-twist tel que théorisé par Lepescheux (Fig. 18.e- $\alpha$ ). Les imprécisions peuvent être imputées à un caractère de désorganisation due à différents facteurs perturbant, tels que la vitesse trop rapide de séchage, la structure ayant été observée lors de sa formation sur quelques heures, ou un état de séchage pas encore assez avancé. La structure similaire au contact en coloris bleu indicatifs d'une orientation à  $90^\circ$  de celle précédemment décrite est indicative d'une structure double-twist telle que représentée en 18.e- $\beta$ , qui n'est jamais que la structure  $\alpha$  ayant subi une rotation de  $180^\circ$  autour de l'axe directeur. Le phénomène entraîne un contact entre tropocollagènes à un angle proche de  $90^\circ$  aux interfaces, une des formes de contact privilégiées par les cholestériques.

L'ensemble de la structure présente d'autres phénomènes, comme des cylindres qui ne semblent pas se conformer à la structure double-twist discutée précédemment (Fig. 18.f). Sur celles-ci, le diamètre ne semble pas onduler comme avec le cylindre de double-twist, et les variations d'orientations apparaissent moins prononcées à la fois en variation d'orientation et en largeur. Il pourrait s'agir soit d'un cylindre sans twist, bien que cela n'explique pas les variations d'orientation qui traversent complètement la structure. L'autre possibilité serait l'enroulement l'un sur l'autre de deux cylindres de doubles twist, avec les lignes transversales d'orientation les joints entre cylindres.

Un dernier phénomène observé sur cette figure est la présence de lignes transverses, souvent associées à la couleur violette ici sur l'image en polscope. Il semble s'agir de cylindres qui sortent de l'alignement général en passant soit au-dessus ou en-dessous des autres, changeant la mesure locale d'orientation. Il est difficile de déterminer le caractère de twist de ceux-ci puisqu'ils semblent modifier la mesure d'orientation de manière inconstante au niveau des cylindres qu'ils croisent. Ce changement est sans doute dû à la superposition, puisque les variations de couleur d'orientation ne suivent pas le schéma étudié des cylindres de double-twists, avec des variations de  $40^\circ$  dans un champ de possibles de  $60^\circ$  autour de l'axe directeur de la fibre. Le comportement apparaît plutôt comme une oscillation autour d'une orientation à  $90^\circ$  de l'axe directeur. Il est difficile de déterminer à partir de ces données si les extinctions sont dues à un cylindre formé de manière incomplète puisque contraint contre les limites du système, ou bien qu'il s'agisse de correspondances locales de l'orientation entre le pitch du twist et de celui qu'il traverse.

#### 6) Déformation de l'interface à cylindres twistés

Un certain nombre de structures combinant différents aspects des cas discutés plus tôt a également été observé. Nous nous intéressons ici principalement au cas décrit en 4) de la déformation d'interface, dans un état de séchage bien plus avancé que celui discuté précédemment. Il est difficile à ce stade de déterminer si la structure (Fig.19) fut exactement la

même à l'origine et a présenté la ligne de séparation entre domaines orientationnels. Ce qui est en revanche aisément observable est le caractère double twisté des cylindres présents en certains points. Ceci est cependant à contrebalancer avec l'aspect très inhomogène de la représentation de cette sous-structure au sein de la structure principale. Tous les cylindres ne présentent pas de double twist, et il est par endroits difficile de savoir si nous avons affaire à des ensembles cohérents.

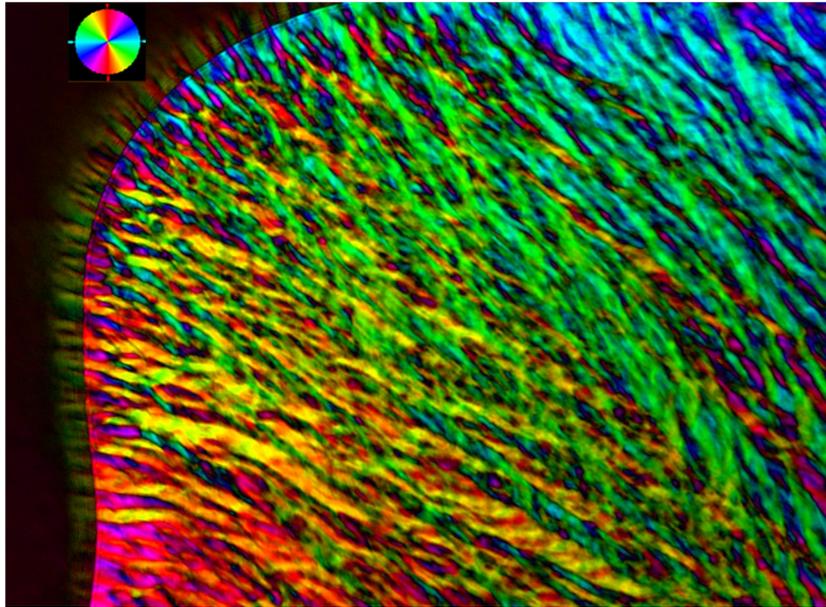


Figure 19.: Structure de déformation d'interface à séchage avancé, présentant de nombreuses structures de fibres, full scale 3,8x2,5mm

Le caractère mal défini des sous-structures présentes ici peut potentiellement être imputé au fait qu'à un moment, la structure ait présenté des domaines orientationnels incompatibles en contact. Cela aurait entraîné de fortes contraintes, notamment lors du réagencement du collagène depuis une phase cholestérique, voire smectique, en structures fibrillaires. Si d'autres causes sont responsables, nous n'avons pas observé celles-ci sur les différents échantillons de séchage de collagène.

Il est possible également d'observer au niveau de l'interface, dans la partie air, la présence de structures en bandes telles que décrites plus tôt en **2.d**), toujours nettement définies en dépit de l'état de séchage bien plus avancé de cet échantillon. Il semble d'autre part qu'il y ait une certaine correspondance entre les domaines ainsi formés et les départs de fibres situés de l'autre côté de l'interface.

### 7) Domaines de fibres orientées en bandes

La dernière figure de séchage de collagène suivant la configuration du séchage entre lame et lamelle en gradient d'épaisseur que nous avons observé (Fig. 19a) présente des similitudes importantes avec la figure de bandes discutée en 2), bien qu'à une échelle plus importante et en profondeur de la phase de collagène, plutôt que selon une couche restée après le retrait de la phase liquide. Les domaines ici doivent plutôt être considérés suivant leur orientation moyenne, en raison des 'stries' d'orientation différentes qui les traversent. Les 'bandes' verticales présentent un comportement similaire à celui précédemment observé, avec une

orientation générale autour de  $30^\circ$  de l'axe de la longueur, qui y est une fois de plus orthogonal à l'interface.

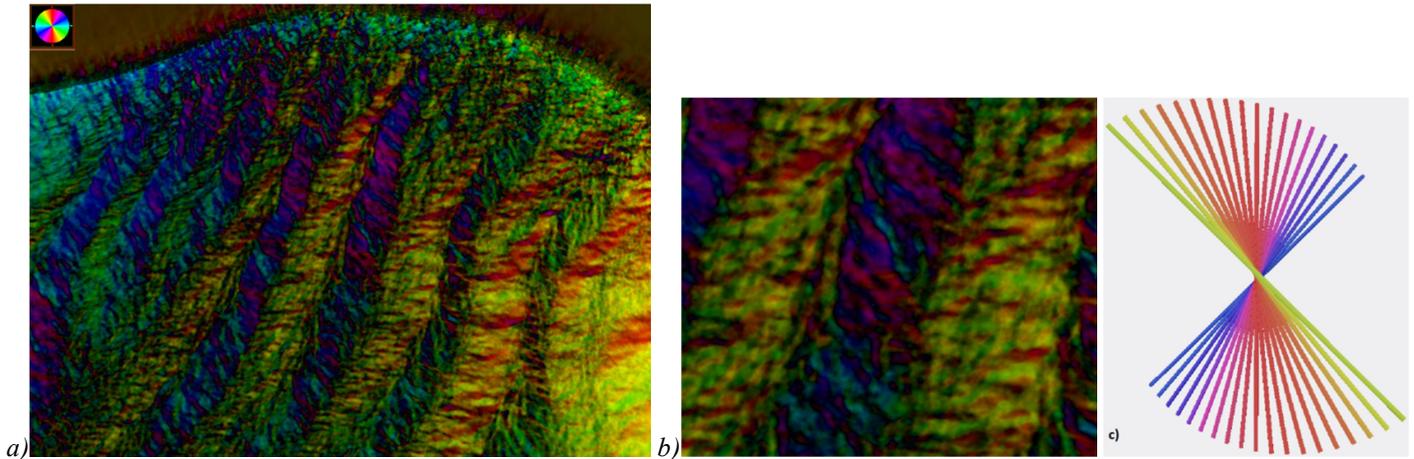


Figure 20.: a) Structure en bandes en séchage avancé, full scale  $317 \times 252 \mu\text{m}$  b) Zoom sur l'aspect d'entrelacement de fibrilles des domaines. c) Rotation de l'orientation des tropocollagène dans l'épaisseur (axe  $z$ ) de la fibre avec le code couleur de l'orientation en polscope.

Les variations d'orientation le long des domaines en revanche sont plus équivoques. Il ne semble pas y avoir de continuité des variations à travers les domaines, comme il a été vu en 5), aussi il n'apparaît pas que celles-ci soient le fait de cylindres transverses. S'il est possible de distinguer des variations qui laissent à supposer un enroulement de plusieurs cylindres (Fig. 20b), les variations d'orientation ne semblent pas ici correspondre à une structure de double twist, puisque la plupart dépassent de la largeur des cylindres considérés.

On peut noter également que ces 'striations' tendent largement dans le cas des domaines jaunes vers une orientation plus éloignée de l'axe directeur. Pour les domaines majoritairement bleus, il est difficile de dégager une orientation de base, mais les domaines les plus à gauche laissent à penser que l'orientation correspondant au bleu foncé est la plus probable, les éléments bleus clairs potentiellement un effet d'une variation de l'axe directeur. Cependant, dans ce cas de figure, les éléments violets correspondent également à un éloignement de l'azimut de l'axe directeur.

Les perturbations des domaines correspondent donc à un éloignement de l'azimut de l'axe directeur vers des valeurs à  $90^\circ$  de celui-ci. Cela semble indiquer une orientation plus en accord avec un alignement des molécules avec l'axe directeur des domaines. De plus, la structure naturelle du collagène est celle d'un cholestérique, et l'orientation des molécules des cylindres suivant l'axe  $z$  est telle que représenté en figure 18c). Une possibilité ici est que ces défauts ont pour cause le séchage très avancé de la solution, au point que des craquelures soient apparues, révélant alors les ensembles de collagène orientés suivant l'axe directeur dans la profondeur de la ou des cylindres composant le domaine considéré.

Toutes ces observations nous ont permis d'étudier les formes et agencements du collagène tels qu'il peut être observé au polscope, ce qui nous permet d'étendre ces observations au domaine de la formation osseuse.

## 8) Discussion

Le fait d'imposer un gradient d'épaisseur à une solution de collagène et d'en observer l'organisation au cours d'un séchage forcé inhomogène a permis de présenter et de tenter d'expliquer ici un certain nombre de structures de plus en plus complexes. Cette diversité des organisations et des formes que peuvent prendre les ensembles de molécules de collagène seule est un élément essentiel pour comprendre la complexité de la structuration et de l'organisation du collagène dans un cadre biologique, où n'importe quel nombre de composants minéraux ou biologiques peuvent être impliqués, et la production des structures provenir de différents processus constructifs et s'exprimer suivant un grand nombre d'organisations différentes.

Bien qu'il soit difficile de déterminer à partir de ces méthodes simples de mise en œuvre et d'analyse la portée des contraintes imposées par un séchage asymétrique et un gradient d'épaisseur sur les structures, il est possible de dégager certaines règles de l'organisation du collagène des observations précédentes. Le premier élément observé est l'influence de l'interface milieu extérieur/collagène, qui tend à imposer une direction d'organisation initiale, et impose la direction des différentes structures au cours du séchage. L'épaisseur imposée par l'espace entre lame et lamelle peut entraîner la faisabilité ou l'impossibilité de certaines structures. Enfin, la complexité des structures semble dépendre directement de la concentration en collagène de la solution à un moment donné, élément qui a été vérifié en partie dans la partie C) avec l'usage de solution de différentes concentrations pour départ.

La lumière polarisée présente cependant des limites quant à la capacité d'analyse et d'interprétation possible des différentes structures observées, la complexité des différentes structures possibles et leurs différentes combinaisons rendant la compréhension de certaines plus qu'ardues. L'image ci-dessous est un exemple de structure où je ne saurais même pas par où commencer avec la seule lumière polarisée comme outil.

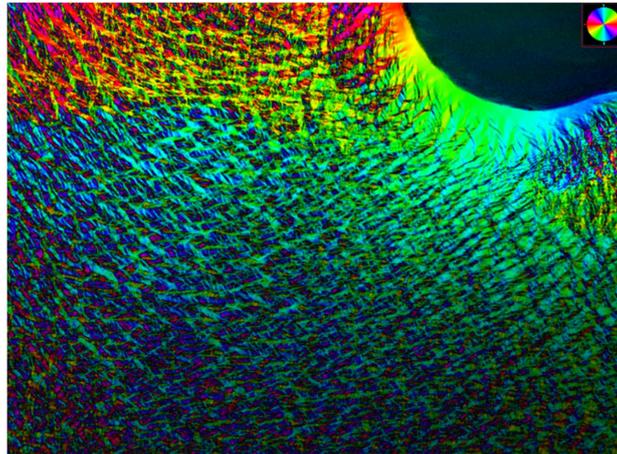


Figure 21.: Structure obtenue après 24h de séchage, full scale 662x500 $\mu$ m.

## B. Étude de structure de collagène transparente d'origine biologique

Voir annexe 1, Salameh, C. *et al.* Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials. *PNAS* **117**, 11947–11953 (2020).<sup>8</sup>

### **C. Séchage de solution de collagène en milieu microtexturé**

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre de la participation à la thèse de Elora Bessot sous la direction de Nadine Nassif. Le principe de cette coopération est d'étudier la concentration du collagène dans des conditions pouvant approcher celle de la formation d'os en ostéons par microscopie en lumière polarisée. Pour cela, nous avons utilisé un système de séchage déjà employé dans le cadre d'autres études au laboratoire, celui des chambres microfluidiques texturées. Ces chambres microfluidiques sont faites en polydiméthylsiloxane (PDMS), et la texture prend la forme de plot répartis de manière régulière à travers la chambre d'épaisseur de l'ordre des dizaines de microns et de diamètre de l'ordre du centimètre. Ces plots circulaires ont ici pour but de simuler un espace interdit, tel le centre d'ostéons, autour desquels le collagène va s'organiser au fur et à mesure du séchage. L'espoir ici est de voir se former une structure cholestérique concentrique similaire à un réseau d'ostéons, et les défauts qui en résultent.

#### **1) Matériel et méthode**

La solution de collagène employée reste celle composée de collagène de tendon de queue de rat en solution d'acide acétique employée précédemment. Celle-ci est placée sous la forme d'une goutte sur une lame de verre, puis la chambre microfluidique en PDMS à fond ouvert est déposée par-dessus. Une pression homogène est alors exercée sur l'ensemble pour assurer le contact des plots avec le verre, ainsi que l'étalement de la solution dans la chambre.

Les chambres microfluidiques sont réalisées en PDMS à partir de moules réalisés en résine SU-8 sur des wafers en silicium en utilisant un procédé déjà employé au laboratoire lors de thèses précédentes<sup>9,10</sup>.

#### **a) Fabrication des moules**

Les chambres microfluidiques sont réalisées par moulage. Les moules sont créés en photolithographie de la résine photosensible SU-8 sur des wafers de silicium réalisés en salle blanche à l'Institut de Physique de Rennes. La résine SU-8 est un polymère visqueux qui durcit lors de l'exposition à des rayonnements UV.

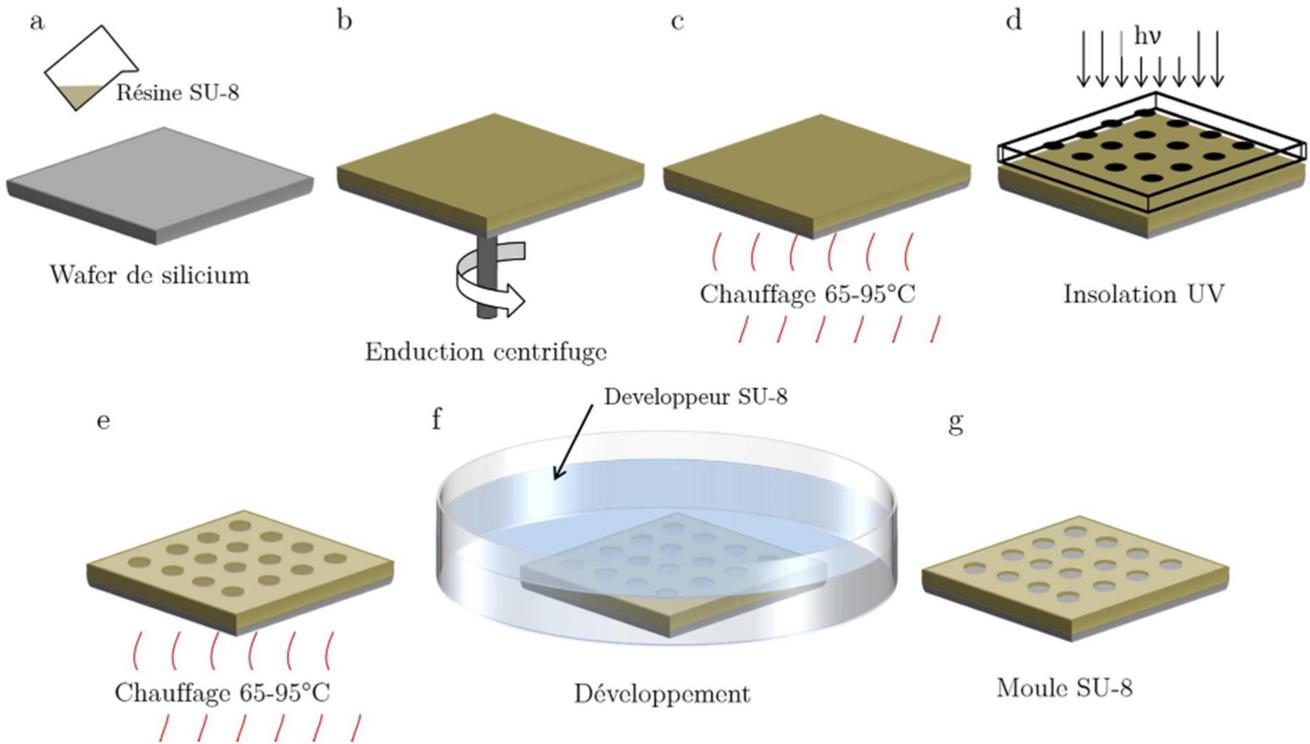


Figure 22.: Etapes successives de fabrication d'un moule pour chambre microfluidique. a) Dépôt de résine photosensible SU-8 sur wafer de silicium. b) Spin-coating à épaisseur entre 30 et 80 $\mu\text{m}$ . c)Evaporation du solvant par chauffage en deux temps. d)Réticulation UV de la résine à travers un masque au motif de la chambre microfluidique à réaliser. e)Cuisson en deux temps. f)Dissolution de la résine non-réticulée par bain de 2 à 3 minutes dans du développeur. g)Rinçage à l'isopropanol puis séchage, le moule est prêt à l'emploi.

La résine est disposée sur un wafer en silicium, puis spin-coatée à une vitesse définie en fonction de la hauteur de chambre microfluidique désirée. Le wafer avec la couche de résine est ensuite déposé sur une plaque chauffante à 65°C pendant 2 minutes avant d'être transféré sur une plaque chauffante à 95°C pendant 7 minutes. Cette étape est réalisée dans le but d'évaporer le solvant de la résine, en deux temps afin d'éviter la formation de craquelures par une mise trop brutale à 95°C.

Le substrat est ensuite réticulé par une lampe UV, avec un masque entre la source lumineuse et le wafer. Ce masque consiste en une feuille de matériau transparent sur laquelle le motif des textures de la chambre microfluidique a été imprimé avec un matériau opaque aux UV. L'objectif est de prévenir la réticulation de la résine de telle manière que des plots soient formés dans la chambre microfluidique suivant un schéma particulier. Ce procédé permet de réaliser les textures avec une précision de 0,5 $\mu\text{m}$ . L'exposition aux UV de la résine entraîne la formation de liaisons covalentes entre polymères.

Le wafer est ensuite à nouveau chauffé suivant le procédé déjà employé plus tôt sur des durées d'une minute et demie et de 6 minutes. La partie non réticulée est ensuite enlevée par bains successifs dans une solution de solvant spécifique appelé ici 'développeur'. Le moule est ensuite nettoyé à l'isopropanol puis séché doucement à l'air comprimé afin de retirer toute trace de développeur ou d'isopropanol.

**b) Moulage des chambres microfluidiques en PDMS**

Le PDMS est matériau souvent utilisé en microfluidique car il possède des propriétés qui s'y prêtent beaucoup. Il permet de mouler de nombreuses formes avec une précision micrométrique, est transparent, ce qui est capital pour l'observation des phénomènes internes, non toxique et possède une souplesse qui permet les déformations réversibles. Pour ses interactions avec des solutions, le PDMS est un matériau hydrophobe.

Les chambres microfluidiques réalisées par moulage PDMS sont ici typiquement d'une hauteur de 50 $\mu\text{m}$ , parsemées de plots de diamètre 100 $\mu\text{m}$ , avec des espaces les séparant variables de l'ordre de la centaine de micromètres. Les réseaux de plots réalisés sont généralement carrés ou rectangulaires, ainsi que quelque structures de quasi-cristaux 2D.

Les chambres microfluidiques sont réalisées avec un mélange de PDMS et de réticulant pour une proportion de 9 pour 1. Le mélange est d'abord mis sous cloche à vide afin de dégazer toute bulle qui s'y trouverait, avant d'être versé sur le moule posé dans une boîte de pétri. Un second dégazage est alors effectué afin de prévenir toute bulle qui pourrait impacter la structure ou la visibilité à l'intérieur de la chambre, les gravures des moules étant particulièrement aptes à garder de l'air captif.

L'ensemble est ensuite déposé au four à 65°C pour accélérer la réticulation. On obtient alors une couche élastomère qu'il convient de découper avant de pouvoir la décoller doucement. On obtient ainsi une chambre microfluidique ouverte sur un côté prête à être déposée sur une lame de verre avec la solution de son choix.

**c) Diffusion séchage à travers le PDMS**

Le procédé de mise en place du séchage d'échantillon liquide en chambre microfluidique microtexturée est le suivant. Une goutte de la solution est déposée sur une lame de verre, puis la chambre microfluidique est déposée par-dessus. Une pression homogène est exercée sur le timbre en PDMS afin d'assurer le contact entre les plots et la lame de verre, ainsi que d'assurer l'étalement de la goutte de solution. La chambre est ensuite scellée à la colle industrielle époxy Loctite par étalement sur les bords afin de garantir au mieux l'étanchéité.

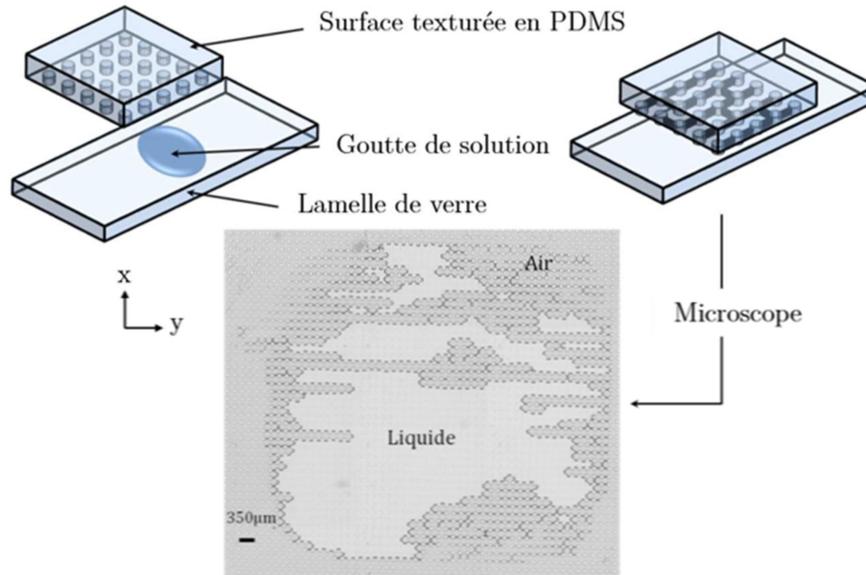


Figure 23.: Mise en œuvre du confinement d'une solution par une chambre microfluidique microtexturée.

Une fois l'étanchéité assurée commence le processus de séchage. Or, dans ces circonstances, le volume d'air emprisonné avec la solution est limité, et la quantité de liquide susceptible de s'évaporer est faible avant d'atteindre la pression de vapeur saturante. Le processus de séchage s'effectue principalement par diffusion à travers le PDMS.

Le PDMS fait partie de la catégorie des caoutchouc en silicone, et possède à ce titre une sorption de 0,38g d'eau pour 100g de PDMS<sup>11</sup>. Cela fait du PDMS un matériau très peu perméable à l'eau, qui est la base de la partie solvant des solutions employées ici. La sorption dépend également de la quantité d'eau déjà diffusée à travers le matériau. L'ensemble de ces paramètres permet, dans le cadre de nos échantillons liquides de l'ordre du microlitre, d'assurer un séchage lent du système.

Le système de séchage de nos solutions est donc de la pervaporation hydrophile, bien que le PDMS soit largement hydrophobe. L'épaisseur de PDMS au-dessus de la chambre microfluidiques de l'ordre du millimètre fait alors office de membrane, à travers laquelle un flux continu d'eau va pervaporer dans l'atmosphère extérieure<sup>12</sup>.

## 2) Direction d'orientation imposée par le flux

Lors du processus de mise en place de la chambre microfluidique, le timbre de PDMS microtexturé est déposé sur une goutte de solution. Le dépôt du timbre sur celle-ci entraîne donc un écoulement de la solution à l'intérieur de la chambre, avec des flux qui dépendent du motif du réseau de plots. Afin de mieux évaluer la réorganisation du collagène lors du séchage, nous cherchons tout d'abord à estimer l'impact de l'écoulement sur l'organisation des phases du collagène.

De par la nature de la mise en place, le flux principal généré est radial par rapport au centre de la goutte de solution. La forme que prennent les flux à partir de là peuvent être appuyés par des études de collisions<sup>13</sup>. On peut observer l'aspect de l'orientation du collagène dans le

milieu microtexturé suivant le flux lors de l'écrasement de la goutte initiale dans la figure suivante. Le point de départ des différents flux y est facilement identifiable en haut de l'image, et l'orientation mesurée du collagène dans les allées générées par le réseau de plot en partance de ce point de départ sont fermement dans le sens de l'écoulement, soit l'indicateur que le collagène se trouve orienté par le flux suivant la direction de propagation.

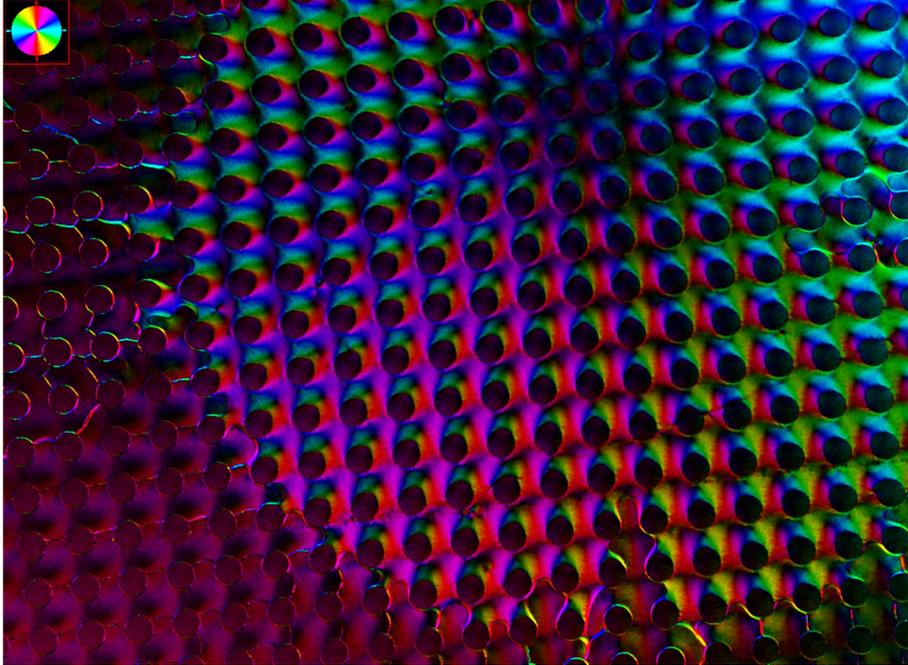


Figure 24.: Image polscope de collagène en milieu microtexturé à réseau carré de plots de  $100\mu\text{m}$  de diamètre, séparés d'un espace de  $100\mu\text{m}$ , full scale  $3,8 \times 2,5\text{mm}$ .

Il est possible d'observer suivant les diffusions verticales et horizontales que l'orientation dans ces allées reste très homogène, mais que les niveaux de retardance semblent fluctuer avec un minimum situé proche de l'espace où les plots sont les plus proches. Dans ces directions, des points de défauts semblent apparaître devant et derrière les plots suivant le flux, et il est difficile de distinguer s'il s'agit d'un effet de point d'arrêt, de fuite, ou d'une combinaison des deux.

Si l'on observe la zone en direction diagonale vers le bas-gauche en revanche, on observe bien une fois de plus une prévalence de l'orientation mesurée dans la direction de propagation, mais les orientations alternatives apparaissent plus nettement comme situées au niveau des points d'arrêts des flux sur les plots. La chute de retardance apparaît ici en front de ces changements d'orientation plutôt que au point qui pourrait correspondre à l'entrée dans un espace entre quatre plots, que l'on appellera cellule, ou en sortie d'un étranglement entre deux plots.

Il apparaît donc que par le simple fait d'écraser la goutte de solution de collagène, nous entraînons déjà une organisation des orientations du collagène suivant les directions selon lesquelles le flux s'écoule, générant au passage des défauts en front des plots. Le séchage entraîne cependant une contraction du volume de la goutte et une augmentation de la concentration en collagène, ce qui crée une réorganisation du collagène.

### 3) Réseaux de défauts d'organisation du collagène

Que ce soit lors de l'étalement ou au cours du séchage, la phase cristal liquide nématique du collagène va s'organiser localement suivant différentes orientations. Ces orientations ne sont pas toujours en proximité avec d'autres orientations compatibles suivant l'effet de cholestérisation du collagène. Il se forme alors des défauts, des points de contact entre orientations incompatibles, souvent associées à une forte chute de la valeur de retardance. Ce sont ces défauts et leur organisation que nous avons cherché à observer à travers différentes configurations de plots de nos chambres microfluidiques microtexturées.

Nous avons observé le séchage du collagène dans 4 chambres microfluidiques différentes. Trois chambres à plots en configuration de réseau carré séparés par des interdistances respectives de 75, 120 et 200  $\mu\text{m}$ , et une chambre en réseau hexagonal à 100  $\mu\text{m}$ . Nous définissons pour chaque réseau la cellule comme l'espace compris entre quatre plots.

#### a) Réseaux carrés

Dans le cadre de l'étude des défauts dans l'orientation des phases du collagène, nous avons employé une fonction de visualisation de l'orientation mesurée au polscope. Celle-ci se présente comme un overlay de points desquels partent des traits dans la direction de l'orientation mesurée, à  $180^\circ$  près. Ces points n'apparaissent que pour des valeurs de retardance supérieures à un minimum. Dans le cadre de cette représentation, nous définissons les défauts comme les points de rencontre entre plusieurs orientations incompatibles ou une rupture franche de la continuité de l'orientation. Ceux-ci sont souvent associés à une faible retardance, et sont indiqués sur les images suivantes par des cercles blancs.

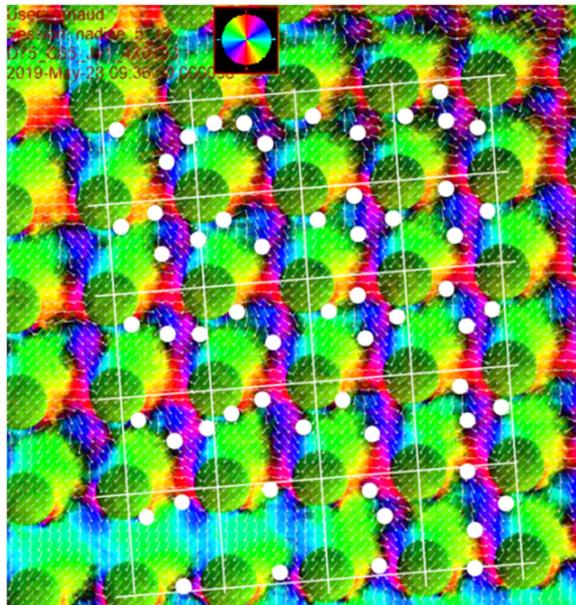


Figure 25.: Image polscope de solution de collagène en milieu microtexturé réseau carré d'interdistance  $75\mu\text{m}$  avec overlay de l'orientation mesurée. Full scale  $1,1 \times 1,05\text{mm}$

Dans le cas ci-avant du réseau à 75  $\mu\text{m}$ , nous pouvons observer que le nombre de défauts à s'être formés par cellule est important, entre deux et quatre. L'écoulement ici provient de la direction en bas à droite, et nous retrouvons les points d'arrêt de l'écoulement suivant cette direction sur un grand nombre des plots. L'ensemble des défauts se trouvent dans chaque

cellule à des positions qui se répètent dans le réseau. Outre les points d'arrêt, on observe une forte récurrence des défauts dans les espaces horizontaux entre plots, et au centre des cellules. Le reste est essentiellement suivant les lignes verticales entre plots, aucun défaut n'apparaît en contact des plots ou même proches suivant d'autres directions.

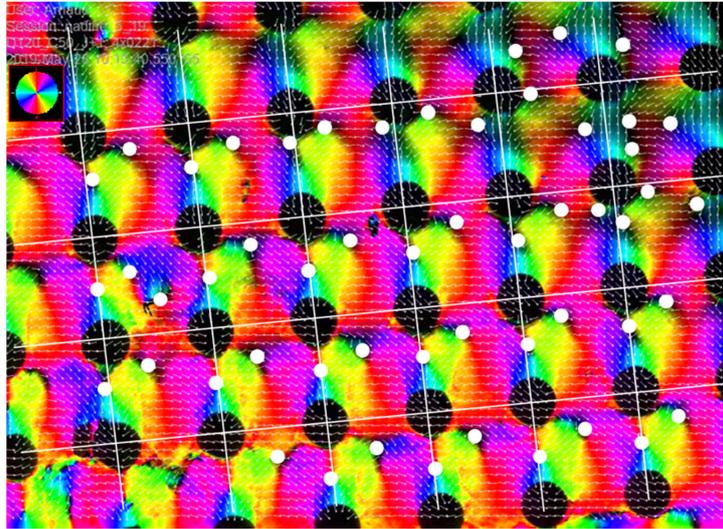


Figure 26.: Image polscope de solution de collagène en milieu microtexturé réseau carré d'interdistance  $120\mu\text{m}$  avec overlay de l'orientation mesurée. Full scale  $1,5 \times 1,1\text{mm}$ .

Dans le cas du réseau à  $120\mu\text{m}$ , on observe une quantité de défauts nettement inférieure, avec seulement deux défauts par cellule. Ce nombre est également beaucoup plus constant, avec quelques exceptions de cas à trois défauts, certains dus à des impuretés. Nous sommes ici dans le cas d'un écoulement provenant de la direction en haut à droite, mais également en proximité de l'interface air/collagène. Celle-ci se traduit par la plus haute retardance observée ici, trace de l'augmentation de concentration due au séchage. A noter qu'il ne semble pas y avoir d'effet de reflux de la matière causé par le relâchement de la pression lors de la mise en place de la chambre microfluidique.

Les positions des défauts sont également très reproductibles, avec les positions dans chaque cellule correspondant avec les lignes verticales entre plots et un espace un peu en-deçà des lignes horizontales, ce type de défaut particulier se prolongeant jusqu'à être ancré sur le plot. Cependant, la solution moins concentrée en haut à droite semble présenter plus de défauts, notamment en front de plot par rapport à l'écoulement, et dans des positions différentes. Il est probable que la régularité des défauts observables ici soit autant le fait du séchage que de la distance entre plots. On retrouve cependant ici des positions particulières similaires à une partie de celles observées sur l'échantillon à  $75\mu\text{m}$  (Fig. 25).

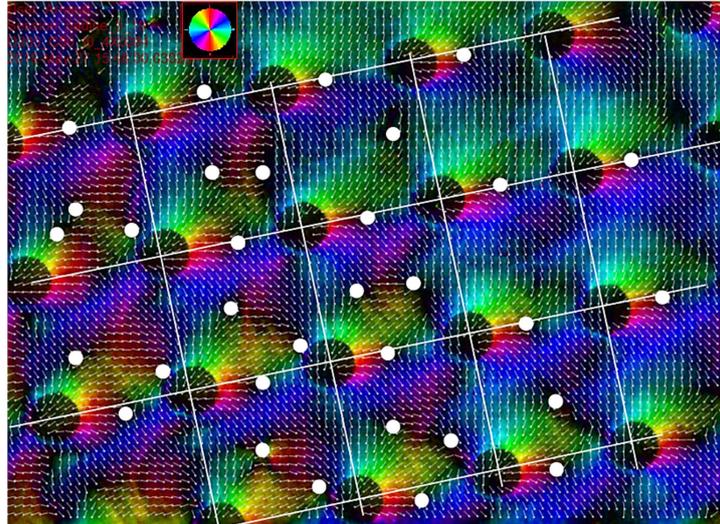


Figure 27.: Image polyscope de solution de collagène en milieu microtexturé réseau carré d'interdistance  $200\mu\text{m}$  avec overlay de l'orientation mesurée. Full scale  $1,5 \times 1,1\text{mm}$ .

L'échantillon à  $200\mu\text{m}$  présente des disparités dans sa répartition des défauts. Une part des cellules possède en moyenne trois défauts, tandis que la partie droite est composée de cellules où l'on n'observe qu'un défaut, situé en front d'écoulement depuis la droite au niveau des lignes horizontales entre plots. Les autres positions occupées par les défauts sont ici beaucoup plus disparates, l'espace offert entre plot semblant permettre l'expression d'une plus grande gamme d'organisation des orientations du collagène. Il semblerait que la présence de défauts soit liée à l'espace libre disponible pour que le collagène s'organise correctement.

#### b) Réseau hexagonal

L'autre format de chambre microtexturée à notre disposition est le réseau de plot hexagonal.

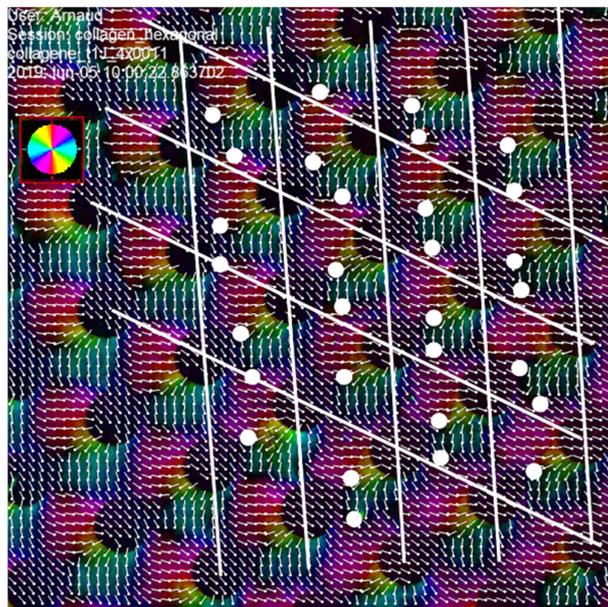


Figure 28.: Image de polyscope en milieu microtexturé hexagonal à  $100\mu\text{m}$  d'interdistance après un jour de séchage, avec overlay de l'orientation mesurée. Full scale  $1,2 \times 1,2\text{mm}$ .

Sur l'échantillon en chambre microfluidique à réseau hexagonal, on peut observer une présence par cellule de un à deux défauts. Ces défauts semblent être essentiellement situés selon les lignes tracées entre plots, à l'exception de la verticale. On trouve ici une régularité dans les défauts qui semblent pour la plupart fonctionner par paires éloignées d'une distance inférieure à l'interdistance entre plots. Les cas de cellules ne contenant qu'un défaut ne semblent pas présenter de disparité majeure dans l'organisation de leur orientation. Il est possible que ceux-ci soient le résultat d'un déplacement des défauts jusqu'à combinaison.

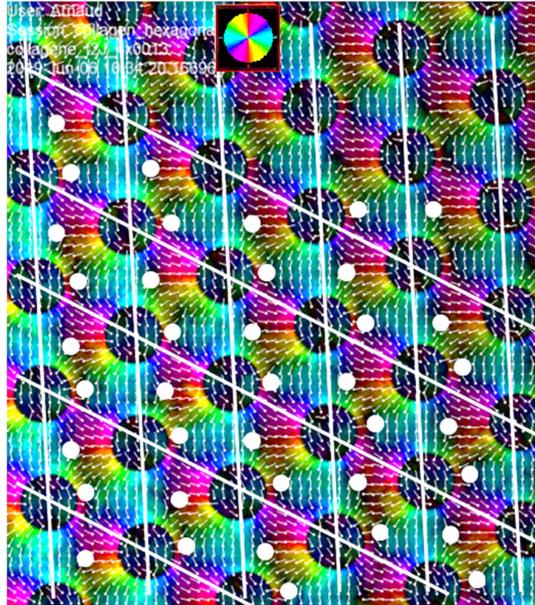


Figure 29.: Image de polscope en milieu microtexturé hexagonal après deux jours de séchage, avec overlay de l'orientation mesurée. Full scale 1,2 x1,1mm.

Sur l'image de l'échantillon à deux jours (Fig. 28), nous nous sommes placés en proximité de l'interface air/collagène, ce qui se traduit ici de la même manière que pour la figure 25. On observe ici que l'orientation est désormais très organisée, avec des lignes iso-orientation entre tous les plots, le collagène s'étant ordonné perpendiculairement aux lignes reliant ceux-ci. De même, tous les plots présentent désormais une couche continue de collagène orienté tangentiellement à leurs surfaces.

Les défauts pour leur part ont migré par rapport à la figure 28, mais se constituent en un réseau plus évident. On peut clairement voir ici le réseau hexagonal de défauts décalé vers la gauche autour de chaque plot. Le schéma que l'on trouve dans chaque cellule se répète, avec deux positions de défauts. Le défaut en proche contact des plots, ou le collagène en surface des plots interagit avec la phase libre entre les plots, et le défaut qui se trouve de manière beaucoup plus centrale de l'espace entre trois plots. Nous avons pour chaque espace entre trois plots l'un de ces cas, qui alternent régulièrement suivant les trois directions du réseau hexagonal de la chambre microfluidique.

Nous avons donc au cours du séchage une réorganisation du collagène au cours du séchage qui semble tendre vers un équilibre, la taille des défauts se réduisant et leur position évoluant par paires. L'organisation du collagène se faisant sur le contact des plots petit à petit jusqu'à une couche orientée tangentiellement complète. Le nombre de défauts par cellules est

susceptible de changer au cours du temps, mais la situation à haute concentration semble tendre vers deux pour les interdistances de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4) Conclusion

Dans ces exercices de mise en place d'une représentation de l'organisation du collagène en milieu texturé, nous avons observé que la manière dont le collagène s'organisait était très dépendant du réseau des plots de la microtexture, et des flux de solutions induits par la mise en contact de la chambre microfluidique. La direction des flux imposée par le réseau conditionne l'orientation du collagène dans la chambre ainsi que le positionnement des défauts initiaux par rapport aux plots.

Cependant, c'est véritablement la concentration qui semble organiser le collagène suivant une phase ordonnée, faisant apparaître une structure imposée par le contact avec les plots, et des défauts au niveau des points de contact multiples, parfois ancrés sur les surfaces. Les différents défauts exercent peut-être une pression entre eux qui aurait tendance à les forcer à s'organiser les uns par rapport aux autres. Tout cela suggère une forte influence du mode de dépôt du collagène et de la structure de contact sur l'organisation du collagène dans le cadre d'un modèle biologique.

## IV. Étude de l'os en microscopie à lumière polarisée

Suite à l'étude effectuée sur l'organisation du collagène en milieu microtexturé, nous avons voulu observer et étudier comment celui-ci s'organisait dans le cadre de la reconstruction osseuse. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la structure générale du collagène dans l'os grâce au polscope, avant de nous pencher sur la question du collagène aux interfaces de reconstruction.

### A. **Observation de tranches d'os long**

L'os est un matériau hiérarchique composé essentiellement de collagène de type I et de cristaux d'hydroxyapatite, le collagène composant essentiel de la structure à différents niveaux et l'un des éléments essentiels de son organisation. L'un des objectifs de cette partie est de pouvoir déterminer la portée éventuelle de la microscopie en lumière polarisée pour des études histopathologiques au regard de l'altération de la structure osseuse.

#### 1) Tibia de souris modèle

La nature hiérarchique de l'os et du collagène le composant entraîne un certain niveau d'organisation, ce qui se traduit par une biréfringence du matériel biologique non-nulle. Cela permet une mesure, grâce au système polscope décrit plus tôt, à la fois du niveau de retardance du matériel et de l'orientation de la structure. Notre première étude dans ce cadre s'est portée sur un échantillon d'os de souris fourni par l'équipe de Françoise Rédini, sous la forme d'une tranche de 200 $\mu\text{m}$  d'épaisseur de patte arrière, qui s'est essentiellement centrée sur la tête du tibia (Fig. 30).

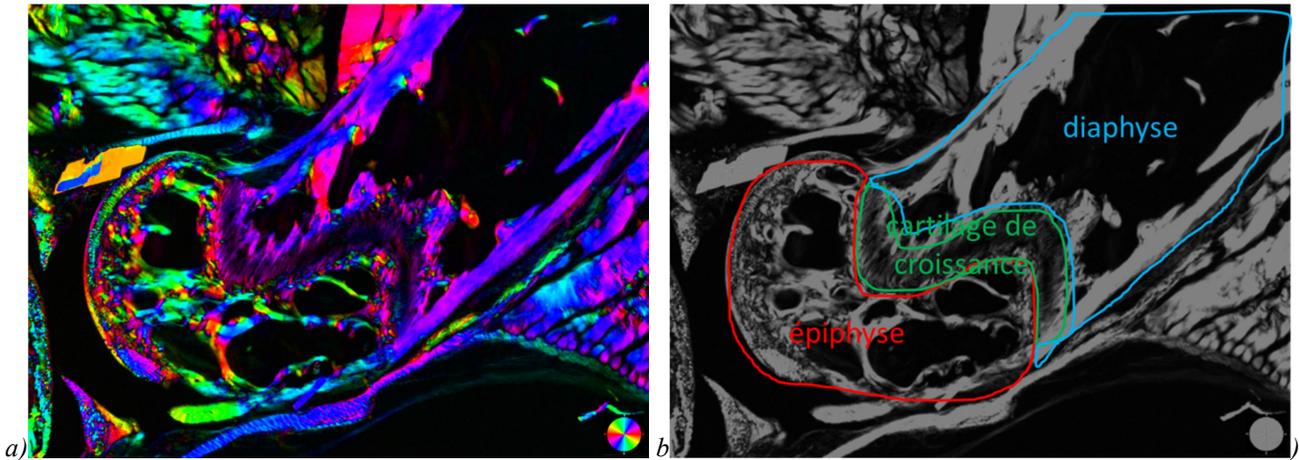


Figure 30.: a) Image polyscope d'une tranche à 200µm d'épaisseur de tête de tibia de souris, full scale 3,8x2,5mm. b) Identification des différentes zones de la tête du tibia.

On note tout d'abord le caractère biréfringent autour de l'os du tissu musculaire ainsi que des tendons. Ces derniers étant composés essentiellement de collagène organisé, leur niveau de biréfringence s'avère souvent élevé. Nos observations vont se porter essentiellement sur trois zones de l'os. D'une part l'épiphyse, puis l'os cortical, soit ce qu'il reste de la diaphyse, et enfin le cartilage de croissance qui les sépare, au centre de l'image.

L'épiphyse présente en surface externe une couche importante de cartilage, un composé une fois encore du collagène, de type 2 cependant, et de protéoglycane formant une matrice compacte parsemée de cellules appelées chondrocytes. L'orientation du collagène en surface de ce cartilage<sup>14</sup> commence tangentielle à la surface pour ensuite y être perpendiculaire dans la profondeur (figure 31). Le reste de l'épiphyse est composé d'os trabéculaire, qui à l'exception de certaines trabécules présente un mélange d'orientations de la structure osseuse.

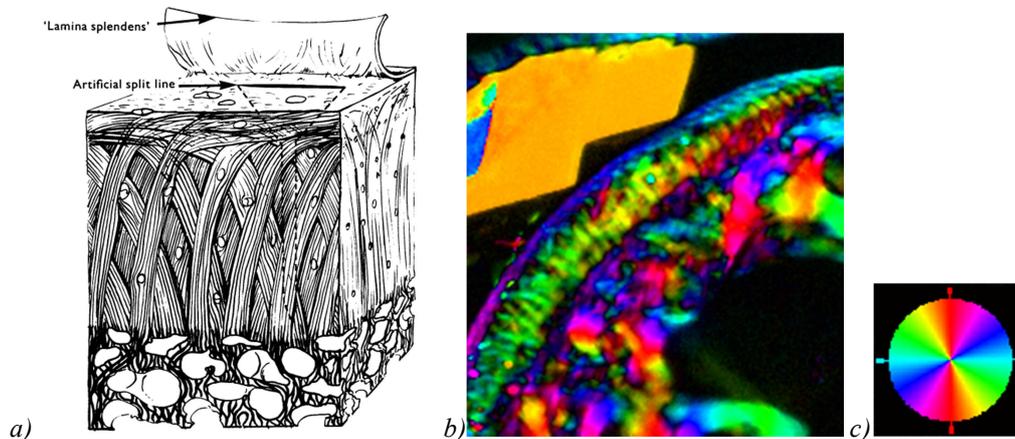


Figure 31.: a) Vue schématique de l'organisation fibrillaire du collagène dans le cartilage humain en épaisseur, de la surface à l'os, agrandi environ 50 fois. Tiré de R. J. MINNS AND F. S. STEVEN<sup>15</sup> b) Zoom du cartilage articulaire au polyscope c) Rappel du cercle chromatique de l'orientation

L'os cortical observé ici démarre depuis le cartilage de croissance et présente une structure très homogène dans son orientation. Orientation structurelle qui coïncide avec l'orientation de l'os cortical lui-même. Cette même orientation correspond également avec les fragments d'os trabéculaires en sortie du cartilage de croissance, ce qui est en adéquation avec les

connaissances actuelles du procédé de croissance des os chez les adolescents, ce que notre modèle de souris étudié est.

Le cartilage de croissance pour sa part présente une faible biréfringence, voir apparemment absente à ce niveau de sensibilité de mesure au cœur de certaines zones. La structure de la matrice cartilagineuse est différente du cartilage articulaire observé plus tôt, la fonction de croissance de la zone impliquant d'après la littérature une concentration en chondrocytes bien plus importante. Le front de minéralisation du cartilage en os est supposé être la ligne courbe de plus forte biréfringence en sortie de la zone à faible biréfringence.

Il est possible de conclure sur cette méthode d'observation de l'os qu'elle apporte des indications importantes sur les quantités d'os présentes, sur l'orientation des structures osseuses en interne, mais également sur le niveau d'ordre des orientations, l'os trabéculaire épiphysial est ici un bon exemple. Les éléments d'orientation et de biréfringence permettent de visualiser efficacement l'orientation et le niveau d'organisation structurale du matériel composant l'os, des éléments importants à prendre en compte dans le développement de la masse ostéoïde de l'ostéosarcome.

## 2) Échantillons de souris : tibias infectés à l'ostéosarcome

Les échantillons employés pour cette partie sur le sujet de l'ostéosarcome sont issus d'une série fournie par Jérôme Amiaud fabriqués à partir de patte saine et infectée à 7 jours conservés dans de la paraffine puis coupés en tranches de 2, 4, 6 et 8  $\mu\text{m}$ . Les différentes épaisseurs n'ont pas offert de différences marquées dans les résultats, si ce n'est peut-être dans les valeurs d'intensité observées. Afin de faciliter la comparaison, un travail d'ajustement sur les couleurs d'orientation des images suivantes a été effectué, dans le but de faire correspondre autant que possible les couleurs en fonction des zones. L'élément de référence choisi pour cet ajustement est ici l'os cortical situé à droite des échantillons. Les images en microscopie classique ne sont pas ici incluses simplement parce que la transparence des zones de l'os est supérieure à celle de la paraffine, et sans réelle lisibilité.

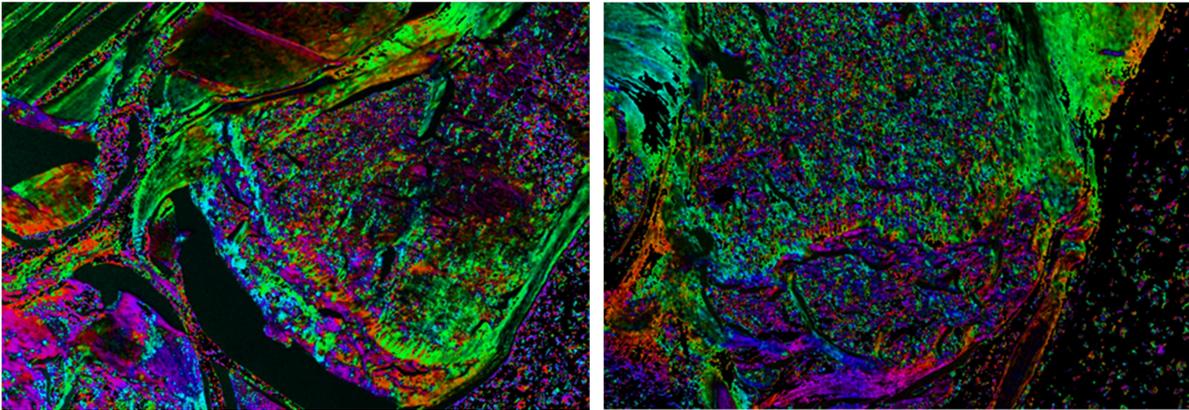


Figure 32.: A gauche, image polscope de tranche à  $8\mu\text{m}$  d'échantillon sain paraffiné, full scale  $2,0 \times 1,5\text{mm}$ . A droite, image polscope de tranche à  $8\mu\text{m}$  d'échantillon infecté à 7 jours paraffiné, full scale  $2,0 \times 1,5\text{mm}$ .

Ces deux exemples présentent ici une grande disparité entre les formes des deux épiphyses, mais les autres tranches nous permettent d'affirmer que cela n'est pas dû à un développement tumoral. Pour ce qui est de l'os trabéculaire, il semble malheureusement que la paraffine, ou la

moelle osseuse ici restée captive ou encore le mélange des deux présente une forte biréfringence qui rend la distinction des trabécules osseuses difficiles. Au vu de la paraffine en bas à droite des images, s'il s'agit de paraffine seule, l'effet de confinement dans la diaphyse a résulté sur un meilleur taux de cristallisation. En définitive, aucun résultat probant n'apparaît de la comparaison entre coupes saines et infectées sur cette série d'échantillons.

Le procédé d'observation au polscope a également été appliqué à une série d'échantillons déminéralisés réalisés avec Alain Fautrel, mais ceux-ci n'ont pas apporté de nouvelles données par rapport à notre os de souris de référence, et aucun point de désordre du collagène n'a été observé le long de la diaphyse qui pourrait indiquer un développement local de l'ostéosarcome sur les durées de 7 et 13 jours. La méthode n'a donc pas porté de fruits à cette échelle quant à l'observation du développement de l'ostéosarcome, mais mérite pourrait présenter un certain mérite sur une analyse d'échantillons sans paraffine, plus poussée d'une série de tranches représentant la totalité des échantillons, ou encore sur des temps de développement plus longs.

Si la microscopie à lumière polarisée n'a pas permis d'observation des premiers instants du développement de l'ostéosarcome, elle a en revanche offert des résultats beaucoup plus concrets quant à l'interface de construction de l'os.

## **B. Interface de construction de l'os**

Nous avons donc étudié comment le collagène en solution s'organise dans un modèle de séchage plus ou moins contraint en deux dimensions et les figures de biréfringence qui en résultent. Nous avons participé à l'étude de la configuration du collagène lors de la production d'os dans sa phase pré minéralisation, portée par Nadine Nassif.

### **1) Interface de la structure osseuse**

L'échantillon étudié dans ce cadre est une coupe transversale d'os de brebis (Détail Fig. 33a). La coupe a résulté en une série de dégâts sous la forme de craquelures horizontales et transversales, ainsi que de nombreuses délamination entre couches de collagène minéralisé, correspondant aux plus petites fentes comprises dans la structure. Les lignes noires verticales, pour leur part, résultent d'un recouvrement de matériel déplacé lors de la coupe. Les espaces libres naturels sont essentiellement occupés par des cellules de divers types, constituant des parois vasculaires, de la moelle osseuse et des cellules du remodelage de l'os, ostéoblastes et ostéoclastes. Les points noirs qui peuvent y être observés sont ici les noyaux des cellules.

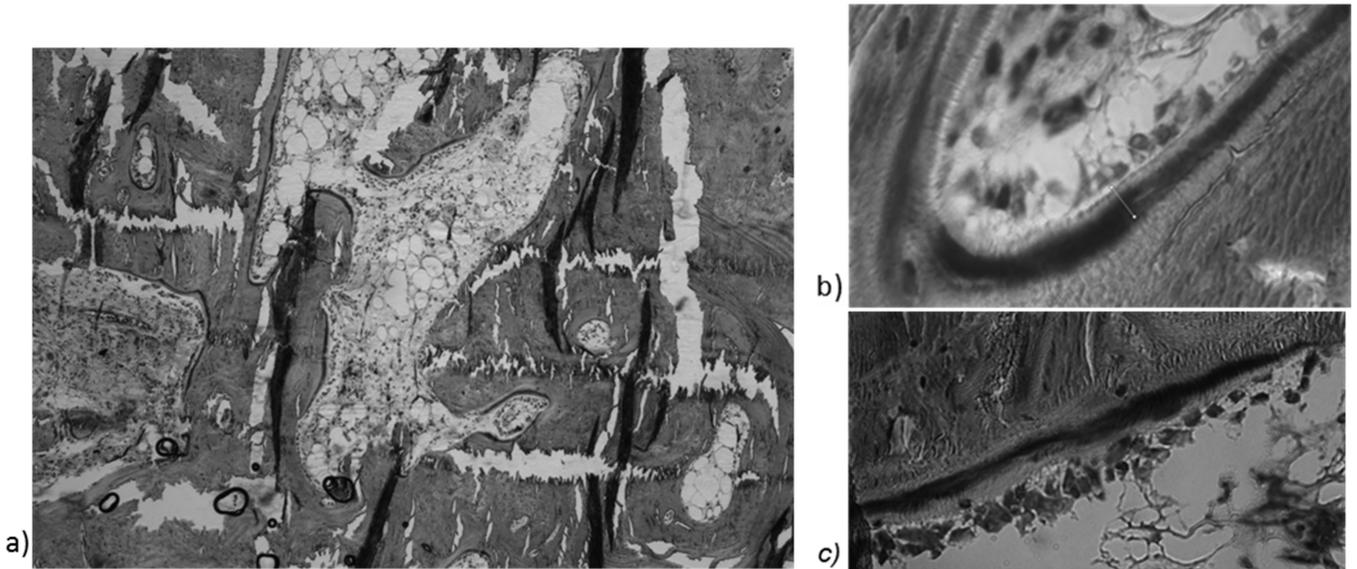


Figure 33.: a) Image noir et blanc en microscopie de coupe transversale d'os de brebis, full scale 2,42x1,49mm. b) Première interface os/ostéoblastes étudiée, full scale 120x182 $\mu$ m. c) Seconde interface os/ostéoblastes étudiée, full scale 107x182 $\mu$ m.

La partie qui nous intéresse ici est l'interface entre l'os mature et les ostéoblastes en cours de construction osseuse (Fig. 33.b-c), la forte concentration de noyaux cellulaires étant ici celle d'ostéoblastes. La partie la plus marquante sur ces images est la ligne noire que chacune présente. Celle-ci est le résultat d'une coloration trichrome de Masson employée sur l'os de brebis qui résulte en une coloration de l'os minéralisé en vert, et des parties non-minéralisées et noyaux cellulaires en rouge. Ce pourquoi ils apparaissent ici en différents niveaux de gris et noir, la lumière employée étant celle monochromée à 546 nm (verte) du polscope. Les bandes noires ici sont donc distinctes de celles beaucoup plus larges de la figure 33 a), et nettement indicatives de collagène non-minéralisé. Le tissu osseux minéralisé avec lequel la bande de collagène se trouve en contact ne semble pas présenter de front directionnel uniforme sur les zones considérées, élément à potentiellement confirmer en microscopie à lumière polarisée.

## 2) Observations polscope de l'interface

L'objectif ici est de déterminer si le collagène produit à l'interface par les ostéoblastes est déjà organisé selon une structure spécifique et dans quelle mesure. Dans ce cadre les images de la figure 33 b) et c) ont été acquises en configuration polscope (Fig. 34.a-b). Il est immédiatement possible d'observer des différences dans l'expression des orientations de la couche de collagène non minéralisé entre les deux échantillons. Là où notre échantillon 1 apparaît posséder une orientation globalement homogène le long de l'interface droite, l'orientation dans l'interface de l'échantillon 2 présente une évolution assez marquée selon sa longueur, avec notamment une certaine évolution dans l'épaisseur en plus de la longueur.

A noter également les différences importantes dans la continuité du caractère biréfringent du matériel avec la phase minéralisée. L'échantillon 1 présente une vaste plage de phase minéralisée non biréfringente au contact de l'interface, puis une section importante suivant majoritairement selon la même orientation que cette dernière. La phase minéralisée de

l'échantillon 2 en revanche est complexe, avec la part gauche de la phase non-minéralisée qui semble être dans la continuité de la phase minéralisée en haut à droite.

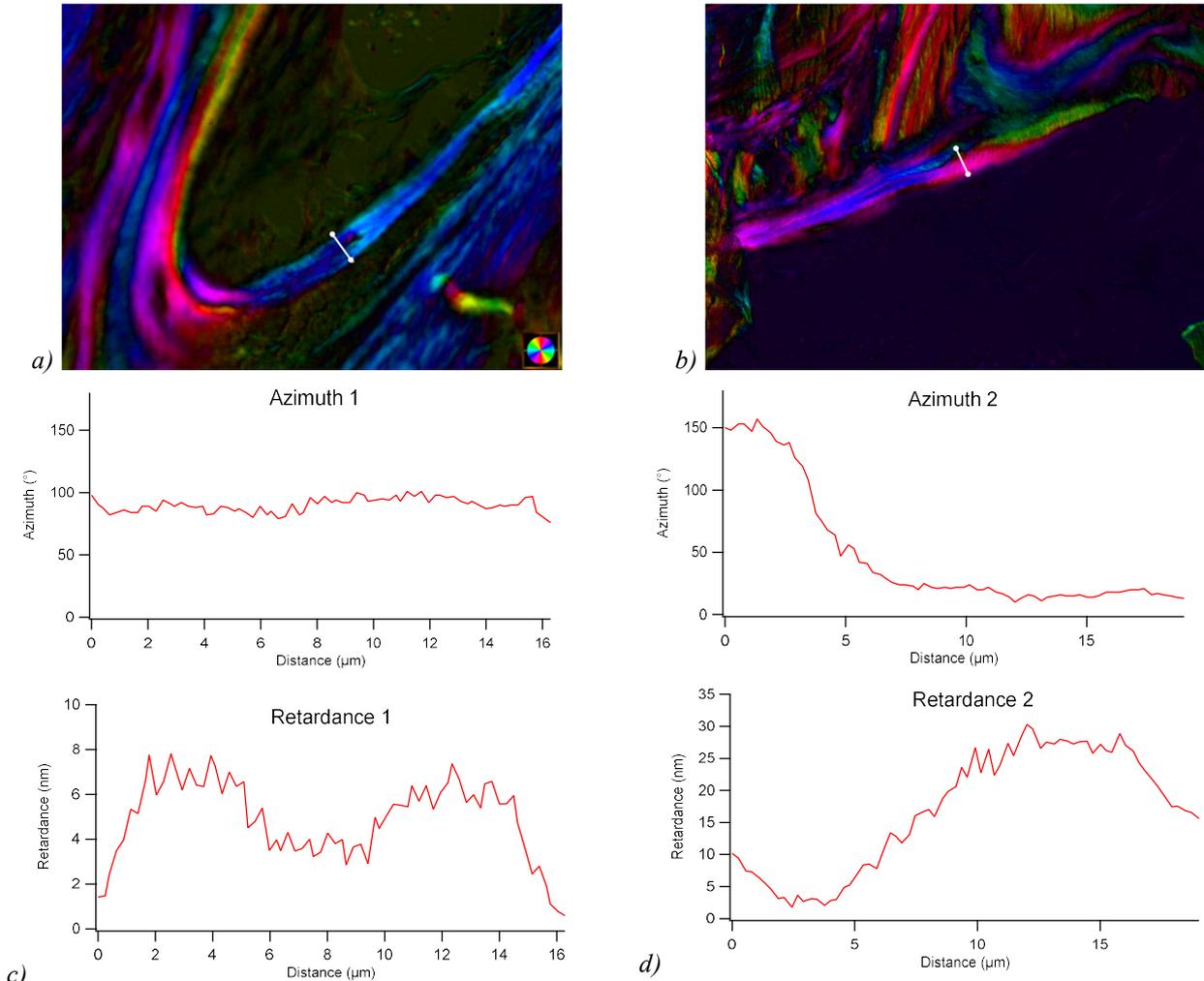


Figure 34.: a) Première interface os/ostéoblastes étudiée en azimuth-retardance. Ligne de mesure 1 en blanc, full scale  $169 \times 211 \mu\text{m}$ . b) Seconde interface os/ostéoblastes étudiée. Ligne de mesure 2 en blanc, full scale  $169 \times 211 \mu\text{m}$ . c) Mesure d'azimuth et retardance selon la ligne 1, de la phase minéralisée vers les ostéoblastes. d) Mesure d'azimuth et retardance selon la ligne 2, de la phase minéralisée vers les ostéoblastes.

Les comportements de l'azimuth et de la retardance à travers la bande de collagène ont été mesurés (Fig. 34 c, d), et présentent d'une manière générale des comportements distincts suggérant une forme d'organisation plutôt qu'un quelconque désordre. Cependant, les figures ici d'azimuth et de retardance sont très différentes entre nos deux exemples. Or la structure naturelle vers laquelle le collagène de type 1 de l'os tend est celle du cholestérique et il a été démontré auparavant que l'organisation apparente du collagène dépend de l'angle de coupe de la phase cholestérique<sup>16</sup> et plus précisément dans le cadre de l'os. Nos configurations pourraient donc correspondre dans le cas 1 à une coupe transverse aux plans de la phase cholestérique, et dans le cas 2 une coupe selon un angle résultant sur une figure en arceaux<sup>4</sup>.

S'il s'agit bien d'une expression de la forme cholestérique du collagène, il est alors possible de modéliser les résultats de mesure en fonction des paramètres de la phase cholestérique, ainsi que de l'angle auquel celle-ci aurait été coupé.

### 3) Modélisation azimuth/retardance du collagène déposé en interface

Nous avons cherché à reproduire les figures d'azimuth et de retardance par calcul. Tout d'abord, rappelons que les mesures de retardance et d'azimuth dépendent des indices de la différence entre indices de réfractions suivant deux axes perpendiculaires, que nous notons ici  $\Delta n$ . Or, notre plan d'observation est ici le plan de coupe, à un angle  $\mu$  inconnu de notre axe directeur de l'hélice cholestérique. Ce qui génère donc un pas observé du cholestérique  $p^* = p/\cos(\mu)$ , et par la même de la période de répétition  $q^* = 2\pi/p$ . Cela impacte à son tour l'expression de la biréfringence suivant deux composantes, alignées sur l'axe directeur  $\Delta n_a$  et perpendiculaire  $\Delta n_p$ .

A partir de là, il est possible d'exprimer  $\Delta n_a$  et  $\Delta n_p$  en fonction de quatre paramètres, la biréfringence  $\Delta n$ , l'angle de coupe  $\mu$ , le pas cholestérique  $p$  et la position  $d$ .

$$\Delta n_p = \Delta n \sin(q^*d)$$

$$\Delta n_a = \Delta n \cos(q^*d) \sin\mu$$

Les plans cholestériques étant composés de molécules toutes orientées pareillement dans le plan, la composante perpendiculaire n'est affectée que par le changement de pas, là où la composante suivant l'axe directeur dépend directement de l'angle de coupe. Les valeurs de retardance et d'azimuth observées peuvent alors être déterminées comme :

$$\delta = \sqrt{\Delta n_p^2 + \Delta n_a^2} \quad \text{et} \quad \theta = \tan^{-1}\left(\frac{\Delta n_a}{\Delta n_p}\right)$$

Ce qui permet alors de générer des fits pour les mesures de nos échantillons (Fig. 35).

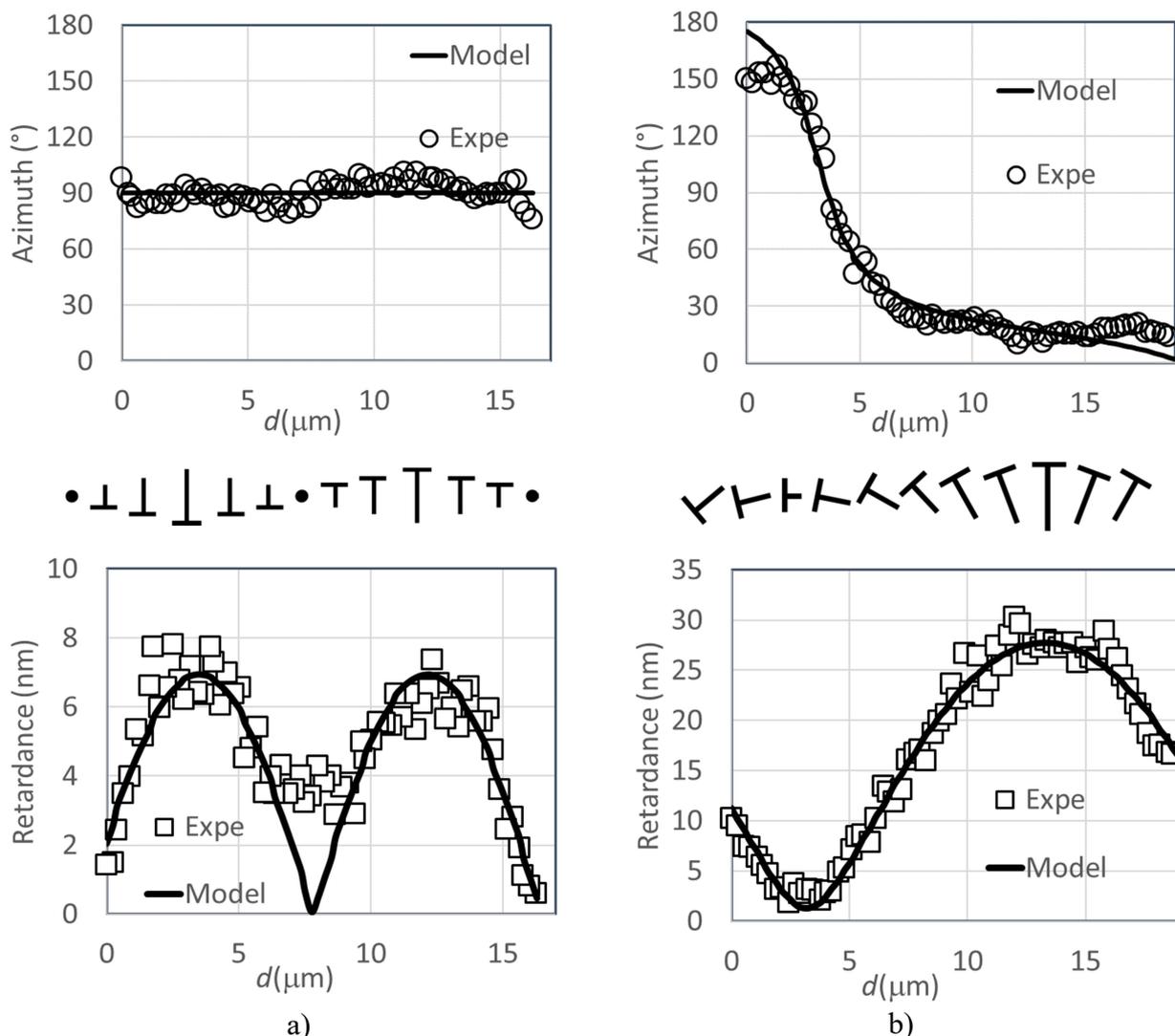


Figure 35.: Colonne a) Azimuth et retardance expérimentale et calculée pour le cas 1 avec un angle de coupe  $\mu=0^\circ$  et une demi-période spatiale de 8,6 microns, et représentation graphique correspondante de l'orientation du collagène. Colonne b) Azimuth et retardance expérimentale et calculée pour le cas 2 avec un angle de coupe  $\mu=12^\circ$  et une demi-période spatiale de 20,5 microns, et représentation graphique correspondante de l'orientation du collagène.

Les modélisations qui correspondent au mieux à nos données expérimentales sont calculées pour les deux cas. La modélisation du cas 1 (Fig. 33 a) correspond à un angle de coupe  $\mu=0^\circ$ , ce qui est la configuration à même de générer ces variations de retardance à azimuth constant. Le cas 2 (Fig. 21 b) pour sa part est modélisé pour un angle de coupe de  $\mu=12^\circ$ , correspondant à une structure qui apparaît dans le plan d'observation comme des arceaux<sup>4,16</sup>. Il est de plus possible à partir de cette idée de représenter comme en fin de figure 35 les configurations du collagène correspondant à la situation observée.

Il apparaît que le collagène généré par les ostéoblastes s'organise naturellement à l'interface sous la forme de plans cholestériques pré-minéralisation, avec le pas cholestérique de la phase perpendiculaire à l'interface entre ostéoïde et os mature. La question de la formation des plans cholestériques aux interfaces s'est cependant posée, question à laquelle

nous avons tenté de répondre en étudiant la progression de l'organisation du collagène dans des chambres microfluidiques texturées.

## **V. Conclusion**

Nous avons achevé à travers la thèse une meilleure compréhension des techniques de l'optique en lumière polarisée, et avons à partir de celles-ci mis au point un système de microscopie polscope portatif. Ce système nous a ensuite permis de poursuivre nos études sur l'organisation du collagène, suite à une panne de notre dispositif initial.

A travers les différentes techniques de microscopie en lumière polarisée, nous avons pu étudier à la fois différents aspects du comportement du collagène dans l'os, et les différentes formes d'organisations que peut prendre le collagène naturellement depuis sa phase nématique CL. Par l'étude de l'interface os/collagène générée par des ostéoblastes, ainsi que les comportements du collagène en confinement libre ou microtexturé, nous avons pu observer que les phases CL du collagène possèdent une tendance à s'aligner sur les surfaces, puis à voir leur orientation évoluer par plans.

Tout ceci a permis de démontrer l'efficacité des techniques de microscopie en lumière polarisée dans l'étude de l'organisation de systèmes de collagène. La possibilité d'étudier des systèmes biologiques d'organisation du collagène tels que l'os, les tendons, le cartilage ou encore la cornée, à tout le moins en compléments d'autres méthodes d'analyse, offre des perspectives intéressantes pour l'avenir. En effet, nous avons vu que les capacités de résolution d'orientation et de structure de matériau cholestérique par lumière polarisée restent insuffisantes pour nous permettre en l'état de résoudre de manière concluante les différentes structures observées.

Nos échantillons, suivant les différentes techniques de microscopie par lesquelles nous les avons observés, semblent présenter une cohérence de la structure osseuse potentiellement fragilisée. Ce dès un temps de développement de sept jours, et autour du cartilage de croissance, soit à distance du point d'injection des cellules tumorales. Ceci, en revanche, ne semble pas, à partir des échantillons observés, se traduire de manière évidente au niveau de l'organisation des fibrilles de collagène constituant l'os observé.

## VI. Bibliographie

1. Bass et Optical Society of America - 1995 - Handbook of optics.pdf.
2. Shribak, M. & Oldenbourg, R. Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions. *Appl. Opt.* **42**, 3009 (2003).
3. Bouligand, Y., Lagerwall, S. T. & Stebler, B. Blue-phase drops on a glass interface and their decoration at the cholesteric transition. *Comptes Rendus Chimie* **11**, 212–220 (2008).
4. Mosser, G., Anglo, A., Helary, C., Bouligand, Y. & Giraud-Guille, M.-M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology* **25**, 3–13 (2006).
5. Bouligand, Y., Deneffe, J. P., Lechaire, J. P. & Maillard, M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures. *Biology of the Cell* **54**, 143–162 (1985).
6. Jessy, P. J., Radha, S. & Patel, N. Morphological, optical and dielectric behavior of chiral nematic liquid crystal mixture: Study on effect of different amount of chirality. *Journal of Molecular Liquids* **255**, 215–223 (2018).
7. Lepescheux, L. Spatial organization of collagen in annelid cuticle: order and defects. *Biology of the Cell* **62**, 17–31 (1988).
8. Salameh, C. *et al.* Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials. *PNAS* **117**, 11947–11953 (2020).
9. Postic, M. Auto-organisation de matériaux multi-échelles par séchage : des mécanismes de retrait des ménisques dans un milieu poreux modèle à la cristallisation de nanoparticules. <http://www.theses.fr> (Rennes 1, 2012).
10. Algaba, H. Étude de la formation de structures complexes auto-organisées par séchage confiné de solutions dans des milieux poreux microtexturés en 2D. <http://www.theses.fr> (Rennes 1, 2016).
11. Blume, I., Schwering, P. J. F., Mulder, M. H. V. & Smolders, C. A. Vapour sorption and permeation properties of poly (dimethylsiloxane) films. *Journal of Membrane Science* **61**, 85–97 (1991).
12. Kujawska, A., Knozowska, K., Kujawa, J., Li, G. & Kujawski, W. Fabrication of PDMS based membranes with improved separation efficiency in hydrophobic pervaporation. *Separation and Purification Technology* **234**, 116092 (2020).
13. Gleghorn, J. P., Smith, J. P. & Kirby, B. J. Transport and collision dynamics in periodic asymmetric obstacle arrays: Rational design of microfluidic rare-cell immunocapture devices. *Phys. Rev. E* **88**, 032136 (2013).
14. PhD, W. K. O. & PhD, P. C. N. *Netter's Essential Histology: with Student Consult Access.* (Elsevier Health Sciences, 2013).
15. Minns, R. J. & STEVENT, F. S. The collagen fibril organization in human articular cartilage. 21.

16. Giraud-Guille, M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 167–180 (1988).

CHAPITRE 3 :  
ETUDE A L'ECHELLE NANOSCOPIQUE DE  
L'OSTEOSARCOME AUX TEMPS COURTS

## Table des matières Chapitre 3

I.	Introduction.....	82
II.	Production des échantillons .....	82
A.	Protocole d'infection des souris .....	83
B.	Réalisation des coupes et choix des échantillons pour analyse SAXS .....	84
1)	Coupe des échantillons .....	84
2)	Choix des échantillons pour SAXS .....	84
III.	Observation macroscopique des échantillons .....	85
IV.	Principe et état de l'art analyse SAXS de l'os .....	87
A.	Concept de la diffraction des rayons X.....	87
1)	Interaction rayonnement-matière.....	87
2)	Diffraction des rayons X.....	88
3)	Diffusion des rayons X.....	90
a)	Facteur de forme .....	90
b)	Facteur de structure .....	91
4)	Interprétation des figures de diffraction des rayons X.....	91
B.	Fonctionnement de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL .....	92
1)	Synchrotron .....	92
a)	Accélérateur linéaire .....	93
b)	Booster .....	93
c)	Anneau de stockage .....	94
2)	Ligne SWING.....	95
a)	Traitement du rayonnement incident.....	95
b)	Système de mesure .....	95
C.	Signal du collagène de tendon.....	96
1)	Pics à 67nm du collagène .....	96
2)	Pic d'organisation latérale du collagène.....	96
D.	Signaux de l'os .....	97
1)	Phase organique de la matrice osseuse : le collagène.....	97
a)	Pic à 67 nm du collagène.....	97
b)	Pics d'organisation latérale du collagène.....	98
2)	Phase minérale de la matrice osseuse : l'apatite.....	99
a)	Ordre orientationnel des cristaux observé par SAXS .....	99
b)	Forme et structure des cristaux observés par SAXS.....	99

c)	Structure cristalline observée par WAXS.....	101
V.	Analyse conventionnelle des spectres SAXS .....	102
A.	Introduction .....	102
B.	Analyse des spectres de diffusion 2D .....	102
1)	Localisation des données employées.....	102
2)	Visualisation des spectres 2D .....	104
3)	Epiphyse .....	105
4)	Cavité médullaire.....	107
5)	Os cortical.....	108
C.	Analyse des spectres de diffusion 1D .....	109
1)	Fit réalisé avec le programme Sasfit.....	109
2)	Résultats d'analyse Sasfit .....	110
3)	Résultats d'analyse individuelle : pics du collagène .....	112
4)	Conclusion.....	113
5)	Limites de la méthode et stratégie .....	113
VI.	Cartographies SAXS des échantillons .....	113
A.	Qualité de l'os .....	114
1)	Saturation du signal .....	115
a)	Principe et mesure.....	115
b)	Cartographies .....	116
2)	Intensité diffusée.....	116
a)	Principe et mesure.....	117
b)	Cartographies .....	117
3)	Orientation .....	120
a)	Principe et mesure.....	120
b)	Cartographies .....	121
4)	Anisotropie .....	122
a)	Principe et mesure.....	122
b)	Cartographies .....	122
5)	Conclusions .....	124
B.	Analyse du signal de l'apatite .....	124
1)	Zones de Fourier et Porod : mesure automatique des pentes .....	124
2)	Cartographies de la pente dans la zone de Fourier .....	125
3)	Cartographies de la pente dans la zone de Porod .....	126
4)	Intersection entre les pentes, périmètre des cristaux d'apatite .....	127

a)	Principe, mesure et validité.....	127
b)	Cartographies .....	128
5)	Structure cristalline des cristaux d'apatite par WAXS.....	129
a)	Pic de l'apatite 002 .....	130
b)	Pic de l'apatite 211 .....	131
C.	Analyse du signal de l'organisation latérale des fibrilles de collagène.....	131
1)	Pics de diffraction des fibrilles du collagène.....	131
a)	Méthode automatique de mesure .....	132
b)	Cartographies de la première bosse.....	133
c)	Cartographies de la seconde bosse .....	135
2)	Paramètre de maille .....	136
a)	Théorie et calcul .....	136
b)	Cartographies .....	137
3)	Pics de diffraction secondaires du collagène.....	138
a)	Méthode de mesure .....	139
b)	Cartographies .....	139
D.	Conclusions .....	140
1)	Différentes structures osseuses .....	140
2)	Vieillessement de l'os .....	141
3)	Ostéosarcome.....	143
VII.	Techniques de microscopie.....	144
A.	Microscopie optique.....	144
B.	Microscopie Electronique à Transmission .....	146
C.	Propriétés mécaniques.....	148
D.	Conclusions .....	149
VIII.	Conclusion.....	149
IX.	Bibliographie.....	152

## **I. Introduction**

L'ostéosarcome est une pathologie qui se caractérise en grande partie par la production de matériel osseux de manière incontrôlée. Ce matériau osseux possède des disparités marquées avec l'os issu de génération saine. De plus, comme il s'agit d'une pathologie rare, celle-ci est rarement détectée tôt dans son développement. Aussi, si le sujet est recherché avec une certaine assiduité, les études se sont pour l'instant principalement portées sur des ostéosarcomes pleinement formés, ou bien essentiellement à un niveau cellulaire. De ce fait, très peu d'études ont été effectuées aux temps courts sur le mode de fonctionnement et d'induction de l'ostéosarcome, et sur ses vecteurs d'action sur le processus de remodelage de l'os. Si des études sur l'interaction entre les cellules tumorales et la production d'os ont été effectuées, établissant le modèle du cercle vicieux de propagation de l'ostéosarcome, le vecteur de ces interactions et le développement aux premières étapes restent à établir.

L'os est un matériau biologique important et fortement étudié, dans ses mécanismes de formation comme dans sa composition. D'un point de vue de physicien, dans le cadre de la science des matériaux, cela offre une opportunité d'étude importante. La possibilité d'identifier les structures au niveau nanométrique des différents types d'os, et conséquemment de déterminer les déviations et modifications de celles-ci. L'opportunité est d'identifier dès les premiers jours les modifications de la structure osseuse induites par les cellules tumorales.

La diffraction des rayons X est une technique d'analyse de la matière basée sur l'interaction entre des rayonnements de longueur d'onde de l'ordre de l'angström et le cortège électronique des atomes. Ces interactions se présentent comme des chocs élastiques entraînant une diffusion selon un angle suivant la loi de Bragg. Au sein de systèmes organisés, la répétition de distances caractéristiques entraîne l'expression plus marquée d'un angle spécifique de diffusion, résultant sur des figures de diffraction correspondant aux dites distances caractéristiques. Suivant le niveau d'organisation des structures, ces figures de diffraction se trouvent être entre deux possibilités extrêmes, sous la forme d'un point pour un matériau parfaitement régulier tel un macro-cristal, jusqu'à un cercle pour une poudre cristalline. On distingue les différentes techniques de diffraction des rayons X suivant la valeur d'angle étudiée, des grands angles (WAXS), aux petits angles (SAXS), voire aux très petits angles (USAXS).

Cette méthode d'analyse des matériaux offre de grandes possibilités pour étudier dans l'épaisseur un matériau, offrant des informations sur les distances entre éléments, leur niveau d'organisation, leur orientation et bien d'autres données. Aussi est-ce la technique d'analyse que nous avons employé afin d'étudier l'évolution de l'os infecté par l'ostéosarcome à des temps de développement courts. L'objectif ici est de comparer les données d'échantillons sains avec les différents résultats issus d'échantillons sarcomateux, dans le but de caractériser les différences, et de déduire l'impact aux premiers jours et potentiellement le vecteur d'action de l'ostéosarcome.

## **II. Production des échantillons**

Nous avons travaillé en partenariat avec l'équipe de Françoise Rédini qui nous a fourni les échantillons d'os sur lesquels nous avons travaillé au cours de cette thèse. Notre stratégie d'étude s'est basée sur l'observation des premières étapes de développement de l'ostéosarcome, à quelques jours après le début de l'infection. Pour cela, une série de sujets de rats nus immunodéficients ont été infectés avec des cellules d'ostéosarcome, puis sacrifiés à différents temps après infection.

#### A. Protocole d'infection des souris

Les échantillons réalisés et utilisés au cours de cette thèse ont été réalisés au service d'anapathologie de Nantes par l'équipe de Françoise Rédini avec l'aide donc de Jérôme Amiaud. Les sujets employés sont des souris immunodéficientes adolescentes, qui se sont vues injectées des cellules d'ostéosarcome au niveau du périoste sur le tibia.

Les cellules cancéreuses d'ostéosarcome employées lors de la réalisation de ces échantillons proviennent de la ligne MOS-J d'ostéosarcome murin (de souris) obtenu auprès de l'American Type Culture Collection.

Les souris en question se voient donc soumises à un même protocole d'infection<sup>1</sup>, qui consiste à ouvrir la patte gauche de la souris à environ 1/3 de proximal du tibia. Cette zone est ensuite soumise à une forme de grattage du périoste à l'aide d'une spatule métallique afin d'activer le remodelage osseux, que l'ostéosarcome est ensuite mieux à même de subvertir. Un échantillon de cellules cancéreuses d'ostéosarcome est ensuite déposé sous forme de solution sur la zone avivée, avant de refermer la plaie.

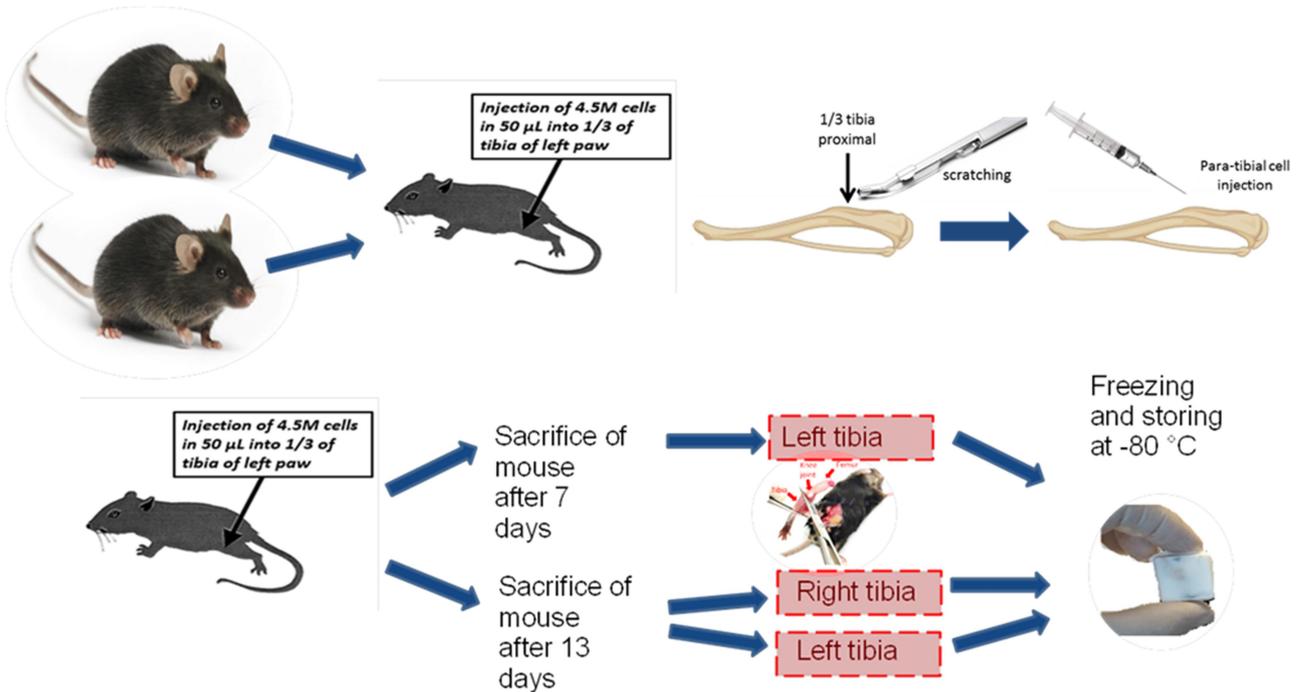


Figure 1.: Processus de fabrication des échantillons infectés.

Un processus similaire est effectué sur le tibia droit de la souris, exception faite du dépôt de cellules cancéreuses, afin d'offrir des échantillons sains de comparaison. Le but de l'avivement est ici de supprimer le risque de fausser les mesures par le biais de la réponse osseuse à celui-ci ayant affecté via le remodelage la densité et structure osseuse locale.

Les spécimens sont ensuite sacrifiés à 7 et 13 jours après infection pour offrir des éléments de comparaison aux temps courts. Les pattes des souris sont alors séparées de la carcasse avant d'être conservés dans de la glace à -80°C. A l'opposé des procédures habituelles pour ce genre d'échantillon, aucun produit de fixation, comme de la paraffine, ou de marquage n'ont été employés, afin de prévenir tout problème de pollution de la mesure SAXS par ces produits en aval.

## **B. Réalisation des coupes et choix des échantillons pour analyse SAXS**

Les échantillons ainsi obtenus sont cependant massifs et impropres à l'analyse par diffraction des rayons X. Il a donc été nécessaire d'effectuer des coupes des échantillons pleins afin d'obtenir des tranches fines plus à même de correspondre à nos besoins.

### **1) Coupe des échantillons**

Les coupes ont été réalisées par Alain Fautrel au service d'histopathologie de Rennes, à partir des échantillons congelés et conservés à  $-48^{\circ}\text{C}$ . Il s'agissait de la première opération du genre effectuée dans ce cadre par l'équipe, aussi a-t-elle servi pour établir certains éléments pour de futurs protocoles. Un élément qui est apparu dans le cadre de la réalisation des coupes d'échantillons, est que la glace dans laquelle les pattes de souris ont été conservées se trouvait être opaque au moment de la coupe. En l'absence de l'anticipation de ce paramètre, il nous était difficile d'établir la position exacte de la patte, tant du point de vue localisation que de l'orientation. Aussi les coupes réalisées ne se sont pas trouvées être parfaitement effectuées suivant la longueur du tibia.

Nous avons réalisé un certain nombre de coupes, en alternant les échantillons déposés sur verre dans le cadre d'une observation polscope ou d'une étude des propriétés mécaniques, avec des coupes déposées sur un substrat souple et fin en nalophane pour les études en SAXS. Les coupes ont été réalisées. La totalité des échantillons a ensuite été séché pendant 48 heures en étuve à  $40^{\circ}\text{C}$ .

A noter que certaines des coupes ont finis enroulées sur elles-mêmes ou bien perdues lors du processus de coupe. Aussi la succession des échantillons trouvés dans l'annexe 2 "Echantillons" ne représente pas directement une continuité de la structure des os coupés. Un autre élément important à noter et le degré important de dégradation de la structure trabéculaire mais aussi corticale sur les différents échantillons induit par la coupe, qui était ici suivant une première procédure pas encore affinée.

### **2) Choix des échantillons pour SAXS**

Si l'on observe les différentes coupes disponibles, le choix de l'échantillon de contrôle à J+13 (J13C) D1 sur le nalophane pour l'étude SAXS se trouve être assez évident, la coupe n°12 présentant à la fois l'une des structures trabéculaires les plus intactes ainsi que la longueur d'os cortical la plus grande. Le choix de l'échantillon D2 aurait pu se porter sur les coupes 14 ou 15 de l'échantillon sarcome à J+13 (J13S), malheureusement ceux-ci se sont décollés de leur support nalophane et furent perdus. La logique employée pour le choix des échantillons D4 et D5 (J7S) s'est essentiellement portée sur la quantité de matériel disponible à l'étude SAXS en proximité du cartilage de croissance, zone qui paraissait supporter le mieux la coupe. Qui plus est, cette structure est facilement identifiable pour comparaisons, ses mécanismes biologiques impliquent fortement le remodelage de l'os, et en tant que tel particulièrement sensible à une action à distance possible de l'ostéosarcome sur les cellules ostéoblastes ou ostéoclastes.

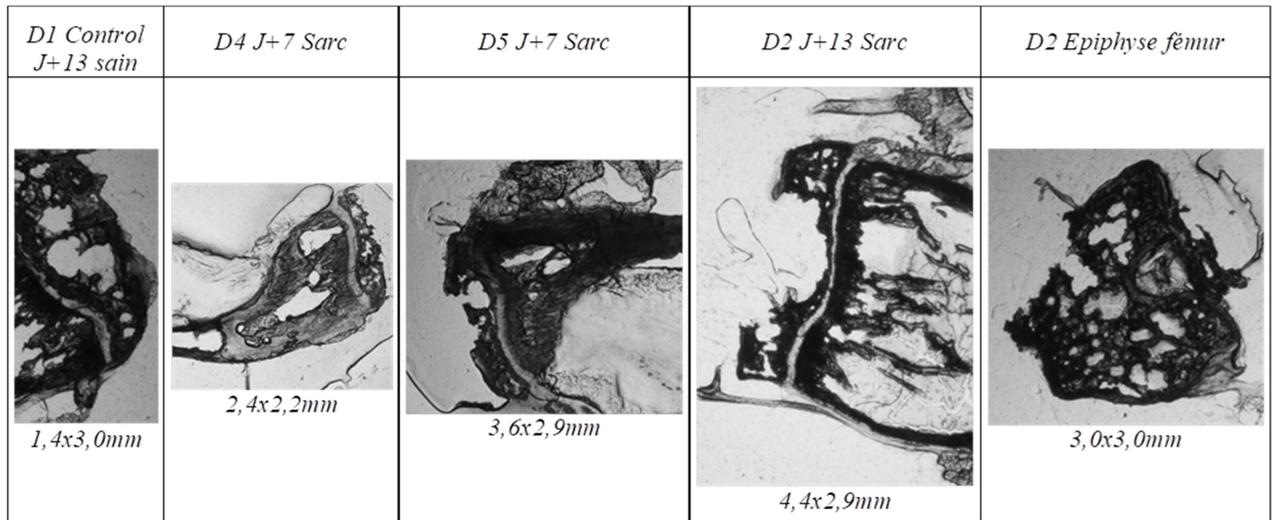


Figure 2.: Images des échantillons sélectionnés pour l'étude SAXS, les photos ont été retailées pour correspondre aux zones balayées au synchrotron.

Les tranches de la patte 690 Gauche (J7S) ont beaucoup souffert de la coupe, et il est impossible de même pouvoir déterminer la localisation des fragments d'os obtenus. Aussi l'ensemble de la sélection d'échantillons (Figure 2) se portant sur la durée de développement à 7 jours s'est reportée sur les coupes de la patte 689 Gauche. La sélection s'est finalement portée sur les coupes 14 et 23 (D4 et D5 à J7S) qui semblent être dans le meilleur état disponible pour la suite de l'étude, avec une zone trabéculaire presque compacte dans son intégrité par rapport aux autres coupes. De plus, l'éloignement relatif des numéros de coupes peut permettre de vérifier la continuité des résultats de mesure sur un même échantillon par les méthodes d'analyse employées ici, à savoir essentiellement la diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS).

### **III. Observation macroscopique des échantillons**

Avant de procéder à une quelconque analyse de nos échantillons en utilisant des techniques d'analyse de la matière telle que la diffraction des rayons X, nous avons souhaité faire une première série d'observations des échantillons obtenus à différentes échelles en utilisant un panel de méthodes d'observations, de microscopie mais également d'analyse de la réponse mécanique d'échantillons. La première de celle-ci est l'échelle macroscopique, avec des photographies hautes définition des échantillons.

Si nous considérons l'ensemble de nos échantillons présentés dans l'annexe éponyme, nous observons une fois de plus l'état de dégradation important des tibias issus de cette série de coupes. Toute étude se doit de fournir des données comparables, et la zone qui apparaît dans le meilleur état dans l'ensemble des coupes se trouve être la zone du cartilage de croissance.

Cette zone de l'os offre un intérêt double. D'une part il s'agit d'une zone facilement identifiable et en bon état comparativement à l'épiphyse ou la cavité médullaire, mais le second intérêt porte sur la morphologie des structures osseuses disponibles à l'étude dans cette région. Celle-ci présente en effet à courte portée autour du cartilage de croissance la structure osseuse trabéculaire de l'épiphyse comme de la diaphyse, cette dernière étant générée par un mécanisme de production d'os spécifique, ainsi que de l'os cortical.

Aussi, si une structure osseuse spécifique se trouve être plus sensible à un effet à distance des cellules tumorales, la zone autour du cartilage de croissance offre la meilleure opportunité d'en observer les effets. L'observation macroscopique, même sur des échantillons aux temps aussi

courts que ceux considérés offre une première approche comparative d'une possible évolution des échantillons en réponse à l'ostéosarcome.

Revenons à l'annexe 2 "échantillons". Si l'on considère les coupes de l'échantillon de contrôle à 13 jours, outre les dégâts imputables à la coupe, nous pouvons observer facilement que ceux-ci présentaient une structure trabéculaire complète et assez dense, particulièrement à partir de la coupe n°9. En comparaison, les coupes de l'échantillon sarcome à J+13 semblent présenter différents comportements.

Si les coupes 11 à 16 présentent bien une structure trabéculaire intacte et fournie, spécialement la coupe n°15, le cas diffère pour les coupes 7 et 10. Là où les coupes 11 à 16 ne paraissent pas différer de la structure saine de l'os dans la cavité médullaire, les coupes 7 et 10 présentent une ouverture de cette dernière plus importante, spécialement en comparaison à l'étroitesse de celle-ci sur laquelle les coupes se terminent. Si cela peut être imputable à l'angle de la coupe vis-à-vis de la forme du tibia de la souris, les différences dans la structure trabéculaire restent d'intérêt.

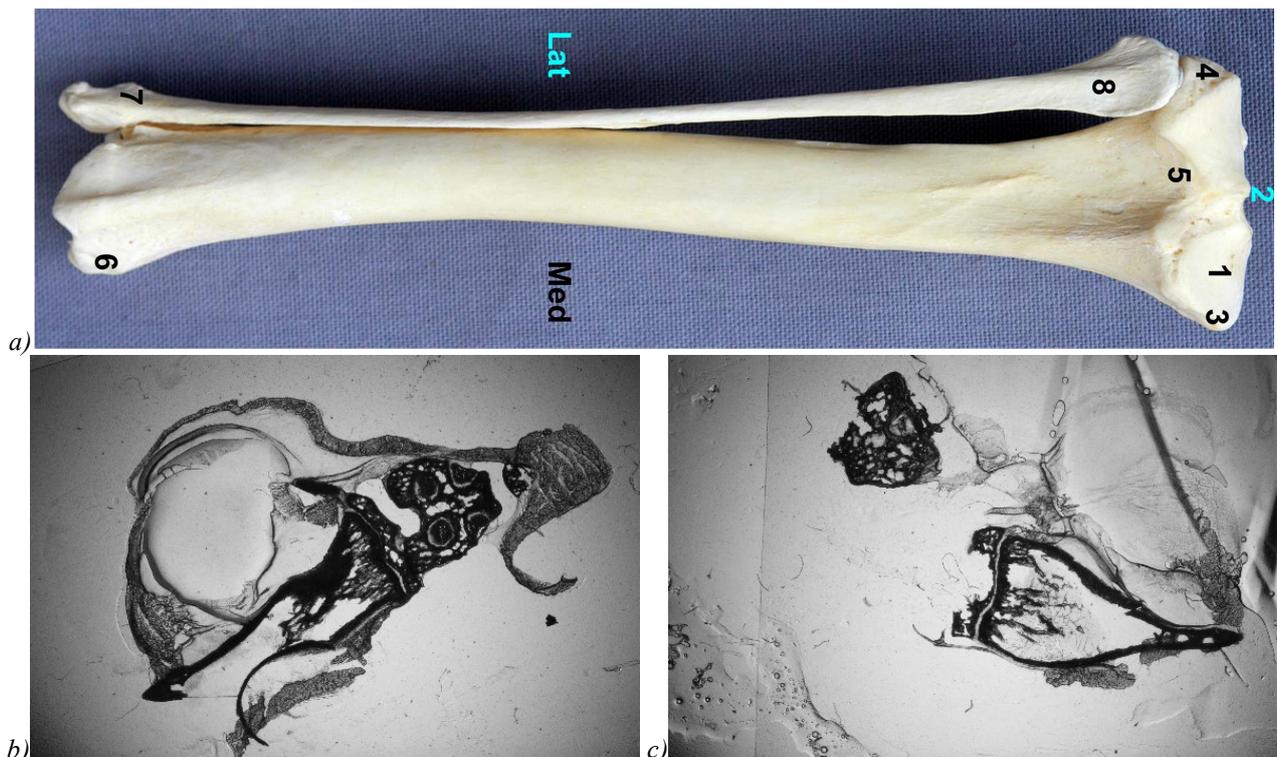


Figure 3.: a) Tibia de souris<sup>2</sup>. La zone de travail se trouve du côté du 2.  
b) Coupe n°15 de l'échantillon J+13 sarcome. c) Coupe n°10 de l'échantillon J+13 sarcome.

Si l'absence de matériel trabéculaire dans la coupe n°10 est sans doute en partie due au mécanisme de coupe, le matériel en sortie du cartilage de croissance apparaissant coupé brutalement dans sa continuité, les éléments d'os trabéculaires restant dans la cavité apparaissent atypique. Dans aucun autre échantillon, et quelle que soit l'apparente qualité de la coupe, avons-nous pu observer cette structure raréfiée et dans la continuité du proximal du cartilage de croissance. Il est également possible de distinguer des éléments de structure biologique qui sont absents des zones dégradées à la coupe des autres coupes quels que soient les échantillons.

L'ensemble de ces éléments tendent à indiquer une différence de comportement dans la densité de la structure trabéculaire sur ces coupes spécifiques, qui contrastent avec les coupes plus profondes de l'échantillon comme avec celles des autres échantillons. Les coupes de

l'échantillon de contrôle ne sont pas assez longues pour permettre une conclusion plus décisive sur ces observations, mais nous considérons ce phénomène comme un élément à surveiller.

Parallèlement, les échantillons exploitables d'os infecté à J+7 semblent présenter une structure trabéculaire complète là où elle a subsisté, et non pas des éléments épars dans la cavité. Celle-ci se présente soit sous la forme d'une structure dense, comme sur les coupes 12 à 14 et 23, soit comme un réseau bien défini dans les autres coupes. La structure dense, du reste, n'est pas observable dans les échantillons à 13 jours, qu'ils soient sain ou non. La structure apparaît plus compacte que dans les coupes de l'échantillon de contrôle, malgré la densité de matériel en proximité du cartilage de croissance.

Afin de pousser plus loin l'observation, en partenariat avec Nadine NASSIF, des coupes de quelques microns ont été réalisées à partir de l'échantillon sélectionné pour l'analyse SAXS D5 (J7S) après que celui-ci ait rempli sa fonction. Pour des raisons de disponibilités, l'échantillon de comparaison à J+13 de contrôle est la coupe n°10 de la patte 696 Droite (annexe 2 échantillons). Ceux-ci ont ensuite servi pour une analyse en microscopie plus poussée en optique et en microscopie TEM. Les échantillons sélectionnés ont pour leur part servi en diffraction des rayons X.

## IV. Principe et état de l'art analyse SAXS de l'os

La diffraction des rayons X est une technique basée sur l'interaction entre des rayonnements X et le cortège d'électrons, permettant de déterminer les distances de répétition au niveau atomique des matériaux. Dans cette partie, nous décrivons le principe de fonctionnement de la diffraction des rayons X, avant de considérer les résultats existants dans la bibliographie relatifs à l'étude de l'os, spécialement les signatures spécifiques du collagène et de l'apatite.

### A. **Concept de la diffraction des rayons X**

#### 1) Interaction rayonnement-matière

Comme nous l'avons précisé, la diffraction des rayons X est le fruit de l'interaction des rayonnements, à des énergies comprises entre 1 et 100 keV, avec le cortège électronique des atomes. Il s'agit de diffusion élastique, aussi dite cohérente, ou effet Thomson.

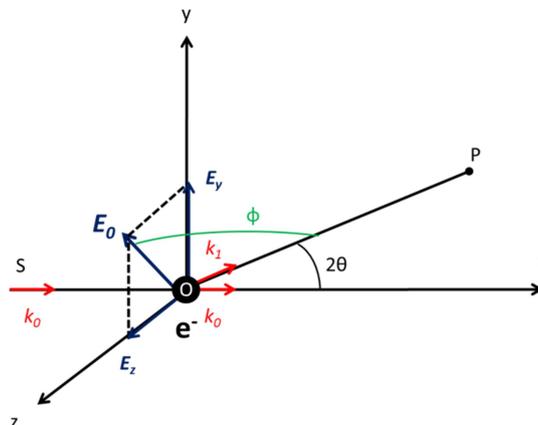


Figure 4.: Schéma de diffraction de rayonnement X sur un électron.

Dans le cadre d'un rayonnement incident non polarisé issu d'une source S se propageant suivant un vecteur  $k_0$  suivant l'axe x, l'onde électromagnétique non polarisée  $E$  est considérée suivant ses deux composantes, suivant les axes y et z,  $E_y$  et  $E_z$ . La direction de propagation de

l'onde électromagnétique après collision suivant le vecteur  $k_l$  dépend de l'angle de collision  $\theta$  entre ceux-ci, résultant sur une diffusion suivant un angle  $2\theta$  par rapport au rayonnement incident. La formule de Thomson nous donne l'amplitude diffusée au point  $P$  d'un flux de rayons X suivant la formule suivante :

$$E_P = r_e \frac{\cos(\Phi)}{d_{OP}} E_0$$

Avec  $r_e$  rayon de l'électron,  $d_{OP}$  la distance entre le point de diffraction O et le point d'observation P et  $\Phi$  l'angle entre la polarisation de l'onde et la direction d'observation de l'onde diffractée. Cette formule s'applique au cas d'une polarisation particulière. Dans le cas d'un flux incidents sans polarisation, nous avons alors, suivant les composantes y et z de la polarisation :

$$\begin{aligned} \langle E_y^2 \rangle &= \langle E_z^2 \rangle = \frac{E_0^2}{2} = \frac{I_0}{2} \\ E_{Py} &= \frac{r_e}{d_{OP}} E_y \sin\left(\frac{\pi}{2} - 2\theta\right) = \frac{r_e}{d_{OP}} E_y \cos(2\theta) \\ E_{Pz} &= \frac{r_e}{d_{OP}} E_z \sin\left(\frac{\pi}{2}\right) = \frac{r_e}{d_{OP}} E_y \quad \text{car nous avons situé la} \\ &\quad \text{diffraction dans le plan xOy} \end{aligned}$$

Soit :

$$\begin{aligned} \langle E_{Py}^2 \rangle &= \frac{r_e^2}{d_{OP}^2} \cos^2(2\theta) \frac{I_0}{2} \\ \langle E_z^2 \rangle &= \frac{r_e^2}{d_{OP}^2} \frac{I_0}{2} \end{aligned}$$

Ce qui nous donne pour intensité totale en P :

$$I_P = \langle E_{Py}^2 \rangle + \langle E_z^2 \rangle = \frac{r_e^2}{d_{OP}^2} \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2} I_0$$

Nous avons donc une diffusion élastique des rayons dans l'espace avec une intensité qui décroît avec l'angle de diffraction, et sans rapport direct à la nature des matériaux ou leur organisation. C'est parce que les figures de diffraction des rayons en SAXS et autres techniques est le fruit d'interférences entre les rayonnements diffractés.

## 2) Diffraction des rayons X

Les images de diffraction des rayons X sont le résultat d'interférences constructives locales entre intensités diffractées. Lorsqu'un échantillon est soumis à un flux de rayons X, les atomes et leurs électrons susceptibles de résulter en de la diffraction sont nombreux, mais diffusent tous de la même manière vue précédemment, avec une absence marquée de direction particulière signature pour chaque élément. En revanche, dans un matériau organisé, des interdistances répétées entre éléments vont se dégager. L'exemple le plus marquant est celui de la structure cristalline, qui présente une répétition des distances entre éléments dans trois dimensions. Déterminer cette organisation et composition est la base même de la cristallographie.

Afin que des interférences constructives apparaissent, il est nécessaire que la différence de chemin optique parcouru par deux rayonnements diffractés différents soit égale à un multiple de la longueur d'onde  $\lambda$  de l'onde électromagnétique. La formule qui lie l'angle de diffraction à une interférence constructive est appelée relation ou loi de Bragg. Sur la figure suivante, on peut

facilement déterminer que la différence de chemin optique parcourue par deux ondes diffractées par deux éléments distants de  $d_{100}$  est égale à  $BC+CD$ .

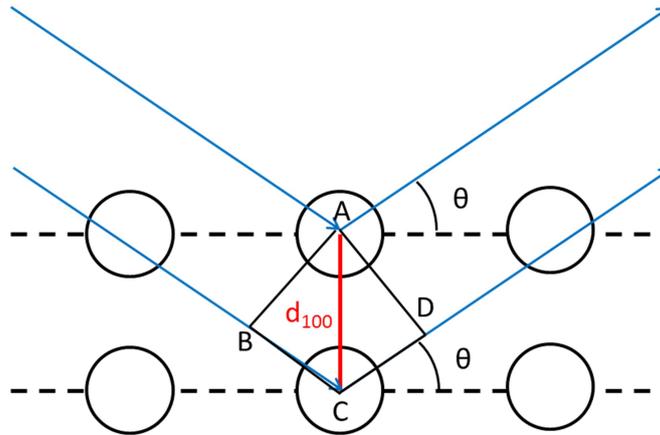


Figure 5.: Schéma du fonctionnement de la loi de Bragg

Alors une simple relation de trigonométrie nous permet de déterminer cette distance comme :

$$BC + CD = 2d_{100}\sin\theta$$

Or nous avons établi plus tôt qu'une interférence constructive dépend du fait que la différence entre chemins optiques soit un multiple de la longueur d'onde du rayonnement diffracté, soit la relation de Bragg :

$$2d \sin \theta = p\lambda \text{ où } p \text{ est un entier quelconque.}$$

Cela nous donne donc un angle spécifique pour chaque distance entre éléments, suivant les multiples directions, perceptibles pourvu que lesdites distances se répètent. De la même manière, tant qu'un type d'éléments se répète dans une direction avec une distance  $d$ , une certaine forme de répétition apparaît pour les multiples de  $d$ , ce qui peut faire apparaître des figures d'interférence constructive secondaire, tertiaire, etc.

A noter que les figures résultantes de diffraction des rayons X dépendent de l'angle  $\theta$ , qui peut être déterminé à partir de la position par rapport au flux incident non diffracté sur le détecteur et la distance entre détecteur et échantillon. Il est alors possible de déduire les valeurs observables de  $d$  en inversant la relation de Bragg :

$$d = \frac{p\lambda}{2 \sin \theta}$$

Ce qui nous donne une observation au niveau du détecteur de la distance entre figure diffractée et flux incident inversement proportionnelle à l'interdistance entre éléments organisés au sein du matériau. D'où les différentes techniques d'observation de la diffraction des rayons X en fonction des angles étudiés, plus l'angle étant grand, plus les structures résolues étant petites. Le tout évidemment, proportionnellement à la longueur d'onde utilisée. L'intensité mesurée de ces figures de diffraction est également proportionnelle à la quantité d'électrons disponibles pour une diffraction, et donc un résultat de la densité électronique de l'échantillon et aussi simplement de la quantité de matière exposée au flux incident.

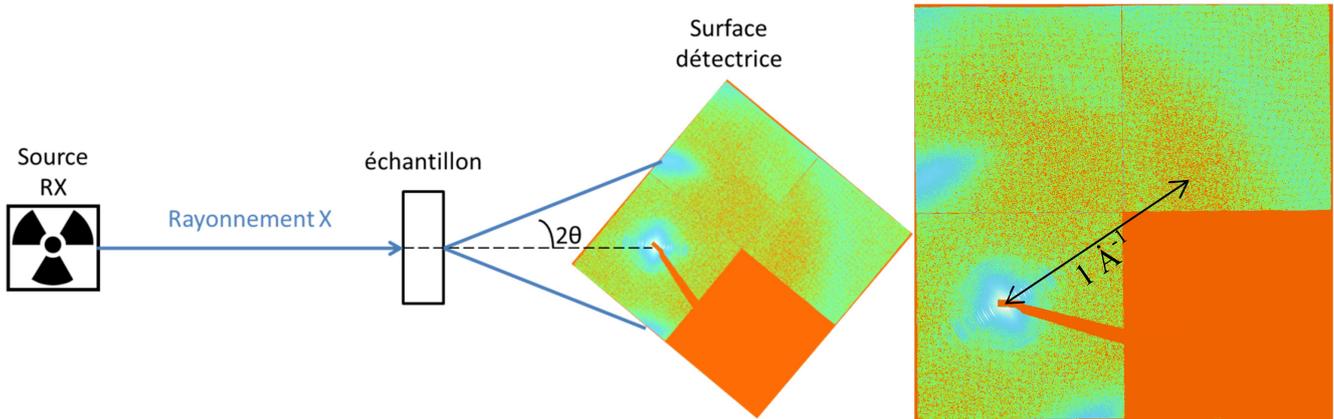


Figure 6.: En haut, schéma d'un montage SAXS.  
En bas, image détecteur en logarithme d'intensité de SAXS sur un échantillon de tendon de souris.

La figure d'interférence apparaît suivant un angle  $2\theta$  spécifique qui dépend de la distance  $d$  entre éléments, mais dépend également de l'orientation de la structure en question. Dans le cas d'un monocristal, si l'on considère une seule interdistances, celle-ci s'exprimera selon une figure de diffraction composée de deux tâches ponctuelles, situées de manière symétrique par rapport au flux incident. La direction selon laquelle ces deux tâches apparaissent nous indique l'orientation dans laquelle l'interdistances correspondante s'exprime. Si le matériau considéré possède un ordre positionnel fort mais aucun ordre orientationnel, alors la figure de diffraction sur le détecteur sera un cercle. Suivant le degré d'ordre positionnel et orientationnel, les figures de diffraction peuvent être plus ou moins localisées suivant  $\theta$  et autour du flux incident. Mais cela relève plutôt de l'interprétation des figures de diffraction obtenues.

### 3) Diffusion des rayons X

Nous avons vu le cas de la diffraction de Bragg des rayons X par la matière entre plans réticulaires, toutefois, l'interaction des rayons X avec la matière passant par des collisions élastiques avec le cortège électronique de chaque atome. La figure de diffraction des rayons X par tout matériel contenant des hétérogénéités à l'échelle du nanomètre est usuellement décrite comme le produit d'un facteur de forme  $F$  avec un facteur de structure  $S$ . Ce modèle donne une intensité diffractée  $I$  de la forme :

$$I(q) = \sum_i^N \left\{ \left[ \int_a^b F(q, x) f(x) dx \right] S(q) \right\}$$

Soit la somme d'un nombre  $N$  de contributions  $i$  avec le facteur de forme  $F$  suivant une polydispersité des diffuseurs  $f$  sur l'intervalle  $[a, b]$ , et un facteur de structure  $S$ .

#### a) Facteur de forme

La valeur du facteur de forme dépend largement de la forme considérée, ainsi que de certaines de leurs propriétés, telle la capacité à partager leur espace nominatif, formes molles, ou non, formes dures. Si nous prenons le cas d'un modèle de sphères dures comme exemple, le facteur de forme est tel que :

$$F(q) = \left( 3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)$$

Où  $R$  est le rayon de la sphère. Suivant le type d'objet considéré, ce facteur de forme peut se trouver être couplé, nous l'avons évoqué, à un facteur de polydispersité pour le cas où l'ensemble des objets présentent une variation possible dans leur taille, ici la valeur de  $R$ .

## b) Facteur de structure

Le facteur de structure  $S(q)$  est représentatif de la corrélation des positions entre les atomes ou molécules, ce qui est une conséquence directe d'une forme d'interaction entre celles-ci, attraction ou répulsion. Le facteur de structure dans le calcul de l'intensité correspond à la Transformée de Fourier inverse de la fonction de Corrélation de Paire, qui représente la probabilité de trouver un second objet identique dans un espace donné. Le cas du pic de Bragg dans ce cadre correspond à un facteur de structure proche de 1, puisqu'il s'agit d'une répétition cristalline, soit périodique. La probabilité de trouver un même objet à une distance donnée est donc presque garantie.

La représentation mathématique de ce facteur dépend du modèle de l'objet diffractant, suivant ses capacités d'attraction/répulsion, sa forme, etc. Il est à considérer également que le facteur de structure est également indicatif de l'ordre à grande portée des systèmes, permettant d'évaluer le degré d'organisation des structures.

### 4) Interprétation des figures de diffraction des rayons X

Il existe deux manières de considérer les résultats obtenus en SAXS. La première est d'analyser directement l'image de diffraction, on parle alors de spectre 2D. Les distances au centre spécifiques à des tailles de structures peuvent alors être exprimées en valeurs d'angle  $2\theta$  ou en inverse de distance dans l'espace réciproque. Nous avons vu que la forme que prend la figure de diffraction, que ce soit un point, un arc de cercle ou un cercle complet est indicative du degré d'orientation de la structure diffractant et de la direction de ladite orientation.

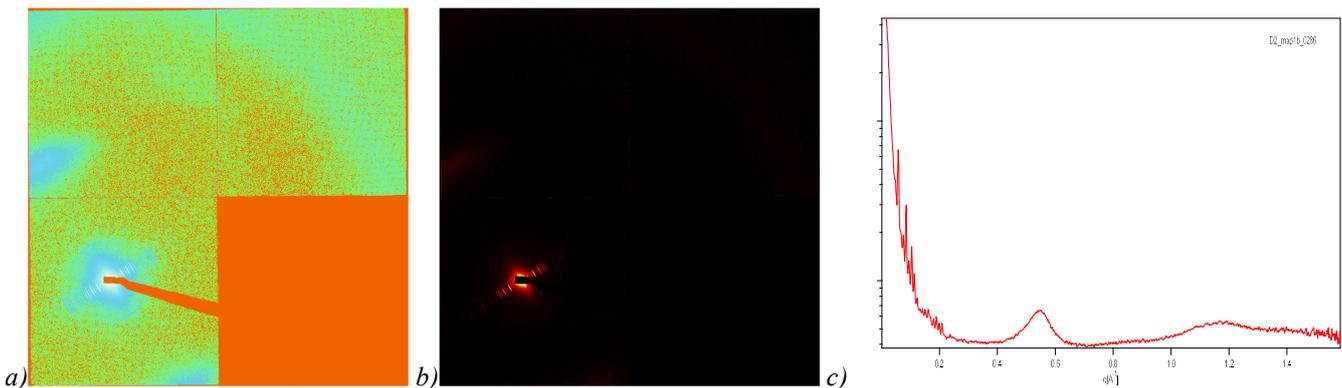


Figure 7.: a) Spectre 2D de tendon d'os de souris en échelle logarithmique d'intensité. b) Spectre 2D de tendon d'os de souris en échelle linéaire d'intensité. c) Intégration radiale en spectre 1D en échelle logarithmique du spectre 2D précédent.

Une autre manière de considérer les résultats fréquemment utilisée est le spectre 1D. Il résulte d'une intégration radiale centrée sur la position du rayonnement incident caché par le beam stop sur la figure de diffraction. Cette intégration radiale donne alors un graphe de l'intensité perçue en fonction de l'angle  $2\theta$  qui permet une analyse plus facile des pics d'intensité correspondant à des interdistances spécifiques dans la matière étudiée. Ces pics sont des signatures correspondant à différentes organisations de matériaux ou superstructures, et forment la base de l'étude cristallographique en rayons X.

Si cette manière de procéder perd l'information orientationnelle et de la qualité de l'orientation, elle offre en revanche une meilleure lisibilité de certains pics et permet un autre niveau d'analyse. Il est en effet possible de remonter à des informations de quantité d'évènements de diffraction à partir de la surface du pic, puisqu'une plus grande incidence d'évènements de diffraction correspond à une plus grande intensité diffractée. Un autre paramètre analysable est le degré d'organisation de la matière à partir de la largeur du pic. Là où une structure cristalline très bien définie aux interdistances fixes est représentée par un pic particulièrement aigu (Figure 7 c pics à  $q < 0.02 \text{\AA}^{-1}$ ), une structure moins définie correspond à un

élargissement du pic représentatif (Figure 7 c pic à  $q=0.55\text{\AA}^{-1}$ ) avec la largeur à mi-hauteur la valeur indice.

Ce sont ici les représentations en SAXS les plus fréquentes que nous allons traiter et auxquelles nous souhaitons avoir des éléments de référence issus de la littérature, bien que cette dernière se concentre fortement sur les spectres 1D.

## B. Fonctionnement de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL

La ligne SWING du synchrotron SOLEIL<sup>3</sup> est notre principale source de données SAXS. Nous l'avons employée sur la série de cinq échantillons sélectionnés indiqués plus haut, et réalisé dans ce cadre des balayages sur plusieurs millimètres suivant plusieurs milliers de clichés de SAXS par échantillon.

### 1) Synchrotron

La technologie synchrotron dans son ensemble fonctionne sur le principe d'accélération d'électrons<sup>4</sup>. Toute particule chargée subissant une accélération perd de l'énergie sous forme de rayonnement électromagnétique, aussi l'accélération d'électrons permet la génération d'une grande variété de rayonnements à hautes énergies en grande quantités sans dépendre de sources multiples. Si l'accélération est poussée jusqu'à des vitesses relativistes, les rayonnements ainsi générés sont appelés 'synchrotron' et possèdent des propriétés particulières de cohérence, de polarisation, une faible divergence et ce sur une grande plage spectrale. Ces rayonnements peuvent ensuite être discriminés afin de répondre à des besoins spécifiques d'analyse.

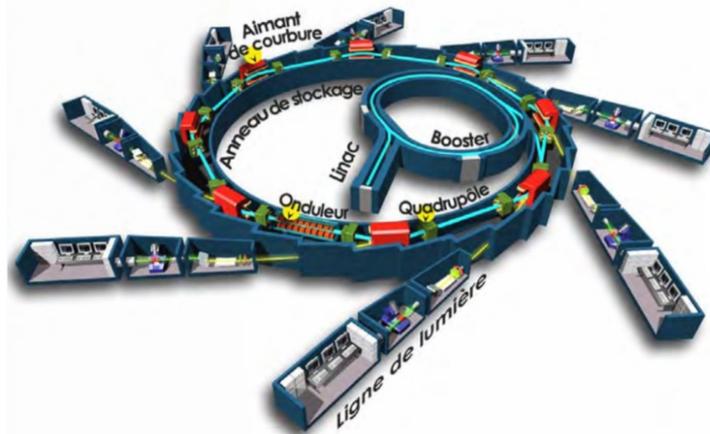


Figure 8.: Schéma de principe du synchrotron SOLEIL

Le principe même d'un synchrotron est l'accélération de particules dans un circuit circulaire. Le synchrotron SOLEIL est composé de différents éléments qui résultent sur la production de ces rayonnements nécessaires à l'analyse de la matière. Les différents composants de ce système sont dans l'ordre un accélérateur linéaire en sortie d'un canon à électrons, suivi d'un accélérateur circulaire qui possède une ouverture sur un anneau de stockage qui débouche en plusieurs points sur les différentes lignes d'analyse. Comme l'ensemble du système repose sur des flux de particules chargées à des vitesses proches de celle de la lumière et des rayonnements susceptibles d'interagir avec la matière, l'ensemble des canaux du synchrotron sont maintenus sous un vide très poussé dit 'ultravide' à  $10^{-10}$  Pa.

### a) Accélérateur linéaire

L'accélérateur linéaire est le premier élément du système, construit pour créer des faisceaux d'électrons sur 300ns trois fois par seconde. Les électrons ainsi produits ont pour objectif d'entrer l'étape suivante du synchrotron avec une énergie de l'ordre de 100MeV. Il s'agit d'un ensemble de 16 mètres de long composé d'un canon à électrons et d'un ensemble de systèmes générateurs d'ondes électromagnétiques ayant pour but d'accélérer des particules chargées jusqu'à des vitesses relativistes.

Les électrons sont générés au départ par un fil de tungstène chauffé, on parle ici de source 'thermonucléaire' d'électrons. Le chauffage du filament fournit aux électrons l'énergie nécessaire pour franchir la barrière de potentiel les maintenant dans le solide, qui sont alors accélérés par un champ électrique généré par un système de cathodes sous tension à 90kV. Les électrons en sortie du canon à électrons sont à une vitesse de  $c/2$ , soit 90keV. Ils vont passer ensuite par trois systèmes avec pour but de les accélérer plus avant.

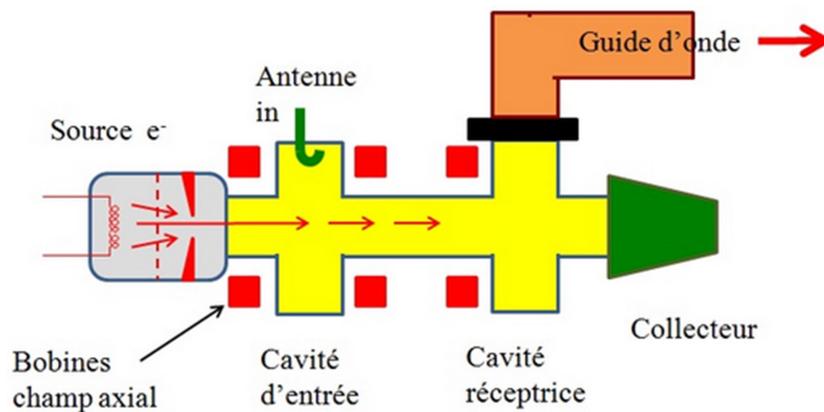


Figure 9.: Schéma de fonctionnement d'un klystron.

On parle dans leur cas de klystrons. Il s'agit de cavités résonantes disposées sur le chemin du flux d'électrons incidents, avec la première comportant une source d'onde électromagnétique émise à la fréquence de résonance. Les électrons sont alors accélérés ou décélérés suivant qu'ils passent au maximum ou au minimum de l'onde émise, ce qui a pour conséquence de former des 'paquets' plutôt qu'un flux continu. Les paquets se succèdent alors à la fréquence de résonance, et activent la seconde cavité lorsqu'ils la passent, créant une onde de même fréquence que celle d'entrée mais d'énergie supérieure. Celle-ci peut ensuite par un guide d'onde être envoyée dans une nouvelle cavité afin de répéter le processus. Les systèmes accélérateurs de l'accélérateur linéaire consistent en des séries de cavités klystron qui l'un après l'autre accélèrent les paquets d'électrons à des vitesses relativistes.

A noter que les électrons étant de même charges, les électrons des paquets ont tendance à se repousser. Aussi des systèmes de bobines sont employés afin de donner aux électrons parcourant la ligne de l'accélérateur linéaire une vitesse radiale, ce afin de donner aux particules une trajectoire en hélice autour de l'axe de propagation plutôt que de diverger dans les parois du système. Les électrons en sortie de la ligne accélératrice entrent alors dans la partie booster du synchrotron avec une énergie propre autour de 100MeV ce qui correspond déjà à une différence avec la célérité inférieure à 0,001%.

### b) Booster

La partie booster consiste en un synchrotron circulaire de 157 mètres de périmètre, dans lequel les électrons sont accélérés par champ magnétique. Le but ici est d'amener les électrons

d'une énergie de 100MeV à 2,75GeV. Les électrons sont introduits via une ligne de transfert qui discrimine les paquets d'électrons en fonction de leur énergie moyenne, afin de transmettre uniquement les paquets autour de l'énergie d'entrée indiquée plus tôt. Les autres paquets se dispersent alors dans le système, faisant tomber le rendement de l'accélérateur linéaire à environ 30%.

L'accélération des électrons est une fois de plus assurée par des cavités dans lesquelles sont émises des fréquences de résonance. L'aspect circulaire du système permet de faire passer les électrons un grand nombre de fois par les mêmes cavités afin de parvenir à l'énergie voulue. Le nombre total de circuit complet du booster pour arriver à 2,75GeV est de 300,000 fois. Cependant, le fait est que la trajectoire des électrons dans ce système doit être ajustée afin d'éviter leur dispersion dans les parois du système, la trajectoire des électrons ne pouvant ici être courbes sans contrainte extérieure.

La courbure de la trajectoire des électrons est assurée par des séries de dipôles émettant des champs magnétiques, dont la puissance est ajustée suivant la vitesse des électrons se propageant à l'intérieur du dispositif. Cette augmentation progressive du champ magnétique exercé est corrélée à l'accélération des particules à affecter. Au fur et à mesure que leur vitesse augmente, le temps passé dans une section de courbure et sous l'influence du champ magnétique diminue, et la force à exercer dans une des 32 sections pour assurer une courbure du faisceau de  $11,25^\circ$  se doit d'augmenter avec la vitesse.

L'ensemble du système à tous ses niveaux comporte aussi régulièrement des ensembles quadripôles et sextupôles. Les quadripôles ont pour objectif de focaliser le faisceau d'électrons, les charges répulsives ayant pour effet de défocaliser le faisceau au cours de la propagation. Ce montage magnétique agit comme une lentille sur le faisceau d'électrons parcourant les différents éléments de la ligne synchrotron. Les sextupôles sont des systèmes à symétrie 6 qui servent à stabiliser le faisceau mais selon des forces dans trois directions plus ajustables.

Les électrons à 2,75GeV sont ensuite introduits dans l'anneau de stockage, une section de 354m de périmètre construite dans l'optique de générer et récolter les flux de rayonnements utilisés par les différentes lignes d'analyse. L'insertion se fait ici avec un meilleur rendement de 70%.

### **c) Anneau de stockage**

L'anneau de stockage est constitué de l'ensemble des éléments magnétiques décrits plus avant, de deux cavités accélératrices pour maintenir la vitesse désirée, les rayonnements récoltés étant le fruit d'une décélération des électrons, et d'un ensemble d'appareils appelés 'onduleurs' et 'wrigglers'. Ces appareils sont eux-mêmes constitués d'éléments magnétiques. A noter que le changement de direction imposé par les systèmes de dipôles crée déjà des rayonnements, puisque cela correspond à une accélération dans la nouvelle direction et une décélération suivant la précédente.

Le wriggler et l'onduleur fonctionnent tous les deux suivant le même principe, l'application de champs magnétiques alternatifs sur le faisceau d'électrons afin créer des changements d'accélération. La différence fondamentale entre les deux systèmes tiens essentiellement à la différence dans leur longueur d'onde d'oscillation du champ magnétique alternatif. Le synchrotron Soleil possède des onduleurs/wrigglers avec des longueurs d'ondes au moins comprises entre 20 et 256mm.

L'objectif des deux systèmes est en revanche très différent. Le wriggler modifie le rayonnement vers de plus courtes longueurs d'ondes, mais produit au passage une plus grande brillance (intensité de photons par angle, surface, unité de longueur d'onde et de temps) suivant

un spectre continu, que l'émission résultant de l'action d'un dipôle de courbure. L'onduleur pour sa part produit un spectre à des brillances très différentes suivant la longueur d'onde, résultant sur un spectre de raies à une brillance plus importante. Les différents rayonnements sont ensuite envoyés dans les différentes lignes synchrotron où ils seront discriminés suivant les usages.

## 2) Ligne SWING

Les mesures ont été réalisées sur la ligne SWING du synchrotron Soleil en configuration SAXS. Cette ligne sert essentiellement à déterminer la structure de matériaux au niveau nanométrique à micrométrique, via des techniques de SAXS et WAXS.

### a) **Traitement du rayonnement incident**

La ligne SWING est comme toutes les lignes du synchrotron Soleil, découpée en trois salles. Une cabine optique, où la sélection et préparation du rayonnement s'effectue, la cabine d'expérience, où l'interaction rayonnement-matière s'effectue et ses effets sont détectés, et une station de travail où une grande partie des opérations sont contrôlées à distance.

Le rayonnement incident est sélectionné grâce à un onduleur U20 sous vide dont l'entrefer entre les rangées d'aimants détermine la longueur d'onde sélectionnée. Le montage de la ligne SWING permet l'usage de rayons X d'énergies entre 5 et 16 keV monochromés avec un système Sil1 à double cristaux.

Le flux résultant de l'ensemble du montage optique est de  $10^{13}$  photon/s. La configuration que nous avons employée au cours de cette série d'analyses utilise une énergie de 12 keV suivant une configuration Microfocus qui permet une surface de rayon incident de  $17 \times 17 \mu\text{m}$ . La technologie Microfocus est assez récente et permet de faire de la microscopie avec les techniques de SAXS, une avancée dans la méthode qui offre de nouveaux domaines d'étude des microstructures par SAXS. Le faisceau incident est ensuite envoyé sur l'échantillon positionné sur un passeur motorisé TX4/TZ4 à  $1 \mu\text{m}$  de précision en  $x$  et en  $y$ .

### b) **Système de mesure**

Une fois le rayonnement ayant traversé l'échantillon d'étude, celui-ci traverse tunnel de détection de 2 m de diamètre sur 7 m de longueur à un vide primaire de  $10^{-7}$  bar. Le flux incident est interrompu en configuration Microfocus par un beam stop de  $6 \times 3 \text{ mm}$  diode Si (Hamamatsu).

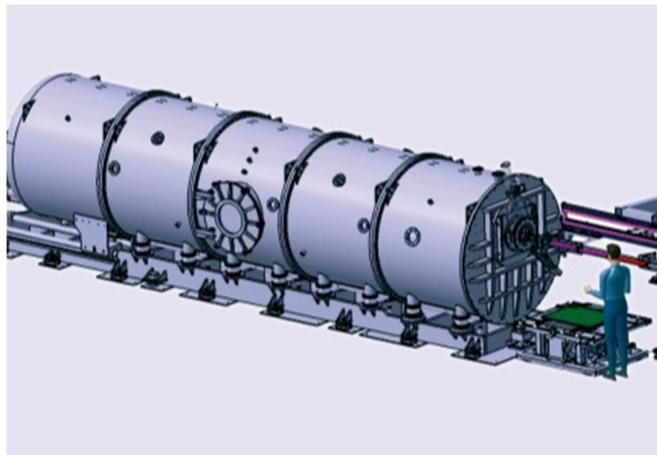


Figure 10.: Tunnel de détection sous vide de la ligne SWING du synchrotron SOLEIL.

Le rayonnement diffracté est ensuite collecté par un détecteur PCCD170 d'AVIEX de  $170 \times 170 \text{ mm}$  avec des pixels de  $43 \mu\text{m}$ , pour 15 Mpixels. Celui-ci est positionné de manière excentrée pour offrir une gamme d'analyse de structures de  $4 \text{ \AA}$  à  $100 \mu\text{m}$  dans notre cas.

### C. Signal du collagène de tendon

L'exemple de figures de diffraction sous formes de spectres 2D et 1D de la Fig. 7 est celui d'un morceau de tendon. Il s'agit d'une structure biologique presque exclusivement composée de collagène, et nous permet donc d'établir un certain nombre d'éléments relatifs à cette molécule et son signal par SAXS.

#### 1) Pics à 67nm du collagène

Les fibres de collagène sont le résultat d'un assemblage de triples hélices de tropocollagène suivant un modèle de décalage par paquet de cinq, créant un espace libre entre collagènes consécutifs suivant la direction longitudinale de la fibre. Cet espace libre résulte sur une structure en bandes parfaitement répétées de 67nm de longueur, ce qui donne par diffraction des rayons X des pics de Bragg correspondant.

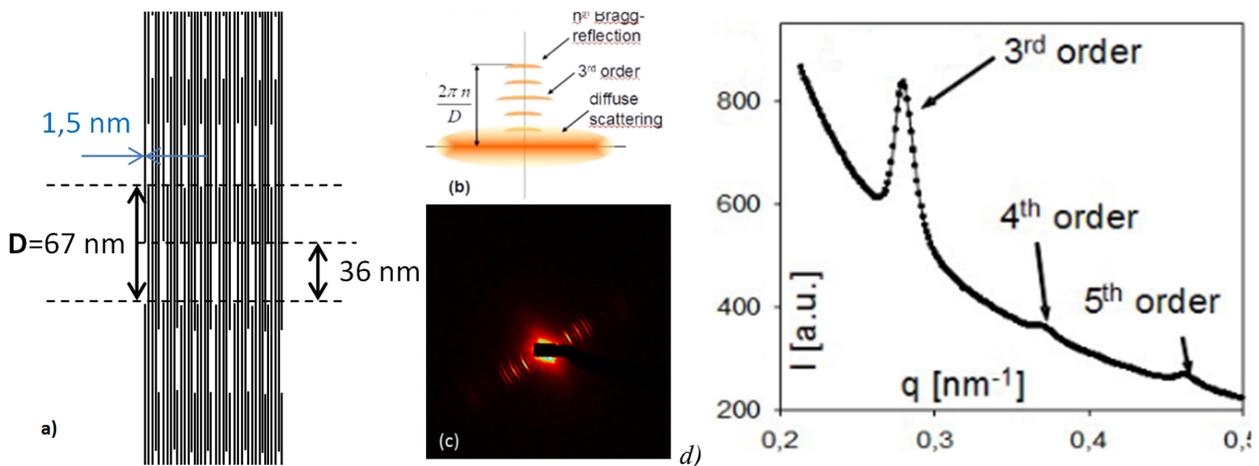


Figure 11.: a) Rappel de la structure de la fibre de collagène et de l'origine de l'interdistance  $D$  à 67nm. b) Image tirée de Wagermaier et al<sup>5</sup> : Schéma de la figure 2D de SAXS du collagène avec des arcs de cercles correspondant aux différents ordres des figures de diffraction. c) Image 2D de diffraction SAXS de  $D$  dans le tendon. d) Spectre 1D de la diffraction du collagène avec le premier pic celui du 3° ordre, les 1° et 2° ordres relevant de l'USAXS.

Si nous avons un signal clair de l'organisation longitudinale des tropocollagènes en fibre de collagène, l'organisation latérale de ceux-ci présente également son propre signal.

#### 2) Pic d'organisation latérale du collagène

Les tropocollagènes dans le tendon sont organisés latéralement selon une structure quasi-hexagonale<sup>6</sup>, ce qui est aisément déduit de la connaissance du diamètre à 1,5 nm des tropocollagènes comparé à la valeur proche de 1,3 nm correspondant à la bosse. Cela en effet correspond interdistance de  $d \cdot \sin \frac{\pi}{3}$ .

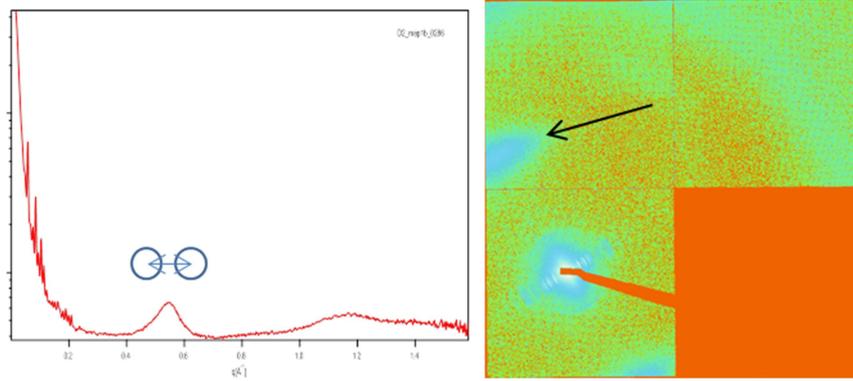


Figure 12.: Bosse d'organisation latérale du tropocollagène, représentatif des interdistances entre molécules, ici à  $\sim 1,3$ nm, proche du réseau hexagonal, et position correspondante sur le spectre 2D en échelle logarithmique.

La position du signal de cette bosse du packing latéral du tropocollagène dans le tendon est à  $90^\circ$  de celle des pics de Bragg de la largeur de bande  $D$ , ce qui correspond au caractère perpendiculaire des deux directions d'organisation ici considérées. A noter qu'il s'agit ici bien d'une bosse et non d'un pic, et que l'ordre à longue portée est ici inférieur à celui d'une structure cristalline.

Le tendon est un exemple intéressant en ce qu'il nous procure des spectres 2D et 1D d'une grande clarté, tout en nous renseignant sur l'organisation latérale d'une structure composée quasi-exclusivement de collagène. Cela offre un point de comparaison intéressant avec la structure observable de la phase du collagène de l'os.

#### D. Signaux de l'os

Contrairement au tendon, l'os est composé de deux phases, une phase organique composée des fibrilles de collagène d'une part, et une phase minérale composée de cristaux d'hydroxyapatite d'autre part. Chacune de ces deux structures, bien que cohabitant dans un même espace général, va présenter son propre signal SAXS.

##### 1) Phase organique de la matrice osseuse : le collagène

La structure du collagène dans l'os est également faite de tropocollagènes organisés en fibrilles, mais la présence de cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice de la phase organique entraîne certaines différences dans la figure de diffraction des rayons X.

##### a) Pic à 67 nm du collagène

La figure de diffraction relative à l'interdistance  $D = 67$  nm reste toujours présente dans le signal SAXS de l'os, mais l'apparence de celui-ci est plus difficile à résoudre en raison du fort signal de diffusion par l'apatite en proximité.

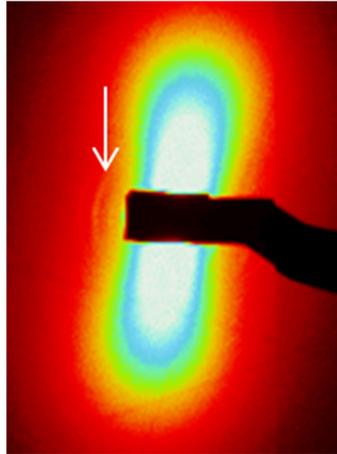


Figure 13.: Figure de diffraction en échelle linéaire de l'os Tache centrale de diffusion signal de l'apatite, 3° pic de Bragg de D indiqué par la flèche.

Nous pouvons voir sur le spectre 2D dans des cas bien résolus le 3° pic de Bragg de D, et deviner les suivants, mais ceux-ci sont complètement perdus dans le signal de l'apatite sur les spectres 1D.

### b) Pics d'organisation latérale du collagène

L'organisation latérale des fibrilles de collagène dans l'os existe dans la littérature (Images ci-après<sup>7,8</sup>) mais est assez rare pour des raisons de limitations des systèmes de SAXS et de WAXS. En effet, la plupart des analyses en SAXS de l'os s'arrêtent à  $0,5 \text{ \AA}^{-1}$  (soit  $5 \text{ nm}^{-1}$ ) au plus, tandis que les spectres 1D en WAXS tendent à commencer à  $1 \text{ \AA}^{-1}$  (soit  $10 \text{ nm}^{-1}$ )<sup>9,10</sup>, ce qui laisse un vide régulier dans l'étude pour les structures comprises entre 13 et  $6,5 \text{ \AA}$ .

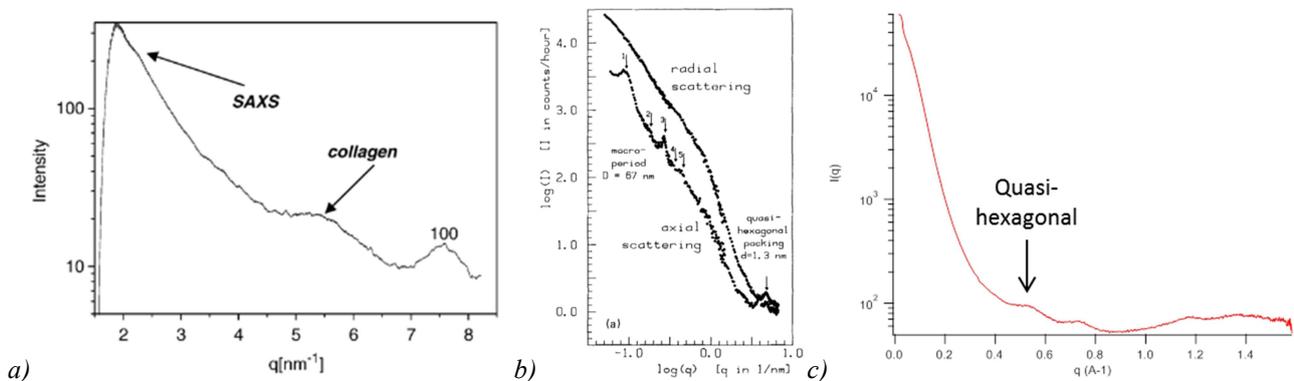


Figure 14.: a) Spectre 1D de SAXS d'os minéralisé issu de Cedola et al. 2007<sup>7</sup>. b) Spectre 1D en échelle double logarithme de SAXS d'os long de souris issu de Fratzl et al. 1991<sup>8</sup>. c) Résultat expérimental avec deux bosses que nous avons associé à l'organisation latérale du collagène.

Tout arrangement de structure de collagène est susceptible de correspondre à une interdistance entre plans réticulaires de tropocollagènes inférieure au diamètre propre de ce dernier. A noter qu'une interdistance de  $15 \text{ \AA}$  (organisation carrée) correspondrait à  $0,42 \text{ \AA}^{-1}$ . Il est possible de retrouver également cette bosse de l'organisation du collagène dans l'étude du tendon<sup>6</sup>, mais généralement pour des valeurs inférieures à  $0,5 \text{ \AA}^{-1}$  en raison d'une organisation plus lâche des tropocollagène, généralement liée au degré d'hydratation.

A noter que nous nous trouvons dans la position de ne pas utiliser l'interprétation de Cedola et al. vis-à-vis de la bosse qui a été noté 100 dans la figure 14 a). Bien que sa position corresponde à peu près à celle de l'orientation 100 de l'apatite cristalline à  $7,7 \text{ nm}^{-1}$ , la trop grande largeur du pic pour une structure cristalline ainsi que nos propres observations de variations de la position de ce pic en corrélation à celui associé au collagène nous poussent à

interpréter celui-ci comme lié à une autre organisation du collagène. La littérature correspondant aux figures de diffraction de l'apatite est discutée ci-après.

## 2) Phase minérale de la matrice osseuse : l'apatite

La structure de l'apatite osseuse doit répondre à deux questions. Quels sont les plans cristallins de celle-ci, si apatite cristalline il y a ? Et quelle forme ces cristaux d'apatites prennent-ils ? Comme nous avons vu plus tôt, le pic de Bragg correspondant au plan réticulaire 100 de l'apatite se trouve en  $7,7\text{nm}^{-1}$ . Aussi, tous les autres pics de Bragg doivent correspondre à des distances entre plans inférieures à celle du 100, soit un angle de diffraction plus élevé, et en tant que tels, fermement du domaine des WAXS. Les SAXS répondra donc aux questions de formes et d'organisation des cristaux d'apatites.

### a) **Ordre orientationnel des cristaux observé par SAXS**

Tout d'abord, la figure de SAXS du spectre 2D de l'os minéralisé présente systématiquement une figure centrale de forte intensité (Figures ci-dessous) correspondant à une interaction avec l'apatite. Le caractère d'orientation de cette figure est directement lié à l'orientation du grand axe des cristaux<sup>11,12</sup>, et la qualité d'orientation, correspondant au caractère plus ou moins oblong de la figure de diffraction, peut correspondre soit à l'avancement de la minéralisation locale de l'os<sup>13</sup>, soit à une question d'orientation de la mesure par rapport à la structure osseuse, la figure étant ronde pour de la SAXS appliquée longitudinalement à l'orientation de la matrice de collagène.

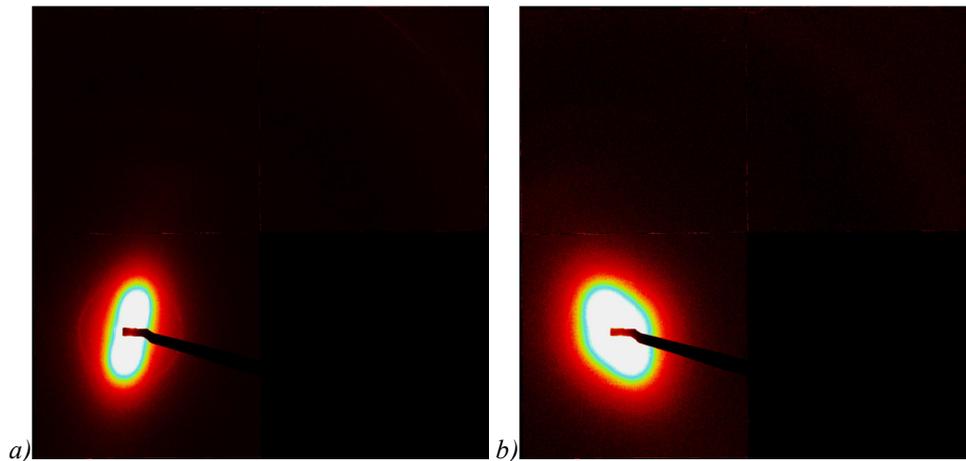


Figure 15.: a et b) Figures de SAXS synchrotron de la zone trabéculaire de l'échantillon D5 infecté à J+7.

Les études précédentes en SAXS supportent l'idée d'une orientation commune des fibres de collagène et de l'axe long des cristaux d'apatite<sup>8</sup>, et en tant que tel une mesure d'orientation et d'anisotropie des cristaux d'apatite peut être appliquée à l'ensemble de la structure osseuse locale, avec bien évidemment un effet de moyennage dû à l'épaisseur et la surface exposée au rayonnement X incident, qui peut résulter sur des figures un peu mixtes comme celle de l'image 15 b).

### b) **Forme et structure des cristaux observés par SAXS**

Il convient, avant de continuer sur l'usage que nous pouvons faire des données en spectres 1D obtenus par intégration radiale des figures de diffraction SAXS, d'émettre une certaine réserve. En effet, par le biais de l'intégration radiale, nous ne pouvons plus distinguer les spectres de structures alignées et orientées des résultats que donnerait une poudre. Nous faisons cependant ici l'hypothèse que les résultats restent cohérents quelle que soit la figure d'orientation 2D, que ce soit sur les valeurs des exposants des lois d'intensité du signal ou bien sur la position de rupture entre les comportements de ladite intensité. Cette hypothèse est du reste, nous le verrons grâce

aux résultats, supportée par la continuité des valeurs obtenues sur ces paramètres. Aussi, il est nécessaire de garder à l'esprit que nous sommes ici cependant limités à une analyse qualitative des différences de valeurs plutôt que capables sans réserve d'entrer dans des considérations quantitatives.

Malgré cela, le spectre 1D de ces figures de diffraction permet également d'apprendre de nombreuses choses sur la forme et taille des cristaux d'apatite osseuse. Ces éléments peuvent être déterminés en utilisant les lois de Guinier-Porod<sup>14-16</sup>, qui permettent de déterminer en fonction de la pente du spectre 1D en échelle logarithmique différents éléments de la structure général des cristallites, de la forme général au degré de rugosité de l'interface minérale/biologique. La forme et rugosité d'interface des cristallites est directement lié à la pente de la courbe en échelle logarithmique sur des domaines spécifiques de  $q$ .

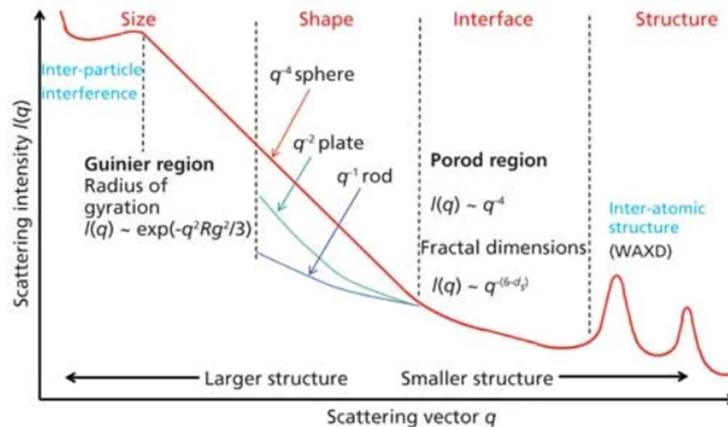


Figure 16.: Schéma du spectre 1D d'un système de particules avec les différentes zones et leur signification, issu de Spectroscopy Online, par N. Sanjeeva<sup>17</sup>.

La loi de Porod est une formule liant l'intensité  $I$  mesurée en fonction de  $q$  suivant une loi de puissance  $I \sim q^{-\alpha}$ . Dans ce cas de figure,  $\alpha$  est la pente en échelle log/log et va nous donner la rugosité de surface, avec  $\alpha = -4$  pour une interface lisse,  $\alpha = -3$  pour une interface rugueuse, et les pentes comprises entre  $-1 < \alpha < -3$  correspondant à des structures fractales<sup>16</sup>.

De la même manière, la forme des particules est liée à l'intensité par une loi en puissance qui apparait comme une pente négative en échelle log/log. Cette pente se trouve dans une zone à plus petit que la zone de Porod, mais plus grand que la zone effective pour la loi de Guinier. La zone en question a été trouvée en une occasion<sup>18</sup> comme la zone de Fourier. Dans cette zone, une pente en  $-4$  correspond à des particules sphériques, en  $-2$  à des plaquettes, et en  $-1$  à des bâtonnets. Evidemment il est possible d'avoir des valeurs de pentes intermédiaires, qui correspondent à des formes intermédiaires telles que des sphères aplaties, ou des plaquettes plus ou moins allongées.

Nous ne considérons pas à l'avenir les possibilités de la loi de Guinier pour deux raisons. La première est d'ordre théorique, la loi de Guinier sert essentiellement à déterminer le rayon de rotation des particules en solution, ce qui ne s'applique pas vraiment ici dans le cadre d'une matrice solide de collagène. La deuxième considération est d'ordre pratique. Comme nous pouvons le voir sur le graphe ci-dessus, la première pente disponible est celle identifiée comme celle du facteur de forme, la région de Guinier étant aux plus petits angles et nous étant ici inaccessible.

La valeur de  $q$  à laquelle il est possible de considérer que l'on passe de la zone de Fourier à la zone de Porod semble correspondre au rayon de gyration<sup>16</sup>, une valeur qui peut notamment être obtenue grâce à la « Pair-distance distribution function » (PDDF), et qui suivant la forme de la

particule permet de trouver l'épaisseur de celle-ci<sup>18</sup>. Une approximation de cette valeur limite de  $q$  peut-être facilement effectuée en observant la coordonnée d'intersection des fits linéaires du logarithme de l'intensité en fonction du logarithme de  $q$  sur les zones de Fourier et Porod.

Ces éléments ont servi à déterminer la forme et taille des cristaux d'apatite lors d'un certain nombre d'études<sup>19</sup>, mais semblent s'être plus concentrées sur la valeur d'épaisseur des cristaux. Fratzl et al 1991<sup>8</sup> offre des données sur la pente dans la région de Porod, avec une pente généralement à -4 indicatrice d'une interface lisse tout au long de la vie de l'os crânien de la souris. La forme de l'apatite varie au cours du vieillissement, avec des modèles d'évolution de la plaquette vers l'aiguille<sup>20,21</sup>. Pour ce qui est des dimensions du cristal individuel quel que soit la forme, nous partons sur des généralités de l'ordre de 15 par 30 nm<sup>22</sup>. La majorité des études s'est portée sur l'épaisseur des cristaux, et donne des résultats d'une grande constance en dépit de la variété des espèces, dont la souris, fermement autour de 3 à 4 nm<sup>12</sup>.

### c) Structure cristalline observée par WAXS

La structure interne des cristaux d'apatite relève quasi-exclusivement du domaine des WAXS, tel que nous l'avons vu plutôt, avec le pic de Bragg correspondant à un plan  $hkl$  de 100 à  $7,7\text{nm}^{-1}$ . Les pics de Bragg de l'hydroxyapatite sont parfaitement connus et la liste des plans de réflexions tout à fait disponible<sup>23</sup>. Nous avons dans le tableau suivant la liste des plans  $hkl$  de l'hydroxyapatite, avec leurs angles de diffractions et interdistances correspondantes. Il est important de considérer la colonne des Intensités relatives  $I_{rel}$  pour savoir à quelles observations s'attendre.

$2\theta(^{\circ})$	$d_{2\theta}(\text{nm})$	$d_{\text{calc}}(\text{nm})$	$I_{rel}$	$hkl$
10.85	0.815	0.816	8	100
16.87	0.525	0.526	3	101
18.84	0.471	0.471	2	110
21.75	0.408	0.408	6	200
22.84	0.389	0.389	6	111
25.35	0.351	0.351	2	201
25.86	0.344	0.344	36	002
28.11	0.317	0.317	8	102
28.92	0.308	0.308	16	210
31.77	0.281	0.281	100	211
32.18	0.278	0.278	47	112
32.90	0.272	0.272	65	300
34.04	0.263	0.263	22	202
35.44	0.253	0.253	5	301
39.18	0.2297	0.2297	6	212
39.793*	0.2263	0.2263	22	310
40.43	0.2229	0.2229	1	221

Figure 17.: Tableau des données des pics de Bragg de l'hydroxyapatite, l'angle de diffraction, l'interdistance observée, l'interdistance calculée, l'intensité relative au pic maximum (211 à intensité maximale) et le plan  $hkl$  correspondant, issu de Markovic et al 2004<sup>23</sup>

Comme nous pouvons le voir ici, l'intensité relative de la réflexion à 100 est très faible, ce qui nous permet d'appuyer nos dissensions avec la Figure 14 a). Le premier pic que nous sommes en droit d'identifier de manière efficace dans la diffraction opérée sur du matériel osseux serait celui de la configuration en 002. De plus, en raison du bruit et autres signaux issus d'un matériau aussi complexe que l'os, l'observation des pics de Bragg est largement perturbée<sup>24</sup>. Les pics les plus notables restent ceux dont l'intensité est la plus forte, soit 002, le triplet 211, 112 et 300 et le pic à 310, soit des figures de diffraction à  $1,83$ ,  $2,26$  et  $2,78 \text{ \AA}^{-1}$ . La prédominance de ces pics correspond à une structure de cristal hexagonal<sup>25</sup>, avec les pics à 002 et 310 liés. Il se trouve du reste que l'hydroxyapatite cristallise de préférence suivant une structure hexagonale

avec pour paramètres de maille  $a(=b)$  et  $c$  de valeurs de l'ordre de 9,4 et 6,8 Å<sup>26,27</sup> et un angle  $\beta$  de 120°

A partir de ces éléments, nous avons pu analyser en détail les résultats obtenus au sur le montage au laboratoire IPR et cherché à déterminer les différences entre échantillons sains et sarcomateux.

## V. Analyse conventionnelle des spectres SAXS

La première étape de l'analyse de nos données a porté sur la comparaison des résultats en fonction du type d'os observé. Nous avons séparé l'os en différentes zones, épiphyse, diaphyse et métaphyse, et deux types, trabéculaire et cortical. L'objectif était de déterminer les différences évidentes au SAXS entre ces différentes fonctionnalités osseuses et offrir ainsi des éléments sur lesquels se reposer dans notre recherche d'éléments spécifiques à l'ostéosarcome.

Nous avons séparés nos observations en deux catégories, l'observation de spectres choisis de l'échantillon D5 (J7S), l'échantillon de contrôle D1 (J13C) ne présentant pas de quantités estimées suffisantes des différents types d'os pour permettre une analyse correcte, et l'analyse par Sasfit, qui offre des mesures détaillées.

### A. Introduction

Nous avons présenté en IV.A.3) la forme que prennent les données obtenues en diffraction des rayons X en synchrotron. Ces résultats sont obtenus à partir d'un microfaisceau à 15µm, avec chaque cliché acquis avec une interdistance minimale entre chaque de 15 µm également, mais pouvant aller jusqu'à 30µm. Les distances supérieures à 15 µm ont été mises en œuvre pour des raisons de limitations de temps afin de pouvoir couvrir l'ensemble des échantillons. Chaque acquisition fut effectuée sur une durée de 500ms, avec un temps de déplacement entre chaque point de 250ms.

Nous avons employé plusieurs méthodes d'analyse des données, obtenues à SOLEIL sur la ligne SWING avec l'aide inestimable de Thomas BIZIEN. Nous avons deux types généraux d'approche, la première consiste à analyser individuellement chaque spectre, notamment à l'aide du programme Sasfit pour faire correspondre une courbe calculée à la courbe expérimentale. L'autre approche a consisté à mettre au point une série de programmes LabVIEW afin d'automatiser la mesure pour généraliser l'étude à l'ensemble des 20 000 points que comporte chaque cliché en moyenne.

Les analyses se sont portées sur deux formes différentes de données, d'une part les clichés Soleil des spectres 2D SAXS, et d'autre part les spectres 1D issus de l'intégration radiale de ces premiers. Chaque forme offre différentes opportunités d'analyse à travers différentes méthodes.

### B. Analyse des spectres de diffusion 2D

Si la plupart de l'analyse s'effectue sur le spectre 1D issu de l'intégration radiale des spectres de diffraction SAXS, une quantité non-négligeable d'information peut être extraite depuis les spectres 2D.

#### 1) Localisation des données employées

La comparaison qualitative entre les différents spectres, relatif au type d'os observé, s'est effectué sur l'échantillon D5 (J7S), soit un échantillon infecté pour les raisons présentées plus tôt.

L'espoir était de pouvoir dégager déjà à ce niveau des tendances qui permettrait de qualifier la nature de l'os dès le spectre de diffraction en 2D. Puisque le procédé d'observation n'est pas ici automatique, il a été nécessaire d'effectuer des choix quant aux spectres qui allaient être étudiés de cette manière. La décision fut prise de sélectionner des lignes entières d'acquisitions par SAXS afin d'avoir à disposition des spectres représentatifs des mécanismes de transition entre les différents types d'os.

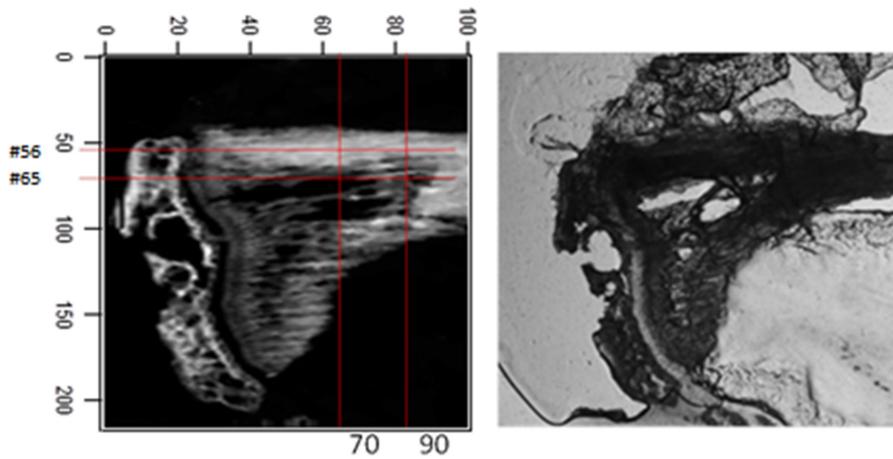


Figure 18.: Positions des lignes sélectionnées pour la comparaison des spectres issus de l'échantillon D5.

Après observation, nous avons sélectionné parmi les données issues de l'échantillon D5 J7S quelques lignes sur lesquelles nous considérons avoir une certaine diversité dans les spectres observés. La ligne horizontale #56 se situe essentiellement dans l'os cortical, ce qui peut permettre une observation pour ce type d'os de l'effet du vieillissement, ou un impact de l'ostéosarcome dont les cellules ont été déposées plus loin sur la diaphyse (à droite). La ligne #65 quant à elle se situe essentiellement dans du matériel trabéculaire de la cavité médullaire, et ce sur la plus grande longueur disponible, ce qui offre les mêmes opportunités que celles indiquées pour l'os cortical. Cependant, les résultats en fin de ligne dans la diaphyse sont à nuancer par le fait que la densité observée de matériel suggère de l'os cortical.

Les lignes verticales offrent pour leur part le même élément de comparaison entre deux suites d'éléments à des vieillissements similaires pour le cortical, mais également une vérification de la continuité dans la structure suivant une coupe transversale.

Nous ne nous intéressons à l'épiphyse uniquement dans un cadre où la structure interne très poreuse et multidirectionnelle pourrait présenter des similitudes avec la matière osseuse de l'ostéosarcome. Cette approche est motivée par l'élément de distance maximale ici au point de dépôt des cellules tumorales, combiné à la faible activité de fabrication et remodelage par rapport à l'os trabéculaire. Ces éléments en font un candidat improbable pour le premier indicateur d'une activité liée à l'ostéosarcome, voire toute activité sur les temps de développement ici étudiés.

Le cartilage de croissance est suivant cette logique encore plus largement ignoré, étant composé de collagène en phase vitreuse désorganisée dépourvue d'apatite, ce qui résulte sur une quantité de signal obtenu par SAXS beaucoup plus faible voire inexistante. Si l'ostéosarcome génère une réaction au niveau du cartilage de croissance autre qu'une minéralisation ou une soudaine organisation du collagène.

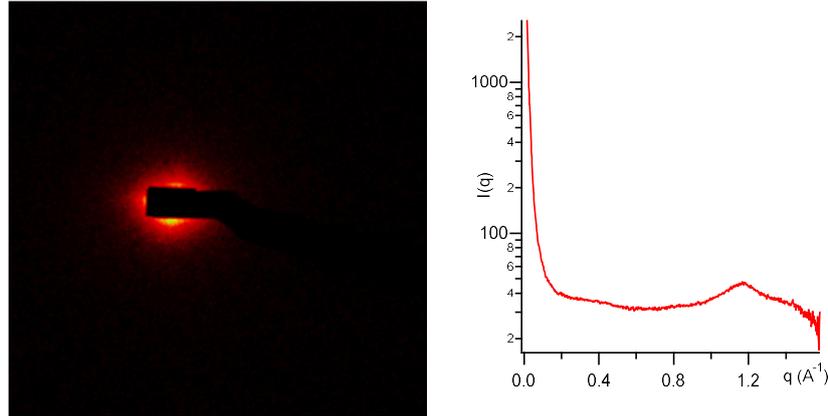


Figure 19.: Exemple de spectres 2D et 1D de cartilage de croissance.

Comme nous pouvons le voir ci-dessus, la quantité de signal diffracté est minimale dans le cas du cartilage de croissance, et le graphe 1D de celui-ci ne présente aucune caractéristique particulière excepté une très faible bosse du collagène à  $q=0,4\text{\AA}^{-1}$  et celle du nalophane à  $q=1,2\text{\AA}^{-1}$ . Tous les spectres du cartilage de croissance étudiés sont sur ce modèle, et s'il y a une influence de l'ostéosarcome à 7 jours sur celui-ci, la méthode SAXS ne paraît pas être la bonne méthode d'observation.

L'os cortical et trabéculaire sont les natures que nous allons le plus observer, étant les plus proches et sensibles au développement de l'ostéosarcome, spécialement dans le cadre des temps considérés. Nous commençons la présentation des résultats d'analyse sur l'épiphyse, en tant que médium le moins susceptible d'altération à ce stade, avant d'aborder la cavité médullaire et enfin l'os cortical dense.

## 2) Visualisation des spectres 2D

La première étape d'analyse se porte tout d'abord sur les clichés de diffraction des rayons X. Il est indiqué ici essentiellement les paramètres étudiables, les méthodes de calcul des valeurs précises sont détaillées plus avant par la suite, et sont issues d'un panel de compétences et de programmes déjà présents dans l'équipe. Il existe cependant certains

Un élément important de cette étape d'analyse est de produire une série de mesures auxquelles comparer les résultats obtenus par les programmes automatiques générant les cartographies, offrant une forme de validation de la justesse de mesure. Les images 2D se présentent suivant deux échelles d'intensité, linéaire et logarithmique.

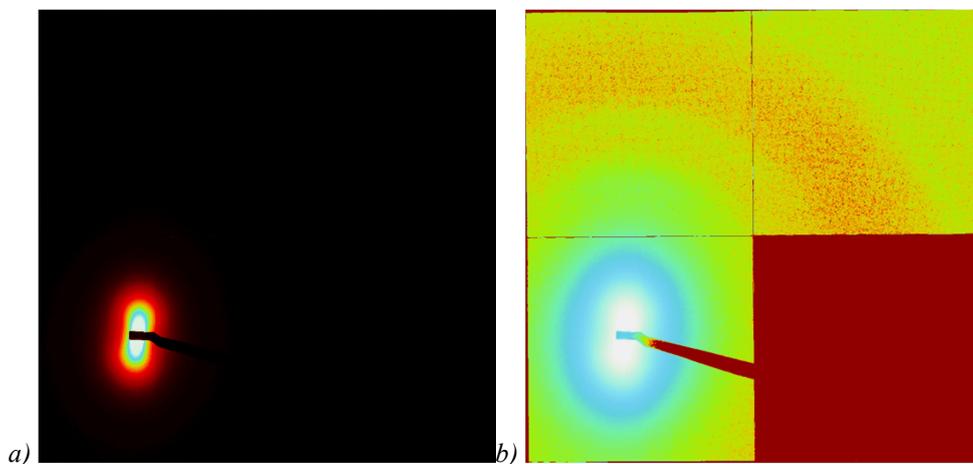


Figure 20.: a) Image SAXS en échelle linéaire d'os cortical de l'échantillon D5 (J7S). b) Image SAXS en échelle logarithmique de la précédente image.

Sur ces images, il est possible de distinguer que dans le cas présent, le signal diffracté suit une orientation préférentielle verticale, qui correspond à la perpendiculaire de l'agencement des structures. Il est donc possible à partir de ces images de déterminer l'orientation de la structure osseuse. La qualité dudit alignement en revanche est liée à la largeur de la figure en question, transcrivant l'anisotropie des éléments constitutifs, la dispersion des orientations sur la surface exposée.

Un autre élément important mesurable sur ces images est l'intensité diffusée, que l'on peut observer plus facilement sur l'image en échelle logarithmique en raison de la saturation du signal au centre. Cette intensité quant à elle correspond à la quantité de matière présente sur le chemin du faisceau incident. Cette mesure permet donc une étude comparative des quantités d'os présent dans les échantillons, et seule la zone autour du point de contact du rayon incident est vraiment nécessaire pour cette mesure, au vu sur les deux images de la différence marquée d'intensité mesurée avec le reste de la détection.

### 3) Epiphyse

L'épiphyse est la tête de l'os, un espace confiné entre cartilage articulaire et cartilage de croissance, composé en interne essentiellement d'os trabéculaire suivant un réseau complexe à même de pouvoir répondre aux contraintes pouvant provenir de nombreuses directions suivant l'activité du sujet et l'orientation de l'os dans le mouvement.

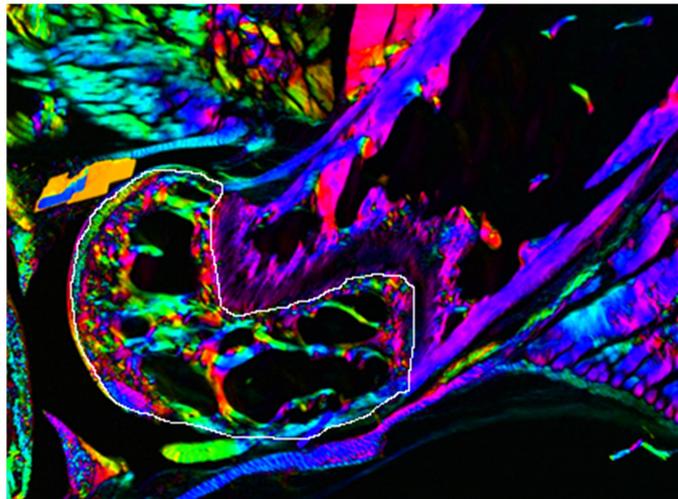


Figure 21.: Image polscope de tibia de souris, épiphyse entourée en blanc.

Si l'on se réfère à l'image polscope d'un tibia de souris, nous pouvons constater à nouveau l'aspect de l'os trabéculaire épiphysal. D'une part sa structure très compacte en contact avec les cartilages limitrophes, et d'autre part la structure interne comportant beaucoup d'espace "vide" et de fortes trabécules agissant comme des murs porteurs. La couleur étant ici un indicateur d'orientation, nous pouvons compter sur une grande diversité d'orientations exprimées par SAXS. Dans le cadre de notre échantillon, la structure générale apparaît plus compacte, mais fonctionne sans doute suivant le même principe avec une quantité de matière dans l'épaisseur très variable.

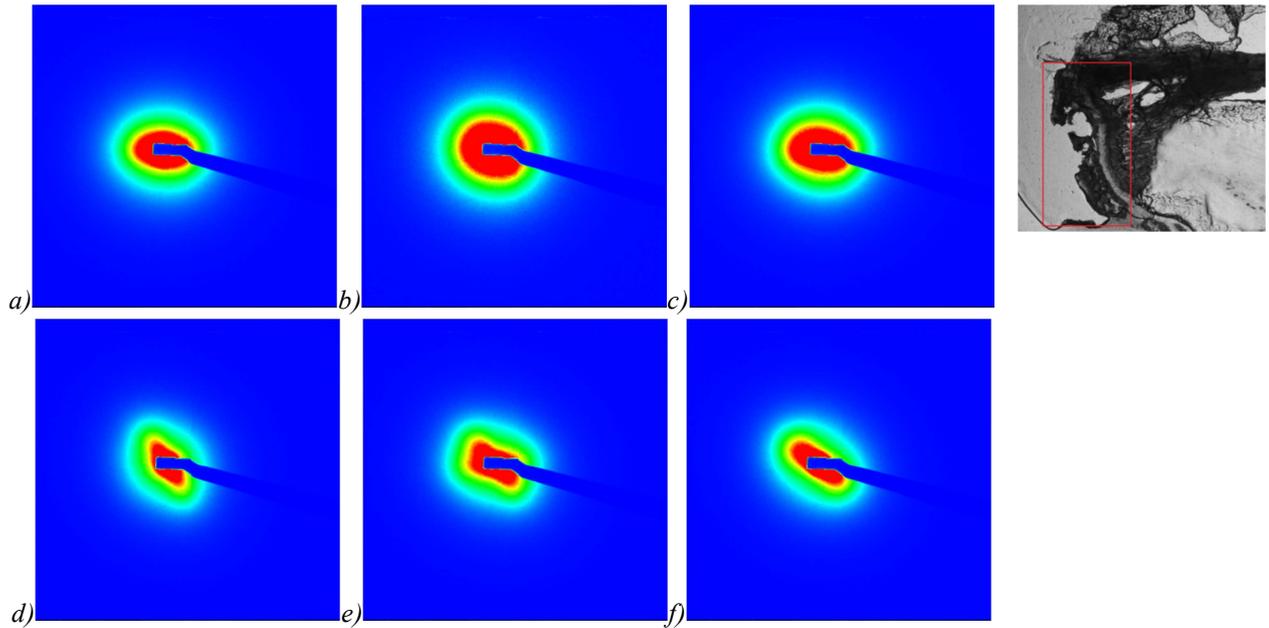


Figure 22.: Echantillons de spectres SAXS en échelle linéaire d'épiphyse de l'échantillon D5 infecté à J+7 issus des lignes #56 et #65 illustrant la diversité des figures de diffraction.

Le premier constat à l'observation des spectres de diffraction issus de l'épiphyse est que ceux-ci présentent une grande diversité dans leurs formes et orientations. La position dans l'épiphyse des différents spectres n'a pas été précisée pour les exemples ci-dessus, car nous n'avons pas constaté de corrélation entre les formes et orientations observées et leur position dans l'échantillon.

Pour ce qui est de l'orientation, nous avons des formes sans orientation comme *b)*, plus ou moins orientées *c)*, *a)* jusqu'à *f)*, ainsi que de rares phénomènes à double orientation tels que *e)*. Cette dernière structure peut être soit le résultat d'une mesure localisée sur un embranchement de trabécule, soit la superposition de trabécules d'orientation différente. Et cela nous confronte à une difficulté de la caractérisation de l'os épiphysal par SAXS, l'effet de moyennage sur la surface exposée au rayonnement, ainsi que suivant l'épaisseur de l'os. Dans le cadre ou ici de nombreuses structures sont de taille plus petite que la surface étudiée et/ou que l'épaisseur de l'échantillon, il est difficile de dégager des tendances générales propres à l'os de l'épiphyse.

En revanche, il est possible d'identifier des comportements particuliers qui soient propres à l'épiphyse. L'os cortical est une structure fortement orientée, et l'os trabéculaire de la diaphyse reste essentiellement orienté suivant la direction de l'os, ce qui se traduit dans les deux cas par une orientation du signal exclusivement autour de  $90^\circ$  de l'axe de la longueur de l'os (axe vertical des spectres ici). Or, les spectres que nous avons ci-dessus, outre de présenter une plus grande diversité dans les orientations, ne sont pas orientés de cette manière, ce qui les identifie de manière quasi-sûre comme de l'os de l'épiphyse, ou potentiellement de l'ostéosarcome, la structure en éponge ne pouvant pas conserver l'orientation générale native de l'os sain. Un autre phénomène propre à l'épiphyse est la figure de spectre à deux orientations quasi-équivalentes. Si des observations des spectres de l'os trabéculaire de la diaphyse suggère un phénomène analogue, dans le cadre des conditions de mesure qui est le nôtre, aucune telle dualité aussi marquée n'a été observé en dehors de l'épiphyse.

Nous avons utilisé les la mention des spectres de l'os cortical et trabéculaire diaphysal pour ici définir les particularités des spectres liés aux structures osseuses de l'épiphyse. Nous allons donc à présent commenter les spectres de l'os de la cavité médullaire, puisque celui-ci est censé

être de l'os trabéculaire, également formé par des lamelles de collagène, par opposition aux ostéons de l'os cortical.

#### 4) Cavité médullaire

L'os trabéculaire de la diaphyse est issu du cartilage de croissance et une structure spongieuse tridimensionnelle propre à absorber les contraintes auxquelles l'os est soumis, en constant remodelage afin de mieux répondre à ces contraintes. Comme le mécanisme de l'ostéosarcome, par le biais du cercle vicieux utilise le remodelage osseux pour se propager, cela rend l'os trabéculaire dans la cavité médullaire particulièrement susceptible à l'influence de cette tumeur. Notre objectif ici est, avec les données des lignes #65 et 70 pour exemples (voir figure 15), d'observer les comportements des spectres de l'os trabéculaire dans l'échantillon.

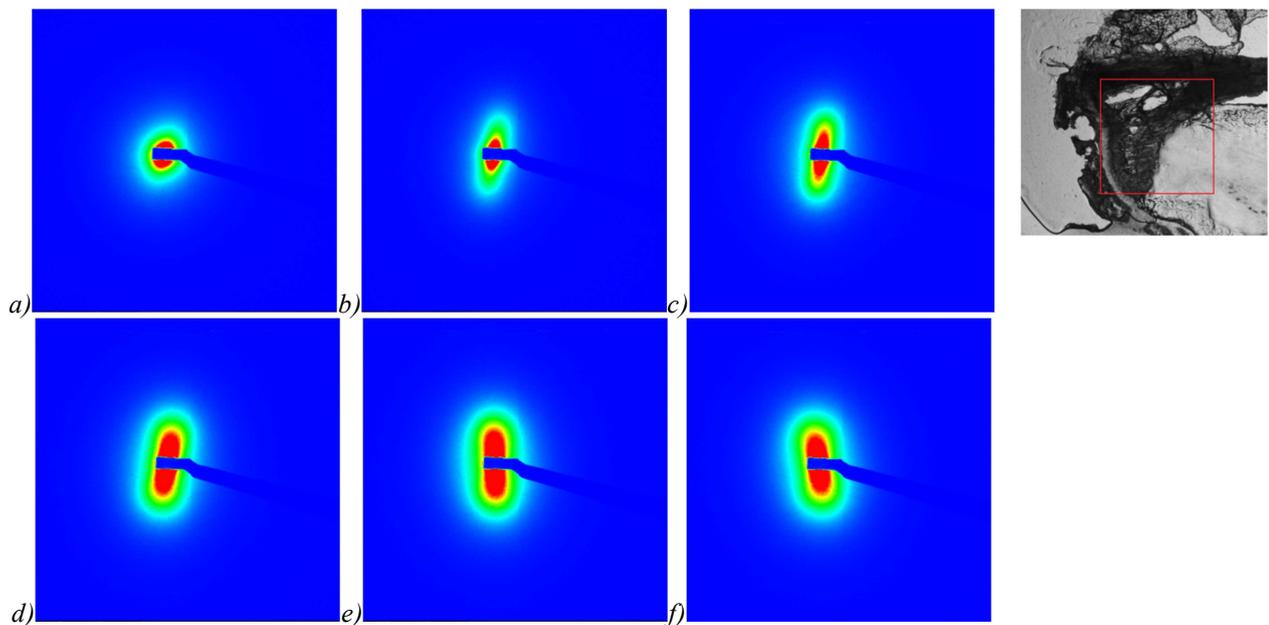


Figure 23.: Série de spectres en échelle linéaire issus de l'échantillon D5 (J7S) :  
 a), b) et c), spectres des positions 25, 45 et 75 sur la ligne horizontale #65 de D5.  
 d.) e) et f), spectres des positions #107, #108 et #109 sur la ligne verticale 70 de D5.

Les trois premières images ci-dessus illustrent un phénomène apparent dans la suite des spectres SAXS sur la ligne #65. En effet, en dépit de leur quantité de signal comparativement faible, nous pouvons observer que l'image a) de l'os trabéculaire proche du cartilage de croissance présente une orientation (forme suivant une direction) très peu marquée. Ce paramètre en revanche, augmente plus nous avançons dans la diaphyse, images b) et c). Aucun phénomène ne semble perturber cette tendance dans la longueur observée qui pourrait suggérer un impact de l'ostéosarcome sur la structure à ce stade de développement.

Un point commun entre tous les spectres observés dans le trabéculaire diaphysal est justement l'orientation générale des spectres. Bien que celle-ci puisse varier à des degrés plus importants que montrer dans la suite de spectre consécutifs d), e) et f), et parfois présenter des traces d'orientation duale dans le type vu dans l'épiphyse, la totalité de ceux-ci présente la même direction générale dans un cône d'environ 60° centré sur la verticale.

La seconde ligne d'images d'exemple sert ici d'illustration pour la continuité dans l'évolution des spectres étudiés, aussi bien longitudinalement que transversalement. A ce titre, et au vu des photos des différents échantillons, l'aspect de continuité des spectres est peut-être plus imputable à l'effet de moyennage de la mesure par surface qu'à une réelle continuité dans les structures, mais puisque non observé dans l'épiphyse, est malgré tout distinct de celle-ci.

S'il faudrait une étude similaire sur un échantillon de contrôle pour en garantir la valeur, les observations des spectres de l'os trabéculaire diaphysal semblent coïncider avec ce que nous sommes en droit d'attendre du comportement normal de cet os. Au niveau de la simple observation des spectres, nous pouvons déjà distinguer l'os trabéculaire de l'épiphyse de celui de la diaphyse, et certains comportements comme les variations d'orientation plus importantes et les phénomènes à orientations doubles bien définies permettent de discriminer certaines mesures de l'os cortical, mais les comportements de ces deux types d'os ne sont pas suffisamment distincts pour une identification au premier coup d'œil.

### 5) Os cortical

L'os cortical est l'os dense qui forme ce que nous pourrions appeler la coque extérieure de la structure osseuse. La structure en ostéons de celle-ci forme une structure fortement orientée beaucoup moins susceptible au remodelage que l'os trabéculaire. De nouvelles quantités d'os cortical sont également produites depuis le cartilage de croissance, ce qui entraîne une corrélation entre distance à celui-ci et âge. Comme dans notre protocole d'infection les cellules tumorales sont déposées sur l'os cortical plutôt qu'injectées à l'intérieur de la cavité médullaire, c'est cette structure osseuse qui subit le plus directement et en premier l'influence de l'ostéosarcome. Nos données d'exemples d'observations sont ici la ligne horizontale #56 et la ligne verticale 90 de l'échantillon D5 (J7S).

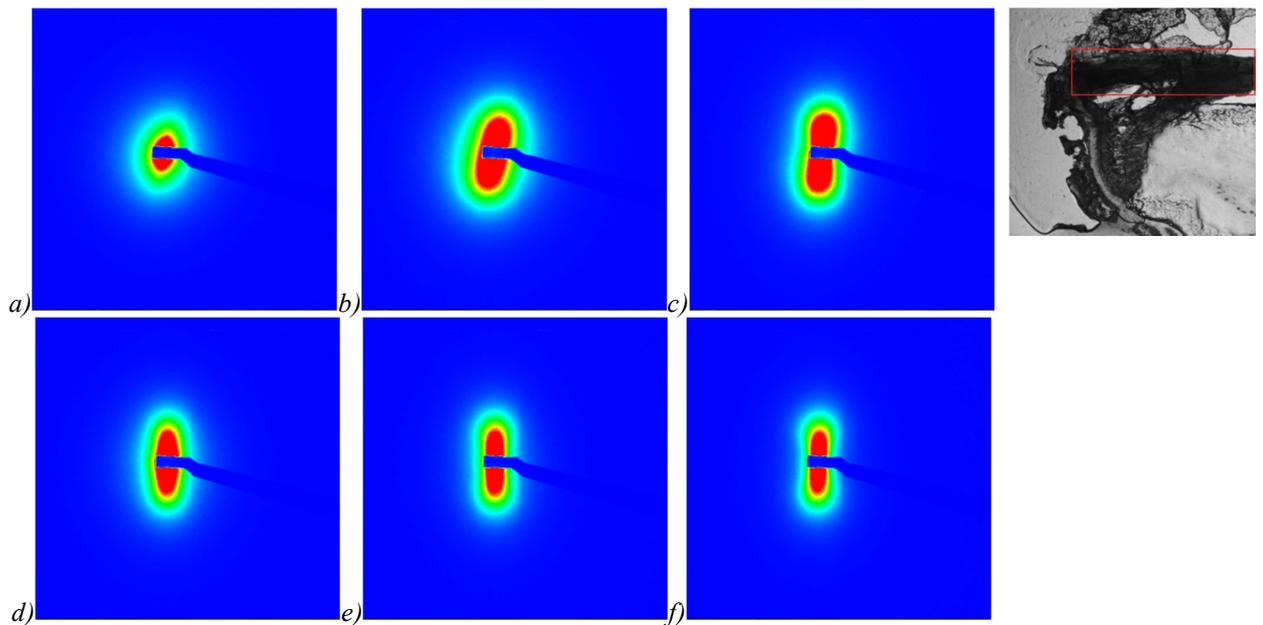


Figure 24.: Série de spectres en échelle linéaire issus de l'échantillon D5 (J7S) :  
 a), b) et c), spectres des positions 27, 47 et 77 sur la ligne horizontale #56 de l'échantillon D5.  
 d,) e) et f), spectres des positions #62, #63 et #64 sur la ligne verticale 90 de l'échantillon D5.

Le même phénomène d'évolution de la qualité d'orientation de l'os avec la position dans la diaphyse est observé ici, sans comportement particulier en local qui puisse être imputable au développement de l'ostéosarcome. L'os cortical en proximal du cartilage de croissance possède en revanche une orientation déjà plus marquée que celle du trabéculaire, et cette tendance se confirme dans l'ensemble.

L'homogénéité dans l'orientation, fermement comprise dans un cône de 30° autour de la verticale est ici encore plus marquée et prévalente que pour l'os trabéculaire. Si ce comportement est propre à l'os cortical, il ne peut servir que d'un indicateur qu'il puisse s'agir de ce type d'os, et uniquement sur une vue d'ensemble, et insuffisant comme méthode d'identification par rapport à l'os trabéculaire.

La deuxième ligne d'images, qui sont consécutives suivant la transversale de l'os, illustre le seul phénomène propre à l'os cortical sur ces observations. A savoir, une variation de la largeur au centre de la figure de diffraction dans une série de mesures plutôt qu'un quelconque autre paramètre. La figure de l'image *d*) pourrait être un exemple de comportement exclusif à l'os cortical.

Au cours de ces observations, si les spectres 2D des différents types d'os peuvent permettre d'identifier la structure observée, cela semble être l'exception plutôt que la règle, avec des comportements atypiques propres à chacun. Nous n'avons pu constater à ce niveau aucune donnée qui pourrait indiquer à ce stade une influence des cellules tumorales sur les structures étudiées, mais pouvons déjà estimer que des variations dans l'orientation et sa qualité par rapport aux présentes observations seraient des indicateurs évidents d'une activité anormale. Au-delà de cette analyse qualitative de l'échantillon, les données d'analyse Sasfit vont nous permettre de quantifier certains paramètres et leur évolution dans le cadre d'une ligne de données suivant la longueur de l'échantillon.

### C. Analyse des spectres de diffusion 1D

L'objectif de cette méthode d'analyse est de traiter individuellement les résultats obtenus plutôt que par une méthode générale automatisée. L'un des objectifs est ici de déterminer les différences entre les différents types d'os, trabéculaire, cortical, différence entre épiphyse et diaphyse, ainsi que l'effet de l'éloignement au cartilage de croissance. Cette partie de l'étude aurait dû se concentrer sur l'échantillon de contrôle D1 J13C, mais comme précisé plus tôt, une erreur de manipulation a entraîné un manque de données sur la diaphyse et le début de la cavité médullaire.

Comme précisé en IV D 2, l'une des méthodes d'analyse des résultats SAXS passe par le profil 1D résultant d'une intégration radiale, et les pentes de ce profil transcrivent un certain nombre de paramètres correspondant aux cristaux d'apatite.

En parallèle, des observations ont également été effectuées sur les différents pics du collagène, notamment quant à leur intensité et distribution, entre autre dans le but de pouvoir par la suite offrir un cadre de référence à la mise en place de moyens de mesure automatisés.

#### 1) Fit réalisé avec le programme Sasfit

Le programme Sasfit nous permet de réaliser un fit sur les spectres 1D de chaque point de mesure SAXS des échantillons afin d'obtenir les paramètres des cristaux d'apatite qui s'y trouvent. Pour la forme des objets, le processus que nous avons employé se base sur l'approximation que les cristaux d'apatite en question sont de la forme de parallélépipèdes avec leurs trois valeurs  $a$ ,  $b$  et  $c$  différentes. Le facteur de structure fonctionne sur celui d'une approximation de Percus-Yevick<sup>28</sup>, avec une distance d'interaction  $R$  entre les objets, et une intensité d'interaction entre les objets  $\eta$ .

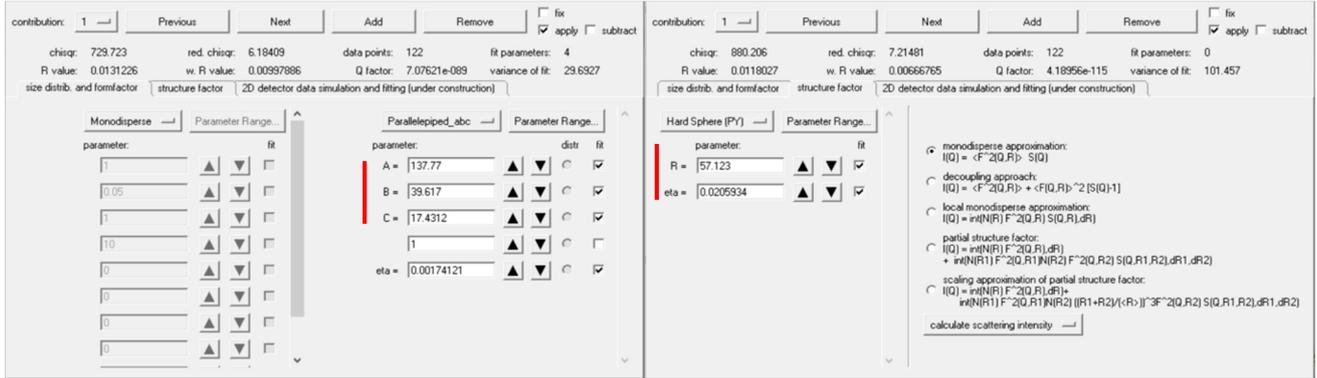


Figure 25.: Exemple de paramètres obtenus et utilisés sous SASFIT. A gauche paramètres de forme, à droite paramètres de structure.

Les différents fits permettent alors de connaître les valeurs des dimensions des cristaux, ici sur notre exemple, une valeur moyenne de 137x39x17 Å, cette méthode ne permettant pas de prendre en compte une éventuelle polydispersité de la taille des cristaux.

Malgré l'approximation effectuée, les fits obtenus par cette méthode sur les zones de Fourier-Porod sont de très bonne qualité, avec des résidus globalement inférieurs à 2% quel que soit le point fitté, ce qui est tout à fait attribuable au bruit.

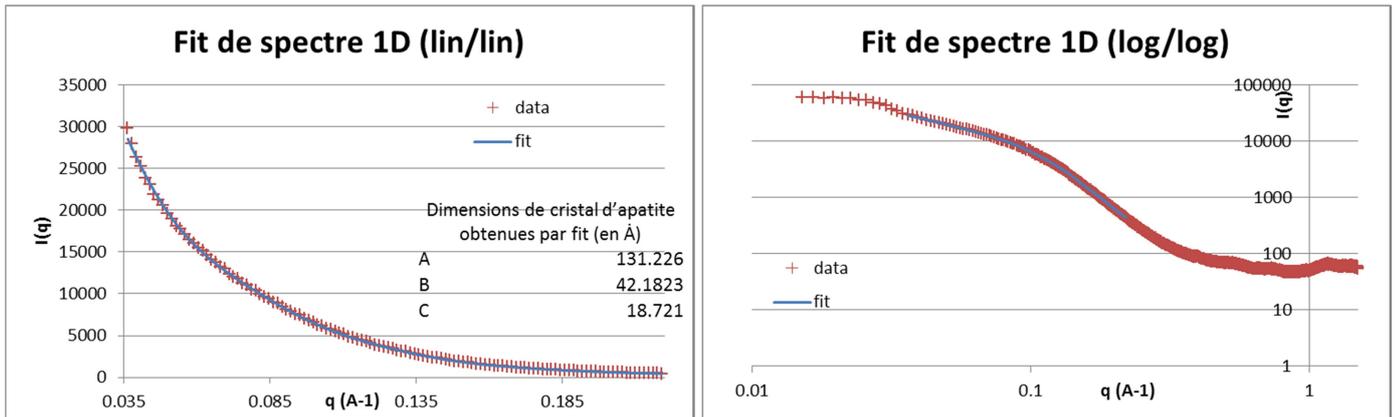


Figure 26.: A gauche, fit Sasfit de spectre 1D de matériel osseux en échelle linéaire sur les zones de Fourier-Porod. A droite, fit Sasfit de spectre 1D de matériel osseux en échelle log/log sur les zones de Fourier-Porod.

La méthode offre l'accès à une grande quantité de paramètres outre les dimensions  $a$ ,  $b$  et  $c$  des cristaux d'apatite, notamment la position des différents pics d'ultrastructure du collagène et leur intensité, ce qui offre une base de travail pour les éléments de comparaisons nécessaires à la mise en place de la solution automatique. Un autre élément, pour notre modèle, est l'interdistance  $R$  entre les objets.

## 2) Résultats d'analyse Sasfit

Les paramètres de forme des cristaux obtenus par les fits effectués via Sasfit sont les dimensions  $a$ ,  $b$  et  $c$  des cristaux d'apatite, fatalement moyennés par la mesure SAXS. Les paramètres de structure des cristaux d'apatite apparaissent sous la forme d'une valeur de la distance entre cristaux d'apatite  $R$ , ainsi qu'un paramètre d'interaction entre particules  $\eta$ . En travaillant sur les lignes horizontales #56 et #65 ; corticale et trabéculaire, nous avons une vision de l'évolution des paramètres en fonction de la position dans la diaphyse, et dans ce cadre nous sommes focalisés sur les données situées dans la diaphyse au-delà du cartilage de croissance, soit à partir de la colonne 30.

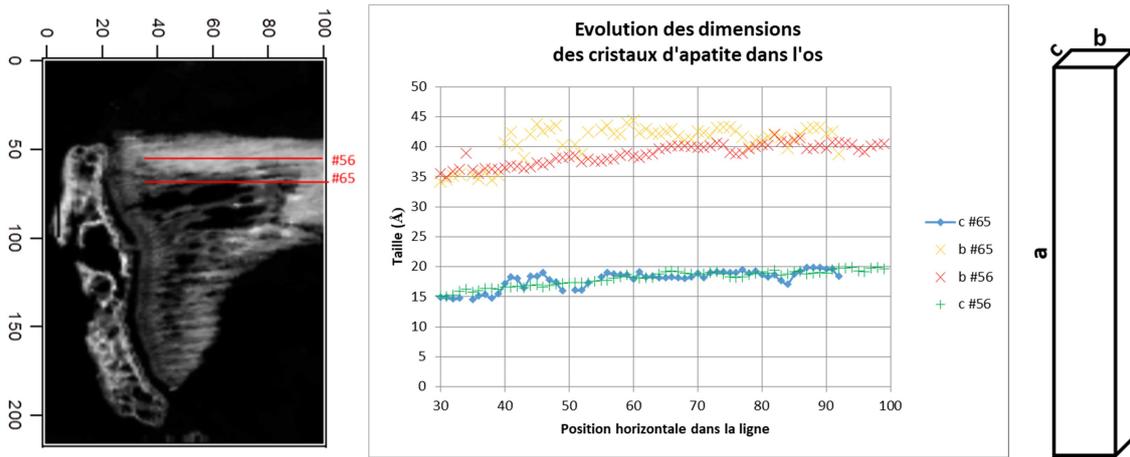


Figure 27.: Au gauche, provenance des données dans l'échantillon. Au milieu, mesures Sasfit des dimensions des cristaux d'apatite dans la longueur de l'échantillon suivant les lignes #56 corticale et #65 trabéculaire. A droite, forme employée pour le fit des dimensions des cristaux.

Le premier constat en observant ces résultats est l'absence du paramètre  $a$  sur le graphe. Ceci est essentiellement dû à un comportement erratique sur les positions 30 à 55, avec une alternance brutale entre trois plateaux de valeurs à très faibles fluctuations. Toujours est-il que ces résultats du fit ont été mis de côté comme peu fiables. Le comportement général des deux autres dimensions est celui d'une faible augmentation dans la diaphyse avec l'éloignement au cartilage de croissance, d'une valeur similaire de l'ordre de 5nm pour  $b$  et  $c$  plutôt que d'une même proportion, ce qui semble suggérer un phénomène d'épaississement des cristaux d'apatite. Il est intéressant de noter ici que le comportement reste globalement le même malgré les variations plus importantes dans le comportement de la ligne #65, associé à de l'os trabéculaire.

Si la forme des cristaux d'apatite évolue légèrement avec la position dans la diaphyse, la distance entre cristaux pour sa part reste largement constante, spécialement dans l'os cortical. L'os trabéculaire de la ligne #65 suit la même tendance, à l'exception de quelques points en proximal du cartilage de croissance, sans doute dû à de l'os en remodelage et minéralisation. Le saut important dans les valeurs en fin de ligne en revanche est plus difficile à expliquer, mais correspond avec l'augmentation d'intensité observée sur la cartographie de la figure 22.

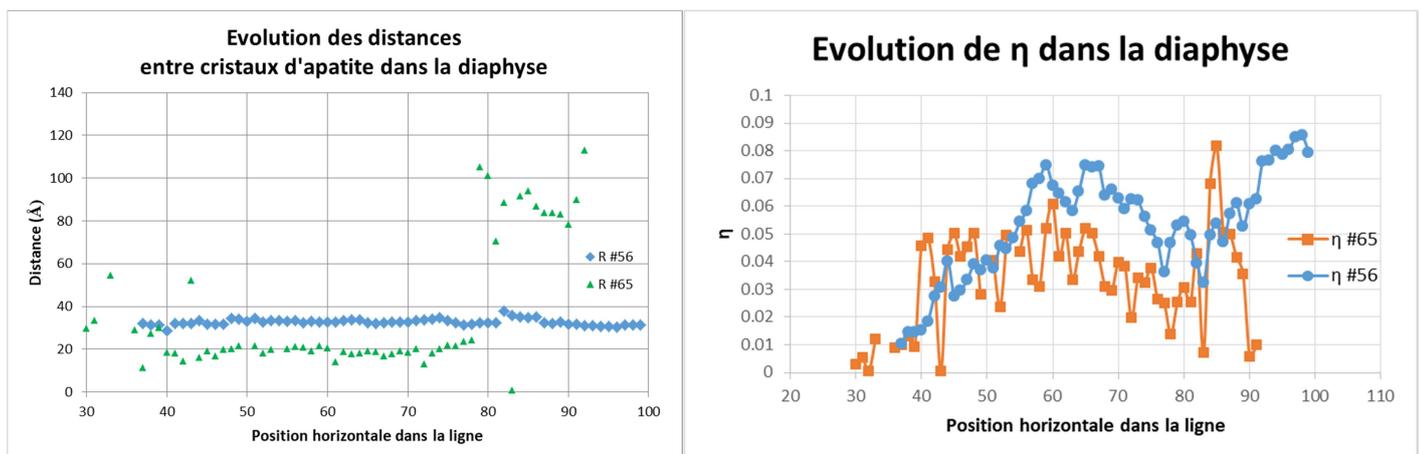


Figure 28.: A gauche, évolution de la valeur de la distance entre cristaux dans les lignes #56 et #65. A droite, évolution du paramètre de répulsion  $\eta$  dans les lignes #56 et #65.

En parallèle de cela, nous avons des comportements différents entre les lignes #56 et #65 au regard du paramètre de répulsion entre particules. Si l'os cortical apparait offrir une répulsion croissante avec la position dans la diaphyse, en lien avec des distances constantes couplées à

une augmentation de la taille des cristaux, la ligne liée à l'os trabéculaire présente des fluctuations comparativement importantes autour d'une valeur moyenne. Il est difficile d'interpréter ces différences marquées de comportement avec ces seules données, aussi nous sommes nous intéressés aux données relatives au collagène. Si nous avons bien une croissance des cristaux d'apatite à distances constantes dans la diaphyse, cela se traduirait par une évolution des structures du collagène. Aussi avons-nous étudié les pics d'ultrastructure du collagène, la position du maximum pour une évolution des interdistances, et leur intensité pour leur niveau d'ordre/densité.

### 3) Résultats d'analyse individuelle : pics du collagène

Nous avons observé deux pics liés au collagène dont nous avons cherché à étudier les paramètres. La position de leur maximum, soit la moyenne de l'interdistance entre fibrilles, ainsi que l'intensité dudit pic, qui est directement liée aussi bien à la quantité de matière qu'au degré d'organisation de celle-ci. Si en raison de l'ignorance quant à la régularité de l'épaisseur et de la densité de l'échantillon nous ne pouvons pas obtenir des déductions précises, les divergences dans les comportements de l'amplitude des deux pics pourraient être plus révélatrices.

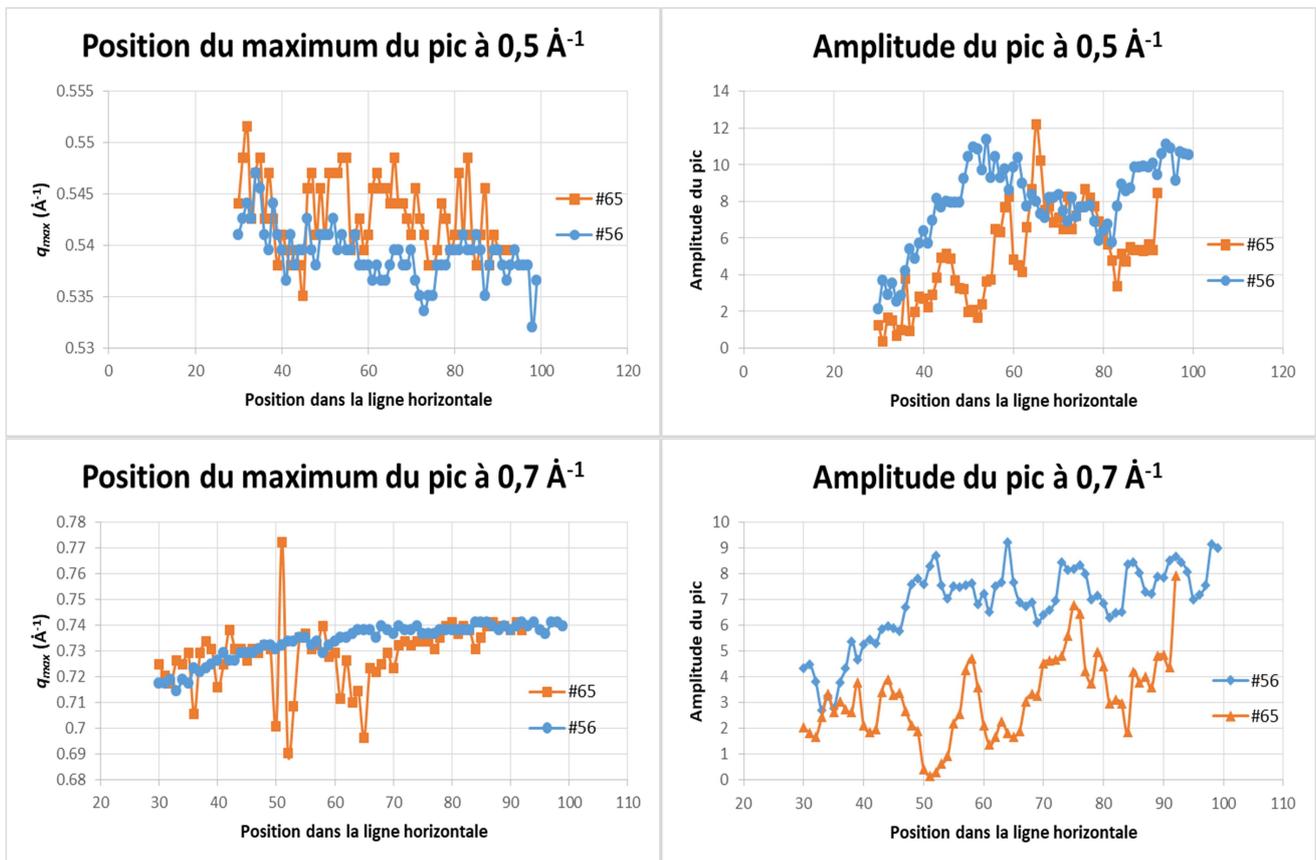


Figure 29.: Graphes de l'évolution des positions des maxima et de l'amplitude des pics d'ultrastructure du collagène dans la ligne #56 de l'échantillon D5.

Le premier constat entre les maxima de pics est le caractère inverse des tendances d'évolution entre le pic d'ultrastructure à  $q=0,54\text{\AA}^{-1}$  (simplifié en l'appellation "pic à 0,5") et le pic à  $q=0,73\text{\AA}^{-1}$  (simplifié en l'appellation "pic à 0,7"). En effet, là où le pic à 0,5 semble présenter une faible diminution dans la position de son maximum avec l'éloignement au cartilage de croissance, soit une augmentation de l'interdistance entre fibrilles, le comportement de pic à 0,7 est celui d'une augmentation de la position de son maximum. Ces observations semblent indiquer une réorganisation du collagène progressive dans la diaphyse, avec une contraction suivant une direction et une dilatation suivant l'autre.

Les valeurs d'amplitude des pics pour leur part, ne semblent pas suivre de comportement constant le long de la diaphyse, et donc impossible de lier ce paramètre à l'évolution des cristaux d'apatite, ou à l'évolution des interdistances entre collagènes. Tout ce qui peut en être dit est que la vision linéaire de l'évolution de ces paramètres ne permet pas ici de déterminer s'il existe ou non un comportement général.

#### 4) Conclusion

Les résultats obtenus par le biais des fits Sasfit indiquent une évolution de deux des dimensions des cristaux d'apatite au cours de la progression de la diaphyse à partir du cartilage de croissance. Nous avons une lente et régulière évolution des paramètres  $b$  et  $c$  le long de la diaphyse, tandis que la valeur de distance entre cristaux reste généralement constante. Nous trouvons également couplé à cela dans l'os cortical une augmentation générale de la valeur du paramètre de répulsion entre particules, ce qui correspond effectivement à un phénomène de grossissement des particules à distance constante. Le phénomène en revanche, n'est pas visible de manière similaire pour la ligne #65 dédiée à l'os trabéculaire.

En revanche, les mesures sur les positions des maxima des pics du collagène offrent une vision d'un comportement similaire pour les deux lignes, avec une contraction d'une interdistance en parallèle d'une contraction indiquée par le second pic. Il est facile de faire le rapprochement et de considérer ces évolutions comme liées, sinon la conséquence, de l'évolution des dimensions des cristaux d'apatite. Les comportements de l'amplitude des pics en revanche, reste largement inconcluante.

Cependant, il paraît imprudent de tirer des conclusions générales pour l'ensemble de l'os à partir des résultats présentés ici. Il ne s'agit ici que des résultats de fit de deux lignes proches d'acquisitions SAXS et ce dans un unique échantillon. Dans le cas où les premiers marqueurs de l'action de l'ostéosarcome aux temps courts seraient localisés, il est nécessaire d'obtenir une vue d'ensemble de l'échantillon pour poursuivre l'étude.

#### 5) Limites de la méthode et stratégie

Si la démarche décrite plus tôt offre une grande qualité des résultats, elle se heurte en revanche à des considérations pratiques handicapantes. Tout d'abord, la simple quantité des données à traiter est trop importante. Si une sélection prudente permettrait de dégager des tendances individuelles des différents types d'os, une vue d'ensemble de l'évolution des différents paramètres et le traitement des dizaines de milliers de clichés pour chaque échantillon n'est pas envisageable de manière réaliste à travers cette procédure manuelle.

A cela doit s'ajouter les limites inhérentes à la méthode de fit de courbe, à savoir l'impossibilité de prévoir à l'avance si le modèle employé permettra la convergence du fit. D'où la démarche de déterminer une série de mesures automatisées sans procédure de fit, offrant des approximations dont la validité a été confrontée aux résultats de fit.

## **VI. Cartographies SAXS des échantillons**

L'avantage d'automatiser la mesure de paramètre des spectres 1D et 2D est de pouvoir tirer le meilleur parti de l'ensemble des données obtenues par SAXS au synchrotron Soleil, d'exploiter la totalité des échantillons ainsi cartographiés, et d'obtenir une vision globale de la structure osseuse par cette méthode d'analyse. Nous avons vu plus tôt les limites de travailler au détail, spécialement dans le cadre de comportements que nous ne parvenons pas à expliquer de manière satisfaisante avec des informations parcellaires.

Nous travaillons ici sur les quatre échantillons sélectionnés qui ont été cartographiés au synchrotron, à savoir un échantillon D1 de contrôle sain à 13 jours après le grattage, deux tranches du même tibia D4 et D5 issues d'une patte infectée à 7 jours après infection, et un échantillon D2 à 13 jours de développement de l'infection.

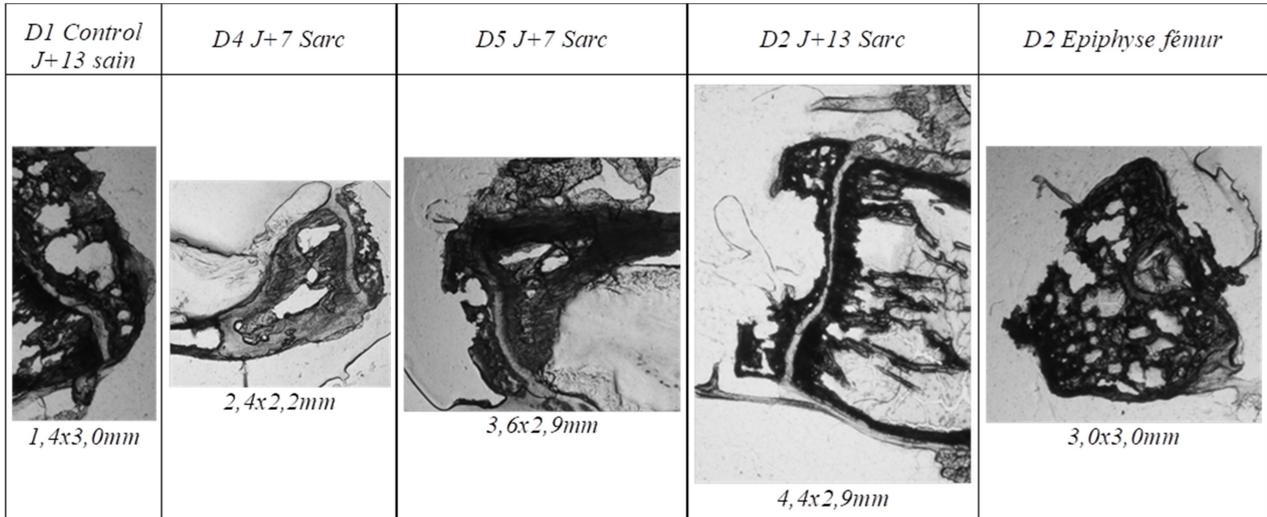


Figure 30.: Rappel des échantillons sélectionnés pour l'étude synchrotron sur les zones cartographiées.

Sur ces échantillons, nous avons mesuré ou calculé différents paramètres suivant des méthodes simples de régression linéaire ou polynômiale, de mesure des surfaces ou de dérivées des spectres 1D, de calculs de phase sur les spectres 2D. La validité de ces mesures est garantie par deux éléments, d'une part la comparaison aux résultats de fits par la méthode Sasfit sur la sélection existante, mais également par l'étude de la cohérence globale des résultats sur l'ensemble de l'échantillon. En effet, si nos résultats correspondent aux mesures précédentes et restent cohérents sur l'ensemble de la partie osseuse de l'échantillon, alors la méthode de calcul automatisée est validée.

Les différentes cartographies ont été réalisées sous Igor, et pour la plupart il leur a été attribué une échelle de couleur discrète plutôt que continue. De (très) nombreuses échelles de couleurs ont été essayées, et très peu offraient une qualité de lecture intéressante. L'échelle arc-en-ciel la plus souvent sélectionnée en revanche, résulte sur une quantité d'information rapprochée dans des tons de bleu et de vert difficile à différencier, rendant la lecture des valeurs en local incroyablement compliquée. Une forme d'échelle des couleurs en discret a au final été sélectionnée afin de faciliter la lecture et l'interprétation des cartographies réalisées. De même, l'ensemble des cartographies pour un même paramètre fonctionnent sur une même échelle, avec les mêmes valeurs maximales et minimales pour assurer l'interprétation entre les différents échantillons. De manière régulière, le blanc et le noir sont utilisés sur ces cartographies pour représenter les valeurs respectivement au-dessus du maximum et en-dessous du minimum de l'échelle.

### A. Qualité de l'os

Certains des paramètres étudiés et cartographiés relèvent de ce que l'on pourrait qualifier de la qualité du matériau osseux considéré, à savoir l'intensité mesurée, relative à la quantité locale de matériau organisé présent, l'orientation, soit la direction prise par la structure osseuse, et l'anisotropie, que l'on pourrait définir comme une mesure de la qualité de l'orientation. Mais

avant toute autre considération, nous devons considérer un phénomène important de l'acquisition, la saturation du détecteur.

### 1) Saturation du signal

#### a) Principe et mesure

La mesure effectuée sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL avec un détecteur AVIEX capable de mesurer jusqu'à 64 000 coups par séquence. Cependant, pour des raisons de sécurité dans nos mesures et dans le cas où celle-ci ne se comporterait pas de manière totalement linéaire à l'approche de ce maximum, nous considérons que la saturation est atteinte à partir de 40 000 coups.

Les pixels saturés se trouvant à proximité du centre de la figure de diffraction, ceux-ci influent essentiellement sur les mesures aux petits  $q$ . L'objectif de cette mesure est double, d'une part estimer la validité des mesures aux petits  $q$ , une grande quantité de pixels saturés impliquant une certaine prudence vis-à-vis des résultats dans ces plages. Un autre élément important est le degré auquel ces pixels influent sur le spectre 1D, et en conséquence à partir de quelle valeur de  $q$  il est possible d'effectuer une mesure d'intensité ou de la pente sur la zone de Fourier.

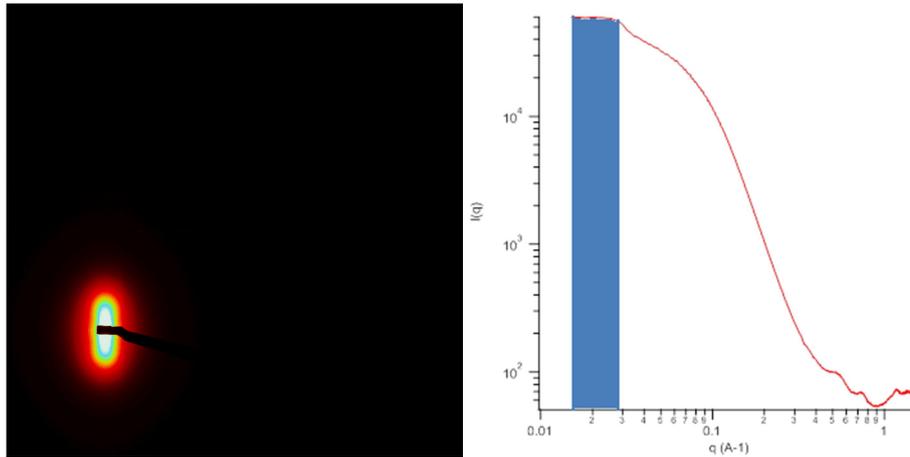


Figure 31.: Exemple de couple de spectres 2D/1D d'image saturée issue de D5 J+7 Sarcome. En bleu sur le spectre 1D zone du signal saturé.

On peut voir sur la partie gauche de l'exemple ci-dessus que l'échelle linéaire de couleur employée pour l'intensité de ne permet pas exactement de distinguer le nombre de pixels saturés, bien que ceux-ci soient tous fermement dans le centre blanc. Des comparaisons avec d'autres échantillons présentant une surface blanche bien plus importante ce sont avérés moins saturés que l'exemple ici présenté. En revanche, on peut discerner aisément sur son pendant 1D le plateau situé au début de la courbe résultant de la saturation, bien que celui-ci soit exagéré par l'échelle log/log pour la lisibilité.

La méthode de mesure du paramètre est ici simplissime, un simple programme comparant le tableau de données de l'image SAXS à notre valeur limite de 40 000, suivi d'une somme du nombre de renvois Vrais. La mesure automatique permet alors d'aller chercher les spectres 1D des images les plus saturées pour établir une limite basse de la valeur de  $q$  à partir de laquelle les mesures peuvent être considérées valides pour l'ensemble des échantillons. A partir de là nous pouvons effectuer une mesure de l'intensité diffractée au plus rapproché du centre qui ne soit pas à risque d'être faussé par la saturation.

## b) Cartographies

La mesure de saturation est basée sur le nombre de pixels saturés dans chaque cliché individuel de SAXS. La cartographie de ce paramètre permet de facilement déterminer quels spectres étudier afin d'établir la valeur de  $q$  minimale pour laquelle les mesures sont dépourvues de saturation, mais également comme une observation préliminaire des densités comparées de cristaux d'apatite.

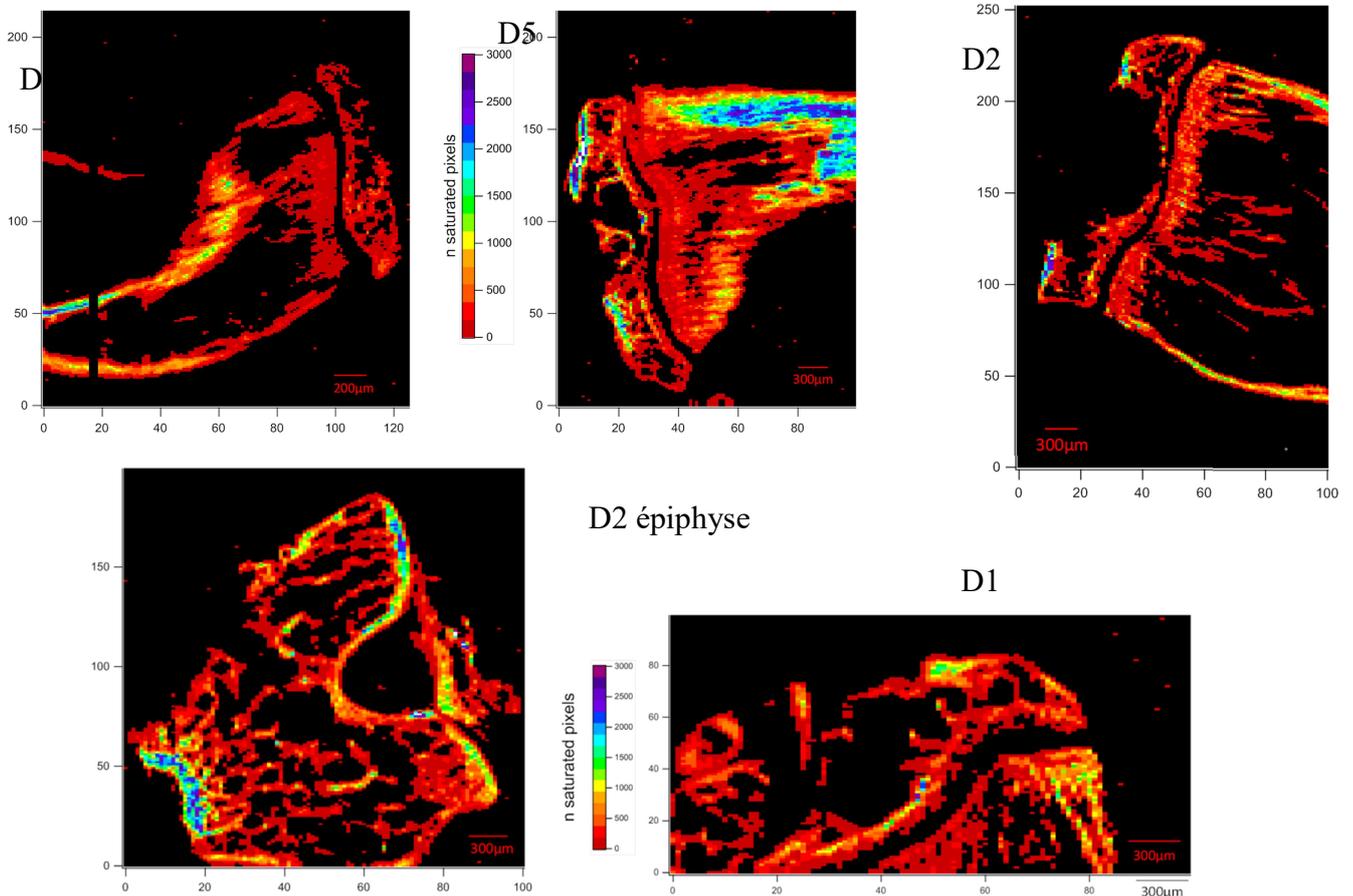


Figure 32.: Cartographies du nombre de pixels saturés sur le spectre de diffraction 2D. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome, D2 J+13 Epiphyse et D1 J+13 Sain

Les différentes cartographies des échantillons, sains ou infectés, présentent le même comportement général, avec un minimum de saturation quasiment partout où de l'os est observé si l'on compare aux autres cartographies. Les zones présentant plus de saturation se trouvent être soit de l'os cortical, soit de l'os épiphysal en proximité des cartilages de croissance et hyalin. A noter que l'échantillon D2 (J13S) épiphyse est en coupe transversale contrairement aux coupes longitudinales des autres échantillons, ce qui positionne le cartilage hyalin au niveau du contour extérieur.

Un résultat important des mesures sur la saturation, est la sélection d'une plage de  $q$  libre de l'influence de la saturation à partir de  $q=0,045\text{\AA}^{-1}$  pour le reste des mesures, mais particulièrement pour la mesure d'intensité du signal diffracté par l'échantillon.

### 2) Intensité diffusée

L'intensité diffusée est un outil qui offre un paramètre qualitatif de la quantité locale de matériau diffractant. Le but ici est de pouvoir se faire une idée des quantités locales d'apatite en fonction du type d'os, mais également dans la distribution en fonction des échantillons.

### a) Principe et mesure

Une valeur d'intensité relative sans dimension peut être déterminée à partir de la somme valeurs de pixels pour  $q \geq 0,045 \text{ \AA}^{-1}$ , ou une intégration sur la partie correspondante du spectre 1D. La majeure partie du signal se trouvant à proximité du centre, avec les signaux les plus éloignés visibles uniquement via une échelle logarithmique quelle que soit la dimension du spectre, il est inutile de poursuivre la mesure au-delà du nécessaire, soit jusqu'à  $q \leq 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ .

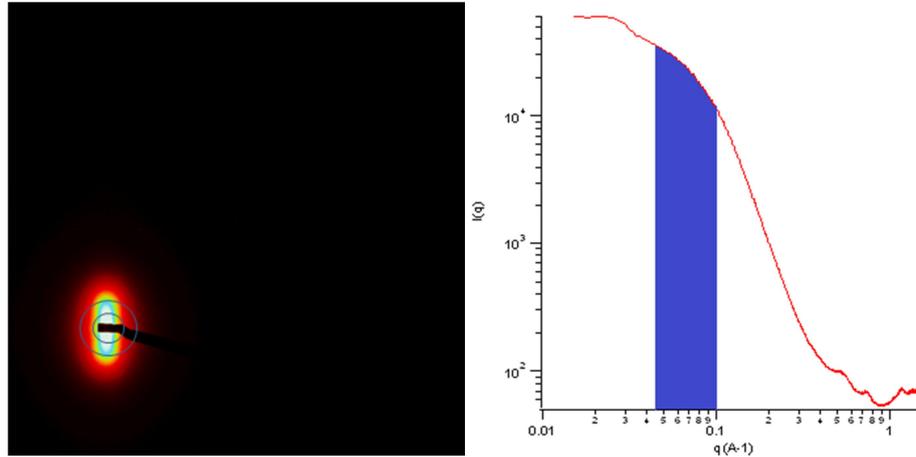


Figure 33.: Représentations de la plage de mesure de l'intensité diffractée sur les spectres 2D et 1D.

La mesure permet donc d'obtenir une valeur objectivement proportionnelle et non faussée de la quantité de matière osseuse présente au point exposé au rayonnement. Cette mesure est essentiellement celle de l'apatite, puisque la zone de mesure est située sur les zones de Fourier-Porod. Cela dit, comme nous pouvons le voir sur le spectre 1D en échelle log/log, la quantité de signal imputable au collagène est trop faible pour faire une quelconque différence significative, en plus de correspondre à une zone du détecteur qui ne permet pas une mesure sur 360 ou même 180° qui en conséquence pourrait fausser la mesure. Cette mesure correspond donc de fait à la quantité d'apatite locale, et exclue de ce fait le cartilage de croissance d'une mesure réelle de "quantité de matière".

L'approximation en question reste cependant tout à fait utile d'un point de vue comparatif entre les différents échantillons, et permet une comparaison aisée de la quantité de **cristaux** d'apatite trouvée localement pour chacun des clichés SAXS, les zones considérées étant le résultat de la diffraction par la morphologie des cristaux plutôt que des arrangements cristallins.

### b) Cartographies

Comme expliqué dans les principes de mesure, l'intensité diffractée a été mesurée sur la plage de  $[0,45-0,1 \text{ \AA}^{-1}]$  des spectres 1D afin de fonctionner sur une plage dépourvue de saturation d'une part, mais également dans les limites de signal circulaire complet du détecteur.

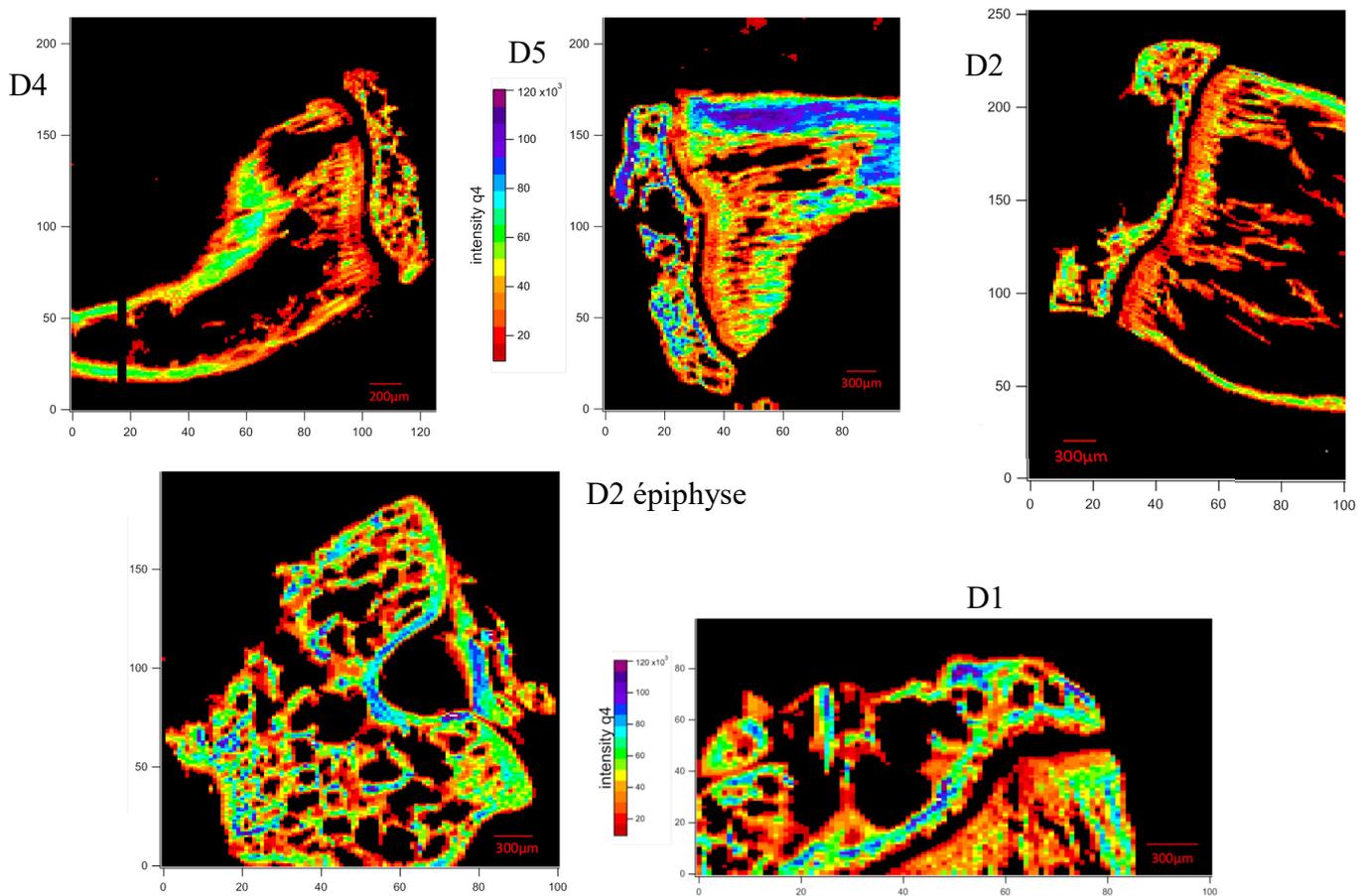


Figure 34.: Cartographies de l'intensité de signal diffracté. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome, D2 J+13 Epiphyse et D1 J+13 Sain.

Notre élément de référence d'intention, l'échantillon sain D1 (J13C), présente différents niveaux d'intensité mesurée, avec des maximums principalement situés dans l'épiphyse, en proximités du cartilage hyalin articulaire, ou en couche proche du cartilage de croissance, ce qui correspond aux attentes en termes de densité osseuse. De même, sur le côté droit, nous observons l'intensité plus élevée de l'os trabéculaire en-dessous de la bande noire du cartilage de croissance. Le cartilage de croissance étant dépourvu d'apatite, son absence de signal suivant notre mesure de l'intensité est en accord avec ce que nous sommes en droit d'escompter de la mesure.

A partir du cartilage de croissance et dans la diaphyse, on constate au niveau de l'os cortical un dégradé de couleur correspondant à une augmentation de l'intensité jusqu'à des valeurs entre 60 et 80. Si l'on suit le front de ce gradient, on peut observer en partant du cartilage de croissance et dans l'os trabéculaire une forme de deuxième ligne de démarcation à l'intensité minimale. Malheureusement il est difficile d'observer plus sur notre unique échantillon sain, l'élément le plus proche d'être sain de manière sûre est le morceau d'épiphyse du fémur en coupe transversale de l'échantillon D2 (J13S).

Nous sommes ici dans le cas où tout le matériel intérieur est censé être de l'os trabéculaire, et aucune garantie que le contour soit formé d'os cortical puisque celui-ci est largement absent de la partie protégée par le cartilage hyalin. L'os trabéculaire ici semble présenter une intensité plus élevée de manière générale, avec des variations d'intensités suivant une même trabécule sans doute dues aux hasards de la coupe à travers une structure tridimensionnelle. Cependant, il semble assez peu probable pour les contours de présenter ici des épaisseurs dans la coupe pouvant attester des différences de mesure d'intensité, soit de quantité d'apatite, aussi devons-

nous considérer certaines de ces variations comme indicatrices de variations dans la densité du matériel osseux.

Si l'on considère désormais l'échantillon D5 (J7S), notre échantillon de référence, nous pouvons instantanément observer que certaines zones présentent des intensités comparativement beaucoup plus fortes. Les lignes sélectionnées plus tôt comme telles sont ici bien confirmées comme de l'os cortical, au vu de la différence d'intensité. Si l'os cortical ne semble pas présenter ici d'évolution de l'intensité lié au positionnement dans la diaphyse, soit suivant la longueur de l'os, un certain gradient existe dans l'os trabéculaire à partir du cartilage de croissance, avec deux couches successives d'intensité différentes, plutôt unie en rouge à jaune dans un temps, suivi d'une couche en quelque sorte "pointillée" de vert, après quoi l'intensité baisse à nouveau avec l'apparition de lacunes de l'os trabéculaire. A noter que nous observons de l'os plein et de forte intensité en limite à droite de la cartographie, ce qui nous laisse considérer qu'il s'agit d'os cortical, sans doute en effet d'un angle à la coupe par rapport à la longueur de l'os.

Notre deuxième coupe de patte D4 J7S présente une intensité générale plus faible que celle de D5 (J7S), sans doute due à une différence d'épaisseur, mais les caractéristiques relatives présentent de nettes similarités. D'une part, le phénomène de double front à partir du cartilage de croissance est également présent ici, bien que moins prononcé, avec des "pointillés" plus jaune-verts que franchement verts, mais sans doute imputable à l'épaisseur de la coupe. D'autre part, l'intensité trouvée dans l'épiphyse est à nouveau du même ordre que celle de l'os cortical de la diaphyse, bien qu'ici l'os cortical en proximité du cartilage de croissance semble bien moins dense, voir potentiellement dégradé pour la partie basse. Ce dernier point est sans doute un effet soit de la structure de l'os, ce qui reste assez improbable, soit un effet de la coupe qui serait ici plus fine que le reste. Dans le cas où ce serait un processus engagé de dégradation de l'os, celui-ci serait encore local, eu égard à la forte densité observée sur D5 (J7S) de la zone correspondante. On note enfin que la quantité d'os trabéculaire y est moindre que sur D5, mais au vu de la présence d'os cortical en bout de D5, cela peut être attribué à des particularités de la structure interne locale.

Notre dernier élément est l'échantillon D2 à J+13, et la comparaison directe avec les échantillons D4 et D5 (J7S) donne une inclinaison clairement dans le sens des observations effectuées sur l'échantillon D4. La localisation de la coupe offre cependant une largeur de cavité médullaire bien plus importante, qui comparativement à D5 particulièrement présente peu de matériel osseux et de manière assez éparse. Nous avons déjà observé en V) l'existence de particularités dans le cadre des quantités du matériel trabéculaire de cet échantillon, et les observations ici ne semblent pas indiquer de nouveaux éléments divergents. L'os cortical pour sa part semble en revanche posséder une intégrité tout à fait satisfaisante par rapport à D4, et semble présenter un juste milieu entre D4 et D5 (J7S). Le double front en proximal du cartilage de croissance semble apparaître à nouveau, bien qu'encore moins prononcé que dans l'échantillon D4.

A ce stade, nous avons observé que l'intensité diffractée semble être la même pour l'épiphyse que l'os cortical dans chacun des échantillons, et pouvons utiliser ces mesures comparatives pour discriminer la limite entre os cortical et trabéculaire. Nous constatons une très forte densité de matériel dans notre échantillon D5 (J7S) qui n'est cependant pas reflétée dans sa coupe sœur D4, jusqu'à constater des faiblesses dans l'os cortical de cette dernière. Excepté ce dernier phénomène, l'échantillon infecté à 13 Jours D2 semble suivre le comportement de D4 (J7S) plutôt que de D5 (J7S), ce qui pourrait avec plus d'information suggérer une progression de la structure vers cette forme sous l'effet de l'ostéosarcome.

L'intensité relative à la présence d'apatite n'a pas permis d'identifier à ce stade une évolution des structures clairement imputable à l'action des cellules tumorales. Comme le mécanisme de

production d'os de l'ostéosarcome crée une substance ostéoïde désorganisée, notre étude se porte ensuite sur la valeur d'orientation de chaque cliché afin de discerner des comportements inattendus de la structure osseuse dans nos échantillons infectés.

### 3) Orientation

Nous le savons, l'os est composé de matériau hiérarchique et organisé. Cette organisation du matériel organique, le collagène, dans lequel nous pouvons trouver le matériel minéral, l'apatite, se fait suivant des directions préférentielles, ce qui se traduit au niveau de la méthode SAXS par une direction préférentielle de la diffraction du signal

#### a) Principe et mesure

Nous pouvons voir sur les images de diffraction SAXS précédentes et dans la théorie de celle-ci qu'un alignement des structures résulte sur une direction de diffraction préférentielle. Une représentation trouvée assez largement dans la littérature de l'orientation du signal SAXS est celle de l'intensité en fonction de l'angle, le profil azimuthal, tel que l'exemple ci-dessous.

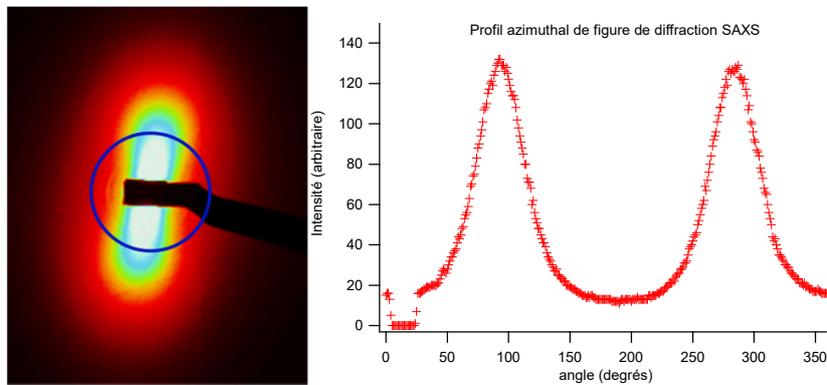


Figure 35.: Profil azimuthal d'intensité diffracté en SAXS par le pic du 3° ordre du collagène, tiré de Wagermeier et al.

Nous l'avons vu, et pouvons l'observer sur le profil exemple ci-dessus, la diffraction des rayons X est un processus qui donne comme résultat une figure de diffraction symétrique par rapport au centre. Cela nous permet de passer par des mécanismes de traitement du signal<sup>29</sup>, avec une fonction d'échantillonnage paire.

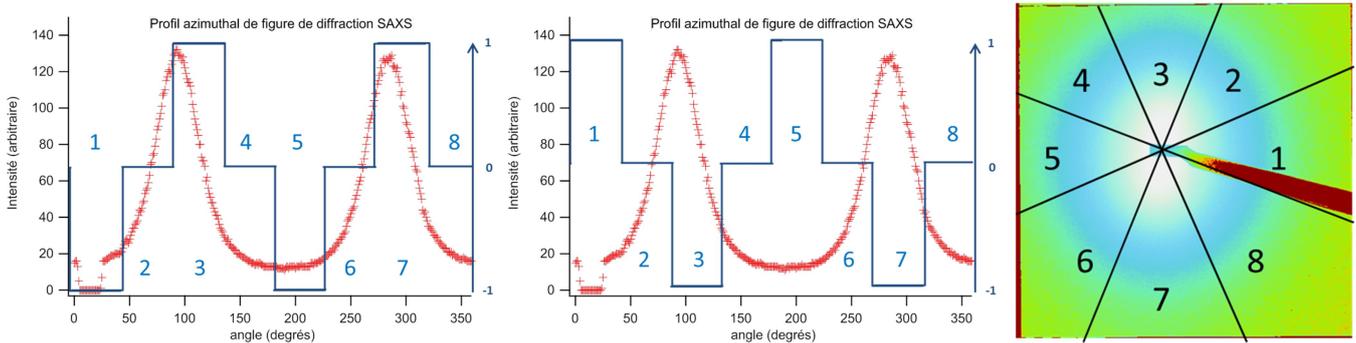


Figure 36.: A gauche et au centre, échantillonnage du signal azimuthal, à droite, représentation de la partition du spectre 2D en différentes zones.

Cela se traduit pratiquement par une partition en huit domaines de 45° centrés sur le positionnement du rayon incident. Chacun de ces quadrants subit alors une intégration radiale telle que :

$$I_x(r) = \int_{45(x-\frac{1}{2})}^{45(x+\frac{1}{2})} I(r; \theta) d\theta$$

Ce qui résulte sur huit séries de valeurs d'intensité  $I_1$  à  $I_8$ , qui peuvent ensuite être appariées avec leur symétrique par rapport au centre, en raison de la nature symétrique du signal. En conséquence, les opérations suivantes fonctionneraient aussi bien avec une moitié continue des quadrants, avec moins de précision. Nous avons alors l'orientation de la figure de diffraction :

$$\theta_{SAXS} = \tan^{-1} \left( \int \frac{(I_2 + I_6) - (I_4 + I_8)}{(I_1 + I_5) - (I_3 + I_7)} dr \right)$$

En termes pratiques, nous avons confronté chaque double quadrant avec son orthogonal direct, ce qui permet de discriminer le signal d'orientation du signal général. L'intégrale suivant  $r$  des résultantes ramène alors cette différence à une seule valeur, et le rapport de ces deux valeurs offre une comparaison similaire à celle de valeurs de cosinus et de sinus, dont l'arctangente offre alors une valeur d'orientation. Une partie de ce procédé est impliqué dans le calcul de l'anisotropie.

### b) Cartographies

La mesure d'orientation est effectuée sur la partie du signal correspondant à l'apatite, les éléments correspondant au collagène relevant d'angles pas ou mal représentés sur nos mesures, comme pour l'ultrastructure du collagène qui n'apparaît que sur les deux quadrants supérieurs, n'offrant pas une vue à 360° pour les calculs. L'orientation a été suivie suivant le modèle de la microscopie en lumière polarisée représentée suivant un cercle chromatique, où la direction de la structure correspond à une couleur donnée. Pour des soucis de lisibilité, les cartographies ont été corrigées à l'aide des mesures d'intensité pour discriminer le matériel osseux du reste, qui en conséquence a été représenté en noir.

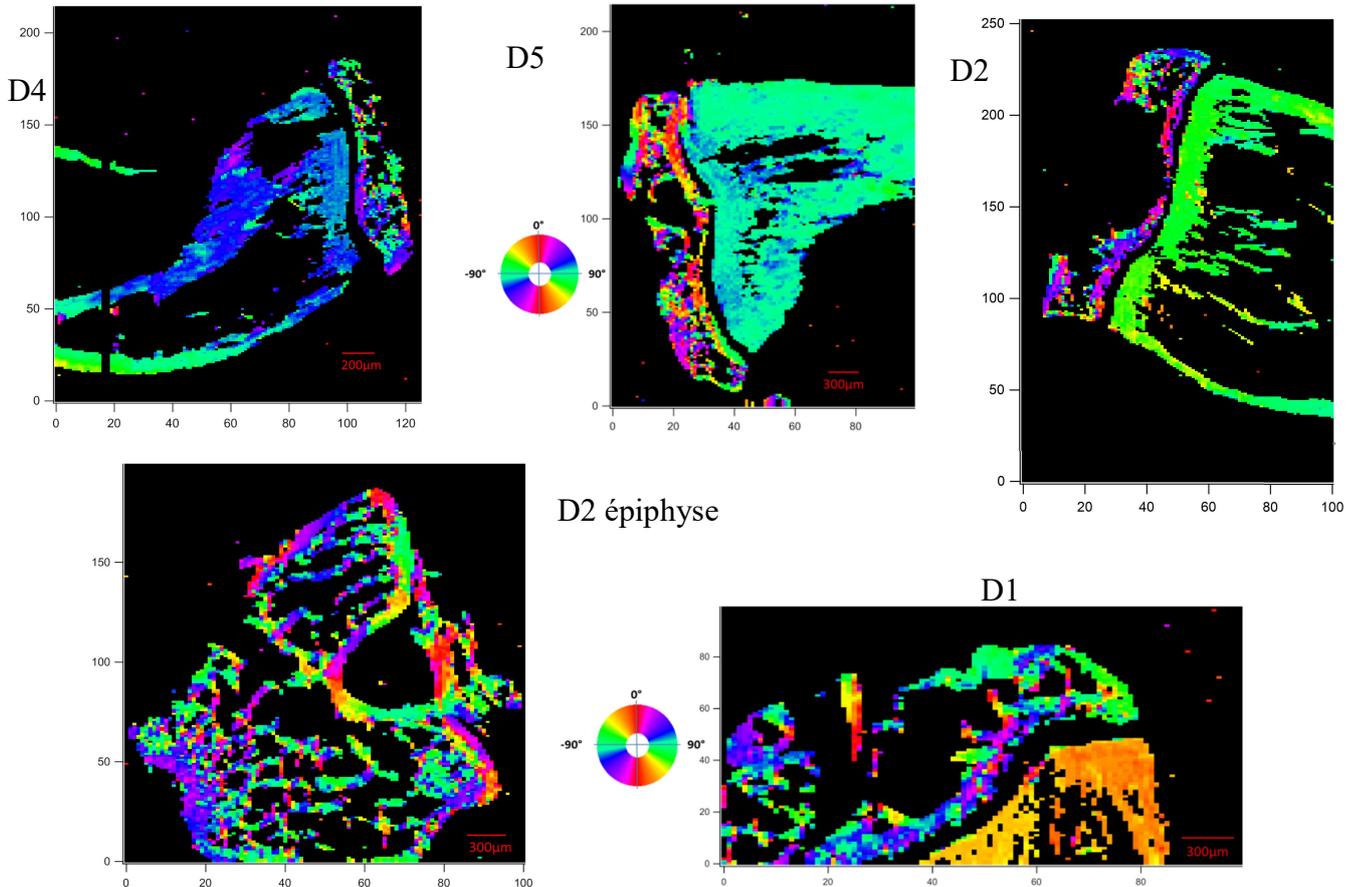


Figure 37.: Cartographies de l'orientation du spectre de diffraction 2D. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome, D2 J+13 Epiphyse et D1 J+13 Sain. Cercle chromatique indicateur de l'orientation de la structure.

Les observations possibles ici illustrent une correspondance marquée du comportement général entre la mesure d'orientation par SAXS et la mesure polscope, avec des structures à la direction complexe dans l'épiphyse, et une orientation essentiellement alignée sur la direction de la structure pour la diaphyse. Le caractère d'alignement entre la structure et la mesure d'orientation apparaît clairement dans tous les échantillons, qu'il s'agisse d'épiphyse, de diaphyse, d'échantillons sains ou infectés. Si les différents exemples d'épiphyse ici présentent la remarquable complexité des orientations de l'architecture osseuse, les éléments d'os trabéculaire diaphysal en revanche correspondent de manière très proche aux orientations de l'os cortical. Il est intéressant d'observer les différences d'orientation autour du cartilage de croissance, avec un alignement avec le bord de celui-ci pour l'épiphyse, mais une direction perpendiculaire pour la diaphyse, résultat du processus de croissance issu du cartilage.

Nous n'observons pas ici de différence dans le comportement de la direction d'orientation dans les échantillons infectés, pas même dans celui à 13 jours, ce qui au vu du développement de la structure ostéoïde de l'ostéosarcome est l'un des indicateurs escompté de l'action des cellules tumorales. Mais si la valeur d'orientation varie peu, il s'agit là encore d'une moyenne, et il convient d'observer la qualité de l'orientation également pour assurer qu'aucun phénomène correspondant à une production d'os désorganisé n'ait encore eu lieu.

#### 4) Anisotropie

L'anisotropie peut être considérée comme une mesure de la qualité d'alignement d'un matériau orienté, là où un matériau sans orientation est dit isotrope. En conséquence, moins un matériau est isotrope, plus son alignement est important.

##### a) Principe et mesure

Si la position des pics sur le profil azimuthal (Fig.33) représente l'orientation moyenne de la structure, la largeur des pics en question est représentative de l'anisotropie de celle-ci, c'est-à-dire le degré de qualité de ladite orientation. Le calcul de la valeur d'anisotropie  $A$  découle directement du processus de mesure de l'orientation :

$$A = \int \sqrt{[(I_2 + I_6) - (I_4 + I_8)]^2 + [(I_1 + I_5) - (I_3 + I_7)]^2} dr$$

Si l'on garde la comparaison de sinus et cosinus du processus précédent, alors le calcul effectué ici correspond à une longueur, longueur d'autant plus affirmée que la différence entre quadrants orthogonaux est importante. Plus l'alignement des structures est important, plus le signal est concentré suivant une seule direction, ce faisant, les différences entre quadrants orthogonaux en sont d'autant plus marquées. Cette méthode de partition offre l'avantage de ne pas souffrir d'une orientation partageant le maximum d'intensité sur deux quadrants consécutifs. La somme finale permet de donner une valeur d'anisotropie à la structure générale, tout en évitant les défauts d'une expression suivant  $r$  issu de la différence de longueur de quadrant.

##### b) Cartographies

La mesure d'anisotropie est un indicateur de la qualité de l'orientation des structures, aussi l'os formé par le processus de propagation de l'ostéosarcome, que nous connaissons comme une structure désorganisée, est escompté de présenter une mesure d'anisotropie remarquablement plus faible que la structure osseuse saine.

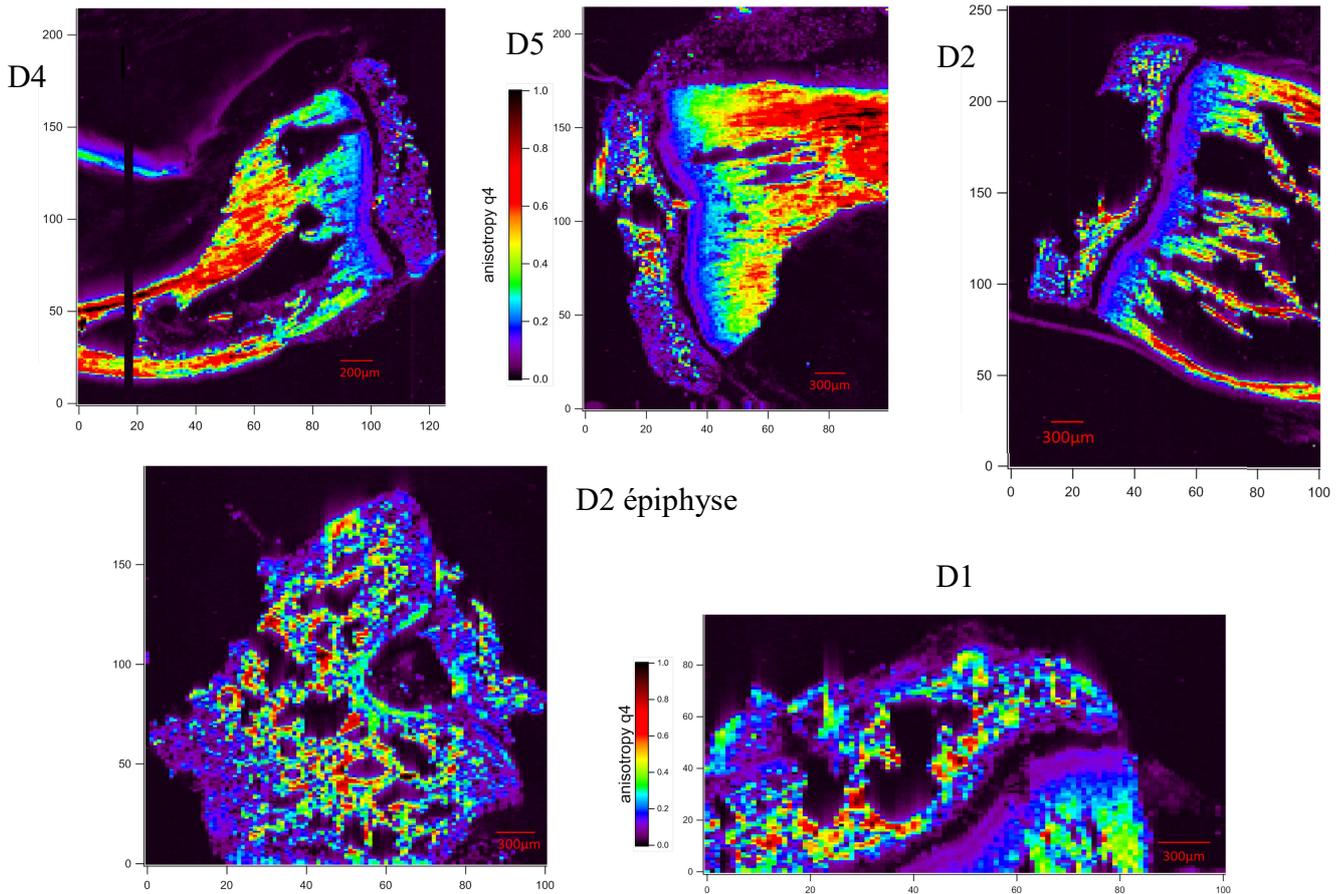


Figure 38.: Cartographies de l'anisotropie sur le spectre de diffraction 2D. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome, D2 J+13 Epiphyse et D1 J+13 Sain

Sur les cartographies ci-dessus, nous pouvons constater en premier lieu les différences de comportement entre épiphyse et diaphyse, avec une valeur d'anisotropie dans l'épiphyse très inégale pour tous les échantillons, variant de très élevé à quasi-inexistant, avec une prédominance pour les faibles valeurs dans les tibias (échantillons sauf D2 (J13S) épiphyse). Le comportement dans la diaphyse des échantillons est autrement plus intéressant, avec un gradient positif depuis le cartilage de croissance, ou plutôt la fin du second front, qui apparait cette fois de manière encore plus flagrante avec une baisse de l'anisotropie coloré après le cartilage de croissance très visible sur D5 (J7S), D2 (J13S) et D1 (J13C).

Ce comportement est observable en partie sur notre échantillon sain, et est notable sur les échantillons infectés, avec une distance entre le cartilage de croissance et un seuil de valeur à 0,6 rouge autour de 500 à 700  $\mu\text{m}$  pour chaque cas. Le phénomène semble donc relativement homogène dans la distance sur laquelle il s'effectue, après quoi l'anisotropie reste autour des mêmes valeurs, exception faite pour les bords des structures où le phénomène de surface de mesure couvrant de l'espace vide résulte sur l'effet de liseré de valeurs plus faibles des images.

Le bord inférieur droit de D4 (J7S) semble présenter une valeur d'anisotropie plus faible sur une distance plus élevée ( $\sim 800\mu\text{m}$ ), ce qui pourrait être un indicateur d'une forme de dégradation en accord avec les observations d'intensité, bien que les longueurs de plus faible intensité et anisotropie ne correspondent pas complètement. Cependant, nous n'avons observé aucune forme de corrélation entre la quantité de matière à travers l'intensité et la qualité d'orientation via l'anisotropie sur l'ensemble des autres échantillons. Et de surcroit, si le phénomène était du fait de l'ostéosarcome, celui-ci se serait trouvé plus répandu et donc vraisemblablement plus exprimé dans notre échantillon à 13 jours.

Nous observons donc par l'anisotropie un phénomène d'augmentation de la qualité d'orientation de l'os avec l'éloignement au cartilage de croissance, sans rapport avéré à l'intensité ou l'orientation. L'os trabéculaire, même fortement abimé de l'échantillon D2 (J13S), présente le même degré d'anisotropie que l'os cortical au même avancement dans la diaphyse, sans rapport avec la quantité d'os présent. Et aussi bien que pour l'orientation, aucune indication ne semble indiquer ici la production irrégulière d'os ou de dégradation dans les structures présentes qui puisse être fermement imputées à la pathologie.

### 5) Conclusions

Grâce à ces cartographies, nous avons pu effectuer l'observation et la comparaison de nos échantillons suivant plusieurs paramètres. Nous avons observé les différences entre os de l'épiphyse et de la diaphyse, avec une orientation très homogène et avec un gradient positif d'anisotropie à partir du cartilage de croissance qui finit sur des valeurs élevées dans la diaphyse, en opposition complète avec l'épiphyse.

Si les résultats suivant l'intensité et la saturation offrent des différences entre os cortical et trabéculaire, ils révèlent également par la mesure de saturation qu'un approfondissement des données liées à l'apatite gagnerait à un set up de mesures sur des angles de diffraction plus petits. Le signal en intensité de l'os trabéculaire apparaît comparativement inférieur à celui de l'os cortical, ce qui correspond à nos attentes en termes de quantités de matériel osseux.

Jusque-là, les comportements de l'orientation et de l'anisotropie ne semblent pas différer entre les échantillons à 7 jours de celui à 13 jours. Seule l'intensité, soit une mesure de la quantité d'apatite présente localement, semble avoir été impactée, en conjonction avec la perte évidente de matière de l'échantillon D2 (J13S). L'impact escompté de l'ostéosarcome sur l'orientation de la matrice osseuse ou son anisotropie n'a pas été observé, ce qui pourrait aussi bien être un fait de l'effet de courte portée à ce stade de développement de la tumeur qu'un effet longue portée pas encore fermement exprimé. Les mesures d'intensité en revanche offrent de larges différences entre échantillons, spécialement D4, D5 (J7S) et D2 (J13S), avec la structure trabéculaire à 7 jours dans un état meilleur que celui à 13 jours. C'est sur cette différence des échantillons aux deux temps de développement que nous allons désormais nous concentrer à travers l'ensemble des autres paramètres étudiés et cartographiés.

A partir de maintenant, dans le détail des résultats vis-à-vis de la structure de l'apatite et du collagène, nous concentrons notre propos sur certaines cartographies plutôt que sur une comparaison globale entre les cinq échantillons.

## **B. Analyse du signal de l'apatite**

Si nous n'avons pas réussi à mettre au point de méthode de calcul pour obtenir les dimensions des cristaux individuels par un procédé automatique, nous avons en revanche pu automatiser la mesure d'une approximation des pentes, que ce soit sur les zones de Fourier ou de Porod des spectres 1D. A partir de ces pentes et de leur intersection, nous avons pu obtenir une certaine quantité de mesures qualitatives des cristaux d'apatite

### 1) Zones de Fourier et Porod : mesure automatique des pentes

Nous rentrons maintenant dans les considérations de zones aux petits  $q$ , soit les zones de Fourier et Porod, sur lesquelles des fits peuvent résulter en une estimation de la taille moyenne des cristaux d'apatite, mais également leur forme et leur qualité d'interface avec le collagène.

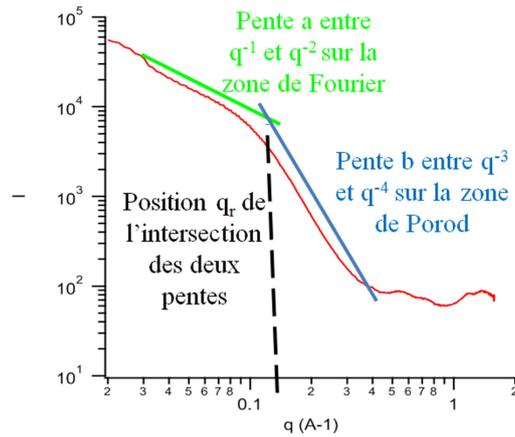


Figure 39.: Détermination des pentes sur les zones de Fourier et Porod et position du point d'intersection  $q_r$  entre les droites résultantes.

En effet, la loi de puissance que suit  $I(q)$  sur ces zones est à chaque fois de la forme  $I(q) \propto q^{-\alpha}$ . Cela permet donc sur chaque zone correctement définie de déterminer la valeur de la pente  $\alpha$  en échelle log/log, et en conséquence les paramètres de forme et de rugosité des cristaux d'apatite, et par cette méthode de les cartographier.

## 2) Cartographies de la pente dans la zone de Fourier

La pente de la zone de Fourier est calculée sur la plage de données à  $q$  compris entre  $0,04232$  et  $0,07255\text{\AA}^{-1}$ , soit à partir de la zone considérée sans saturation jusqu'à avant le début de la rupture entre les deux pentes.

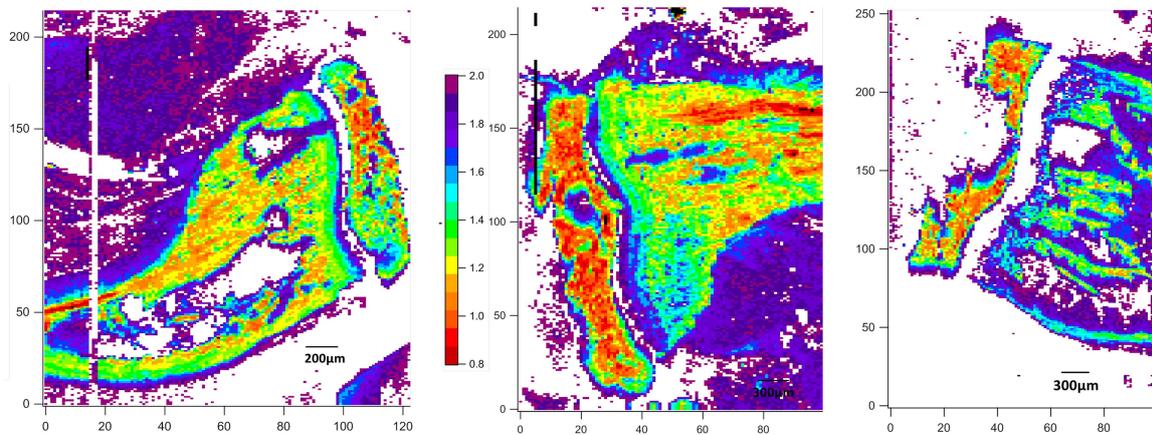


Figure 40.: Cartographies de la pente sur la zone  $0,04232$  à  $0,07255\text{\AA}^{-1}$  du spectre de diffraction 1D. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome.

Les valeurs de pentes observées dans les échantillons varient de  $-0,8$  jusqu'à  $-2,0$  là où se trouve de l'os, avec un espace blanc situé au niveau du cartilage de croissance qui de toute façon ne présente pas a priori d'apatite. Les valeurs de ces pentes sur cette zone correspondent à la forme générale des cristaux d'apatite, avec une valeur de  $-4$  correspondant à des sphères,  $-2$  à des plaquettes et  $-1$  à des aiguilles.

Si nous partons dans la diaphyse à partir du cartilage de croissance, nous avons donc des cristaux qui commencent avec des valeurs autour de  $-1,6$ , donc un compromis entre des plaquettes et des aiguilles, sans doute des plaquettes avec une dimension plus longue que les deux autres. Au fur et à mesure que nous suivons l'os dans la diaphyse, la valeur de ce paramètre apparaît comme augmentant, dans les trois échantillons, pour tendre vers  $-1$ . Ces observations tendent à indiquer une évolution de la forme des cristaux d'apatite, depuis la forme de plaquettes

allongées vers une structure de plus en plus proche de l'aiguille, ce qui se traduit probablement par une croissance longitudinale des cristaux.

A cette observation s'ajoute celle de l'épiphyse, un tissu osseux apparemment beaucoup plus homogène, qui présente des valeurs de pentes qui correspondent aux valeurs de l'os le plus éloigné du cartilage de croissance dans la diaphyse. Nous pouvons donc raisonnablement supposer que la phase minérale tend vers cette forme des cristaux d'apatite. A noter également que nous n'observons pas ici de distinctions marquées entre os trabéculaire et cortical quant à la qualité de l'apatite. Suivant cette interprétation, la diaphyse de l'échantillon à 13 jours présente des formes de cristaux d'apatite plus dans la lignée des plaquettes que ses pendants de l'échantillon à 7 jours. L'autre information sur la forme des cristaux d'apatite nous vient de la pente sur la zone de Porod.

### 3) Cartographies de la pente dans la zone de Porod

La pente sur la zone de Porod pour sa part nous renseigne sur l'interface des cristaux d'apatite, avec des valeurs à -4 pour une interface extérieure lisse, -3 pour une interface rugueuse.

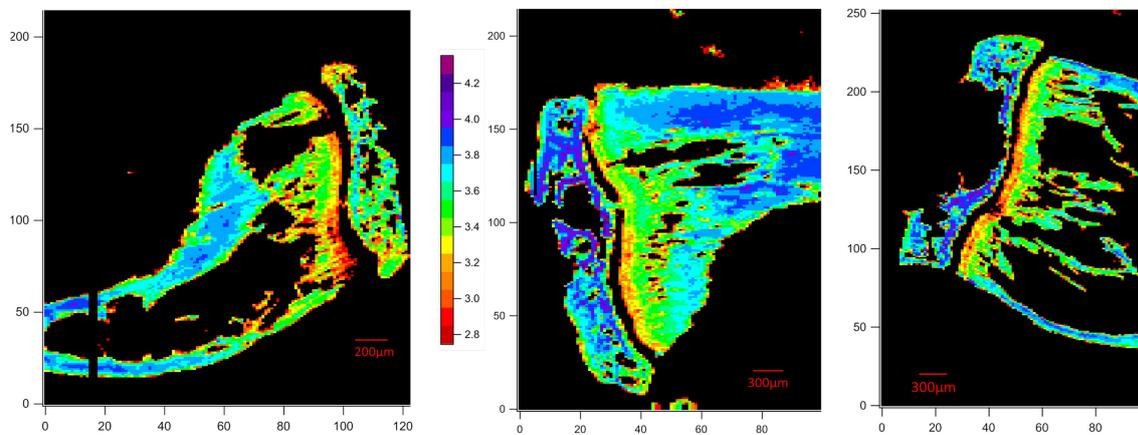


Figure 41.: Cartographies de la pente sur la zone  $0,14962$  à  $0,25077 \text{ \AA}^{-1}$  du spectre de diffraction 1D. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome.

Nous observons immédiatement un phénomène ici parallèle à celui observé sur la pente de la zone de Fourier, avec une distinction claire des comportements entre épiphyse et diaphyse, mais des tendances générales universelles pour les trois échantillons. Nous avons ici aussi une évolution dans la diaphyse en partant du cartilage de croissance, avec des valeurs de départ à environ -3, donc une surface extérieure rugueuse, qui évolue ensuite lentement vers des valeurs proches de -4 qui correspondrait à une surface lisse.

Une fois de plus, les valeurs trouvées dans les espaces de la diaphyse les plus éloignés du cartilage de croissance tendent à correspondre à ce qui peut être observé dans l'épiphyse, certes un peu troublé dans l'échantillon D4 (J7S) qui se trouve plutôt autour de -3,6, mais indique malgré tout une distinction de la rugosité de l'interface extérieure dans les échantillons. Nous pouvons ici considérer qu'il existe une forme de lien entre la forme des cristallites et la rugosité de l'interface, puisque nous retrouvons le même phénomène de gradient dans l'os trabéculaire. La corrélation entre les deux pour l'os trabéculaire apparaît même chez l'échantillon D2 (J13S), qui présente des formes de cristallites plus proches de la plaquette, en conjonction avec des valeurs indiquant un degré de rugosité plus élevé que les échantillons à J7S.

A partir des valeurs de ces pentes, Fourier et Porod, il est possible de calculer la position en  $q$  de l'intersection de celles-ci, ce qui nous offre une estimation de l'évolution du périmètre de ces cristaux.

#### 4) Intersection entre les pentes, périmètre des cristaux d'apatite

Un paramètre assez peu évident est apparu à partir de la mesure des pentes, leur point d'intersection, qui permet une approximation du rayon de gyration des cristaux d'apatite, et à partir de là du périmètre des cristaux.

##### a) Principe, mesure et validité

Nous avons vu comment par réduction linéaire nous obtenions le paramètre de pente des fits linéaires locaux, dans la suite de ceci, nous pouvons alors effectuer le calcul :

$$\beta = \frac{\sum_{q_0}^{q_f} \log(I(q)) - \alpha q}{q_f - q_0}$$

Nous avons alors deux équations de droites de la forme  $\alpha q + \beta$ , à partir desquelles nous pouvons déterminer la position d'intersection  $q_r$  :

$$q_r = \frac{\beta_1 - \beta_2}{\alpha_2 - \alpha_1}$$

L'élément que nous mesurons par ce paramètre  $q_r$  est une évaluation de l'évolution du paramètre de périmètre des cristaux d'apatite. En effet, en se basant sur l'exploitation par Sasfit des données observables sur la ligne horizontale 56 en partant du haut de l'échantillon D5 (J7S), nous pouvons voir sur les graphes suivants le caractère de corrélation entre une valeur calculée du périmètre et la valeur correspondant à notre coordonnée d'intersection des pentes  $d$ . Cette valeur du périmètre est simplement calculée à partir des résultats Sasfit des dimensions  $b$  et  $c$  des cristaux, avec en conséquence du modèle de parallélépipède rectangle une valeur de  $p=2(b+c)$ .

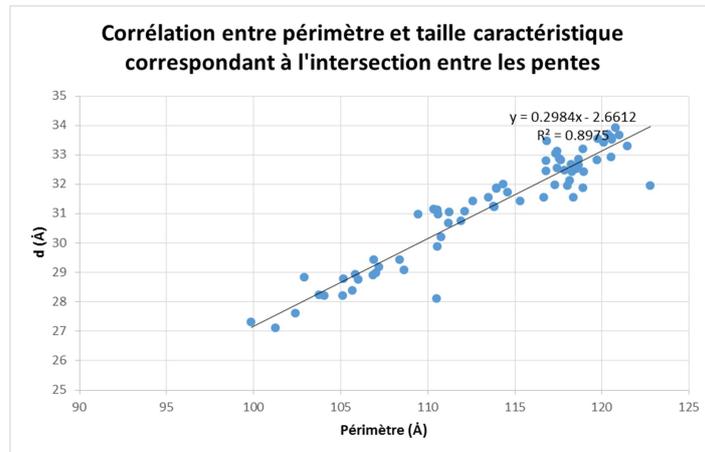


Figure 42.: Corrélation entre le périmètre calculé à partir des paramètres  $b$  et  $c$  de taille de cristaux d'apatite et la taille caractéristique correspondant à l'intersection entre les pentes sur une ligne complète de clichés (n°56 partant du haut) de l'échantillon D5 (J7S).

Une méthode alternative d'approche de la valeur du périmètre est de passer par la mécanique du Kratky plot<sup>30</sup>. Le concept de ce type de mesure est de représenter en fonction de  $q$  la valeur de  $q^2I(q)$ , dont le maximum  $q_{max}$  offre une relation à la valeur du rayon de gyration  $R_G=3^{1/2}/q_{max}$ . Or, nous avons modélisé les représentations des Kratky plot pour des particules de périmètre rectangulaire d'une valeur de 120Å (graphe ci-dessous).

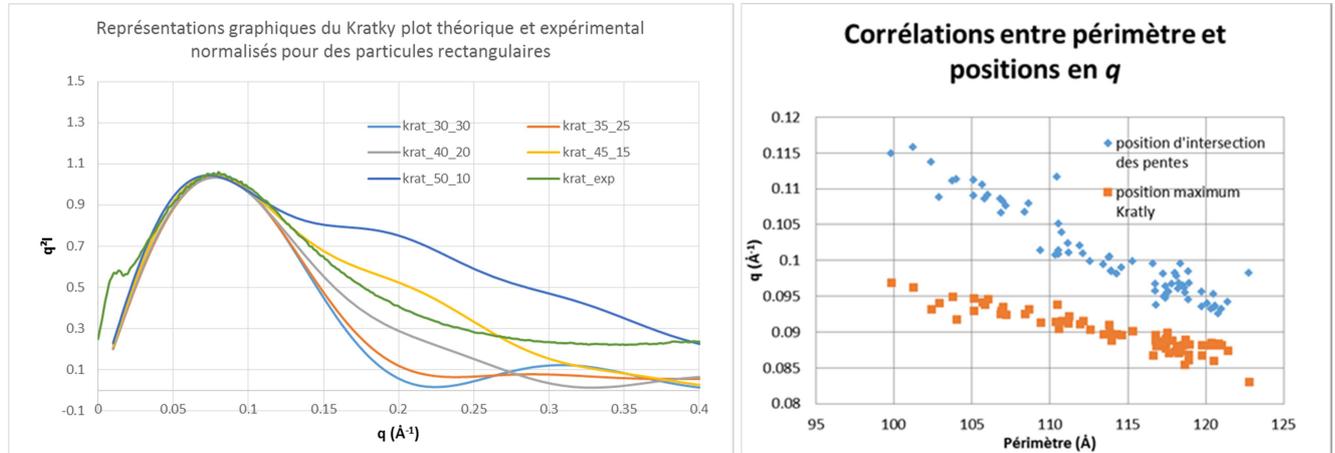


Figure 43.: A gauche, graphes des différents Kratky plot pour des particules rectangulaires avec différentes distributions des valeurs de côté, comparés à un Kratky plot expérimental ajusté à la mesure de 120Å. A droite, relation entre position du maximum du Kratky plot, position de l'intersection entre les pentes et périmètre calculé sur la ligne 52 de l'échantillon D5 (J7S).

Le premier constat sur nos données simulées est que quelles que soient les proportions relatives des côtés du rectangle formé par le périmètre de la surface observée via SAXS, le maximum  $q_{max}$  du Kratky plot ne varie pratiquement pas. La pente après ce maximum ne permet en revanche pas de dégager la forme de ce périmètre et les proportions impliquées, en cause les différents éléments outre l'apatite responsable du signal SAXS. D'autre part, la mesure de la position de  $q_{max}$  présente également un degré de corrélation intéressant avec  $q_r$ . Si une analyse Kratky de nos spectres SAXS ne paraît pas offrir de nouvelle information, cette dernière observation semble nous conforter dans le lien entre périmètre et rayon de gyration  $R_G$ .

Si nous n'avons pas ici la nature de la relation mathématique entre les deux données du périmètre et de  $R_G$ , le degré de corrélation paraît ici suffisant pour se servir de ce dernier comme un indicateur des comportements de périmètre des cristaux d'apatite dans nos structures. A plus forte raison que la ligne employée pour cette démonstration a été particulièrement sélectionnée pour inclure les différents types d'os, du trabéculaire démarrant au cartilage de croissance pour finir dans l'os cortical.

## b) Cartographies

Nous avons donc une corrélation entre périmètre des cristaux d'apatite et la position de l'intersection des pentes, ce qui nous suffit pour essayer d'observer plus avant les phénomènes d'évolution du périmètre dans l'os comme entre nos différents échantillons.

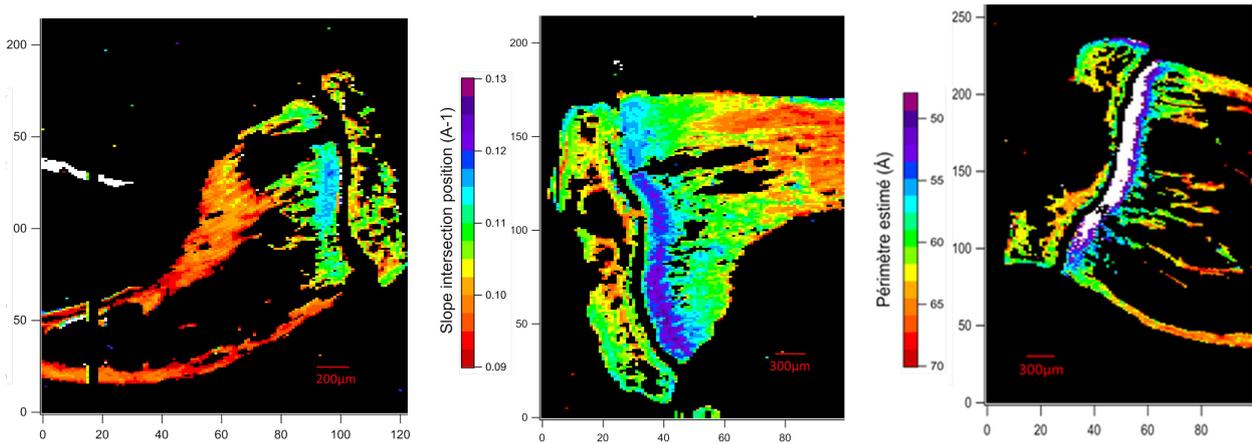


Figure 44.: Cartographies de la position en  $q$  de l'intersection des pentes des zones de Fourier et Porod. De gauche à droite, échantillons D4 J+7 Sarcome, D5 J+7 Sarcome, D2 J+13 Sarcome.

Nous retrouvons ici encore un comportement d'évolution dans la diaphyse des valeurs observées corrélée avec la distance au cartilage de croissance. Plus nous nous éloignons de celui-ci, plus les valeurs observées diminuent, ce qui correspond à des valeurs de  $R_G$  et donc du périmètre qui augmentent. Nous avons ici entre les échantillons des fluctuations entre les valeurs de départ au niveau du cartilage de croissance, mais toutes semblent se stabiliser à des valeurs correspondant à un périmètre qui aurait augmenté. Les valeurs de position  $q$  proches du cartilage de croissance correspondant à des valeurs de l'ordre de  $40\text{\AA}$ , là où les valeurs de l'os plus loin dans la diaphyse va jusqu'à  $70\text{\AA}$ . On pourrait parler pour l'évolution des périmètres ici observée d'un phénomène d'épaississement des cristaux d'apatite.

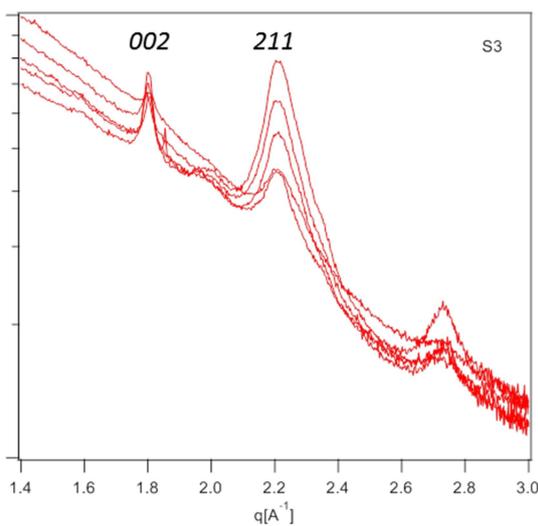
Au vu de la corrélation entre le gradient de périmètre des cristaux d'apatite et l'éloignement au cartilage de croissance, site de production du tissu osseux dans le cadre de la croissance longitudinale, nous estimons que l'évolution de la taille des cristaux d'apatite, et avec cela de leur forme et interface, est le fait du vieillissement osseux. Dans ce cadre, le tissu osseux situé dans l'épiphyse serait déjà mature, avec l'os de la diaphyse produit au niveau du cartilage de croissance en maturation qui s'exprime suivant les gradients de l'apatite.

Il semblerait ici que nous observions des distinctions entre diaphyse éloignée et épiphyse, avec des valeurs semblant indiquer un plus grand périmètre des cristaux dans la diaphyse mature que dans l'épiphyse. Nous observons ici que le phénomène d'épaississement pourrait agir à différentes vitesses, au vu des différences de longueur de zone de gradient entre les échantillons, avec ici plus de similitudes entre les échantillons D4 (J7S) et D2 (J13S). Nous avons donc constaté trois cas d'évolution, avec le vieillissement, de paramètres des cristaux d'apatite de l'os dans nos échantillons.

Ayant l'opportunité de travailler aux grands angles, nous avons voulu observer rapidement si des phénomènes similaires pouvaient avoir lieu au niveau de la structure cristalline de l'apatite.

### 5) Structure cristalline des cristaux d'apatite par WAXS

A partir du dispositif d'analyse SAXS disponible au laboratoire IPR, qui peut être modifié pour une analyse aux grands angles WAXS, nous avons cherché rapidement à observer les deux principaux pics cristallographiques de l'apatite cristalline. Le dispositif employé ici est beaucoup moins fin, avec une résolution du faisceau donnant une surface diffractante supérieure d'un ordre 10 entre les résultats synchrotron et ceux effectués à l'IPR.



hkl	d (nm)	q (Å <sup>-1</sup> )	I <sub>relative</sub>
100	0,816	0,77	8
101	0,526	1,19	3
110	0,471	1,33	2
200	0,408	1,54	6
111	0,389	1,62	6
201	0,351	1,79	2
002	0,344	1,83	36
102	0,317	1,98	8
210	0,308	2,04	16
211	0,281	2,24	100
112	0,278	2,26	47
300	0,272	2,31	65
202	0,263	2,39	22
301	0,253	2,48	5
212	0,2297	2,74	6

Figure 45.: A gauche, exemples de spectres 1D WAXS issus de D5 (J7S). A droite, tableau récapitulatif des pics de Bragg de l'apatite tiré de Markovic et al<sup>23</sup> avec positions en q calculées.

Les paramètres étudiés sur ces pics sont ici l'intensité, traduisant fatalement une plus forte quantité comparative de structure cristalline, et la position du pic dont de faibles fluctuations pourrait indiquer l'implication lors de l'évolution de forme, interface et taille des cristaux de l'inclusion d'ions dans la structure.

**a) Pic de l'apatite 002**

Le premier pic observé est celui du plan cristallin 002, le premier avec une très forte intensité de diffraction. L'étude ici ayant pour but d'effectuer un rapide aperçu, l'analyse n'a porté que sur l'échantillon D5 (J7S).

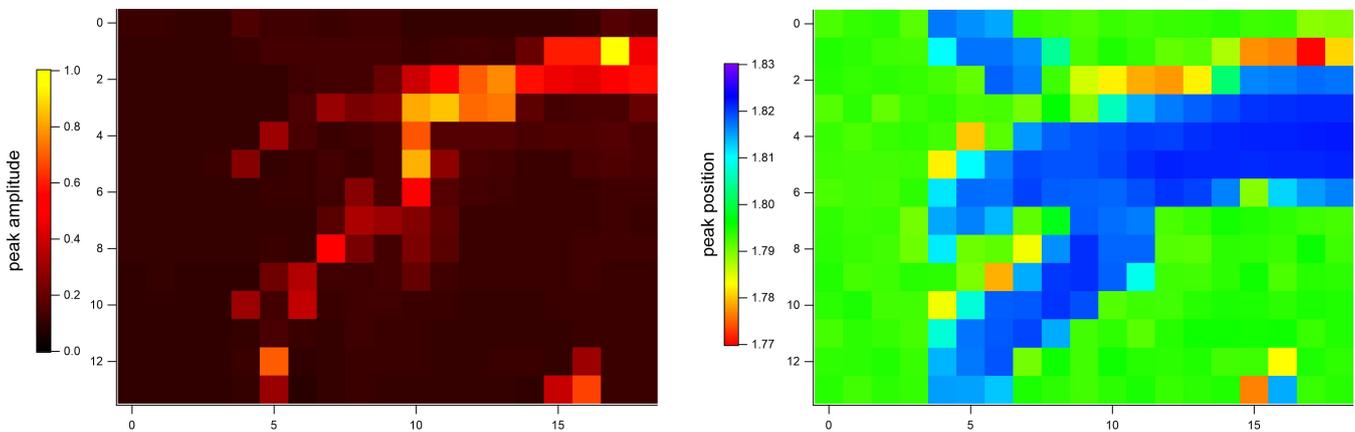


Figure 46.: Cartographies WAXS du pic 002 de l'apatite cristalline de l'échantillon D5 infecté à 7 jours. A gauche, l'intensité, à droite la position du maximum du pic.

La forme de l'échantillon n'est pas ici tout à fait reconnaissable au niveau de la tête, la résolution de la cartographie faisant apparaître un creux correspondant aux deux trous massif de la structure trabéculaire en face d'un autre dans l'épiphyse. Nous avons une forme d'augmentation de l'intensité des pics avec la progression dans la diaphyse qui correspond avec l'observation faite sur l'évolution de l'intensité générale en SAXS qui nous indique que l'os plus âgé semble présenter des quantités d'apatite plus importantes. La mesure WAXS confirme cependant la présence d'apatite dans l'ensemble de l'échantillon, et par là même le lien avec la figure de diffusion centrale par SAXS.

De la même manière, une certaine évolution minimale de la position du pic paraît transparente, mais la résolution faible associée à l'aspect très faible des fluctuations ne nous permet pas d'en tirer plus avec ce jeu de données.

### b) Pic de l'apatite 211

Le deuxième pic de l'apatite cristalline dont l'intensité convient à une observation facile avec le dispositif disponible est le pic à 211. Celui-ci est plus intense que le pic à 002, ce qui permet une meilleure distinction des variations d'intensité.

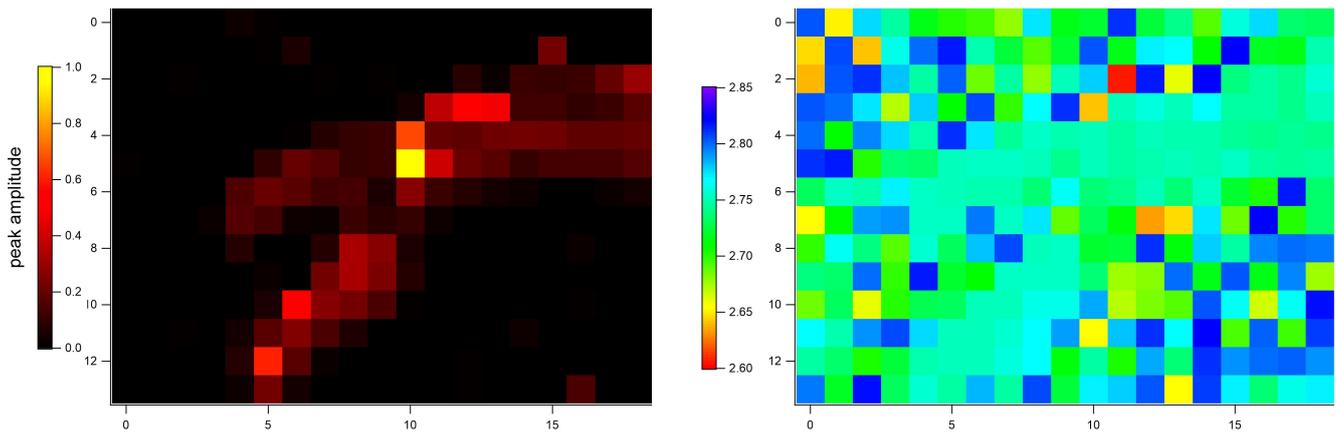


Figure 47.: Cartographies WAXS du pic 310 de l'apatite cristalline de l'échantillon D5 infecté à 7 jours. A gauche, l'intensité, à droite la position du maximum du pic.

Nous avons ici en revanche des phénomènes sans rapport avec les différents gradients de valeurs observés un peu partout ailleurs, avec une intensité apparemment plus forte sur le bord inférieur et spécialement au milieu, peut-être à un point de forte densité osseuse en dehors de l'espace cartographié au synchrotron.

La position du pic ne nous offre pas plus de matériel exploitable à cette résolution. Nous avons passé pour cette petite partie WAXS les procédés employés pour obtenir les mesures, puisque nous détaillons ci-dessous dans la partie sur les pics du collagène une version automatisée de ceux-ci.

## C. Analyse du signal de l'organisation latérale des fibrilles de collagène

La structure osseuse est un arrangement complexe de tropocollagène et de cristaux d'apatite, avec quantité d'autres éléments mineurs, qui sont assemblés suivant une structure hiérarchique. Le tropocollagène constitue l'essentiel de la matrice dans laquelle se trouvent les cristaux d'apatite. Les assemblages de molécules que sont les tropocollagènes sont à leur tour structurés, et cette structuration s'exprime suivant des interdistances qui se traduisent par des pics ou des bosses dans les spectres 1D. Nous avons identifié deux bosses correspondant à de telles interdistances dans la structure, réalisé des cartographies du paramètre de maille calculé à partir de ces valeurs, ainsi que réalisé un certain travail sur les pics secondaires dus à l'espacement  $D=67\text{nm}$  entre tropocollagènes sur l'échantillon D5 (J7S).

### 1) Pics de diffraction des fibrilles du collagène

Nous avons vu plus tôt que des interdistances spécifiques dans les structures et ultrastructures se traduisent en SAXS par l'apparition de pics de diffraction. Le signal associé au collagène se traduit ici par l'apparition de deux bosses dans le spectre 1D situés autour des valeurs de  $q$  à  $0,5\text{\AA}^{-1}$  et  $0,7\text{\AA}^{-1}$ .

**a) Méthode automatique de mesure**

Nous nous sommes intéressés à deux informations en particulier vis-à-vis de ces pics de diffraction pour cartographie, l'amplitude du pic, et sa position, correspondant respectivement au degré relatif d'ordre des structures et les interdistances de celles-ci. Cela se traduit concrètement par les coordonnées en  $q$  et  $I$  du maximum de ces pics sur les spectres 1D. Les pics auxquels nous nous intéressons ici sont ceux de l'ultrastructure du collagène.

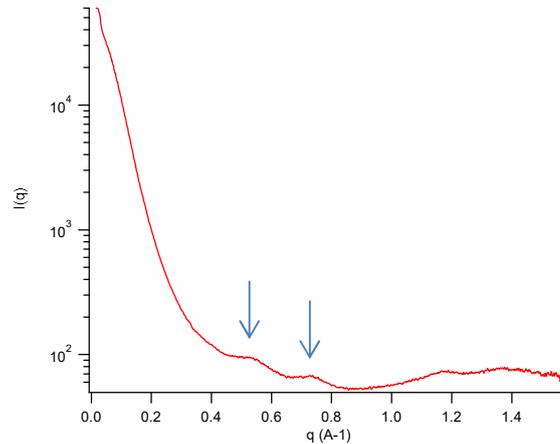


Figure 48.: Spectre 1D en échelle logarithmique de matériel osseux.

On peut voir indiquées sur l'exemple ci-dessus les deux bosses correspondant à ces structures, visibles certes uniquement grâce à l'échelle logarithmique. Ceux-ci représentent cependant des extremums locaux, qu'il est possible de déterminer par des méthodes mathématiques. Nous en avons essayé plusieurs, notamment le fit local par des fonctions polynomiales, qui malheureusement gérait plutôt mal l'influence de la fin de pente de la zone de Porod ou les variations de positions trop importantes. La méthode retenue au final passe par la dérivée seconde de la fonction  $I(q)$ ,  $d^2I(q)/dq^2$ .

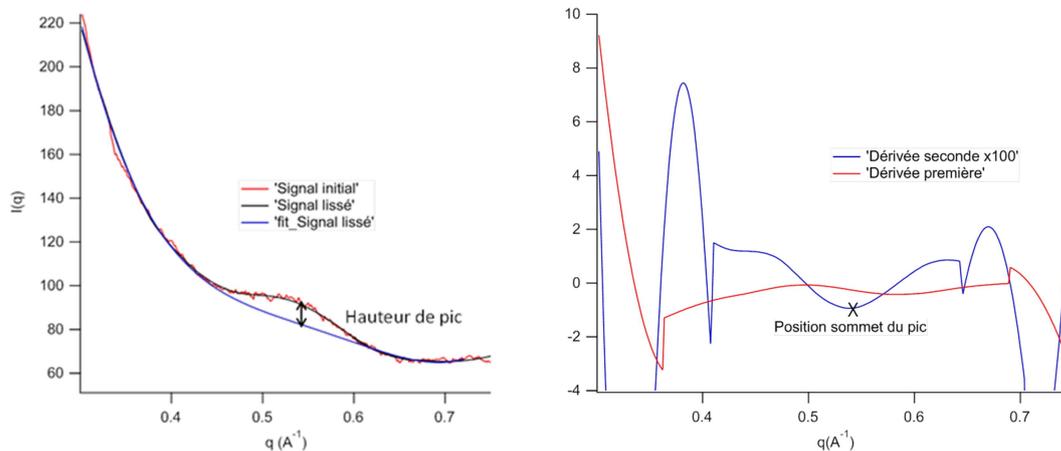


Figure 49.: A gauche, graphes du signal d'un pic d'ultrastructure de collagène bruité et lissé. A droite, dérivées première et seconde du signal lissé.

Le premier élément à prendre en compte est que le graphe du signal sur lequel nous travaillons est bruité, créant une importante quantité de fluctuations se traduisant par une interférence dans notre méthode de détermination de position de pic. Nous effectuons donc une sélection de 200 points de mesure autour de la position nominale du pic, avant de générer un lissage de cette fonction grâce à une fonctionnalité LabVIEW, qui utilise des séries ici de 50 points pour lisser chaque point suivant une méthode des moindres carrés.

Nous pouvons voir sur les figures au-dessus l'impact de ce processus sur la figure du signal, mais aussi sur les 50 points à chaque extrémité de la dérivée première. Si techniquement la position du maximum pourrait être trouvée à partir de la dérivée première dans le cadre d'une bosse bien définie, il arrive suffisamment souvent que celle-ci ne soit pas marquée par un changement de pente, n'offrant alors pas de valeur pour laquelle  $dI(q)/dq = 0$  dont la coordonnée correspondrait à notre position de pic recherchée. Cela dit, le point le plus haut du pic correspond à un minimum local de la variation de pente du signal.

Aussi effectuons-nous une dérivée seconde, dont le point le plus bas correspond à cette caractéristique de variation minimale de la pente et le point de courbure maximale. Comme nous pouvons le voir sur le graphe associé, il est nécessaire au préalable d'effectuer une sélection de la zone centrale de la figure de la dérivée seconde afin d'exclure de la mesure du minimum les fluctuations aberrantes aux extrémités induites par le processus de lissage.

Afin de déterminer la hauteur du pic, il convient de soustraire l'influence de la pente de Porod du processus. Le procédé est effectué sur la pente lissée afin d'éviter l'influence du bruit. Une sélection des points situés avant et après la zone de la bosse/pic de l'ultrastructure du collagène est faite puis employée via un fit hyperbolique pour obtenir une approximation de la pente en l'absence de bosse. Cette courbe est ensuite soustraite de notre signal lissé, ce qui permet alors de mesurer à la coordonnée précédemment déterminée l'amplitude du pic d'ultrastructure. Cette méthodologie est applicable aux deux pics d'ultrastructure du collagène, ce qui nous permet derrière de nous intéresser au paramètre de maille de la celle-ci.

#### **b) Cartographies de la première bosse**

La première bosse d'ultrastructure du collagène observé sur les spectres 1D à partir de l'origine se situe autour de  $0,53 \text{ \AA}^{-1}$ , ce qui correspond à une valeur de l'ordre de 1,2 nm. Les paramètres que nous avons cartographiés sont la position du maximum de la bosse, pour observer l'évolution dans l'échantillon de l'interdistance entre les tropocollagènes, et l'intensité de ce maximum représentatif du degré d'expression de ladite interdistance. Nous n'avons pas pu mettre au point de solution de mesure efficace et automatisée pour la largeur à mi-hauteur de la bosse qui aurait pu nous donner une estimation de la qualité de l'organisation suivant cette superstructure.

Nous avons observé en amont de la mise au point du système de cartographie sur les spectres individuels, les bosses d'ultrastructure du collagène ne sont pas à des positions fixes dans les échantillons, ce qui nous amené à développer le système de cartographie de la position du maximum de celles-ci en sus de la valeur de ce maximum par rapport à la courbe de fin du signal de l'apatite.

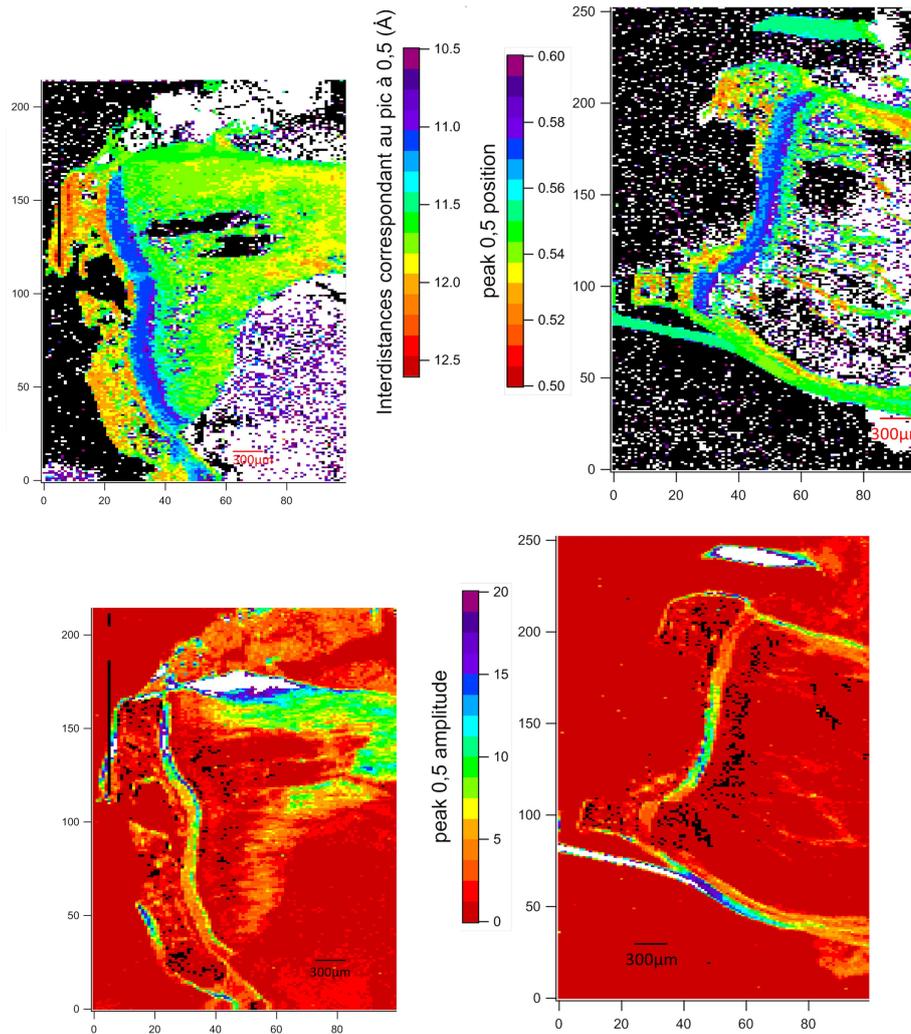


Figure 50.: En haut, cartographies de la position dans le spectre 1D du maximum de la bosse d'ultrastructure à  $0,53\text{\AA}^{-1}$  du collagène. En bas, cartographies de l'intensité de la bosse d'ultrastructure du collagène. A gauche l'échantillon D5 infecté à 7 jours, à droite l'échantillon D2 infecté à 13 jours.

Le premier constat sur les cartographies ci-dessus est l'aspect prononcé de l'amplitude des pics dans le cartilage de croissance, là où l'os trabéculaire en sortie de celui-ci présente une intensité si faible qu'elle est au niveau du bruit de fond, bien que présente. Cette même intensité se retrouve sur la partie extérieure de l'épiphyse, et correspond sans doute au cartilage hyalin. Or si le caractère organisé du collagène dans le cartilage hyalin est parfaitement normal (partie Polscope IV.A.1), cela va à l'encontre de ce que l'on est en droit d'attendre de cartilage de croissance sain, c'est-à-dire du collagène désorganisé. Nous avons vérifié sur des spectres individuels, et les échantillons infectés présentent effectivement du signal d'organisation latérale et longitudinale du collagène au niveau du cartilage de croissance, à l'opposé de ce qui est observable sur l'échantillon de contrôle D1.

Nous avons dans D5 (J7S) un effet clair d'évolution de la position du pic dans la diaphyse en corrélation avec la distance au cartilage de croissance, et qui tend vers les valeurs observables dans l'épiphyse, indiquant semble-t-il un autre phénomène d'évolution de la structure osseuse. L'évolution des valeurs de  $q$  dans la diaphyse va décroissant, ce qui indiquerait une évolution de l'interdistance croissante. Le phénomène est plus discret dans l'échantillon D2 (J13S), mais le peu observable paraît aller dans le même sens. Si l'intensité des pics est beaucoup moins prononcée dans l'épiphyse, on retrouve une évolution dans la diaphyse de D5 (J7S) tout à fait

similaire à celle de l'intensité diffractée, ce qui confirme un phénomène d'évolution de l'épaisseur de l'échantillon ou plutôt de densification osseuse. L'échantillon D2 (J13S) en revanche sur ce point ne nous donne presque pas d'éléments dans l'os trabéculaire, et des valeurs assez constantes dans l'os cortical, bien que ce soit assez difficile de distinguer par cette cartographie entre os et tendon pour la partie basse.

Les zones qui apparaissent blanches en intensité en dehors de l'os même sont indicatrices de tendon, un élément du corps composé essentiellement de collagène très bien aligné et donc résultant sur un pic de diffraction d'une forte intensité. Nous avons aussi au-dessus des deux échantillons des zones de fibres musculaires qui apparaissent nettement en intensité, mais avec des valeurs de positions tellement éloignées qu'elles n'apparaissent pas ici sur l'échelle. Reste à voir si les mêmes comportements sont observables en relation avec les mesures effectuées sur le second pic d'ultrastructure du collagène.

### c) Cartographies de la seconde bosse

La seconde bosse d'ultrastructure du collagène observée sur les spectres 1D se situe pour sa part à partir de  $0,7 \text{ \AA}^{-1}$ , donc sur des interdistances plus petites que celles de la bosse précédente de l'ordre de  $9 \text{ \AA}$ .

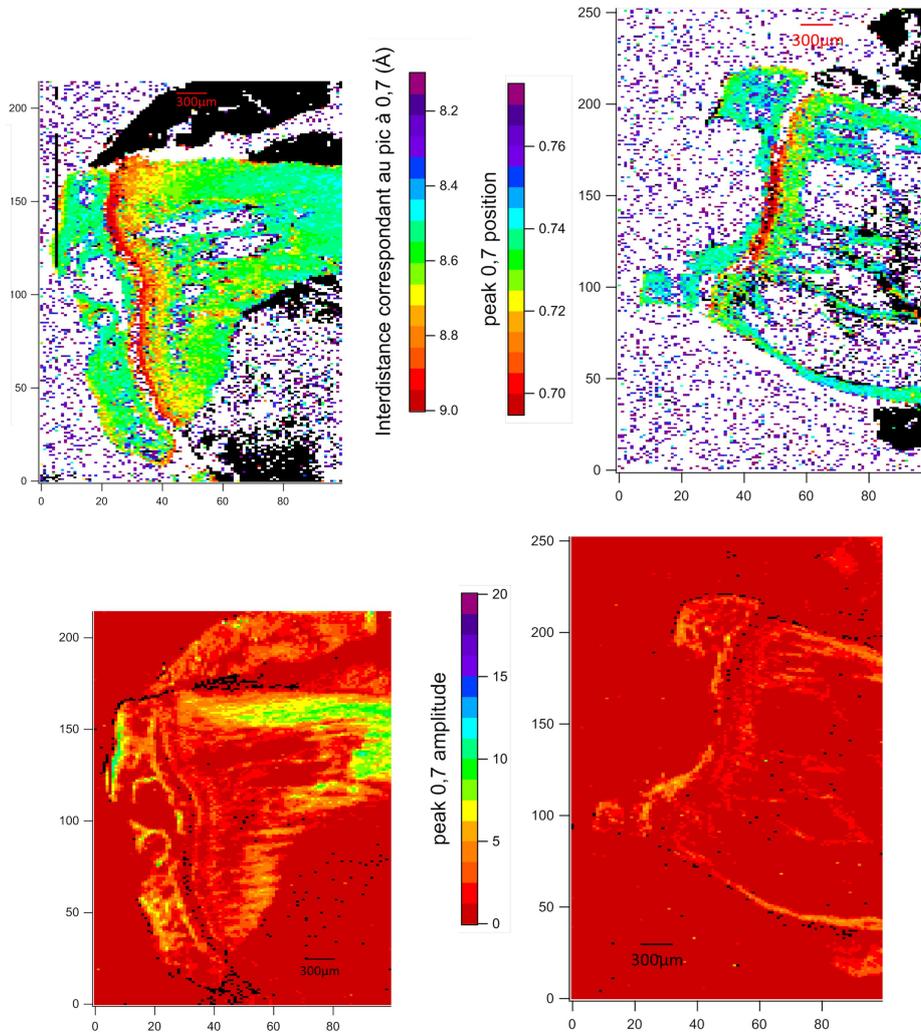


Figure 51.: En haut, cartographies de la position dans le spectre 1D du maximum de la bosse d'ultrastructure à  $0,7 \text{ \AA}^{-1}$  du collagène. En bas, cartographies de l'intensité de la bosse d'ultrastructure du collagène. A gauche l'échantillon D5 infecté à 7 jours, à droite l'échantillon D2 infecté à 13 jours

Nous retrouvons pour ces paramètres des tendances très similaires à celle observées sur le pic à  $q=0,53\text{\AA}^{-1}$ , que ce soit l'évolution de la position du pic selon un gradient depuis le cartilage de croissance qui tend vers les valeurs de l'épiphyse, le caractère très excentré des valeurs dans ledit cartilage, ou les phénomènes dans la localisation des différentes intensités de pic. Cependant, ce pic ne semble pas apparaître dans le cartilage de croissance même infecté, ce qui tend à laisser penser qu'il s'agit d'un signal propre à la structure osseuse.

Nous remarquons dans un premier temps l'absence des zones saturées en intensité identifiées comme du tendon, mais pas nécessairement des fibres musculaires, mais nous observons en revanche une forme de corrélation de l'intensité de l'amplitude dans l'os avec celui de la bosse à 0,5. Cette forte corrélation entre les variations d'intensité et de position avec celles de la bosse de collagène à 0,5 est un élément important de notre interprétation de cette bosse comme associée au collagène. A cela s'ajoute des résultats WAXS montrant des cas d'absence de la bosse déjà excentrée par rapport à la valeur théorique de  $q=0,77\text{\AA}^{-1}$  alors que les autres pics cristallins observés sont très intenses.

Le deuxième constat est celui de la direction du gradient dans l'évolution de la position du pic, inverse à celle du pic à 0,54, qui donc indique un phénomène de contraction de cette interdistance avec la distance au cartilage de croissance. Nous avons donc deux phénomènes d'évolution d'interdistances de l'ultrastructure du collagène en conjonction d'une évolution de la forme et taille des cristaux d'apatite. Nous avons donc cherché à obtenir à partir des valeurs de position des pics une meilleure idée de l'organisation du collagène dans la structure osseuse par le calcul du paramètre de maille dans le plan d'observation.

## 2) Paramètre de maille

Nous avons vu l'évolution de la position des deux bosses que nous avons associé à l'organisation, au packing, latéral des tropocollagènes. Si la première bosse est connue, nous avons fait remarquer l'absence de littérature sur la deuxième en lien avec le collagène. Si les résultats ont présenté la seconde bosse comme issue de l'organisation du collagène tel un fait allant de soi, ceci est le résultat des calculs relatifs au paramètre de maille correspondant.

Le paramètre de maille est un paramètre utilisé en cristallographie de la valeur de distance entre les mailles élémentaires d'une structure cristalline. Etant donné le caractère de répétition des structures dans l'espace des fibrilles de collagène, nous avons appliqué cette théorie pour déterminer la distance entre tropocollagènes, et pouvoir cartographier une éventuelle évolution de ce paramètre dans l'échantillon.

### a) **Théorie et calcul**

Tout d'abord, il convient de noter que cette forme d'organisation ne s'applique que dans deux dimensions, le paramètre  $c$  suivant la longueur des fibrilles n'étant pas observable par SAXS. Les valeurs en  $q$  des positions des pics d'ultrastructure correspondent respectivement aux paramètres de la structure cristalline dans l'espace réciproque.

Si l'on considère que nous sommes dans le cas d'une structure à faces centrées dans le plan, alors il est possible de considérer que les pics d'ultrastructure observés correspondent aux plans réticulaires en (1 ;1) et (2 ;0), les premiers à apparaître en cristallographie. Nous observons donc les pics correspondant à  $q_{11}$  et  $q_{20}$  dans les pics d'ultrastructure. Or, si les deux bosses sont effectivement dues au tropocollagène dans un cas de contact ou proche de contact, le calcul du paramètre de maille correspondant à l'indexation correcte des bosses comme  $q_{11}$  et  $q_{20}$  doit nous donner une distance  $d$  constante, confirmant la corrélation entre les fluctuations des deux positions des bosses.

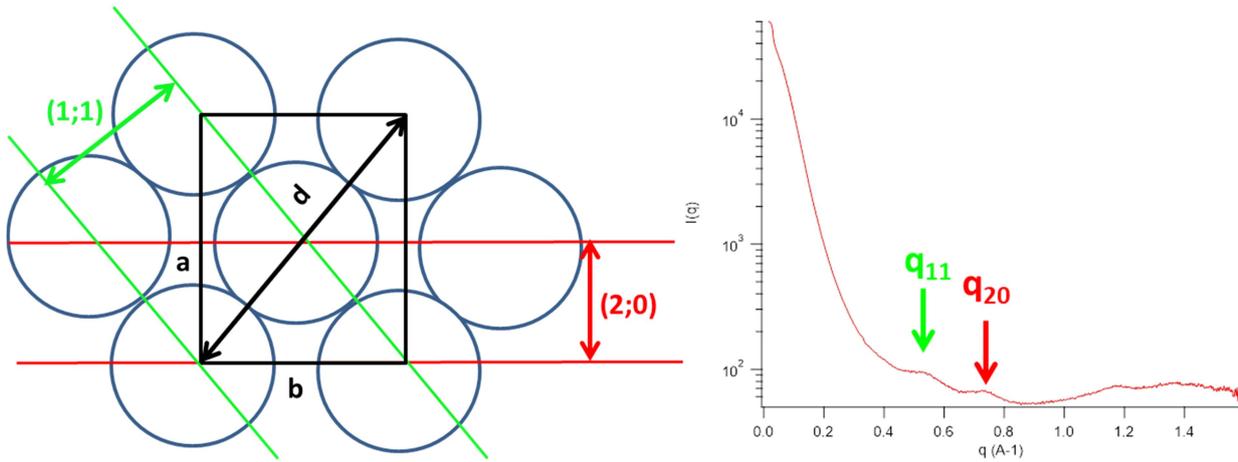


Figure 52.: A gauche, exemple de structure face centrée en cristallographie et avec les dimensions  $a$  et  $b$  avec lesquelles nous travaillons ici, et les plans réticulaires  $(2;0)$  et  $(1;1)$ . A droite, bosses correspondant aux plans réticulaires.

Le paramètre de maille  $d$  de la structure, que nous recherchons ici pour une estimation du comportement de la structure cristalline, se présente, avec  $a^*$  et  $b^*$  les paramètres réciproques de  $a$  et  $b$  de la maille cristalline, tel que :

$$d = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{avec} \quad a = \frac{2\pi}{a^*} \text{ et } b = \frac{2\pi}{b^*}$$

$$\text{Soit: } q_{20}^2 = 4a^{*2} \text{ et } q_{11}^2 = a^{*2} + b^{*2} \text{ ou } q_{11}^2 = 4a^{*2} \text{ et } q_{20}^2 = a^{*2} + b^{*2}$$

Si nous effectuons le calcul pour les deux cas de figure, nous obtenons dans le premier cas  $a=18\text{\AA}$  et  $b=15,8\text{\AA}$ , et dans le second  $a=23,7\text{\AA}$  et  $b=9,7\text{\AA}$ . Ces résultats confirment la première indexation, la seconde apparaissant plutôt invraisemblable.

$$\text{Soit : } a^{*2} = \frac{q_{20}^2}{4} \text{ et en conséquence } b^{*2} = q_{11}^2 - \frac{q_{20}^2}{4}$$

$$\text{Nous avons alors : } a^2 = \frac{16}{q_{20}^2} \text{ et } b^2 = \frac{16\pi^2}{4q_{11}^2 - q_{20}^2}$$

Et donc un paramètre de maille de la structure dans le plan du collagène :

$$d = 4\pi \sqrt{\frac{1}{q_{20}^2} + \frac{1}{4q_{11}^2 - q_{20}^2}}$$

A partir des mesures de position des pics d'ultrastructure du collagène précédents, il est possible de remonter ainsi à un paramètre de maille pour celle-ci.

## b) Cartographies

A partir des cartographies des positions de pics telles que précédemment, nous avons pu réaliser de nouvelles cartographies de la taille de la maille du collagène dans nos échantillons. Sur l'exemple de l'échantillon D5 (J7S) ci-dessous, nous obtenons à partir des calculs effectués un ensemble quasi-constant à  $2,33 \pm 0,06 \text{\AA}$  qui semble confirmer la relation de la seconde bosse comme étant un signal lié au collagène osseux, mais également l'indexation ici considérée.

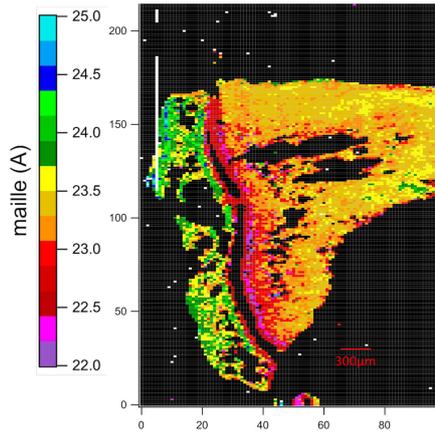


Figure 53.: Cartographies de la taille des mailles du collagène de l'échantillon D5 infecté à 7 jours.

Nous avons une fois de plus des comportements qui diffèrent largement entre épiphyse, diaphyse et cartilage de croissance. Ce dernier présente des valeurs plus basses de plusieurs Angströms que le reste des échantillons, et qui fait apparaître un zone de transition entre le collagène désorganisé du cartilage de croissance et le tissu osseux.

En dehors de la zone proximale du cartilage de croissance, nous avons des résultats différents mais avec une homogénéité similaire dans l'épiphyse et la diaphyse, avec des variations de la distance ne dépassant pas 2,5%, ce qui peut être en partie imputable à la barre d'erreur. Si le comportement dans l'épiphyse est assez peu surprenant au vu des faibles variations de la position des bosses dans cette partie de l'os, c'est surtout le même comportement dans la diaphyse qui est significatif.

En effet, le caractère très faible des variations, couplé à une absence de distinction entre le matériel trabéculaire et cortical prouve ici que les fluctuations des deux bosses sont parfaitement corrélées, établissant la relation de la seconde bosse au signal du tropocollagène. Il est de plus intéressant de noter que cette seconde bosse est, dans nos échantillons, spécifique à l'os, vu qu'elle n'apparaît pas dans les zones identifiées comme du tendon.

La conclusion possible de ce que nous observons ici est un phénomène de réorganisation du collagène en conjonction de l'évolution de la taille des cristaux d'apatite. Sous la pression de la croissance de l'apatite, les interdistances se contractent dans une direction et se dilatent dans une autre, sans ce que cela affecte la distance propre entre tropocollagènes, comme dans un modèle de compression d'un système de colonnes dures.

Le dernier paramètre relatif au collagène disponible à l'étude s'est avéré être les pics secondaires de la structure même du collagène.

### 3) Pics de diffraction secondaires du collagène

Nous l'avons vu en amont, l'organisation biologique du collagène produit un effet de bandes dues aux espaces libres entre tropocollagènes alignés longitudinalement. Cela se traduit donc par un signal de diffraction des rayons X aux très petits angles.

### a) Méthode de mesure

Nous avons vu dans la partie théorique que le collagène possède des pics de diffraction signature de leur assemblage avec une interdistance entre fibres de 67nm. Ceux-ci s'expriment sous la forme de pics, mais également de pics secondaires. Ceux-ci sont visibles directement sur les spectres 2D dans de bonnes conditions de mesures et de contraste de mise en forme de l'image.

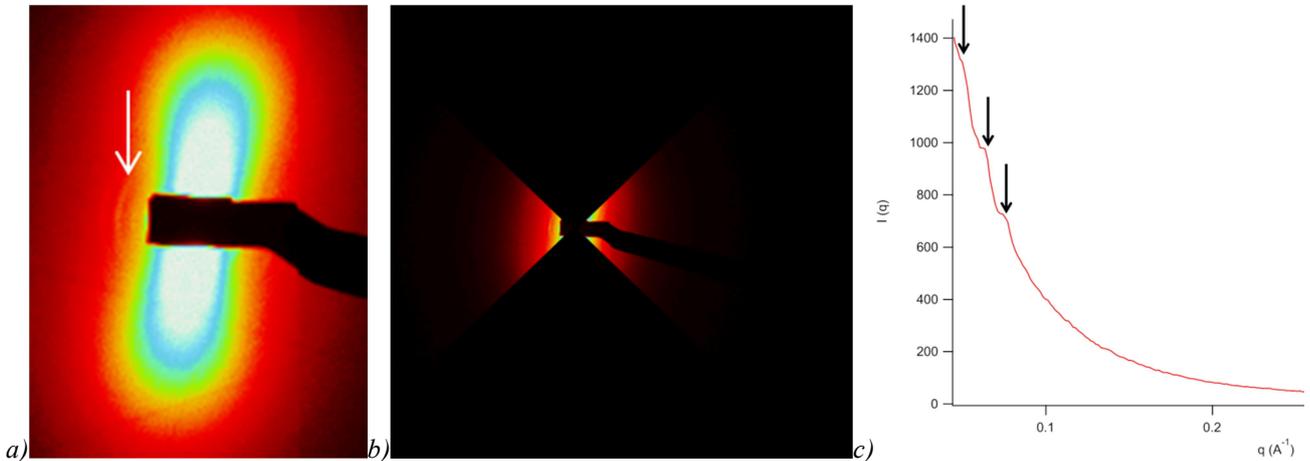


Figure 54.: a) Zoom de spectre 2D pour mettre en valeur les figures de diffraction du collagène (flèche). b) exemple de prétraitement des images afin d'obtenir un spectre 1D où les pics correspondant sont apparents. c) Spectre 1D résultant de l'intégration radiale de l'image b) avec les trois pics secondaires du collagène observables indiqués.

Les pics observés correspondent aux pics secondaires de position 3 à 5 de l'interdistance à 67nm. Comme ces pics sont la signature des interdistances longitudinales du collagène, la figure de diffraction résultante se trouve précisément orthogonale à celle de l'ultrastructure du collagène ainsi que des cristaux d'apatite alignés sur cette matrice. Cependant, leur signal correspondant à des interdistances multiples de 67nm, leur signal se trouve aux très petites valeurs de  $q$ , généralement noyé dans la masse de signal saturé lors de l'intégration radiale, et de base indiscernables sur les spectres 1D.

Afin de pouvoir observer ces figures de diffraction ou employer notre système de mesure automatique des pics, il convient tout d'abord de modifier les images sources. Pour cela, nous allons simplement nous servir des mesures d'orientation de structure telles qu'effectuées suivant le processus vu en VI.A.3) afin d'occulter la moitié de l'image en s'alignant sur cette orientation (Figure 54 b). L'intégration radiale de l'image résultante montre alors la présence de pics de diffraction qu'il est possible de mesurer suivant la procédure vu précédemment, tout en étant largement affranchi du signal de l'apatite.

### b) Cartographies

Donc, en occultant le signal de l'apatite, il est possible d'observer les pics secondaires du collagène sur les spectres 1D tout en effectuant une manipulation qui offre un meilleur poids statistique qu'une simple acquisition suivant un angle unique. Les trois pics observables sont alors cartographiables. Aucune mesure n'a été réalisée sur une potentielle fluctuation de la position des pics, car d'une part nous n'avons aucune attente de voir celles-ci, la structure des tropocollagènes en fibrilles étant bien connue, mais également car nous sommes déjà aux limites de la résolution en termes de pixels.

Les pics n'ont été observés sur les spectres 2D uniquement dans le cas de l'échantillon D5 infecté à 7 jours, aussi les cartographies ne portent que sur cet échantillon.

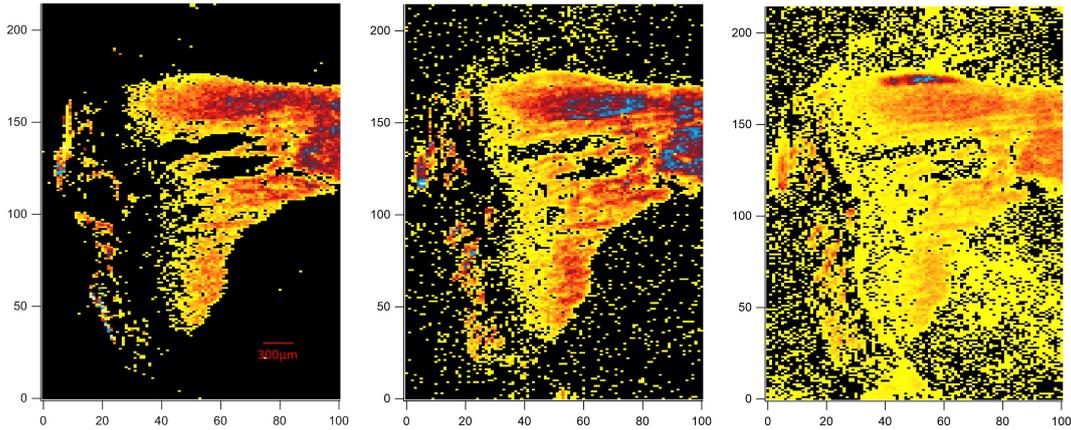


Figure 55.: Cartographies à la même échelle arbitraire des intensités des trois pics secondaires du collagène observables sur les spectres 2D de l'échantillon D5 infecté à 7 jours. A gauche, le troisième pic, au milieu, le quatrième, et à droite le cinquième.

Nous notons sur les cartographies ci-dessus que les deux premiers pics observables sont notoirement absents du cartilage de croissance, dont la bordure apparaît de mieux en mieux définie avec les pics plus éloignés. Il est intéressant de constater que les pics d'ultrastructure du collagène sont bien présents dans le cartilage de croissance, alors que les pics indicateurs de l'organisation en fibrilles est absent, ce qui indiquerait une distance entre tropocollagènes du même ordre, pour une absence d'organisation longitudinale offrant un phénomène de répétition sur une distance inférieure à 67nm.

On note également que les intensités sont plus importantes dans la diaphyse que dans l'épiphyse, et résultent sur de meilleures cartographies. Mais il s'agit ici d'un effet de l'anisotropie, les zones plus anisotropes offrant un bruit de fond de l'apatite bien moindre, et donc une mesure d'intensité des pics par cette méthode plus importante. Le troisième pic apparaît de manière particulièrement intense en haut de la cartographie dans une partie qui correspond sans doute à du tendon, un autre effet de l'absence d'interférence du signal de l'apatite.

En dehors de ces observations, il y a cependant peu d'usage à ce stade et aux angles de diffraction SAXS employés pour ces cartographies. Nous avons donc fait le tour des différents paramètres d'étude à notre disposition sur les échantillons sélectionnés.

## D. Conclusions

Nous avons effectué un grand nombre d'observations à travers l'étude d'un panel assez large de paramètres à partir des acquisitions en SAXS au Synchrotron SOLEIL sur nos différents échantillons, et ce malgré le peu de données disponibles sur notre échantillon de contrôle. Ceux-ci nous permettent cependant d'arriver à un certain nombre de conclusions, sur les différences entre les types d'os existants, sur le processus de vieillissement de l'os et ce qu'il implique au niveau structurel, mais également de formuler une hypothèse sur les mécanismes de fonctionnement de l'ostéosarcome.

### 1) Différentes structures osseuses

Dans un premier temps, le cartilage de croissance qui sert de délimitation entre épiphyse et diaphyse se démarque naturellement, puisque celui-ci ne présente aucune apatite. Le signal en intensité est donc nul, et les études sur l'orientation et l'anisotropie aussi par conséquent. Il est cependant intéressant de noter que les pics d'ultrastructure des tropocollagènes apparaissent, bien

que présentant des interdistances légèrement différentes de celles de l'os, alors que la phase est considérée comme vitreuse dans la littérature.

L'os trabéculaire épiphysial présente une forte densité qui se retrouve au niveau de l'intensité du signal lié à l'apatite aussi bien que des pics d'ultrastructure du collagène, mais avec des orientations diverse se traduisant par une anisotropie faible. Il s'agit cependant d'un milieu plutôt homogène au niveau des structures du collagène et de l'apatite, comparé à ce qui s'observe dans la diaphyse, avec des cristaux d'apatites lisses et en aiguilles au sein d'une structure de collagène présentant des fluctuations faibles dans ses interdistances.

Les os trabéculaires et corticaux de la diaphyse présentent peu de différences entre eux observables à partir de nos mesures, exceptés les différences inhérentes à une densité osseuse plus élevée dans l'os cortical. L'intensité y est très variable, en fonction des échantillons et des parties, mais par opposition à l'épiphyse, l'orientation de l'os y est très homogène, quoi que ce ne soit pas vrai de l'anisotropie. Les deux présentent des gradients divers dans différents paramètres avec le cartilage de croissance pour origine, mais à l'exception des zones les plus éloignées, tendent de manière générale à présenter des paramètres d'apatite plus rugueuse et plate que l'épiphyse, avec des interdistances du collagène décalée vers les valeurs du cartilage de croissance.

## 2) Vieillessement de l'os

Nous le savons, le cartilage de croissance est une zone de production d'os importante pendant la croissance de l'individu jusqu'à l'âge adulte. Les spécimens employés pour cette étude étant des individus jeunes, leur croissance complète n'est pas encore atteinte, et donc de l'os est constamment généré au niveau du cartilage de croissance pour fabriquer la matière de l'élongation des os. C'est pourquoi plus l'os se trouvant dans la diaphyse est éloigné du cartilage de croissance, plus celui-ci est vieux, spécialement pour l'os cortical dont le remodelage est très lent.

Ce phénomène de vieillissement se traduit par une si grande quantité de paramètres différents lors de notre étude, qu'il est impossible de considérer l'ensemble des gradients observés comme ne faisant pas partie d'un même mécanisme. Nous avons tout d'abord l'intensité, qui bien que de manière moins évidente que les autres semble présenter une augmentation avec le vieillissement. Ce phénomène correspond très bien avec ceux de la cartographie de la position d'intersection des pentes de Fourier et Porod, qui nous l'avons vu, est corrélé à une augmentation du périmètre des cristaux d'apatite. Nous avons donc au cours du vieillissement de l'os une augmentation de la quantité d'apatite cristalline via une évolution de la taille des cristaux.

Les pentes des zones de Fourier et Porod nous indique de plus que cette évolution des cristaux s'effectue également suivant la forme des ceux-ci. Nous avons d'une part une évolution de l'interface depuis une structure très rugueuse qui évolue vers une interface lisse avec l'âge de l'os, mais d'autre part une forme entre la plaquette et le bâton au contact du cartilage de croissance qui évolue vers une forme d'aiguille. Cette forme de départ est supposée celle d'une petite plaquette très allongée, qui grossirait dans toutes les directions mais principalement celle la plus réduite initialement. Ce grossissement supposé des cristaux d'apatite entrainerait alors des forces de répulsions plus importantes entre cristaux avec l'âge, soit le paramètre  $\eta$  des fits Sasfit. Cette répulsion plus grande entre cristaux produirait alors une organisation plus forte, qui s'observe au niveau de la cartographie de l'anisotropie, avec une direction de l'orientation inchangée, mais une qualité qui évolue avec l'âge vers une structure plus ordonnée.

Nous avons pu confirmer par la cohérence et l'homogénéité des résultats du calcul de la maille de la cellule cristalline latérale des tropocollagène la corrélation entre les deux pics, et l'indexation de ceux-ci comme signaux du packing latéral des tropocollagènes dans la fibrille

osseuse. S'il est difficile de démêler à ce stade si l'intensité des pics du collagène en corrélation avec ces phénomènes est un effet de la meilleure anisotropie qui réduit le bruit de fond lors de la mesure, ou bien d'une densification de la phase organique avec la phase minérale. Toujours est-il que les évolutions de la position des pics d'ultrastructure du collagène à 0,5 et 0,7 traduisent une forme de réorganisation des tropocollagènes entre eux. Le caractère homogène de la distance calculée entre tropocollagènes à partir de ces deux paramètres tend à démentir une forme de structure différente, mais plutôt une réorganisation due à la pression exercée par la croissance des cristaux d'apatite, qui forceraient alors les fibrilles de collagène à bouger sous la compression due à l'évolution de la taille de ceux-ci.

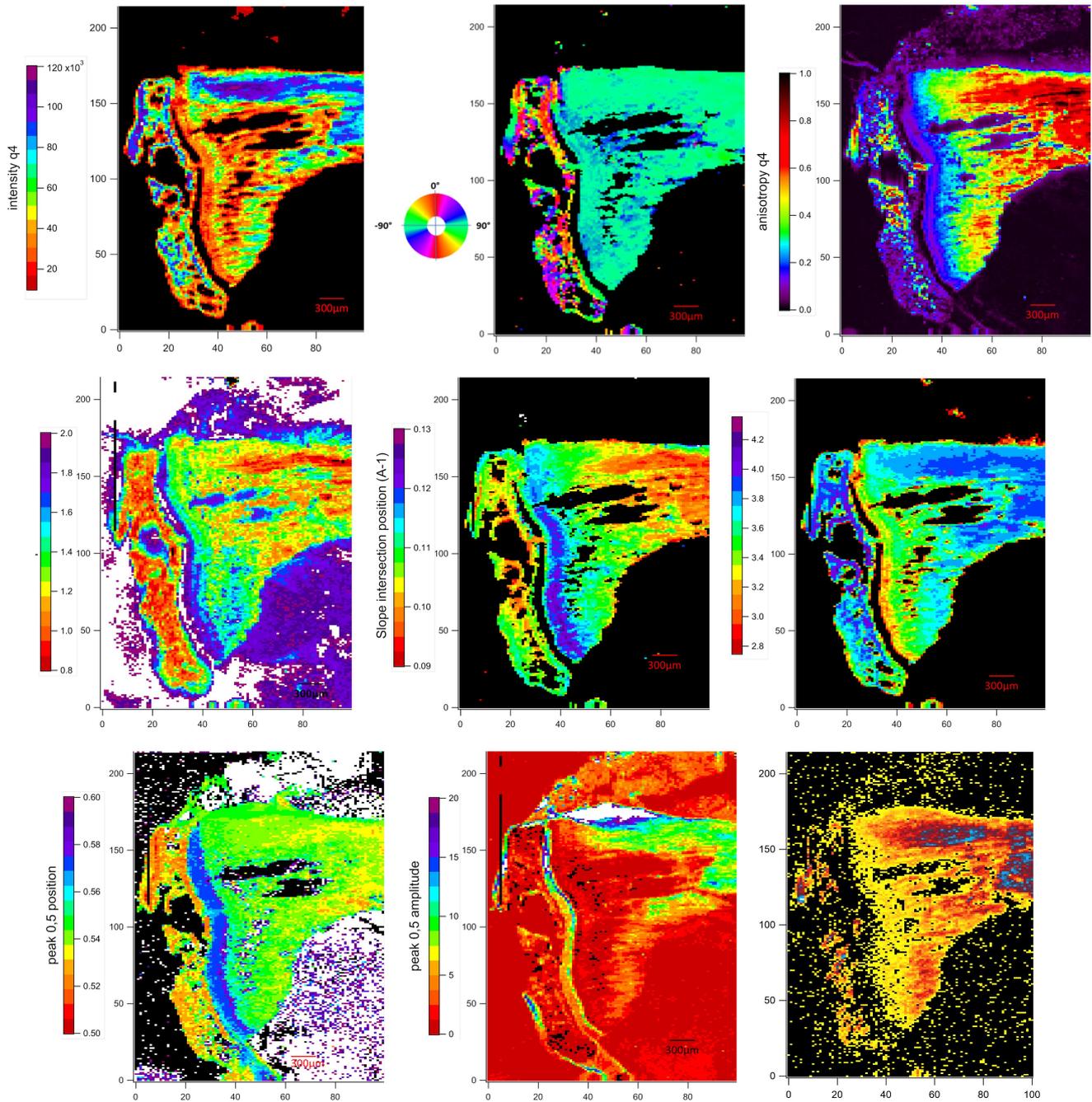


Figure 56.: Récapitulatif sur D5 (J7S) des différentes cartographies. De gauche à droite et haut en bas, intensité, orientation, anisotropie, pente de Fourier, pente de Porod, intersection des pentes/périmètre, position du pic du collagène à 0,5, son intensité, position du pic à 0,7, son intensité, longueur de la maille.

Nous avons donc pu observer à travers nos différents paramètres les phénomènes de vieillissement de l'os au niveau de l'apatite et du collagène, ce qui nous offre une meilleure connaissance des évolutions de la structure osseuse, et une meilleure position de compréhension du matériau étudié. A partir de la connaissance des comportements attendus de ces paramètres, nous sommes plus à même de différencier les comportements liés à l'ostéosarcome. De ce point de vue, la quantité d'os trabéculaire d'une structure plutôt âgée apparaît curieuse, occupant une grande quantité de la cavité médullaire et à un stade de développement avancé là où l'échantillon D5 (J7S) présente des quantités plus proches de ce que l'on est en droit d'attendre.

### 3) Ostéosarcome

Les différences entre échantillons sain et infecté n'ont pas pu être analysées, en raison de la localisation essentiellement dans la diaphyse des différents phénomènes, combinés à l'erreur d'origine qui a résulté sur une cartographie SAXS tronquée de notre échantillon de contrôle. Cependant il est possible de réaliser certaines hypothèses à partir de nos observations entre les échantillons infectés à 7 jours D4 et D5, avec celles de notre échantillon infecté à 13 jours D2.

La différence la plus frappante entre les deux temps de développement est la quantité de matière osseuse, trabéculaire ou corticale, présente dans la diaphyse. Les échantillons D4 et D5 (J7S) présentent des quantités importantes d'os, qui s'avèrent tous être de même facture, avec une orientation homogène et une anisotropie rapidement forte. En comparaison, l'échantillon D2 (J13S) apparaît dégradé, en volume comme en densité de phase minérale de l'os trabéculaire.

En effet, si d'une part les paramètres liés au périmètre des cristaux n'offrent pas de différenciation entre les échantillons à 7 et 13 jours, il n'en est pas de même pour les pentes. Là où les échantillons à 7 jours possèdent un gradient fort dans l'évolution des pentes avec le vieillissement, l'échantillon à 13 jours offre un gradient plus faible, avec des cristaux d'apatite qui évoluent moins vers une interface lisse et une forme d'aiguille dans l'os trabéculaire.

Ces différences apparaissent également dans la structure du collagène, avec par exemple une valeur de distance entre tropocollagènes plus fluctuante dans l'échantillon à 13 jours. Si l'on combine ces comparaisons avec celle des différentes coupes effectuées, il apparaît que la tenue de l'os trabéculaire diaphysal est plus importante dans les échantillons infectés à 7 jours que dans les échantillons sains ou infectés à 13 jours.

Nous avons donc 7 jours après infection un matériel osseux dans la cavité médullaire potentiellement de meilleure qualité et en plus grandes quantités, au vu du taux de remplissage de D5 (J7S), qu'un échantillon sain, avant d'avoir à 13 jours des coupes dont l'os trabéculaire médullaire est plus fragile, et dont la qualité et l'homogénéité au niveau de l'apatite et du collagène est plus faible.

Le mécanisme connu du fonctionnement par combinaison de production et de dégradation de l'os du cercle vicieux est à considérer ici. L'hypothèse que nous formulons à partir de l'ensemble des mesures effectuées est que l'infection par des cellules d'ostéosarcome a entraîné une action depuis le cartilage de croissance, résultant sur une première phase de création d'os importante sous la forme d'os cortical et trabéculaire plus importante, au moins sur la période de 0 à 7 jours. Ce mécanisme ayant lieu au niveau du cartilage de croissance, alors que les cellules tumorales ont été déposées en surface à 1/3 proximal du tibia tend à indiquer l'existence d'un médiateur diffusé par les cellules tumorales capable de diffuser sur cette distance et activer la production osseuse, tout en ayant au préalable dû traverser la couche externe d'os cortical.

Les différences entre les échantillons à 7 et 13 suggèrent que dans cet intervalle de temps, une forte dégradation osseuse a lieu par le biais des ostéoclastes en réponse à la précédente formation osseuse, que ce soit par une réponse naturelle au surplus d'os ou induite par une action des

cellules tumorales sur l'activation des cellules tumorales. La différence de qualité de l'apatite et d'homogénéité dans la distance entre tropocollagènes pourrait indiquer également le fruit de remodelages de pauvre qualité sous l'impulsion de la tumeur en développement.

**L'idée finale de ce mécanisme est que le fonctionnement de l'ostéosarcome passerait par des phases rapides de construction importante de l'os, suivi d'une dégradation osseuse, qui libèrerait alors de l'espace pour la propagation des cellules tumorales, dans une série de cycles de plus en plus erratiques.**

Nous allons dans un dernier temps confronter ce modèle à une série d'observations par microscopie et en mesures mécaniques pour en tester la tenue.

## VII. Techniques de microscopie

Afin de compléter nos observations par SAXS, nous avons employé quelques techniques de microscopie afin d'observer les différences entre échantillon infecté et sain, et déterminer si nous pouvons discerner des éléments à même de confirmer ou d'infirmer nos hypothèses sur le mécanisme de développement de l'ostéosarcome.

### A. Microscopie optique

Grâce à la participation de Nadine NASSIF et de son équipe, nous avons pu obtenir des coupes fines de quelques microns issues des échantillons discutés ci-avant. Ces coupes ont été réalisées avec cette épaisseur essentiellement dans l'intention de les analyser en microscopie électronique à transmission, mais permettent néanmoins une observation plus détaillée au microscope notamment du détail de la structure osseuse et des tissus aux interfaces avec l'os.

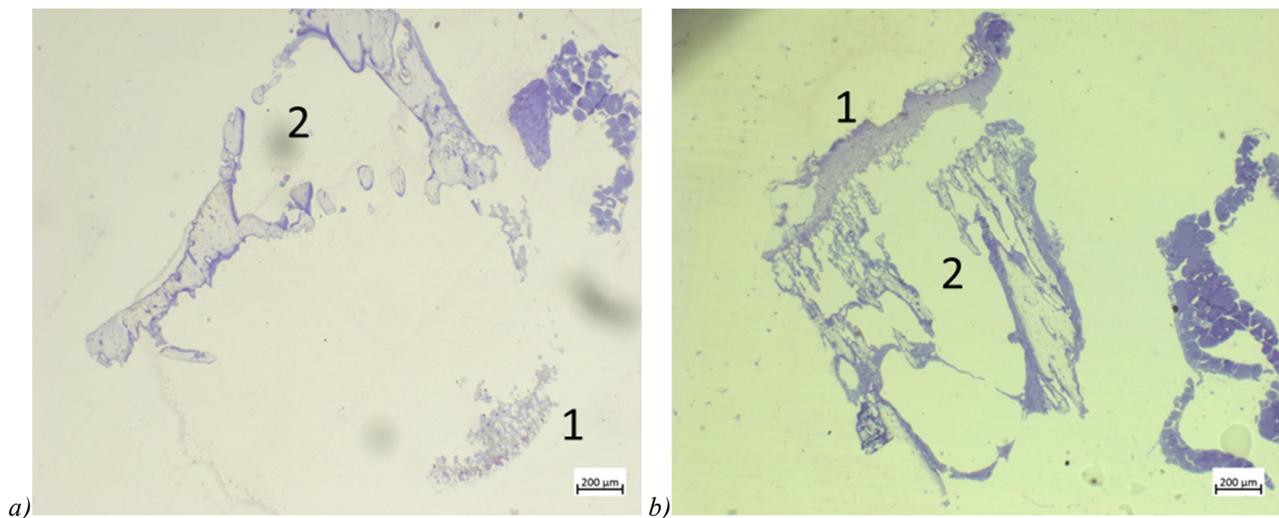


Figure 57.: a) Eléments résultants de la coupe de l'échantillon D5 à J+7 sarcome.

b) Coupe issue de la coupe n°10 de l'échantillon de contrôle à J+13.

1 : Cartilage de croissance. 2 : Os trabéculaire.

A l'observation globale de ces coupes, nous pouvons tout d'abord constater la disparité dans la qualité des éléments résultants. Là où l'échantillon sarcome présente quelques éléments épars, essentiellement de l'os trabéculaire ainsi qu'un fragment de cartilage de croissance (Fig. 58 b), le morceau final de notre échantillon à J+13 sain de contrôle présente une plus grande intégrité, avec en haut un segment assez long de cartilage de croissance suivi de la structure trabéculaire en plus grande quantité et plus ou moins dans la continuité dudit cartilage.

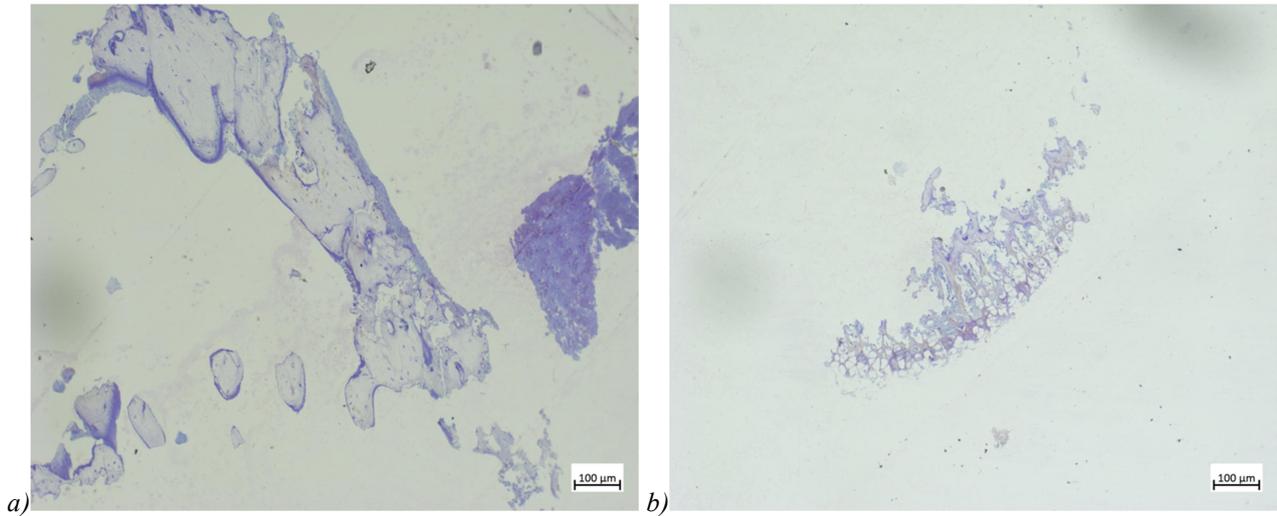


Figure 58.: a) Fragment d'os trabéculaire de l'échantillon à J+7 Sarcome.  
b) Fragment de cartilage de croissance de l'échantillon à J+7 Sarcome.

Si l'on considère les éléments de l'échantillon à J+7 Sarcome, il est possible d'observer non seulement la structure osseuse, mais également une partie de la zoologie des cellules impliquées dans le remodelage osseux. L'ensemble de points violets qui constellent la matrice osseuse sont ici des ostéocytes, et le contour gauche de l'os est fortement coloré en raison de la forte concentration de cellules bordantes, des ostéoblastes au repos. La structure osseuse en elle-même ne présente pas de particularités notables, excepté l'aspect fragmenté au milieu et en bas, mais cela est sans doute imputable au processus de coupe. Le fragment de cartilage de croissance est assez petit et consiste essentiellement d'alvéoles de chondrocytes qui continue ensuite en os trabéculaire issu de la minéralisation du cartilage depuis en bas à droite vers en haut à gauche.

Sur l'échantillon de contrôle à J+13, il est possible de retrouver la même zoologie de cellules du système osseux. Qui plus est, on peut observer dans les alvéoles du cartilage de croissance les noyaux en violet foncé des chondrocytes, ainsi que dans la cavité médullaire les agrégats de cellules de tissu interstitiel propre à l'os comme de la moelle. La zone délimitée par le carré comporte une sorte de dégradé de couleur dans la matrice osseuse qui correspond à un front de minéralisation de la matrice de collagène, ce qui signifie que les cellules bordant cette zone sont sans doute des ostéoblastes actifs.

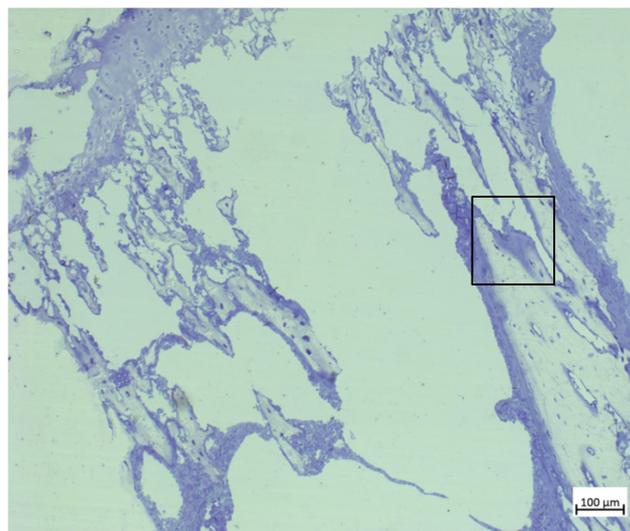


Figure 59.: Coupe de l'échantillon de contrôle à J+13. Le carré est centré sur une zone de minéralisation de la matrice de collagène dans le cadre du processus de remodelage.

L'ensemble de l'échantillon de contrôle à J+13 semble comporter moins de fractures que l'échantillon à J+7 Sarcome. Le cartilage de croissance observé comporte encore des cellules chondrocytes et l'ensemble de l'échantillon comporte une population de cellules diverses beaucoup plus dense. Il serait aisé de comparer les deux cartilages de croissance comme plus ou moins dégradés suivant l'échantillon, cela ne constitue pas un élément définitif de l'activité de l'ostéosarcome, mais s'ajoute aux observations de la qualité des coupes discutées bien plus tôt.

Un élément important de la comparaison entre les coupes des deux échantillons est ici la présence de cellules bordantes de l'os. A des tailles comparables, le morceau d'os trabéculaire issu de l'échantillon infecté à 7 jours D5 présente une bien plus faible quantité de cellules au niveau de sa surface. Etant donné la localisation desdites cellules, il s'agit probablement d'ostéoblastes actifs ou quiescents. Nous avons un exemple d'une autre structure cellulaire probablement musculaire ou de la moelle à droite de la figure 56 a.

Au vu des différences entre échantillons infectés à 7 et 13 jours, cette pauvreté des cellules pourrait être partie de l'action des cellules tumorales. Si nous avons jusque-là constaté, à travers les différents gradients, une évolution partant du cartilage de croissance, les effets de moyenne de la technique SAXS laisse une porte pour un phénomène d'ajout de matière osseuse plus homogène, résultat d'une action généralisée ostéoblastique. Leur absence de la coupe, en revanche, suggère soit une disparition, peu probable sachant la prévalence du système de remodelage osseux dans le mécanisme de propagation de l'ostéosarcome, soit une migration des cellules ostéoblastiques en sus d'une activation par le médiateur des cellules tumorales. Cette migration pourrait également être une conséquence en local proche des cellules tumorales déposées d'une très forte activation du remodelage osseux.

Une manière de mettre cette idée à l'épreuve serait l'observation d'inhomogénéités flagrantes dans la structure osseuse par une méthode de microscopie plus fine, la microscopie à transmission électronique.

## **B. Microscopie Electronique à Transmission**

La technique de microscopie à Transmission Electronique repose sur le principe d'un flux d'électrons envoyés à travers une couche de matériau ultrafin et à mesurer le nombre d'électrons ayant traversé l'échantillon. Cette technique offre une précision nanométrique lors de la fabrication d'images. Cette méthode d'observation de la matière nous permet ici d'observer directement la structure des fibres de collagène et en partie les cristaux d'hydroxyapatite. L'étude s'est effectuée sur les deux mêmes échantillons que ceux observés précédemment en microscopie classique.

La première observation, commune aux deux échantillons, et l'aspect de striures observable dans la matrice, toutes plus ou moins alignées. Il s'agit ici de l'effet de bande à 67nm issu de l'organisation des molécules de collagène en fibres de collagène. Ces effets de bandes sont perpendiculaires à la direction des fibrilles, ce qui nous permet d'identifier l'alignement de celles-ci.

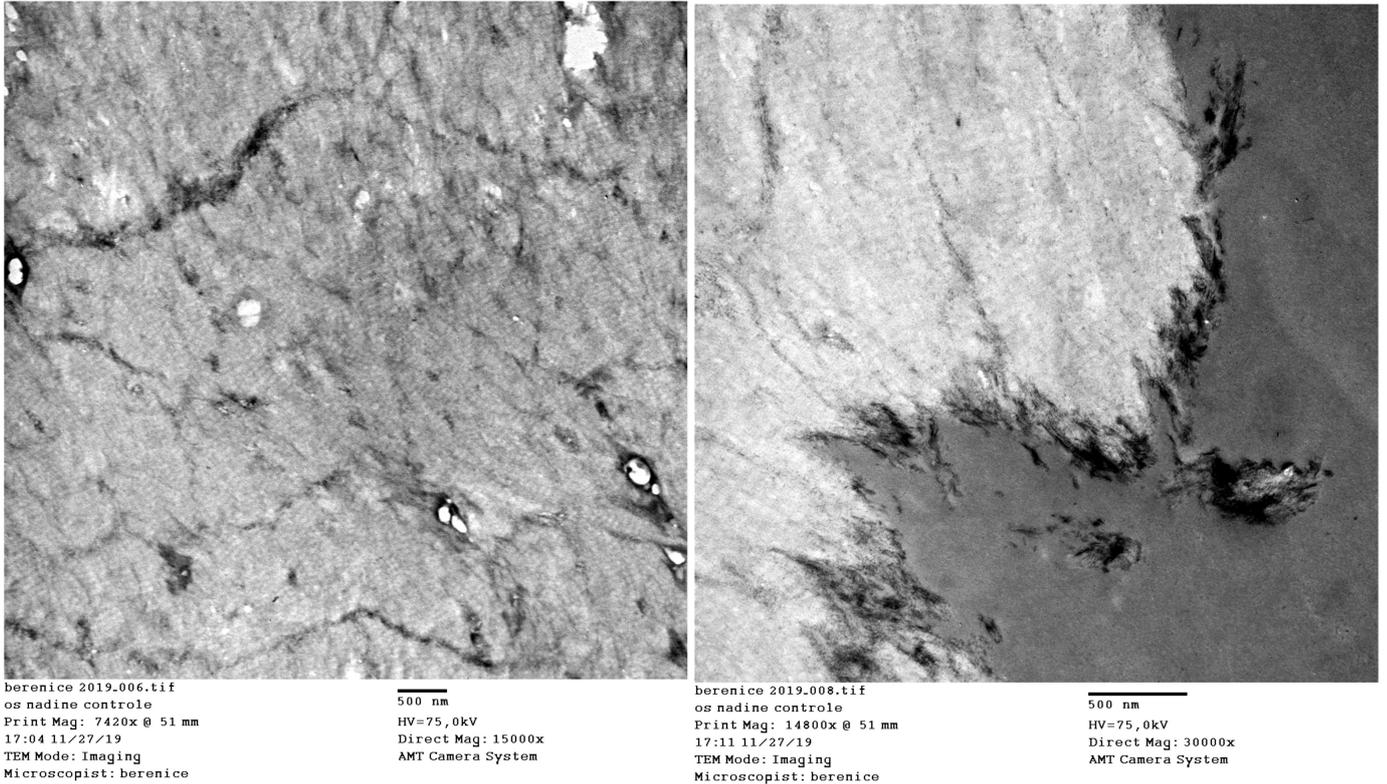


Figure 60.: Images en TEM de l'échantillon de contrôle, en milieu de trabéculaire et à l'interface d'une cassure.

Sur la première image, nous pouvons clairement voir que l'ensemble des fibres de collagène sont majoritairement alignées, avec des ajustements au niveau des différents trous, qui sont soit des canaux de communication entre ostéocytes, soit des éléments de vascularisation. Les variations dans la direction des fibres donnent une impression d'entrelacement des fibres et indiquent une organisation qui n'est pas complètement ordonnée.

Sur l'image de droite, l'élément notable est l'agrégation de points noirs au niveau de l'interface. Ceux-ci correspondent aux cristaux d'hydroxyapatite qui apparaissent clairement visibles au niveau de la cassure. Si l'on observe l'image de plus près, il est possible de distinguer une multitude de précipités inclus dans la matrice de collagène. Ceux-ci sont également observables dans l'image de gauche, qui plus est spécialement visibles au niveau de microfractures qui parsèment cette prise d'image.

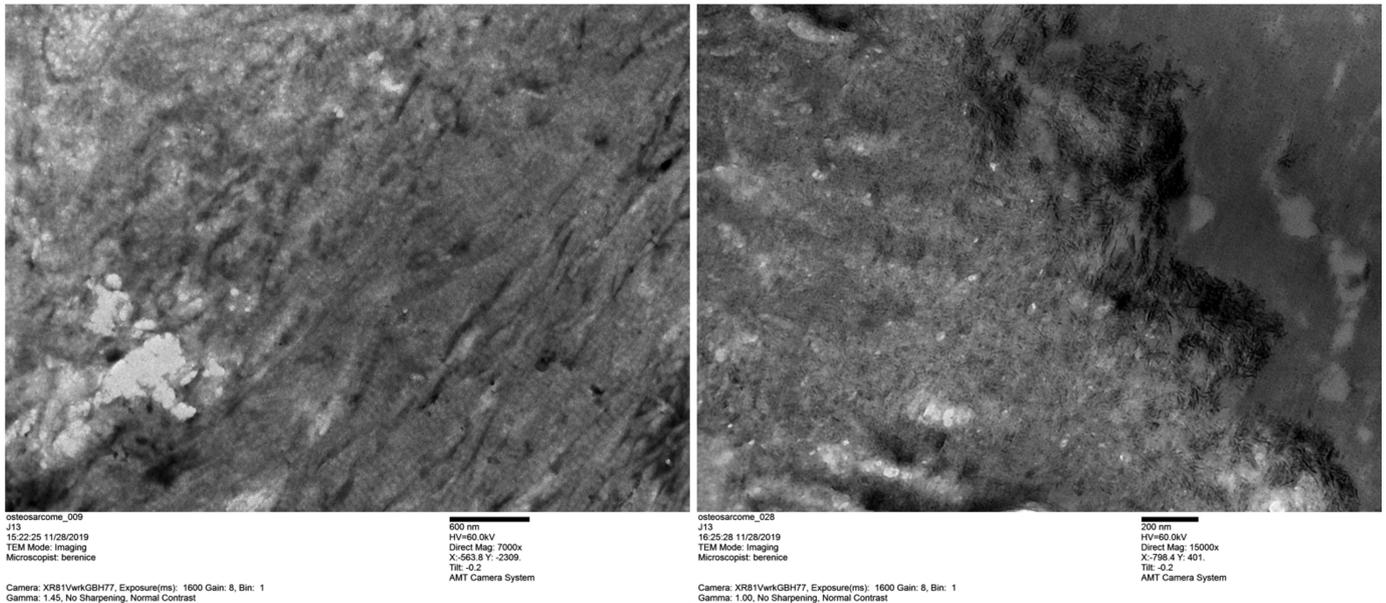


Figure 61.: Images en TEM de l'échantillon infecté avec des cellules d'ostéosarcome.

Les images issues de l'échantillon infecté à J+7 ne présentent pas de disparités importantes des images de contrôle au niveau des microstructures. Si un quelconque désordre supérieur est observé au niveau des fibres de collagène, il est comparativement à certaines des images de l'échantillon de contrôle et pas d'un point de vue global. De plus, si l'image de droite au-dessus présente une forte concentration de cristaux d'apatite visible, c'est en raison de la localisation, qui est celle d'un front de minéralisation.

A noter que les résultats en image présentés ici ne sont que les plus significatifs de séries de plusieurs douzaines d'images acquises entre des ordres de grandeurs allant de 100nm à 10 $\mu$ m. Toujours est-il que rien de particulier ne se dégage dans les comparaisons entre les échantillons au Microscope à Transmission Electronique. La suite de l'étude se porte sur les résultats d'une étude portée sur les mesures de réponse mécanique d'échantillons.

### C. Propriétés mécaniques

L'ensemble des résultats sont ceux de Iman Almarouk qui a travaillé avec nous pour étudier la réponse mécanique de certains de nos échantillons afin de déterminer s'il est possible d'observer une fragilisation de la structure osseuse due à l'ostéosarcome aux temps courts (annexe 3 Propriétés mécaniques).

La conclusion principale de l'étude est qu'aux temps étudié, la matière testée par indentation est bien toujours de l'os et pas de la substance ostéoïde spécifique au développement de l'ostéosarcome. En revanche, les résultats indiquent une disparité importante dans les mesures de dureté de la matière osseuse entre l'échantillon de contrôle, l'échantillon sarcomateux à 7 jours et l'échantillon sarcomateux à 13 jours. La comparaison entre l'échantillon de contrôle et celui à J+7 Sarcome donne une dureté supérieure de l'os chez l'échantillon infecté par rapport à notre échantillon sain. En revanche, la comparaison entre l'échantillon de contrôle et l'échantillon infecté à 13 jours offre le résultat inverse, avec une structure osseuse plus fragile chez l'échantillon infecté. Ces résultats semblent confirmer le modèle suggéré d'une phase de fabrication osseuse avant une phase de dégradation dans un cycle d'action de l'ostéosarcome.

## D. Conclusions

Ces trois méthodes d'analyse complémentaires ont permis de confirmer certaines tendances observées avec d'autres méthodes d'analyse. Le résultat le plus intéressant est celui de l'étude des propriétés mécaniques, avec une forme de confirmation d'une surproduction d'os entre un échantillon sain et un échantillon infecté à 7 jours. Comme il ne s'agit pas de l'échantillon D5, on peut exclure la possibilité que ce soit le fait de l'aspect très "plein" de cette tranche. Et à l'opposé, nous avons des valeurs de réponse mécanique plus faible que l'échantillon de contrôle à partir d'échantillon infecté à 13 jours. La conjonction de ces deux résultats nous conforte dans la possible validité de notre hypothèse de travail, à savoir un cycle de surproduction osseuse suivi d'une forte dégradation, tous deux induits par l'action des cellules tumorales ostéosarcomes.

De plus, l'étude mécanique se portant une fois de plus au niveau de la tête de l'os plutôt qu'en proximité du site de dépôt des cellules tumorales, nous avons un autre facteur suggérant fortement l'existence d'un médiateur à distance relâché par les cellules tumorales.

Les résultats en TEM, bien que très beaux à contempler, n'ont pas offert d'information concrète susceptible de peser sur l'objectif de cette étude, ni à même d'aider à supporter ou infirmer nos différentes hypothèses. Une étude par cette méthode de mesure sur des échantillons d'os issu de l'ostéosarcome plus avancé serait nécessaire pour une comparaison plus efficace.

Enfin, les spéculations de la partie microscopie optique quant à la différence de solidité entre l'échantillon à 7 jours semblent fermement invalidées par l'étude mécanique. Cependant une certaine prudence reste de mise en cas de différence d'expression dans l'action de l'ostéosarcome, ou simplement des résultats sur une base statistique plus large. Nous considérons toutefois que les différences d'intégrité des microcoupes est un résultat de la difficulté des coupes plutôt que des propriétés inhérentes aux échantillons.

Le résultat principal de ces observations en microscopie est d'une part l'identification d'une zone de minéralisation, qui pourrait constituer une zone d'intérêt particulier dans de futures études, mais également la différence marquée des quantités de cellules bordantes entre nos deux échantillons, avec une population bien plus élevée dans notre échantillon sain. Ce qui, excluant la possibilité d'une mort de la population en raison de la mécanique de forte production d'os de l'ostéosarcome, nous pousse à émettre l'hypothèse d'une migration de la population d'ostéoblastes ou de leurs cellules précurseuses sous l'impulsion du médiateur produit par les cellules tumorales.

## VIII. Conclusion

Cette partie d'analyse a vu un grand nombre de résultats et un modèle du mécanisme de développement de l'ostéosarcome aux temps courts mis en hypothèse. nous avons obtenu une meilleure compréhension des comportements de l'apatite et du collagène au cours du vieillissement et dans leur répartition au sein de la structure osseuse. De plus, un ensemble de méthodes automatisées des acquisitions SAXS du synchrotron SOLEIL ont été mises au point, et employées à nouveau dans le cadre d'autres études, permettant le calcul et la cartographie de nombreux paramètres suivant une méthode efficace et rapide.

Il a été observé dans un premier temps les différences de comportement de l'apatite et du collagène au sein des différents types d'os, cortical, trabéculaire épiphysal et diaphysal, et du cartilage de croissance. Nous avons observé dans la diaphyse un certain nombre de gradients relatifs à divers paramètres, que nous avons en partie attribué au vieillissement de l'os. Cette évolution des paramètres se traduit par une forme de croissance des cristaux d'apatite, avec une

augmentation du périmètre, une transition d'une forme de plaquette vers une forme d'aiguille, couplée à une diminution de la rugosité.

En parallèle de cela, l'évolution des interdistances entre plans de tropocollagène semblent traduire une réorganisation en réponse à la pression exercée par la croissance des cristaux d'apatite. Nous observons une contraction dans une direction couplée à une dilatation dans l'autre, sans que cela semble affecter la valeur calculée de distance entre les objets. Ce comportement a pu être mis en évidence grâce à l'étude d'un pic de signal SAXS du collagène, qui n'avait jusque-là pas été identifié comme tel.

Nous avons pu constater aux temps courts un certain nombre de différences et de similitudes entre nos échantillons à 7 et 13 jours, notamment au niveau de la quantité de matière. Mais ce qui semble ressortir le plus est une forme de dégradation de la qualité des structures dans l'échantillon à 13 jours par rapport à ceux à 7 jours à position dans la diaphyse équivalente. L'origine de ces différences apparait provenir du cartilage de croissance, ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un médiateur à distance capable de diffuser à travers l'os cortical, induisant une réaction au niveau des cellules responsables du remodelage osseux, mais également de leur production par les chondrocytes, altérant le cartilage de croissance.

### Evolution Temporelle

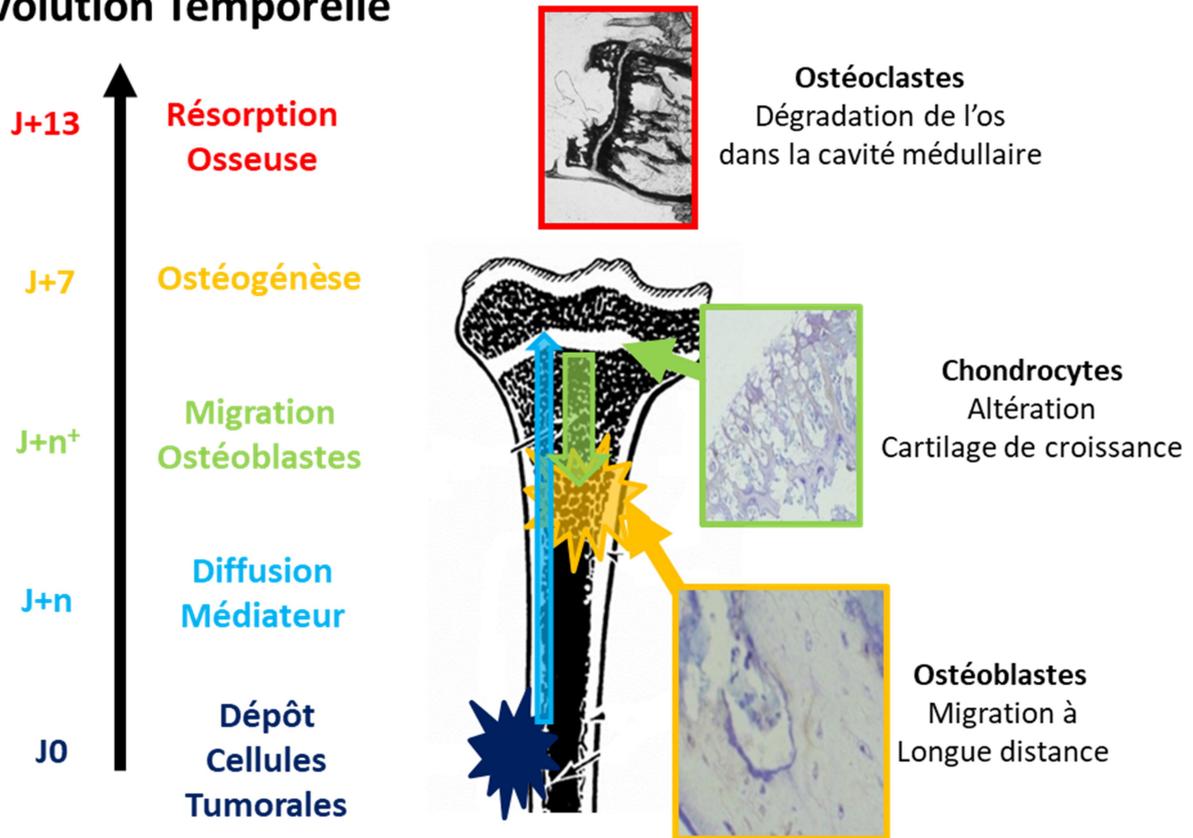


Figure 62.: Modèle d'action des cellules tumorales sur le mécanisme de production de l'os du cartilage de croissance.

A l'apparente dégradation de la qualité osseuse à distance par l'ostéosarcome, s'ajoute les résultats d'Iman Alamrouk, qui confirme cette hypothèse avec des résultats mécaniques indiquant clairement une faiblesse structurale plus grande au sein de l'échantillon à 13 jours. Les observations de microcoupes issues de nos échantillons d'étude tendent à indiquer une différence dans la qualité du cartilage de croissance, mais surtout un appauvrissement en proximal de celui-ci en termes de cellules bordantes et autres impliquées dans le remodelage osseux.

Le modèle établi et retenu à partir de l'ensemble de ces observations est celui de la diffusion par les cellules tumorales à travers l'os cortical d'un médiateur, qui à la date de 7 jours a déjà entraîné une action au niveau du cartilage de croissance et sur les cellules ostéoblastiques, résultant sur une forte production d'os fortement orienté, ce qui pourrait être la conséquence de la migration fortement supposée des ostéoblastes entraînant un faible remodelage de la structure trabéculaire. Le phénomène entraîne une réponse, soit résultat naturel de la surproduction, soit instigué par le médiateur, qui voit ensuite la forte dégradation de la structure osseuse tel que constaté à 13 jours, dans un cycle de création et dégradation osseuse, libérant du reste de l'espace pour l'occupation par les cellules tumorales.

A ce stade, la poursuite de cette ligne d'étude passe par une extension du même type de mesures sur une plus grande batterie d'échantillons, avec une série de dates intermédiaires de développement. Celle-ci était programmée pour Mars 2020, mais a été bloquée par la crise Covid, et de nouvelles mesures au synchrotron n'ont pas encore pu être mises en œuvre. La réalisation d'une série de mesures SAXS sur des échantillons sains serait un ajout essentiel pour mieux comprendre sur quels points l'ostéosarcome entraîne une déviation des schémas normaux. Enfin, la mise au point d'une méthode de localisation du point de dépôt des cellules tumorales au moment de la coupe pourrait permettre l'analyse de ce point particulier du développement tumoral.

## IX. Bibliographie

1. Jacques, C. *et al.* Murine Models of Bone Sarcomas. *Methods Mol Biol* **1914**, 331–342 (2019).
2. Site d'Ostéologie.  
[http://theses.vet-alfort.fr/Th\\_multimedia/mraffaelli/SCRIPT/form.php?action=2&id=259](http://theses.vet-alfort.fr/Th_multimedia/mraffaelli/SCRIPT/form.php?action=2&id=259).
3. SOLEIL en 3 questions | Centre de rayonnement synchrotron français. <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/qui-sommes-nous/quest-ce-que-soleil/soleil-en-3-questions#1>.
4. L'Annunziata, M. F. Chapter 8 - Electromagnetic Radiation: Photons. in *Radioactivity (Second Edition)* (ed. L'Annunziata, M. F.) 269–302 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63489-4.00008-3.
5. Wagermaier, W., Gourrier, A. & Aichmayer, B. Understanding hierarchy and functions of bone using scanning x-ray scattering methods. in *Understanding hierarchy and functions of bone using scanning x-ray scattering methods* (eds. Fratzl, P., Dunlop, J. W. C. & Weinkamer, R.) (RSC publishing, 2013). doi:10.1039/9781849737555-00046.
6. Fratzl, P., Fratzl-Zelman, N. & Klaushofer, K. Collagen packing and mineralization. An x-ray scattering investigation of turkey leg tendon. *Biophysical Journal* **64**, 260–266 (1993).
7. Cedola, A. *et al.* Orientation of mineral crystals by collagen fibers during in vivo bone engineering: An X-ray diffraction imaging study. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **62**, 642–647 (2007).
8. Fratzl, P., Fratzl-Zelman, N., Klaushofer, K., Vogl, G. & Koller, K. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int* **48**, 407–413 (1991).
9. Delgado-López, J. M. *et al.* The synergic role of collagen and citrate in stabilizing amorphous calcium phosphate precursors with platy morphology. *Acta Biomaterialia* **49**, 555–562 (2017).
10. Acerbo, A. S., Kwaczala, A. T., Yang, L., Judex, S. & Miller, L. M. Alterations in Collagen and Mineral Nanostructure Observed in Osteoporosis and Pharmaceutical Treatments Using Simultaneous Small- and Wide-Angle X-ray Scattering. *Calcif Tissue Int* **95**, 446–456 (2014).
11. Törnquist, E. *et al.* Comparison of small-angle neutron and X-ray scattering for studying cortical bone nanostructure. *Scientific Reports* **10**, 14552 (2020).
12. Fratzl, P. *et al.* Mineral crystals in calcified tissues: A comparative study by SAXS. *Journal of Bone and Mineral Research*  
<https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbmr.5650070313> (1992)  
doi:10.1002/jbmr.5650070313.
13. Ascenzi, A., Bonucci, E., Ripamonti, A. & Roveri, N. X-ray diffraction and electron microscope study of osteons during calcification. *Calc. Tis Res.* **25**, 133–143 (1978).
14. Rice, S. A. Small angle scattering of X-rays. A. Guinier and G. Fournet. Translated by C. B. Wilson and with a bibliographical appendix by K. L. Yudowitch. Wiley, New York, 1955. 268 pp. \$7.50. *Journal of Polymer Science* **19**, 594–594 (1956).
15. Sinha, S. K., Sirota, E. B., Garoff, S. & Stanley, H. B. X-ray and neutron scattering from rough surfaces. *Phys. Rev. B: Condens. Matter; (United States)* **38:4**, (1988).
16. Oleg Gang. Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) from Bulks and Surfaces. (2015).
17. N. Sanjeeva Murthy, Spectroscopy OnlineN. Sanjeeva Murthy. Recent Developments in Small-Angle X-Ray Scattering. *Spectroscopy Online*

<https://www.spectroscopyonline.com/authors/n-sanjeeva-murthy> (1 November à&è).

18. The SAXS Guide :: Anton-Paar.com. *Anton Paar* <https://www.anton-paar.com/corp-en/saxs-guide/>.
19. Matsushima, N., Akiyama, M. & Terayama, Y. Quantitative Analysis of Small-Angle X-Ray Scattering of Bone: Determination of Sizes of Its Collagen and Apatite Components. *Japanese Journal of Applied Physics* **20**, 699–702 (1981).
20. Lotsari, A., Rajasekharan, A. K., Halvarsson, M. & Andersson, M. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite. *Nature Communications* **9**, 4170 (2018).
21. Poundarik, A., Gundberg, C. & Vashishth, D. Non-collageneous proteins influence bone crystal size and morphology: A SAXS study. in *2011 IEEE 37th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC)* 1–2 (2011). doi:10.1109/NEBC.2011.5778671.
22. Euw, S. von. Biominéralisation osseuse : de la caractérisation structurale du minéral à son organisation 3D. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014).
23. Markovic, M., Fowler, B. O. & Tung, M. S. Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *J Res Natl Inst Stand Technol* **109**, 553–568 (2004).
24. Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J. P., Chen, Z. & Pan, H. Insight into Biological Apatite: Physiochemical Properties and Preparation Approaches. *BioMed Research International* vol. 2013 e929748 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/929748/> (2013).
25. Vetter, U., Eanes, E. D., Kopp, J. B., Termine, J. D. & Robey, P. G. Changes in apatite crystal size in bones of patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int* **49**, 248–250 (1991).
26. Boyer, A. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées. (Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2014).
27. Synthesis, Characterization and In Vitro Study of Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics: A Comparison - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29495348/>.
28. Manual sasfit - [PDF Document]. *fdocuments.in* <https://fdocuments.in/document/manual-sasfit.html>.
29. Dialogues, L. *Méthodes et techniques de traitement du signal ... - Jacques Max - Masson*.
30. Deschamps, A. & De Geuser, F. On the validity of simple precipitate size measurements by small-angle scattering in metallic systems. *Journal of Applied Crystallography* **44**, (2011).

CHAPITRE 4 :  
ANALYSE ET MODELISATION DE LA STRUCTURE  
OSSEUSE MACROSCOPIQUE DE L'OSTEOSARCOME  
AVANCE

## Table des matières du Chapitre 4

I.	Introduction.....	158
II.	Données expérimentales obtenues par tomographie.....	158
	A. Données tomographiques d'ostéosarcome avancé.....	158
	B. Représentation 3D de la structure osseuse par logiciel Paraview.....	159
	C. Traitement des images et analyse particulière.....	161
	D. Méthodes d'analyse de structure des acquisitions en tomographie.....	161
	1) Analyse par spectre de puissance.....	161
	2) Analyse par fonction de corrélation de paire.....	162
	E. Résultats d'analyse d'images de tomographie.....	163
	1) Analyse 3D en spectre de puissance.....	163
	2) Analyse en spectres de puissance suivant trois axes orthogonaux.....	164
	3) Effets de localisation dans l'échantillon.....	165
	4) Éléments pour comparaison avec modélisation.....	167
III.	Principe de l'automate cellulaire.....	168
	A. Généralités de l'automate cellulaire.....	168
	B. Hypothèses du modèle.....	168
	C. Représentation de l'automate.....	169
	D. Changement d'état des cellules de l'automate.....	170
	1) Capacité de changement des cellules.....	170
	2) Fonctions d'influence à distance.....	171
	3) Modèle de transition d'état absolu.....	172
	4) Modèle de transition d'état probabiliste.....	172
	a) Etablir une probabilité de transition d'état.....	173
	b) Ajustement de la probabilité maximum $\alpha$ .....	173
	c) Seuil d'activation de la transition d'état $\beta$ .....	174
	d) Modulation de la probabilité de transition.....	175
	5) Traitement de la rugosité.....	175
IV.	Réalisation du programme.....	176
	A. Généralités de la structure du programme.....	177
	B. Amorçage.....	178
	1) Lecture image de départ.....	178
	2) Création des matrices de calcul.....	179
	C. Boucle itérative.....	180
	1) Préparation au calcul.....	180

2)	Fabrication des matrices d'autorisation de transition d'état.....	181
3)	Calcul et tirage au sort du changement d'état.....	182
4)	Modification des matrices de présence d'état et suppression des points isolés.....	183
D.	Acquisition de données .....	183
1)	Mesures.....	184
2)	Sauvegarde d'images .....	184
V.	Résultats de simulation .....	185
A.	Stratégie d'étude de l'automate pour l'optimisation des paramètres.....	185
B.	Comportements émergents du modèle.....	185
C.	Impact des paramètres.....	187
1)	Paramètre $\alpha$ , ajustement de vitesses relatives.....	187
2)	Paramètre $\beta$ , seuil d'activation de la transition d'état .....	189
3)	Paramètre $R_{état}$ , limite de l'influence à distance .....	190
D.	Effet de la fonction d'influence à distance sur la transition d'état .....	191
E.	Recherche de paramètres optimums .....	193
VI.	Evolutions récentes et perspectives .....	194
A.	Effets des images de départ.....	195
B.	Passage de la simulation à la 3D.....	195
C.	Perspectives.....	196
VII.	Conclusion .....	196
VIII.	Bibliographie.....	198

GLOSSAIRE :

$TF(f)$  : Transformée de Fourier d'une fonction  $f$ .

$TF^{-1}(f)$  : Transformée de Fourier inverse d'une fonction  $f$ .

$[i ; j]$  : Coordonnées des cellules de l'automate et des matrices correspondantes.

$tissu, os, sarcome$  : Etats possibles des cellules de l'automate, représentant respectivement du tissu sain, de l'os et des cellules sarcomateuses.

$n$  : Numéro de l'itération de l'automate cellulaire.

$n_{fin}$  : Itération finale de l'automate cellulaire.

$f_{état}(r)$  : Fonction d'influence à distance  $r$  exercée par les cellules d'un certain état,  $os$  ou  $sarcome$ .

$R_{état}$  : Portée maximale d'influence d'un état,  $os$  ou  $sarcome$ .

$\delta_{état}(i ; j)$  : Fonction de présence d'un état influent aux coordonnées  $(i ; j)$ , de valeur 1 si vrai, et 0 si faux.

$I_{état}^{tot}$  : Influence totale exercée par les cellules d'un état particulier sur une cellule.

$$I_{état}^{tot} = \sum_{r < R_{état}}^{i, j} \delta_{état}(i ; j) f_{état}[r]$$

$I_{état}^{seuil}$  : Influence minimale en-deçà de laquelle la transition d'état d'une cellule est impossible dans le modèle de transition absolue.

$I_{état}^{max}$  : Influence maximale que peut subir une cellule par un état donné, soit le cas théorique ou l'ensemble des cellules dans le rayon  $R_{état}$  sont influentes sur la transition d'état.

$$I_{état}^{max} = \sum_{r < R_{état}}^{i, j} f_{état}[r]$$

$P$  : Probabilité de transition d'un état 1 vers état 2 dans le modèle probabiliste.

$$P_{état1 \rightarrow état} = \frac{1}{1 - \beta_{état}} \left( \frac{I_{état1}^{tot}}{I_{état}^{max}} - \beta_{état} \right)$$

$a$  : Valeur aléatoire comprise entre 0 et 1 tirée pour chaque transition possible du modèle probabiliste.

$\alpha_{état1 \rightarrow état2}$  : Paramètre d'ajustement de la probabilité maximale de transition d'un état 1 vers état 2.

$\beta_{état1}$  : Seuil d'activation de l'influence normalisée  $\frac{I_{état1}^{tot}}{I_{état1}^{max}}$  de la transition vers état 1 en-deçà duquel la transition est impossible.

$L(r)$  : Fonction Lorentzienne généralisée employée comme fonction de distance.

$$L(r) = \frac{1}{(r^2 + r_0^2)^\eta}$$

$r_0^{état}$  : Paramètre de largeur de pic de la fonction Lorentzienne appliqué à l'influence exercé par un état.

$\eta_{\text{état}}$  : Paramètre d'intensité relative des effets d'influence à longue distance d'un *état* de la fonction Lorentzienne.

$M_{\text{état}}(n)$  : Matrice de présence d'un état dans la grille de l'automate cellulaire à une itération  $n$ .

$M_{\text{calc}}^{\text{état1} \rightarrow \text{état2}}$  : Matrices de calcul des poids d'influence des cellules pour la transition d'un *état1* vers un *état2*.

$M_{\text{voisins}}^{\text{état}}$  : Matrices du nombre de voisins d'un état donné de chaque cellule.

$M_{\text{même voisins}}^{\text{état}}$  : Matrices du nombre de voisins d'un même état que la cellule considérée de chaque cellule.

$M_{\text{autorisation}}^{\text{état1} \rightarrow \text{état2}}$  : Matrices d'autorisation de transition d'un *état1* vers un *état2* de chaque cellule.

$M_{\text{lecture autorisation}}$  : Matrice de lecture des transitions d'état possibles pour chaque cellule.

$M_{\text{change}}^{\text{état1} \rightarrow \text{état2}}$  : Matrices des changements d'un *état1* vers un *état2* opérées pour une itération  $n$ .

$M_{\text{isolées}}^{\text{état}}$  : Matrices des cellules isolées d'un état donné vers la fin de l'itération.

$M_{\text{voisins état}}^{\text{tissu isolées}}$  : Matrices du nombre de voisins d'un état donné de chaque cellule de tissu isolée, seules cellules susceptibles d'être isolées par deux *états* différents.

## **I. Introduction**

L'ostéosarcome se caractérise par la production d'une substance proche de l'os dite "ostéoïde" suivant une structure spongieuse d'ostéoïde et de cellules tumorales. C'est par la propagation de cette structure que l'ostéosarcome se caractérise, mais suivant différents modes d'expression qui peuvent dans certains cas mener à un remplacement de la structure osseuse saine. La dynamique de l'évolution de l'ensemble de la structure ostéoïde générée par la pathologie reste cependant assez obscure.

Dans le but de comprendre la structure produite par la pathologie et éventuellement pouvoir remonter aux mécanismes de propagation à partir de celle-ci, nous avons engagé deux démarches complémentaires. Dans un premier temps, l'étude structurale d'un cas d'ostéosarcome avancé à partir de l'acquisition dans le volume complet sur le cas d'une patte de souris par des méthodes de tomographie. Nous employons à cet effet plusieurs formes de traitement des images et volumes pour tenter de dégager des tendances dans les tailles formes et distances de la structure spongieuse de l'ostéosarcome, pour déterminer s'ils existent les aspects cohérents de la structure macroscopique à petite échelle.

Dans un second temps, nous avons mis au point une simulation 2D sous LabVIEW sous la forme d'un automate cellulaire commandé par des règles simples dans le but de reproduire le type même de structure de l'ostéosarcome. Si par l'implémentation de règles simples dans un modèle itératif il est possible de reproduire la structure observée par tomographie de l'ostéoïde produit par l'ostéosarcome, alors il est possible que les règles employées soient au moins de manière empirique liées au mode de propagation de la pathologie. Et à partir de ces règles, il devient alors possible de remonter au mode de diffusion du vecteur de propagation par fabrication de l'ostéoïde. C'est pourquoi nous utilisons la simulation pour rechercher les paramètres de la propagation de l'ostéosarcome, en comparant les résultats de simulation aux résultats de tomographie de stade avancé de la pathologie.

## **II. Données expérimentales obtenues par tomographie**

La tomographie est une technique d'imagerie non destructive très utilisée en médecine qui permet de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures extérieures au volume. Il existe deux formes de tomographies employées en médecine, la Tomographie à Emission de Positons (TEP) et la tomographie rayons X.

La méthode employée fonctionne par une rotation à 360° de différentes acquisitions par rayons X, avec le niveau de transmission mesuré. A partir de ces mesures une image 3D du volume peut être reconstruite, et dans le cas d'une substance proche de l'os comme l'ostéoïde produite par l'ostéosarcome, il s'agit ici de la méthode employée.

### **A. Données tomographiques d'ostéosarcome avancé**

Les acquisitions sur lesquelles nous travaillons nous ont été fournies par Séverine Battaglia de l'équipe de l'équipe Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés de l'UFR de Médecine de l'université de Nantes UMR Inserm, et se présentent sous la forme de 2057 images consécutives suivant l'axe du tibia du sujet depuis le "pied" jusqu'au "genou", d'une souris infectée par ostéosarcome à un stade de développement avancé.

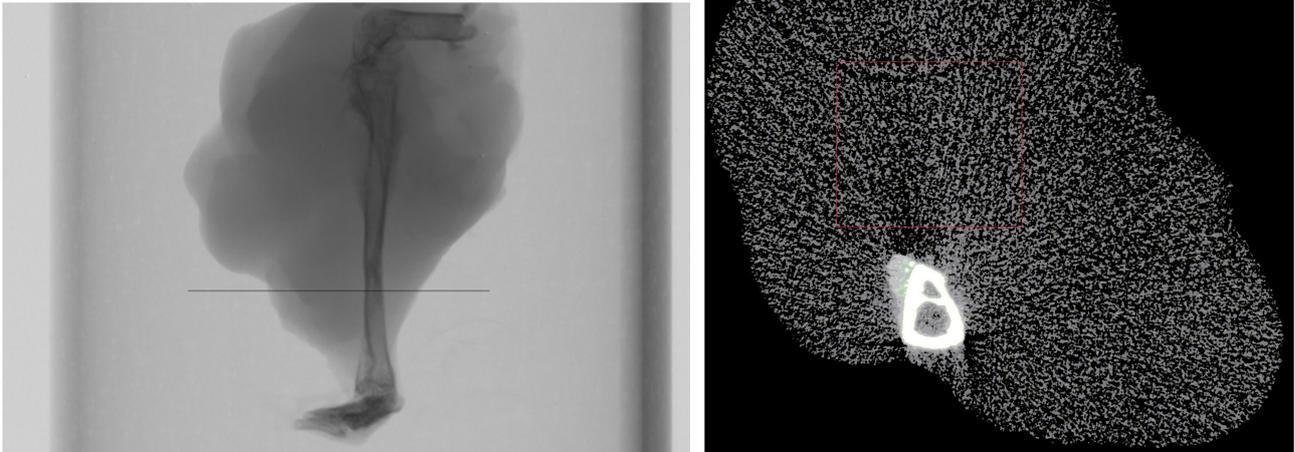


Figure 1.: A gauche, radiographie de l'échantillon, patte de souris atteinte d'ostéosarcome avancé, le nuage gris étant la mousse de substance ostéoïde. A droite, image de tomographie en transversal du tibia n°1512 en contraste intensifié.

Le cas sur lequel nous avons travaillé est ici à un stade fortement avancé, avec un volume de structure tumorale énorme comparé à la taille de l'individu. Nous sommes ici dans le cas où la structure osseuse saine n'a pas été dégradée par le mécanisme de croissance de l'ostéosarcome.

Nous pouvons voir sur l'exemple ci-dessus le caractère invasif de l'ostéosarcome et la forte progression de la pathologie, mais en l'absence de visualisation directe des cellules tumorales, il est difficile à partir de ces acquisitions si il existe un front de cellules tumorales avant la progression de la structure ostéoïde, ou si celle-ci se propage dans le tissu sain, ou si ladite progression est parfaitement de concert.

En revanche, de la simple observation d'une telle coupe 2D, il semble à l'œil qu'une certaine forme de structure radiale centrée sur l'os sain apparaisse. Si l'image a été traitée afin d'améliorer le contraste des gris pour faciliter la lecture, celle-ci n'a pas été purement binarisée, et il est difficile de dire quelle est la part de tissu tumoral et quelle est la part de substance ostéoïde et leur ratio dans la structure complète. Nous faisons ici l'hypothèse que seules les cellules tumorales subsistent au sein de la mousse ostéoïde.

Afin de mieux se représenter la structure interne de l'ostéosarcome, nous avons cherché à représenter en 3D une portion de l'échantillon à partir des images consécutives de tomographie.

## B. Représentation 3D de la structure osseuse par logiciel Paraview

A partir des images de tomographie consécutives, nous avons pu grâce au logiciel Paraview reconstituer en 3D une approximation des deux structures imbriquées de cellules tumorales et de substance ostéoïde. L'objectif est ici d'observer la structure 3D, mais également de vérifier à partir des images de tomographie la structure bicontinue de l'ostéosarcome, un entremêlement d'une phase continue d'ostéoïde et d'une phase continue de cellules tumorales.

Pour cela, nous avons sélectionné une zone au cœur de la structure dans laquelle nous avons cherché à récupérer et représenter les isosurfaces d'un cube de 256 pixels de côté. Nous désignons par isosurfaces l'ensemble des pixels d'une même valeur choisie ainsi que les interfaces entre pixels dont la valeur en niveau de gris sont de part et d'autre de cette valeur choisie. L'ensemble des points ainsi calculés forment une surface en 3D, ce qui permet de délimiter des zones d'intensités différentes.

Nous avons ouvert grâce à Labview 256 images en montant à partir de l'image 1512, l'image 1 étant au niveau du pied et l'image 2057 au niveau du genou et découpé dans chaque image la même exacte zone de de 256x256 pixels afin de former une matrice 3D des valeurs en niveaux de gris des extraits d'image. A partir de ces valeurs, nous avons ensuite réalisé un certain nombre d'expérimentations sur les valeurs limites employées pour définir les isosurfaces de la phase ostéoïde et de la phase tumorale représentées en 3D avec le logiciel Paraview.

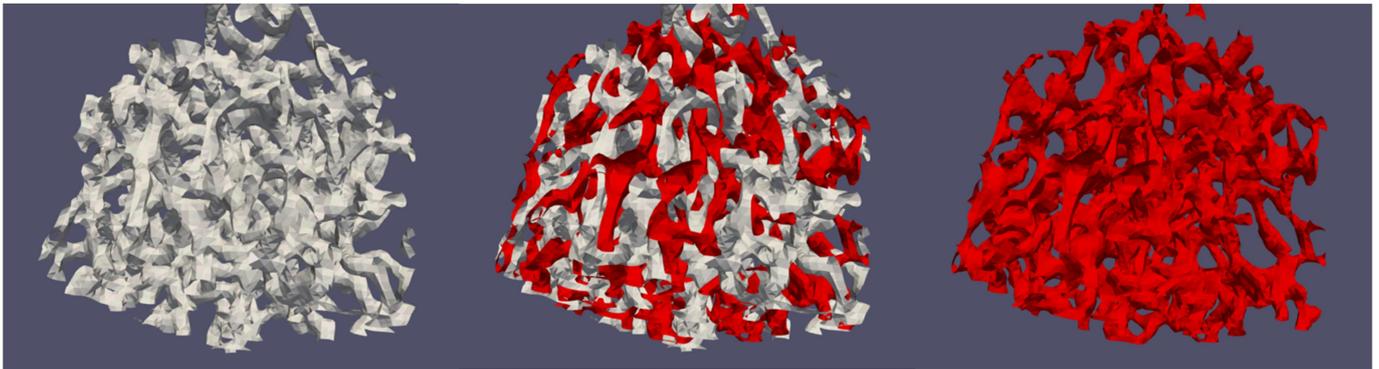
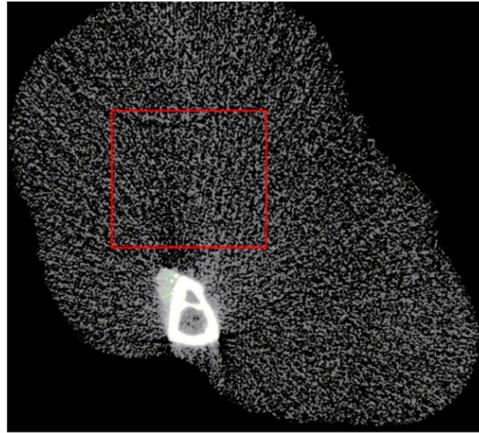


Figure 2.: En haut, sélection carrée de 256x256 pixels sur l'image de tomographie n°1512 éclaircie. En bas, reconstruction des volumes 3D par Praview. A gauche, représentation 3D isosurface correspondant à la phase ostéoïde du cube sélectionné. A droite, représentation 3D isosurface correspondant à la phase cellulaire tumorale. Au centre, imbrication des deux structures 3D ostéoïde et cellulaire tumorale.

Pour le résultat final, nous avons sélectionnées deux valeurs différentes pour représenter l'isosurface de la phase ostéoïde et celle de la phase tumorale plutôt que la simple interface entre les deux afin d'augmenter la lisibilité de la structure 3D résultante. Le choix d'une sélection d'un cube de 256 pixels de côté a principalement été motivé par cet effort de lisibilité des résultats.

Nous avons donc recréé à partir de ces données de tomographie deux objets 3D à partir des valeurs d'isosurfaces sélectionnées comme nous pouvons le voir ci-dessus, avec la structure ostéoïde en blanc et la structure cellulaire tumorale en rouge. le choix de passer par deux structures avec une lacune entre les deux dans leur imbrication sert à illustrer la coexistence bicontinue des deux phases, de telle sorte qu'il n'y ait pas de collision dans les objets 3D ainsi créés.

L'observation dans l'espace des objets ainsi recréés à partir des données de tomographie confirme la nature bicontinue des phases tumorales et ostéoïde. Cet élément est particulièrement important dans l'appréhension de l'ostéosarcome, puisqu'il nous indique que malgré le caractère erratique de la croissance de la structure de la pathologie, celle-ci se fait suivant une logique qui ne résulte en aucune particule isolée d'ostéoïde dans la phase cellulaire, ou cellulaire dans la phase ostéoïde.

Cependant, la reconstitution 3D par isosurface des deux phases dépend largement des valeurs limites des phases employées. Le travail sur des niveaux de gris offre une certaine marge d'interprétation quant à la détermination de la limite entre les deux phases, et une certaine forme de travail a été effectuée afin de trouver un compromis acceptable entre lisibilité et justesse pour l'analyse.

### **C. Traitement des images et analyse particulière**

Une partie importante du travail de traitement des images et de la recherche du compromis entre lisibilité et justesse pour analyse a été effectué lors d'un stage par Yoann Jegat pour son Master 1, dont la tâche principale était la préparation des images de tomographie pour l'exploitation, et une analyse statistique et quantitative des particules osseuses (voir annexe 4 : Analyse de coupes tomographiques).

Outre d'avoir mis au point la procédure de traitement des images de tomographie, les résultats obtenus révèlent une progression plus avancée du volume de la pathologie autour du point d'injection des cellules tumorales, qui semble se traduire par proportion de particules de grande taille plus importante. Cette observation peut éventuellement suggérer soit une évolution dans la dynamique de propagation de la pathologie, soit un effet de vieillissement au sein de la structure.

Son travail a permis de déterminer une série de paramètres pertinents pour de futures études comparatives, spécialement vis-à-vis des résultats de simulation. Cependant, l'étude particulière par Labview ne fournit pas à partir des fonctionnalités employées d'information sur la structure générale de la mousse ostéoïde générée par la pathologie, et pour cela il a été nécessaire d'employer d'autres outils mathématiques.

### **D. Méthodes d'analyse de structure des acquisitions en tomographie**

Afin d'étudier les effets de structure plutôt que de forme au sein des images de tomographie, de dégager des tendances de répétitions, nous avons dû avoir recours à de nouveaux outils mathématiques afin d'analyser les images de tomographie. Afin d'exploiter ces éléments, nous passons par des techniques issues de la transformée de Fourier, une opération mathématique qui transcrit tout signal réel dans l'espace réciproque des fréquences spatiales, révélant les informations fréquentielles d'un signal, ici les intensités des pixels qui sont proportionnelles à la présence d'os.

#### **1) Analyse par spectre de puissance**

Le spectre de puissance est une fonction qui pour tout signal donne une représentation de valeurs de puissance en fonction de la fréquence, soit une représentation graphique de la distribution des fréquences du signal, où la puissance est considérée comme la moyenne du signal au carré. Le principe est similaire à la figure de diffraction des rayons X en SAXS, avec en 2D des figures en symétrie autour d'un point central<sup>1</sup>.

La transformée de Fourier d'une fonction est toujours une fonction complexe, et le spectre de puissance se calcule à partir de celle-ci comme le produit de la transformée de Fourier ( $TF$ ) par son conjugué. Soit pour une fonction  $f$  en exemple, le spectre de puissance  $S$  s'obtient simplement tel que :

$$TF(f) = F \quad \text{soit } S = F \times \bar{F} = a^2 + b^2 \\ \text{avec } F = a + ib \text{ dont le conjugué s'écrit } \bar{F} = a - ib$$

En termes d'usage sur des images 2 ou 3D, le spectre de puissance se comporte exactement comme une figure résultante d'une acquisition SAXS sur une structure, avec des informations

potentielles d'intensité, d'orientation et d'anisotropie en natif, mais par une intégration radiale, peut nous donner accès aux interdistances entre signaux les plus exprimées et la qualité de l'ordre de cette distribution. L'ensemble de ces informations sont essentiellement des mesures de l'organisation de la structure aux ordres longs, soit en lien avec la répétition des structures sur de grandes distances.

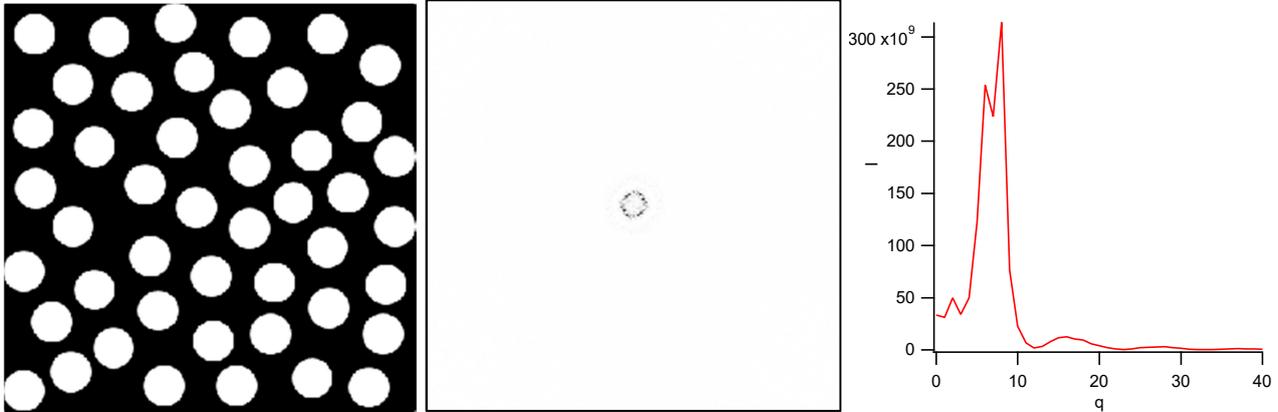


Figure 3.: A gauche, exemple de structure en 256x256 pixels. A milieu, spectre de puissance en couleur inversée de l'exemple. A droite, spectre 1D résultant d'une intégration radiale du spectre de puissance précédent.

Les techniques employées sont celles de la Transformée de Fourier Rapide (Fast Fourier Transform, FFT), ce qui impose de travailler dans des intervalles en puissance de 2, d'où la sélection en 64x64 ( $2^8$ ) de l'échantillon pour l'exemple ci-dessus. Nous pouvons voir sur l'exemple ci-dessus l'expression d'une interdistance entre structures de l'ordre de 8 pixels.

Nous avons donc accès par la réalisation du spectre de puissance à des informations structurelles relatives à la répétition aux grands ordres. Pour les informations aux petits ordres, nous utilisons la technique de la fonction de corrélation de paire.

## 2) Analyse par fonction de corrélation de paire

La deuxième fonction mathématique employée est la fonction de corrélation de paire (Pair Distribution Function, PDF). Il s'agit d'une fonction largement employée pour l'analyse de matériaux désorganisés. Celle-ci offre une représentation moyenne sur une sélection donnée de la forme des particules, ainsi que de l'organisation aux ordres courts. L'intensité affichée représente la probabilité pour chaque point de trouver un autre point de signal autour de lui-même à la distance affichée.

Cette fonction peut se calculer aisément à partir du spectre de puissance  $S$ , suivant une transformée de Fourier inverse de ce dernier. Soit une fonction de corrélation de paire  $C$  telle que :

$$C = TF^{-1}(S)$$

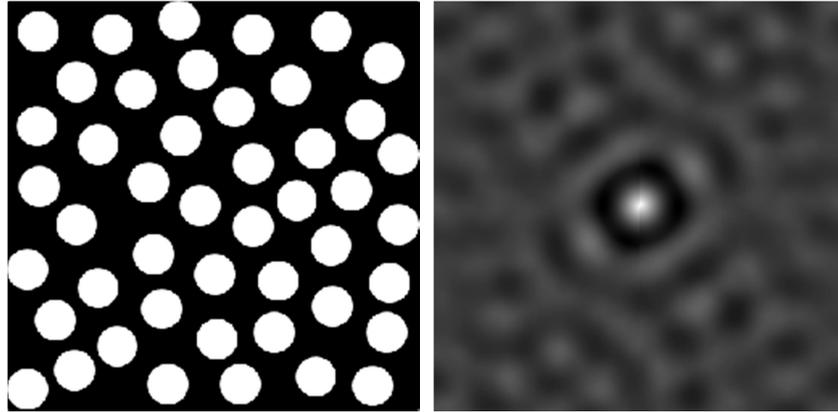


Figure 4.: A gauche, sélection de 64x64 pixels d'image de tomographie. A droite, PDF correspondante de la sélection.

Les effets de moyenne spatiale du procédé fait apparaître sur l'image de fonction de corrélation de paire des connexions qui n'existent pas, mais indiquent cependant les directions les plus susceptibles de présenter un autre objet. L'organisation à courte portée est donc identifiable à partir de cette image, et un effet de taille mesuré.

### E. Résultats d'analyse d'images de tomographie

Différentes approches pour l'analyse structurale des acquisitions tomographiques ont été envisagées, afin de déterminer laquelle pourrait être la plus adaptée pour révéler les tendances de la structure ostéoïde générée par l'ostéosarcome. La technique de la fonction de corrélation de paire n'a été envisagée que tardivement, c'est pourquoi celle-ci est largement absente de nos efforts de compréhension de la structure ostéoïde.

#### 1) Analyse 3D en spectre de puissance

La structure étudiée étant en trois dimensions, la première démarche a été de tenter l'analyse par spectre de puissance en trois dimensions, afin de pouvoir vérifier si on ordre aux grandes distance fort se dégageait, avec des interdistances entre éléments ostéoïdes bien définies, ou en termes d'orientation.

La sélection employée est la même que celle transcrite en structure 3D, soit une sélection cubique de 256 pixels de côté située au cœur de l'échantillon, soit autour de la 1512 tranche, considérée comme proche du lieu d'injection initial des cellules tumorales.

Si la partie calculatoire du spectre de puissance 3D fut assez aisée à mettre en place par programmation Labview, l'analyse s'est ensuite heurtée à un problème d'ordre pratique en termes d'analyse, à savoir la difficulté de représenter une figure 3D d'intensité variable de manière lisible. Une tentative d'analyse a été faite en réalisant une série d'isosurfaces sur Paraview (la raison première de l'utilisation de ce programme).

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à recréer un objet 3D du spectre de puissance permettant une lisibilité efficace de celui-ci, mais les séries de différentes isosurfaces tendaient à ne pas indiquer de forte expression d'une distance ou d'une direction dans l'espace. Outre ce premier résultat décevant, le manque de maîtrise du programme entraînait des temps de traitement excessifs pour des résultats médiocres, ce qui nous a incité à envisager une méthode de travail différente.

## 2) Analyse en spectres de puissance suivant trois axes orthogonaux

Nous avons pu voir sur le premier exemple de spectre de puissance une figure assez mal définie, en raison notamment de la taille de la sélection appliquée. Celle-ci est cependant nécessaire, puisque des sélections supérieures de 512 pixels de côté deviennent très difficiles à sélectionner sans que le tibia ou le péroné n'apparaissent, leur présence entraînant des erreurs de mesure.

Afin d'obtenir une vision tridimensionnelle malgré tout, nous avons travaillé à reconstruire des tranches suivant les axes  $x$  et  $y$ , l'axe  $z$  étant celui suivant l'axe de l'os. Nous avons employé un programme codé sous Labview qui lit chaque image de tomographie en notre possession afin de reconstituer une matrice 3D des valeurs de gris, avant de les distribuer en matrices 2D/tranches suivant les axes de notre choix.

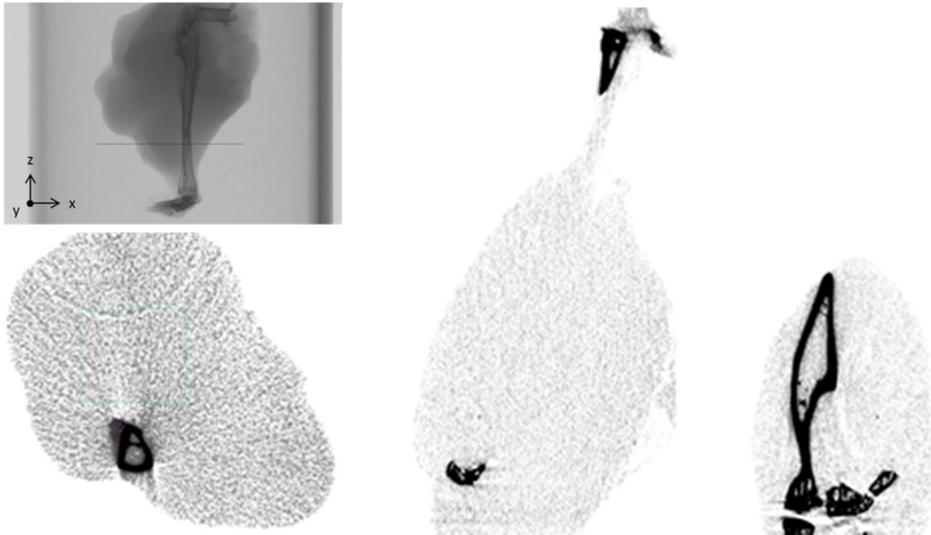


Figure 5.: Exemples d'images de tomographie, à gauche tel que reçues selon l'axe  $z$ , au centre reconstitution suivant l'axe  $y$ , à droite, reconstitution suivant l'axe  $x$ .

A partir de ces reconstitutions, il est possible de découper des séries d'images en 256x256 pixels pour recréer des spectres de puissance suivant les trois axes, ceci afin de pouvoir explorer si les spectres de puissance révèlent un comportement similaire de la structure ostéoïde suivant différentes directions, ou s'il s'avère que le mode de propagation résulte sur une structure homogène dans l'espace.

Cependant, les sélections disponibles sans englober de l'espace extérieur à la structure ou de l'os apparemment sain sont somme toute assez réduites, surtout au regard de la contrainte de travailler avec des sélections en pixels suivant des puissances de deux pour les fonctions de transformée de Fourier rapides. Aussi les sélections en question afin de réaliser un pour analyser le même espace suivant trois directions ne permettent pas de dépasser les 256 pixels de côté.

Aussi, afin de pouvoir appréhender plus facilement les tendances générales des structures suivant les trois axes cartésiens, nous avons réalisé la somme pour chaque des 256 spectres de puissance réalisés.

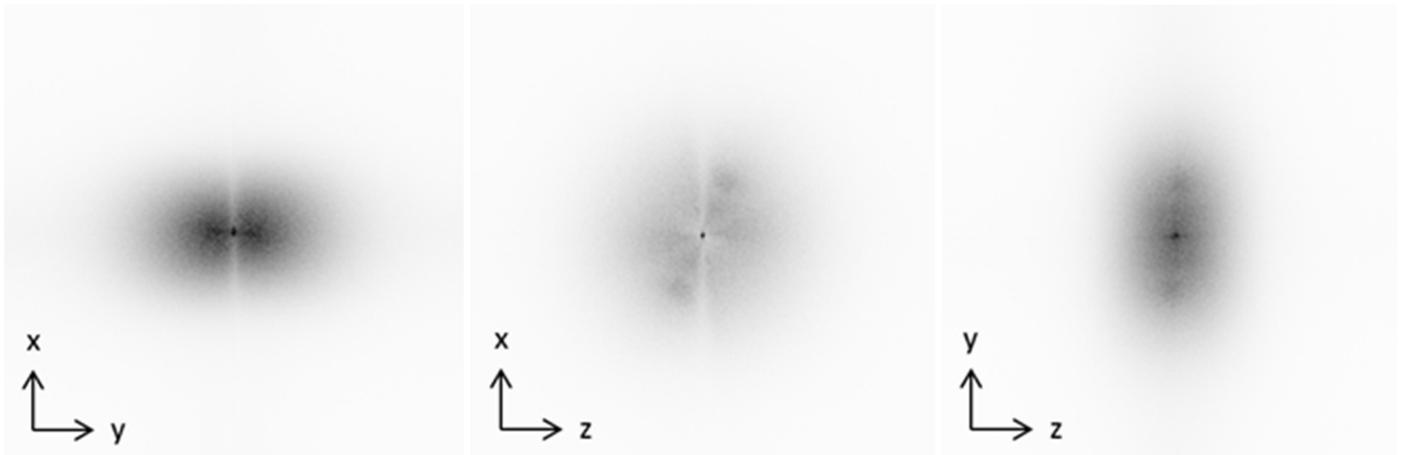


Figure 6.: Sommes des spectres de puissance dans une sélection cubique de 256 pixels de côté, en couleur inversée. A gauche suivant l'axe z, au milieu suivant l'axe y, à droite suivant l'axe x.

Les images ainsi obtenues semblent indiquer plusieurs tendances, mais pas d'ordre marqué à longue distance. Les spectres de puissance suivant l'axe  $x$  ne révèlent rien, si ce n'est une préférence orientationnelle suivant l'axe  $y$ , ce qui s'observe également sur les spectres de l'axe  $z$ . Pour leur part, les spectres des axes  $z$  et  $y$  semblent révéler une mince bande d'exclusion suivant l'axe  $x$ . La seule hypothèse que nous ayons quant à l'origine de cette bande d'exclusion serait un effet de la reconstruction des mesures rayons X en images de tomographie.

Les intégrations radiales de ces résultats pour leur part ne révèlent pas de maximum, et donc aucune interdistance préférentielle particulière. Nous avons donc cherché un autre axe d'étude sur nos acquisitions tomographiques. La sélection cubique de 256 pixels de côté, étant unique dans l'échantillon, nous avons cherché à observer l'effet dans l'échantillon de la position de la sélection sur les spectres de puissance, avec une sélection plus petite.

### 3) Effets de localisation dans l'échantillon

Au moment de l'étude des acquisitions tomographiques, l'un des phénomènes escomptés était le développement plus ou moins radial à partir du point d'injection des cellules tumorales de la structure ostéoïde. Afin de tester cette hypothèse, un effort a été fait sur l'analyse comparative des spectres de puissance suivant une sélection de différentes positions dans l'échantillon. Ces sélections ont été effectuées sur des cubes de 64 pixels de côté dans différentes position de l'échantillon, mais sur un même plan de départ afin de réduire les variables.

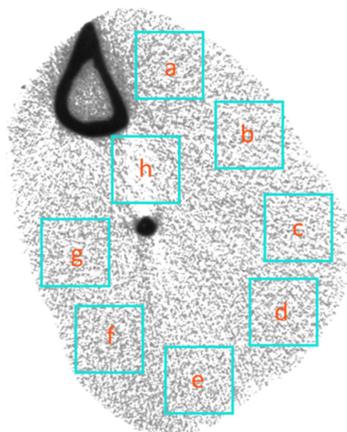


Figure 7.: Différentes localisations des spectres de puissance sommés sur cubes de 64 pixels de côté.

A partir de ces positions, nous avons calculé sur une épaisseur de 64 images les spectres de puissance et fonction de corrélation de paire, avant de les sommer pour donner une forme de représentation de la moyenne de ces mesures.

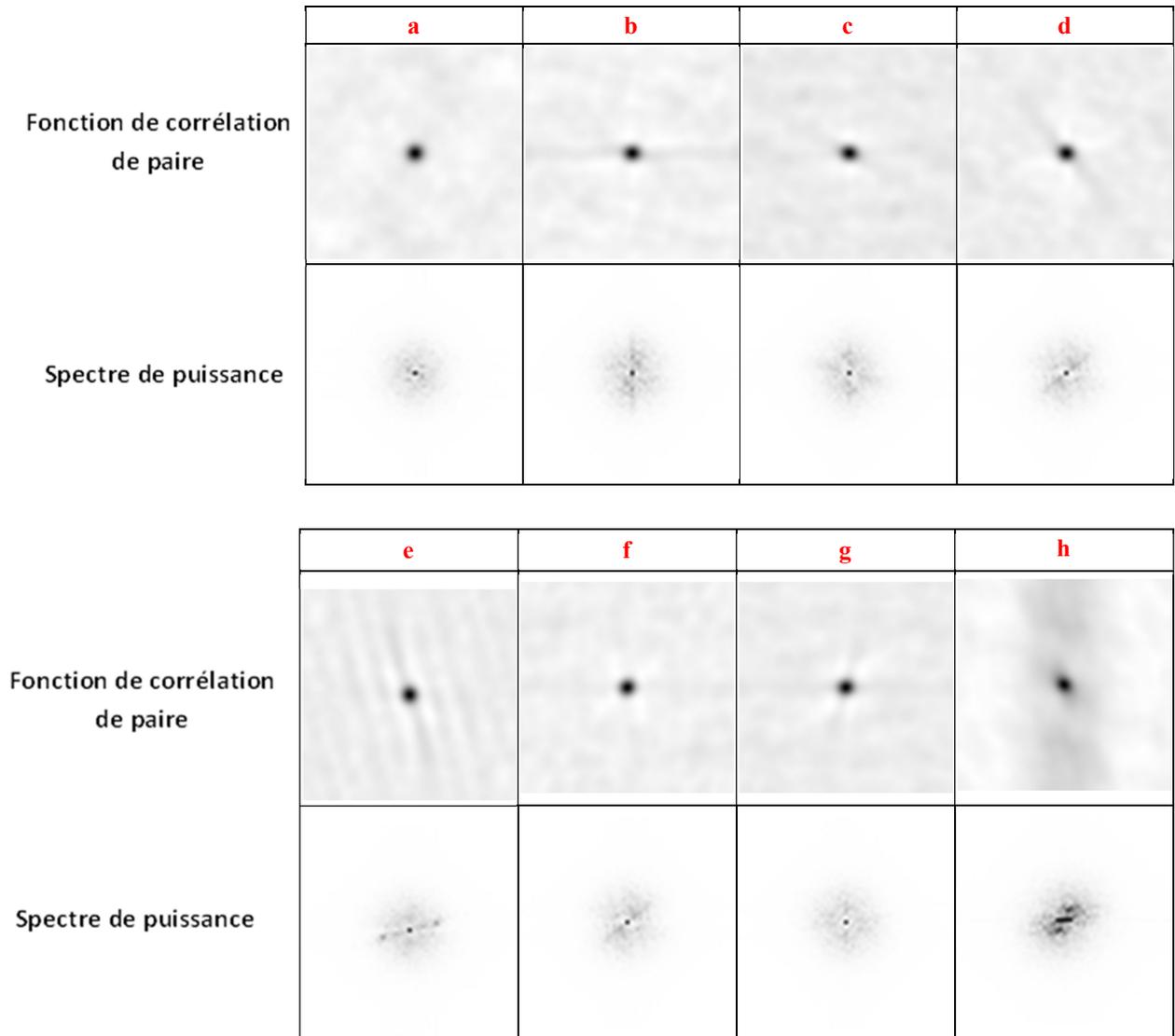


Figure 8.: Tableau récapitulatif des images de corrélation de paire et de spectre de puissance des sites sélectionnés, en couleur inversée.

La majorité des images de corrélation de paire semblent indiquer une orientation préférentielle de la continuité des proches voisins suivant la direction entre le tibia (os principal en noir) et la zone sélectionnée. Les exceptions étant ici *a*, *f* et *h*. Ce dernier subit une forme d'effet d'ombre résultant de sa position entre tibia et péroné, tendance qui est observable dans l'ensemble des images de tomographie. Pour *a* et *f*, pas d'explication, juste l'hypothèse que cet effet d'orientation des proches voisins n'est pas une généralité globale de la structure de l'ostéosarcome, ou une perte de l'orientation au cours du temps, potentiellement par un effet de remodelage.

Les spectres de puissance appuient quelque peu les observations en orientation des fonctions de corrélation de paire, mais à de rares exceptions, ne semblent pas indiquer de distance caractéristique bien définie, élément vérifié par intégration radiale. Le seul échantillon offrant

une forme d'anisotropie marquée est  $h$ , dont les circonstances particulières ont déjà été mentionnées.

En somme, outre un effet d'orientation aux proches voisins avec une tendance radiale des connexions sur l'os initialement infecté, nous n'avons pas réussi à obtenir de données intéressantes à même de révéler une organisation mesurable ou des distances de répétition spécifiques dans la structure de l'ostéosarcome, ni par aucune autre méthode employée. Ce manque de résultat reste cependant un résultat en soi, puisqu'il nous informe de l'important degré de désorganisation générale de la structure de l'ostéosarcome, un élément important à reproduire par le biais de la simulation pour comprendre le mode de propagation.

#### 4) Éléments pour comparaison avec modélisation

Une part importante du travail effectué sur les images de tomographies était, outre une tentative de discerner des éléments d'ordre à longue et courte distance au sein de la structure de l'ostéosarcome, d'apporter des éléments de référence pour comparaison lors de nos efforts à reproduire lesdites structures par le biais d'une simulation.

Voici ci-dessous trois exemples obtenus par spectre de puissance et fonction de corrélation de paire, qui nous offre une idée des résultats structuraux à obtenir par simulation.

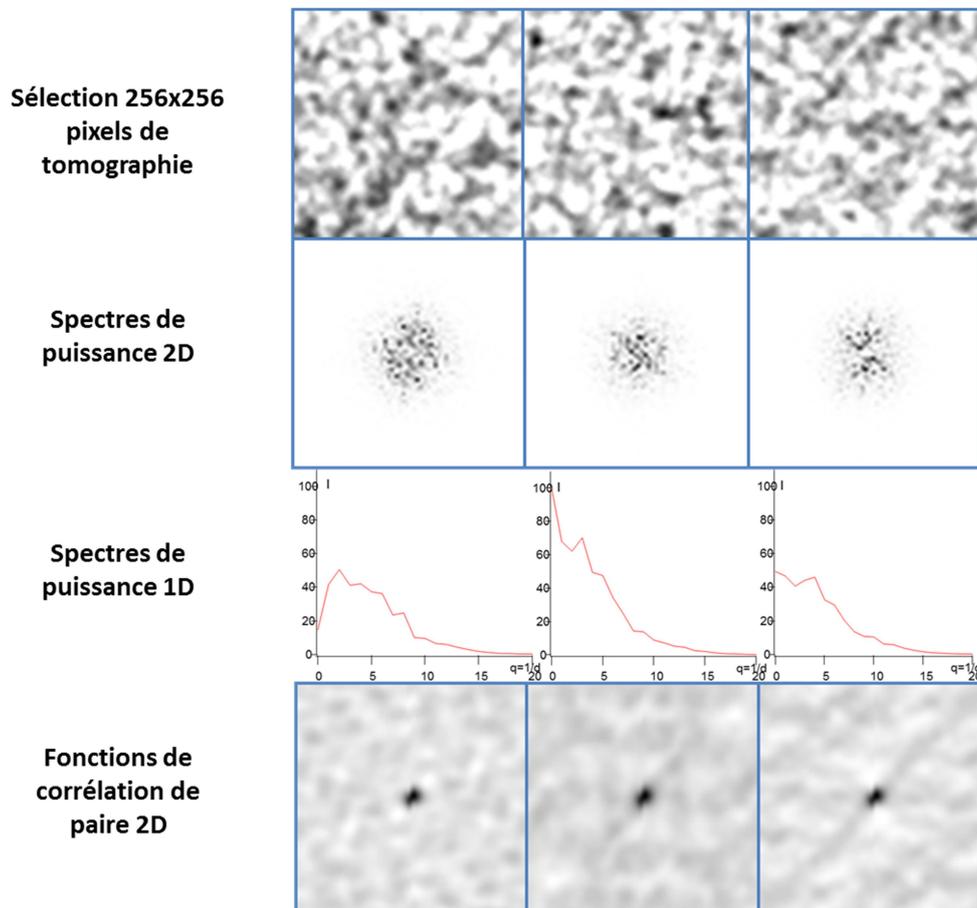


Figure 9.: Trois exemples en 256 pixels de côté d'échantillon tomographique, spectre de puissance, en intégration radiale et fonction de corrélation de paire.

Ces éléments représentent des objectifs à atteindre à partir des résultats de simulation d'automate cellulaire, notamment en termes de désordre et d'interdistances entre les particules.

### **III. Principe de l'automate cellulaire**

Un automate cellulaire est une simulation, dont l'évolution est dictée par un jeu de règles de propagation simples, dont le mécanisme est le fruit de calculs opérés de manière séquentielle et itérative sur un ensemble d'espaces appelés "cellules" constitués en grille. La décision d'utiliser ce type particulier de simulation a été orientée en partie par une connaissance du mode de fonctionnement d'un tel automate au sein du laboratoire par Pascal Panizza<sup>2</sup>, et d'autre part par une facilité à représenter les unités d'espace variables dans la grille.

#### **A. Généralités de l'automate cellulaire**

Les automates cellulaires sont des processus itératifs composés d'un ensemble de cellules en une à trois dimensions pouvant prendre différentes valeurs, généralement discrètes. Chaque changement potentiel d'état des cellules, des unités, s'effectue au moment du changement d'itération, et le plus souvent par contact direct.

Ce changement s'effectue suivant des règles simples généralement immuables et globales itération après itération, en fonction de l'état des cellules voisines. Un des objectifs des automates cellulaires est de découvrir l'effet de certaines règles sur la simulation sous la forme de comportements émergents, comme des structures spécifiques, ou des répétitions qui découlent directement, mais pas nécessairement de manière anticipée.

L'un des usages de ces automates cellulaires est la reproduction par règles simples de modèles de développement, déplacement ou propagation observés dans la réalité<sup>3-6</sup>, afin de déterminer à partir des comportements émergents les règles et lois physiques responsables des phénomènes observés. C'est ici l'approche employée afin d'essayer de comprendre le mode de propagation de l'ostéosarcome, dans un but d'identification du vecteur de propagation à des fins d'inhibition du développement de la pathologie, et de détermination des zones affectées.

Le modèle de simulation choisi ici est dans un premier temps celui d'une grille de cellules 2D carrée de 1024 pixels de côté. Cette décision est motivée par des considérations de simplicité pour la mise au point du modèle par rapport à un modèle 3D, facilitant la correction d'erreurs de codage, d'accessibilité pour une représentation graphique facilement interprétable, de puissance de calcul, une dimension supplémentaire augmentant rapidement la quantité de calcul nécessaire, et de limitation de la complexité des résultats pour l'interprétation des effets des modes de codage et différents paramètres.

Notre automate se base sur certaines hypothèses de travail dans la reproduction de la propagation de l'ostéosarcome, hypothèses établies à partir de la connaissance actuelle des mécanismes de l'ostéosarcome, observations SAXS et spéculations sur le mode de fonctionnement interne.

#### **B. Hypothèses du modèle**

Notre modèle de simulation de l'ostéosarcome repose sur plusieurs hypothèses de travail. La première se base sur le principe de cercle vicieux de l'ostéosarcome<sup>7,8</sup>, où la présence de cellules tumorales favorise la production et la dégradation de matériel osseux et ostéoïde, et dont la dégradation favorise la propagation des cellules tumorales. Les phénomènes de propagation des cellules tumorales et de l'ostéoïde sont intrinsèquement liés selon le modèle du cercle vicieux, sur lequel nous nous basons ici.

Nos hypothèses appliquées à la simulation est donc la suivante, et inspirée des modèles de Turing :

**1° : La présence de cellules tumorales stimule la fabrication d'ostéoïde, et la présence d'ostéoïde favorise en retour la propagation des cellules tumorales,** dans un modèle de stimulation couplée, où chaque élément favorise la propagation de l'autre.

Un modèle plus complet pourrait fonctionner à l'avenir avec une stimulation dynamique de la propagation des cellules tumorales par la quantité d'os dégradé, mais ce premier modèle a vocation à rester simple, d'une part dans une étude de l'intérêt du procédé dans l'étude de l'ostéosarcome, d'autre part afin de faciliter l'étude des comportements émergents des règles appliquées.

**2° : Les structures internes de la tumeur, ostéoïde et cellules tumorales, ne sont pas fixes, et le remodelage se poursuit en interne.** En l'absence d'analyse et d'études complètes sur la dynamique de la formation et propagation de l'ostéosarcome, il est impossible de déterminer si l'activité tumorale est confinée à l'interface entre la tumeur et le tissu sain, ou bien si la production et dégradation osseuse se poursuit en interne.

Entre la possibilité d'un gonflement interne déplaçant les structures périphériques ou bien une activité autre que strictement périphérique, nous appliquons l'hypothèse que les structures osseuses et de cellules tumorales sont impermanentes à notre simulation.

Il est après tout plus facile de couper les phénomènes internes à la structure de la simulation que de rajouter le paramètre à posteriori, et cette configuration nous offre la capacité à explorer les deux possibilités plus facilement en aval.

**3° : La fabrication d'ostéoïde et la propagation des cellules tumorales s'effectuent par contact, sous l'effet des cellules du type opposé suivant une fonction d'influence à distance.** Appuyée entre autre par les résultats obtenus en SAXS, cette hypothèse suppose que l'action des cellules tumorales s'effectue par un vecteur capable d'affecter le remodelage de l'os à distance. En retour, et afin de garder le modèle le plus simple possible, l'influence de l'os dans le modèle de stimulation couplée est également considérée comme effective à distance.

Nous considérons que chaque cellule génère individuellement de l'influence sur la propagation de l'autre espèce, et que le changement opère en fonction du cumul de ces influences à distance. La fonction d'influence en question reste à déterminer, et différents modèles sont envisagés et ont été testés pour en déterminer l'effet. C'est particulièrement l'effet de cette influence à distance qui va agir sur le phénomène itératif de changement de nature des cellules.

### **C. Représentation de l'automate**

Notre simulation par automate cellulaire se présente sous la forme d'une grille, de dimensions 1024x1024 en règle générale, dont chaque cellule est porteuse d'une "valeur" discrète parmi trois possibles. Ces trois valeurs sont "tissu", qui représente le tissu sain, le substrat sur lequel l'ostéoïde et les cellules tumorales vont se propager, "sarcome" qui représente les cellules tumorales, et "os" qui représente également l'os sain à même d'être phagocyté par la pathologie et l'ostéoïde généré par celle-ci.

L'effet de cette grille de "valeurs" permet une représentation graphique de chacun des états sous la forme d'une image dont chaque couleur représente un état, *tissu*, *sarcome* ou *os*, respectivement noir, gris et blanc.

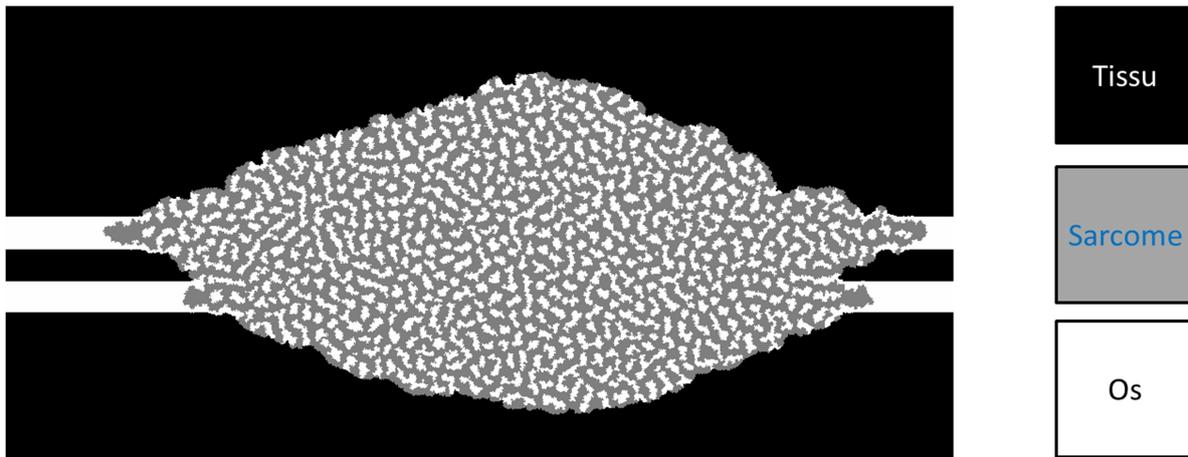


Figure 10.: En haut, code couleur des états possibles des cellules de l'automate. En bas, exemple de résultat de simulation utilisant ce code couleur, chaque pixel représentant une cellule de l'automate.

Cette représentation graphique de l'automate permet une visualisation efficace de l'évolution des phases et offre un grand nombre d'opportunités d'analyse par des techniques de traitement de l'image, plus spécialement celles vues dans l'analyse des images de tomographies employées.

Un élément important du traitement de la grille de l'automate cellulaire est le traitement des bords de celle-ci. Afin de s'affranchir des effets de bord à même d'émerger, nous utilisons les conditions périodiques, qui considèrent les bords opposés se comportent comme s'ils étaient connectés, avec  $[i_{max}+1 ; j_{max}+1]=[i_0 ; j_0]$ .

#### D. Changement d'état des cellules de l'automate

L'automate cellulaire se base sur la capacité de chaque cellule de changer d'état, de "valeur", suivant des circonstances précises. Les circonstances en question sont d'une part géométriques, avec des contacts entre cellules de natures différentes, et d'autre part mathématique, avec un effet de distance.

##### 1) Capacité de changement des cellules

Nous avons vu plus tôt que notre automate est constitué de trois états de cellules possibles, *tissu*, *sarcome* et *os*. Chaque cellule est capable de changer d'état suivant certaines règles, la première de ces règles étant le contact direct avec une cellule dans l'état cible de la transformation.

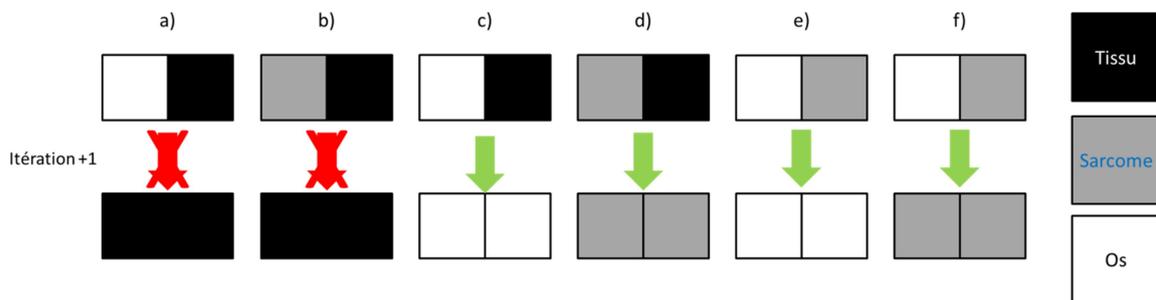


Figure 11.: Récapitulatif des transitions d'état possibles des cellules dans l'automate cellulaire.

Chaque cellule quel que soit son état possède la capacité de changer d'état pour un état *os* (Fig. 11 c et e) ou *sarcome* (Fig. 11 d et f). Les cellules n'ont en revanche pas la capacité à changer en *tissu* (Fig. 11 a et b), puisque d'un point de vue biologique, cela correspondrait à la

récession de la tumeur, ce qui fonctionne suivant des mécanismes différents de ceux de la propagation de l'ostéosarcome et compliquerait inutilement la simulation.

La capacité de cellules *os* de changer pour un état *sarcome* (Fig. 11 *f*) correspond à la phase de résorption osseuse avant remplacement par les cellules tumorales telle que considérée dans le cercle vicieux de développement de la pathologie. La capacité des cellules *sarcome* de changer en l'état *os* (Fig. 11 *e*) en revanche est la résultante directe de l'hypothèse établie que le remodelage osseux se poursuit en interne, avec aucune structure, ostéoïde ou de cellules tumorales, permanente dans la dynamique biologique de la pathologie.

Ces changements s'opèrent sous le résultat de l'influence des cellules propagatrices, soit le changement en état *os* est le fruit de la somme des influences des cellules *sarcome* autour de la cellule en transition d'état, et inversement pour le changement en état *sarcome*. Ces influences sont dépendantes de la distance à la cellule en transition d'état, suivant une même fonction d'influence à distance, mais avec des paramètres potentiellement différents entre *os* et *sarcome*.

## 2) Fonctions d'influence à distance

Nous définissons pour la simulation l'influence comme une force à distance s'exerçant sur les cellules de l'automate agissant comme facteur déterminant de la propagation des espèces. Cette force est définie comme fonction de la distance, dans le cadre d'une représentation d'un phénomène de diffusion, soit inversement proportionnelle à la distance. Chaque cellule, en conséquence, exerce sur les autres cellules une influence individuelle fonction de sa distance à celles-ci.

Cependant, pour plusieurs considérations pratiques, nous limitons la portée de ces fonctions d'influence à distance à un rayon maximal  $R_{état}$  différent pour chaque espèce influenceuse. La principale raison concerne des considérations de quantité et temps de calcul. La seconde raison est l'usage des conditions périodiques, et nous souhaitons dès le départ couper court à tout phénomène d'autoinfluence.

Plusieurs fonctions d'influence différentes ont été employées et testées, mais pour l'explication du mode de fonctionnement, nous utiliserons une fonction représentative de l'effet à distance des cellules  $f(r)$ , où  $r$  est la distance à une cellule de coordonnées  $[i_0, j_0]$  telle que  $r = \sqrt{(i_0 - i)^2 + (j_0 - j)^2}$ .

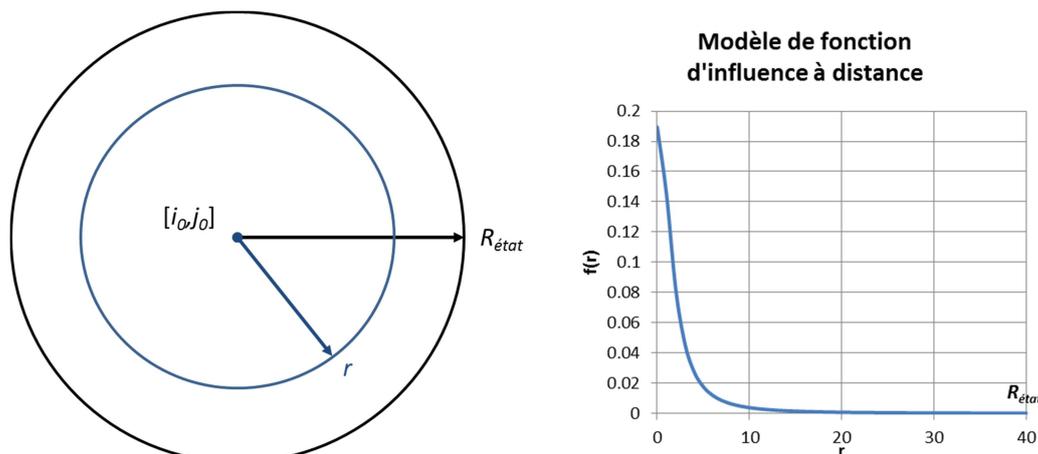


Figure 12.: Effet de la fonction d'influence à distance suivant la distance  $r$ .

Considérant une cellule *os* de coordonnées  $[i_0, j_0]$  en capacité de changer d'état en *sarcome* par contact en passant de l'itération  $n$  à l'itération  $n+1$ , celle-ci, est soumise à la somme des influences  $I_{os}^{tot}$  produites par les cellules *os* dans un rayon déterminé  $R_{os}$  suivant une fonction d'influence à distance qui peut être spécifique  $f_{os}(r)$ .

$$I_{os}^{tot} = \sum_{r < R_{os}}^{i,j} \delta_{os}(i;j) f_{os}[r]$$

L'influence totale  $I_{os}^{tot}$  subie par la cellule de coordonnées  $[i_0, j_0]$  est la somme des valeurs en fonction de distance  $f(r)$  des cellules en état  $os$ , dont l'état est défini par la fonction  $\delta_{os}(i;j)$  qui vaut 1 si l'état est  $os$  aux coordonnées  $[i,j]$ , et 0 sinon, le tout dans un rayon  $R_{os}$  défini essentiellement afin de donner une limite aux calculs à effectuer dans la matrice de l'automate cellulaire.

C'est cette valeur d'influence totale qui va nous permettre de déterminer si la transition d'état  $os$  à  $sarcome$  va s'effectuer, le calcul est d'ailleurs identique pour une transition  $tissu$  vers  $sarcome$ . La transition d'état vers  $os$  se base sur une valeur similaire d'influence totale exercée par les cellules  $sarcome$   $I_{sarcome}^{tot}$ . Ces valeurs sont ensuite employées dans le processus de détermination de la transition d'état suivant un modèle, absolu ou probabiliste.

### 3) Modèle de transition d'état absolu

Il existe deux possibilités distinctes de fonctionnement de détermination de la transition d'état des cellules, absolu et probabiliste. Le modèle déterministe consiste à choisir une valeur seuil d'influence  $I_{seuil}$  pour laquelle chaque cellule présentant  $I_{tot} > I_{seuil}$  change d'état au changement d'itération.

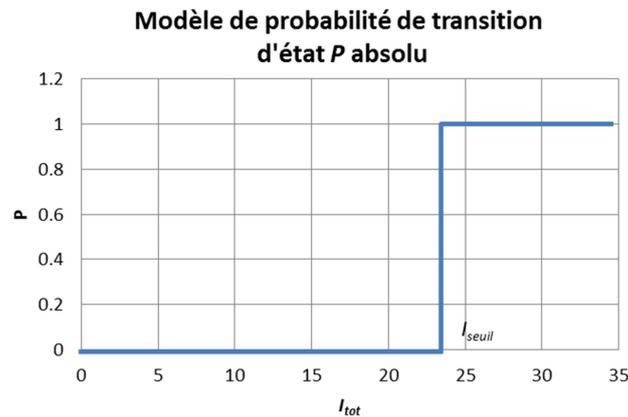


Figure 13.: Graphe représentant l'évolution de la probabilité de la transition d'état en fonction de  $I_{tot}$  pour un modèle absolu.

Cependant, ce modèle de fonctionnement se heurte à des comportements émergents problématiques, avec des fluctuations aux interfaces systématiques. Il n'existe pas de jeu de valeurs  $I_{seuil}$  différenciées qui puissent supprimer le comportement d'alternance à chaque itération à l'interface  $os/sarcome$  à partir du moment où une situation apparaît qui satisfait à chaque valeur  $I_{seuil}$ . Le modèle s'est avéré trop instable, et les possibilités d'ajustement sur le comportement de la transition inexistantes. Nous avons donc envisagé un modèle dit probabiliste.

### 4) Modèle de transition d'état probabiliste

Si les considérations pratiques rendent le modèle absolu inapplicable, le modèle probabiliste apporte un aspect supplémentaire à la simulation. La propagation de l'ostéosarcome est le résultat d'un très grand nombre de paramètres, de vascularisation, contraintes physiques, mécanismes biologiques divers qui assurent l'inhomogénéité de la structure et de sa progression. L'objectif de cette simulation étant de rester simple, la modélisation de l'ensemble des paramètres susceptibles d'affecter la propagation rend très vite l'automate excessivement complexe.

**a) Etablir une probabilité de transition d'état**

Le modèle probabiliste nous permet d'approcher le modèle de propagation de la pathologie, en introduisant une part de hasard dans le mécanisme de la transition d'état. Cette part de hasard est cependant un élément à introduire en lien avec la valeur d'influence totale  $I_{tot}$  décrite plus tôt.

Nous décidons donc de créer une valeur  $P$  comprise entre 0 et 1 à partir de  $I_{tot}$ , en normalisant par une valeur  $I_{max}$  définie comme le cas théorique où toutes les cellules dans le rayon  $R$  favorisent la transition d'état :

$$P = \frac{I_{tot}^{état}}{I_{max}^{état}}, \text{ avec } I_{max}^{état} = \sum_{r < R}^{i, j} f_{état}[r]$$

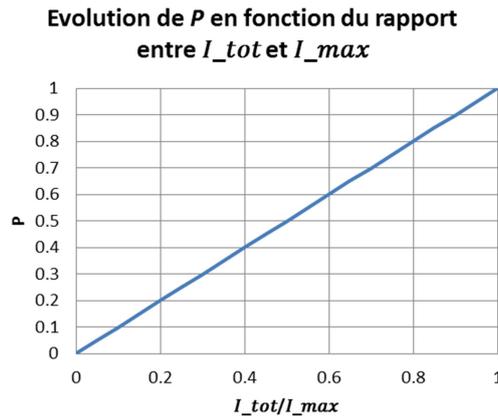


Figure 14.: Graphe représentant l'évolution de la probabilité de la transition d'état en fonction de  $I_{tot}$  pour un modèle probabiliste.

Et à partir de cette valeur "normalisée"  $P$ , il nous est possible de la confronter à une valeur  $a$  générée aléatoirement pour chaque transition d'état possible, telle que la transition s'effectue si  $a \leq P$ . A partir de ce mécanisme probabiliste, nous avons introduit un ensemble de paramètres supplémentaires à même d'affecter le paramètre  $P$ , à savoir un paramètre  $\alpha$  d'ajustement de  $P$  et un paramètre  $\beta$  de valeur seuil d'activation.

**b) Ajustement de la probabilité maximum  $\alpha$**

Nous introduisons afin d'influencer l'interaction entre les différents mécanismes de transition d'état un paramètre  $\alpha$ , spécifique à chaque transition possible sous la forme  $\alpha_{état\ init \rightarrow état\ fin}$ . Cela permet d'affecter rapidement les probabilités comparatives des différentes transitions d'état sans avoir à ajuster les paramètres des fonctions d'influence à distance.

$$P_{tissu \rightarrow sarcome} = \alpha_{tissu \rightarrow sarcome} \frac{I_{tot}^{os}}{I_{max}^{os}}$$

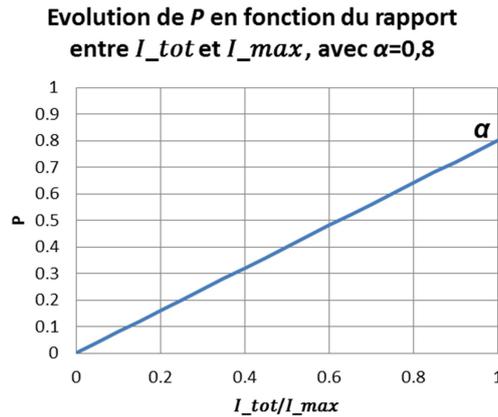


Figure 15.: Graphe représentant l'évolution de la probabilité de la transition d'état en fonction de  $I_{tot}$  pour un modèle probabiliste, avec  $\alpha=0,8$ .

L'exemple ci-dessus présente le cas où la probabilité de transition est affectée négativement, telle que même pour  $I_{tot}=I_{max}$ , le changement d'état n'est pas garanti, ce qui n'est pas foncièrement absurde, au vu de la grande quantité de paramètres impliqués dans la propagation que nous ne modélisons pas. Le cas opposé avec  $\alpha > 1$  est également possible, avec une transition garantie passé une certaine valeur de  $I_{tot}$ , ce qui reprend partiellement le concept de  $I_{seuil}$  du modèle absolu.

### c) Seuil d'activation de la transition d'état $\beta$

Un autre paramètre introduit est un paramètre de seuil  $\beta$ , qui fait sens dans notre simulation de phénomènes biologiques, puisque dans le cas de figure d'un vecteur d'activation responsable de la propagation, les cellules et autres activités biologiques dépendent d'une certaine dose minimale afin d'activer les procédés. L'impact de ce seuil est en revanche renormalisé, tel que pour un cas de transition du *tissu* vers l'*os* :

$$P_{tissu \rightarrow os} = \frac{1}{1 - \beta_{os}} \left( \frac{I_{tot}^{sarcome}}{I_{max}^{sarcome}} - \beta_{os} \right)$$

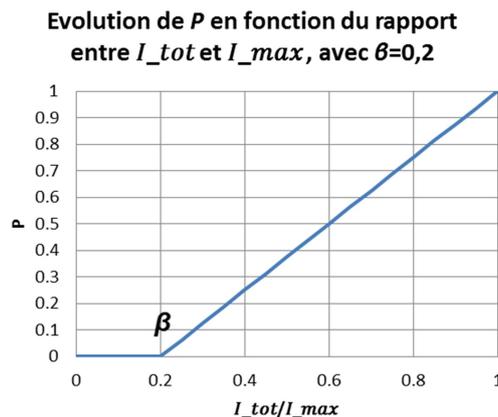


Figure 16.: Graphe représentant l'évolution de la probabilité de la transition d'état en fonction de  $I_{tot}$  pour un modèle probabiliste, avec  $\beta=0,2$ .

Un cas de figure où l'effet de seuil ramène à 0 les valeurs de  $P$  si  $P < \beta$  mais sans effectuer de soustraction est également envisageable, mais n'a pas été poursuivi pour l'instant.

**d) Modulation de la probabilité de transition**

Si l'on prend en compte ces deux paramètres d'ajustement des comportements, nous obtenons donc un calcul de la valeur de  $P$  avant tirage au sort pour par exemple une transition d'état de l'*os* vers le *sarcome* tel que :

$$P_{os \rightarrow sarcome} = \frac{\alpha_{os \rightarrow sarcome}}{1 - \beta_{sarcome}} \left( \frac{I_{tot}^{os}}{I_{max}^{os}} - \beta_{sarcome} \right)$$

Evolution de  $P$  en fonction du rapport entre  $I_{tot}$  et  $I_{max}$ , avec  $\alpha=0,8$  et  $\beta=0,2$

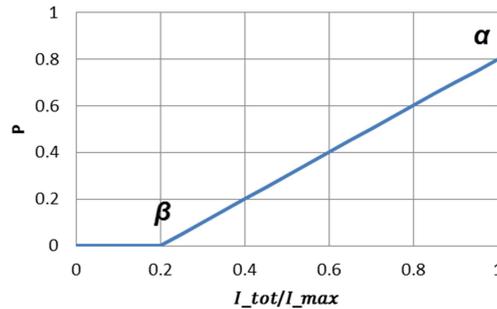


Figure 17.: Graphe représentant l'évolution de la probabilité de la transition d'état en fonction de  $I_{tot}$  pour un modèle probabiliste, avec  $\alpha=0,8$  et  $\beta=0,2$ .

Ce qui nous offre une certaine diversité et flexibilité sur les mécanismes de transition d'état des cellules de l'automate, qui nous permet par ces paramètres d'ajuster les comportements et surtout les vitesses relatives de propagation entre les états *os* et *sarcome*. Nous avons à ce stade suffisamment d'éléments pour faire fonctionner la simulation avec des résultats déjà intéressants, à l'exception d'un phénomène que nous avons intitulé la rugosité.

**5) Traitement de la rugosité**

Deux éléments sont apparus essentiels dans la modélisation de la propagation de l'ostéosarcome, la gestion des points isolés d'une part, et la gestion de la rugosité d'autre part. Les premiers modèles de la simulation basés uniquement sur les règles précédentes ont présentés des résultats en forte inadéquation avec les réalités cohésives de la biologie des structures d'ostéoïde et de cellules tumorales.

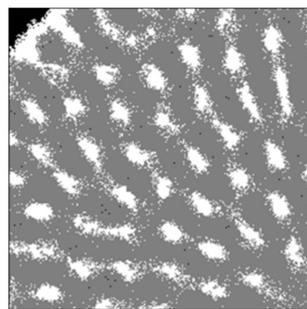


Figure 18.: Détail de résultat de version test de la simulation.

Afin de remédier à cet état de fait, deux règles supplémentaires sont ajoutées. Une première règle apparaît sous la forme d'un procédé dans la simulation, à savoir l'élimination de toute cellule d'un état donné isolée de tout voisin de même nature. Cette démarche est motivée par l'absence d'observation au sein de la structure, établie à partir des images tomographiques comme bicontinue, d'éléments isolés d'os au sein de la phase de cellules tumorales, ou de cellules tumorales dans une gangue d'ostéoïde.

La deuxième règle a trait à la génération de rugosité, soit la capacité du changement d'état à avoir lieu en fonction du nombre de voisins de même nature. Afin de rester dans le cadre d'une simulation proche des effets réels du développement de l'ostéosarcome, nous cherchons à limiter les comportements à même de créer des structures trop "pointues", comme une ligne continue de cellules d'un état "perçant" un domaine d'un état différent.

Afin de limiter ce comportement, nous avons ajouté à l'automate une règle : **Un changement d'état d'une cellule ne peut avoir lieu si la cellule en transition d'état possède plus de voisins de même nature que la cellule contact de l'état cible de la transition.**

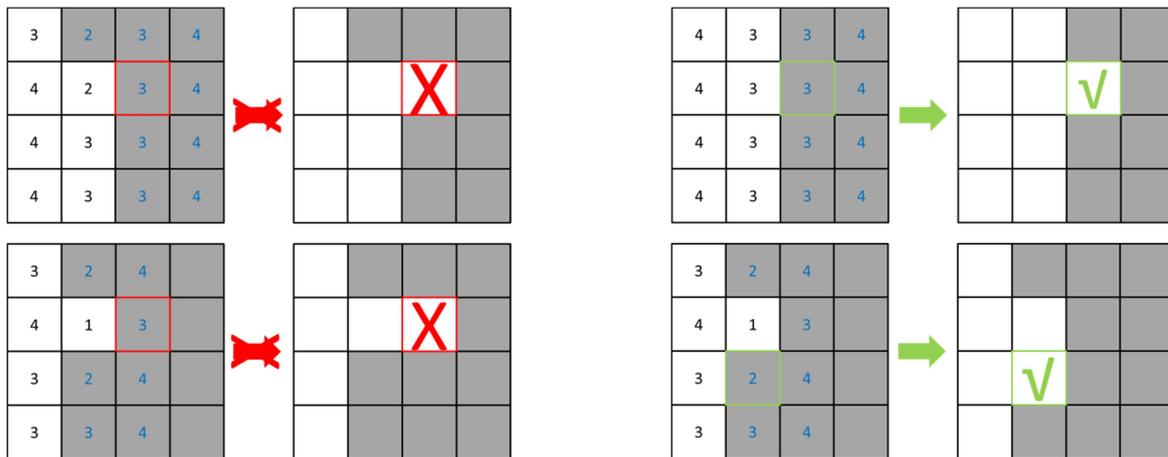


Figure 19.: Exemples de cas autorisés et interdits de transitions d'état en fonction de la comparaison du nombre de voisins de même nature (chiffres en bleu).

La règle de comparaison procède comme suit, calculer pour chaque cellule le nombre de voisins de même nature, puis comparer ce résultat à celui des cellules voisines de nature différente (*os*, *sarcome* ou *tissu*). Si un de ces résultats des voisins de différente nature est supérieur ou égal à celui de la cellule considérée, alors la transition d'état est possible.

L'application de ces règles d'évolution de l'automate cellulaire forment l'ensemble des modules appliqués à notre simulation, et ceux qui ont été codés afin de tenter de recréer par le processus itératif le phénomène de propagation de l'ostéosarcome.

## IV. Réalisation du programme

L'automate a été programmé depuis sous Labview, un logiciel plus souvent utilisé pour l'interfaçage entre appareils de mesure et ordinateur, employé ici pour des raisons personnelles de capacité de codage, de lisibilité du code, mais également pour la forte efficacité du programme à traiter des calculs sur des matrices.

La version présentée ici est la plus aboutie, qui fonctionne sur une fonction d'influence à distance Lorentzienne généralisée, qui fut la plus employée car elle présente l'avantage de ne pas diverger aux petites distances, soit suivant une formule  $L(r)$  telle que :

$$L(r) = \frac{1}{(r^2 + r_0^2)^\eta} \quad \text{avec } r_0 \in [0 ; 60] \text{ et } \eta \in [0 ; 3]$$

Une formule qui introduit donc deux nouveaux paramètres pour les états *os* et *sarcome*,  $r_0^{\text{état}}$  la largeur des effets à courtes portée (largeur du pic centré sur 0) et  $\eta_{\text{état}}$  l'intensité des effets à longue portée (puissance du rapport  $r$  petit et  $r$  grand).

#### A. Généralités de la structure du programme

Tout d'abord, l'exploration des modes de propagation est contrôlée pour la fonction d'influence à distance Lorentzienne par un total de 12 paramètres différents :

Transitions	Paramètre d'ajustement des vitesses relatives de propagation $\alpha$	Seuil d'activation de transition d'état $\beta$	Rayon limite de calcul R	Rayon Lorentzienne $r_0$	Puissance Lorentzienne $\eta$
tissu→sarcome	$\alpha_{\text{tissu} \rightarrow \text{sarcome}}$	$\beta_{\text{os}}$	$R_{\text{os}}$	$r_0^{\text{os}}$	$\eta_{\text{os}}$
os→sarcome	$\alpha_{\text{os} \rightarrow \text{sarcome}}$	$\beta_{\text{os}}$	$R_{\text{os}}$	$r_0^{\text{os}}$	$\eta_{\text{os}}$
tissu→os	$\alpha_{\text{tissu} \rightarrow \text{os}}$	$\beta_{\text{sarcome}}$	$R_{\text{sarcome}}$	$r_0^{\text{sarcome}}$	$\eta_{\text{sarcome}}$
sarcome→os	$\alpha_{\text{sarcome} \rightarrow \text{os}}$	$\beta_{\text{sarcome}}$	$R_{\text{sarcome}}$	$r_0^{\text{sarcome}}$	$\eta_{\text{sarcome}}$

A ces paramètres employés dans le calcul des valeurs individuelles de  $P$  avant tirage au sort pour déterminer la validation de la transition d'état des cellules, s'ajoute un dernier paramètre  $n_{fin}$ , le nombre final d'itérations de la simulation.

Le programme se divise en trois grandes parties, l'amorçage, qui prépare la simulation, transcrit le point de départ en matrices et prépare les matrices de fonctions de distance, la partie de calcul itératif de l'évolution des états, et une partie effectuant des mesures sur la dynamique de l'automate.

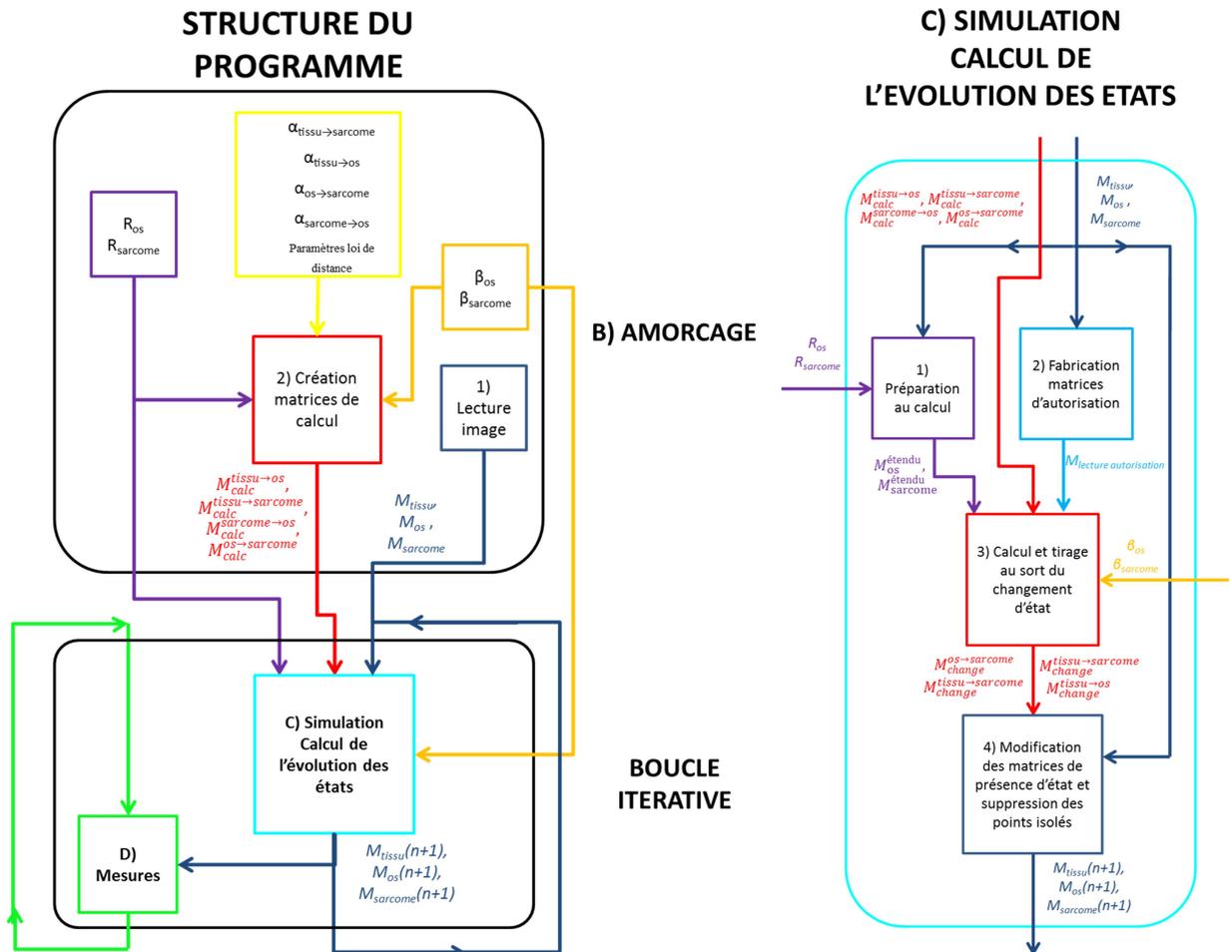


Figure 20.: Diagrammes de la structure du programme et détail des modules de la partie calculatoire de la boucle itérative de l'automate cellulaire.

## B. Amorçage

L'amorçage est l'ensemble des fonctions effectuées afin de préparer le processus de la boucle itérative qui constitue le cœur de la simulation. On y trouve la lecture de l'image de départ et la préparation des matrices de calcul.

### 1) Lecture image de départ

L'image de départ est un élément important de la simulation, qui peut conditionner la direction et la forme de propagation de la simulation dans une certaine mesure. Plusieurs ont été employées, tel l'échantillonnage ci-dessous, mais la plus fréquente fut la première, censée représenter l'idée d'une coupe latérale d'os dont la cavité médullaire serait déjà envahie de cellules tumorales. Les cercles concentriques sont positionnés de manière légèrement excentrée de l'image en 1024x1024 pixels, afin de repérer aisément les problèmes de symétrie (il y en eut).

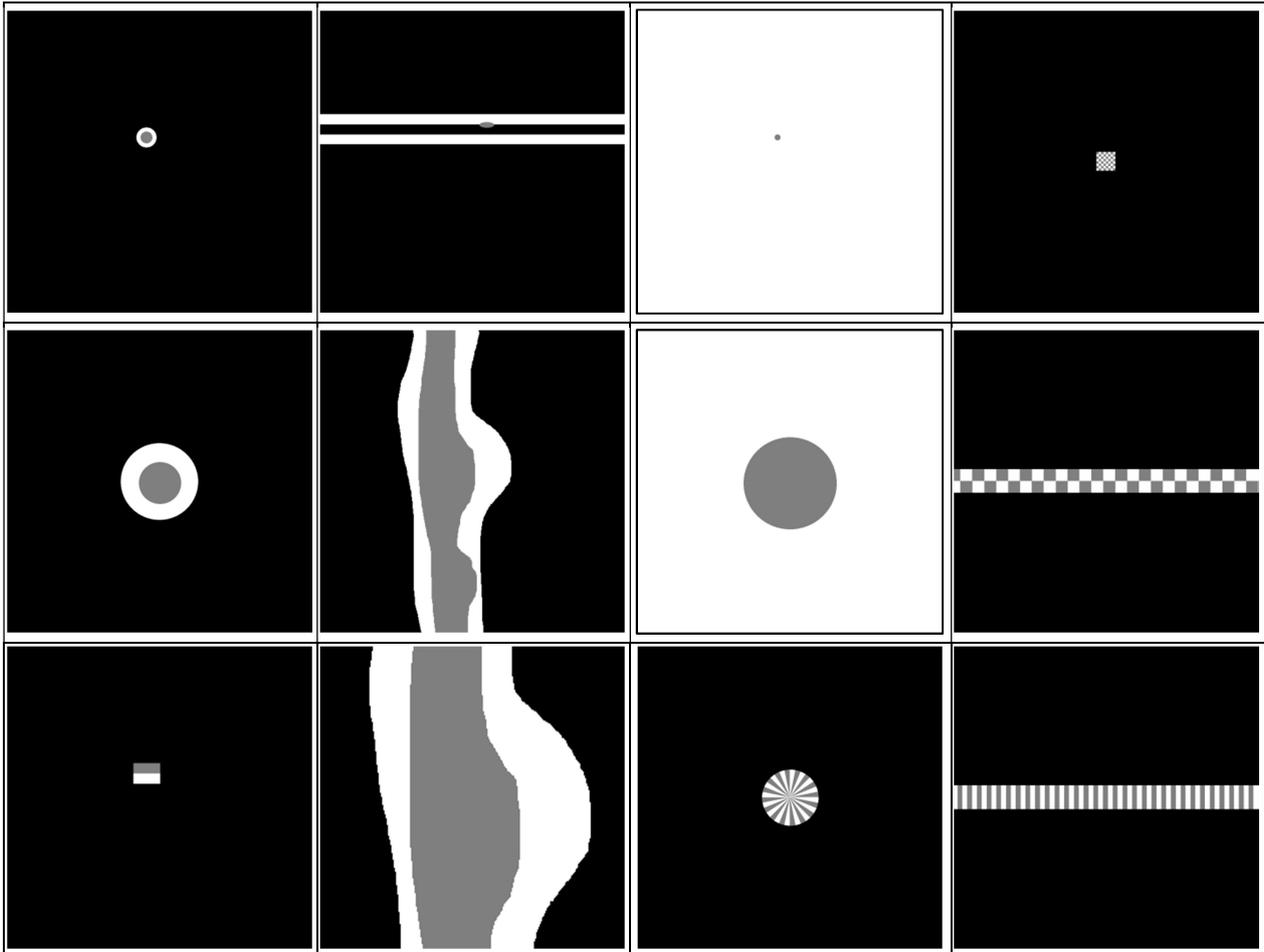


Figure 21.: Images de départ en 1024x1024 pixels.

Ces images sont réalisées sous Paint et enregistrées au format .png, avec les couleurs en niveaux de gris codés sous 8 bits, avec les cellules en état *tissu* en noir avec la valeur 0, l'état *sarcome* en gris avec une valeur de 127, et l'état *os* en blanc de valeur 254. Le sous-programme de lecture va ouvrir une image .png à un emplacement spécifié, la transcrire sous la forme d'une matrice de valeurs comprises entre 0 et 255.

Cette matrice est ensuite comparée trois fois distinctes aux valeurs des différents états, générant ainsi trois nouvelles matrices logiques *tissu*, *os* et *sarcome*, renvoyant Vrai pour les coordonnées présentant l'état correspondant à la dénomination de la matrice, et Faux sinon. Ces trois matrices sont ensuite transformées en matrices numériques, où la valeur 1 prend la place des Vrai, et 0 celle des Faux. Ces trois matrices sont désignées comme les *matrices de présence d'état*,  $M_{tissu}$ ,  $M_{os}$  et  $M_{sarcome}$ .

## 2) Création des matrices de calcul

Afin de sauver du temps dans le processus itératif, et puisque les fonctions de distance sont invariantes au cours de celui-ci, des matrices sont générées de telle manière que le calcul de  $P$  ne demande plus qu'un produit de deux matrices, la matrice de calcul par la matrice de présence de l'état favorisant la transition d'état considérée.

Dans un premier temps, deux matrices des fonctions de distance pour *os* et *sarcome* sont générées, chacune de dimensions carrées  $2R_{état}+1$ , pour une sélection carrée d'accommodant un cercle de rayon  $R_{état}$  centrée sur une cellule. Pour chacune des cases de ces matrices, il est calculé pour  $r < R_{état}$  :

$$L(r) = \frac{1}{(r^2 + (r_0^{état})^2)^{\eta_{état}}}$$

Ce qui donne donc deux matrices des fonctions d'influence à distance, une pour *os*  $M_{dist}^{os}$ , une pour *sarcome*  $M_{dist}^{sarcome}$ . Chacune de ces deux matrices est ensuite déclinée en deux versions prêtes pour le produit  $M_{calc}$ , une pour la transition d'état depuis l'état *tissu*, l'autre pour la transition depuis l'autre état propagateur. Cela s'effectue suivant le calcul :

$$M_{calc}^{tissu \rightarrow os} = \frac{\alpha_{tissu \rightarrow os} M_{dist}^{sarcome}}{1 - \beta_{os} I_{max}^{sarcome}} \text{ où } I_{max}^{sarcome} = \sum M_{dist}^{sarcome}$$

Ce qui nous donne au final quatre *matrices de calcul*, une pour chaque transition d'état possible,  $M_{calc}^{tissu \rightarrow os}$ ,  $M_{calc}^{tissu \rightarrow sarcome}$ ,  $M_{calc}^{sarcome \rightarrow os}$  et  $M_{calc}^{os \rightarrow sarcome}$ .

A partir de ce stade, tous les éléments effectuels en-dehors de la boucle itérative sont préparés.

### C. Boucle itérative

La boucle itérative de la simulation se décompose en plusieurs étapes, la préparation des matrices de présence pour le calcul, la fabrication des matrices de transitions d'états possibles, le calcul des valeurs de  $P$  et tirage au sort avec génération des nouvelles matrices de présence d'états, la modification des matrices de présence et lissage des points isolés, puis la sauvegarde d'images.

#### 1) Préparation au calcul

Les conditions périodiques de la simulation se traduisent par exemple par la cellule de coordonnées [1025 ; 1025] correspondant de fait à la cellule [1 ; 1]. Cela pose cependant un problème lors du calcul de  $P$  qui dépend de l'ensemble des cellules comprises dans le rayon  $R_{état}$  approprié pour la transition d'état en considération.

Le processus par LabVIEW pour reconstituer à chaque opération le morceau des matrices de présence  $M_{état}$  nécessaire au calcul étant prohibitif, deux matrices étendues  $M_{état}^{étendu}$  de la valeur  $R_{état}$  sont préparées à partir des matrices de présence des espèces propagatrices. Exemple ci-dessous avec une  $M_{os}$  de 4x4 pour une valeur de  $R_{os}=2$ .

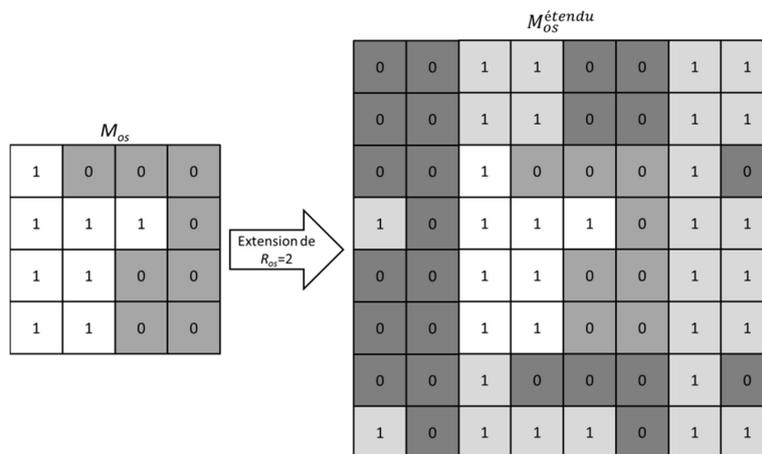


Figure 22.: Processus de fabrication des matrices étendues  $M_{état}^{étendu}$

Les cases ajoutées par le processus ont été ici légèrement assombries pour la différenciation. Ces matrices permettent sous LabVIEW la sélection aisée des blocs  $2R_{état}+1$  autour des cellules pour le calcul, et permettent de gagner du temps.

## 2) Fabrication des matrices d'autorisation de transition d'état

Le propagation des états de cellules se faisant exclusivement par contact, et en fonction du nombre de voisins de même nature, il a été considéré d'intérêt de discriminer les cellules susceptibles d'opérer une transition d'état pour réduire le calcul du paramètre  $P$  à ces cellules.

Afin de pouvoir comparer aux interfaces les nombres de voisins de même nature, des matrices de voisins  $M_{voisins}$  sont générées en décalant les matrices d'état. Exemple ci-dessous avec une matrice de présence  $os$ .

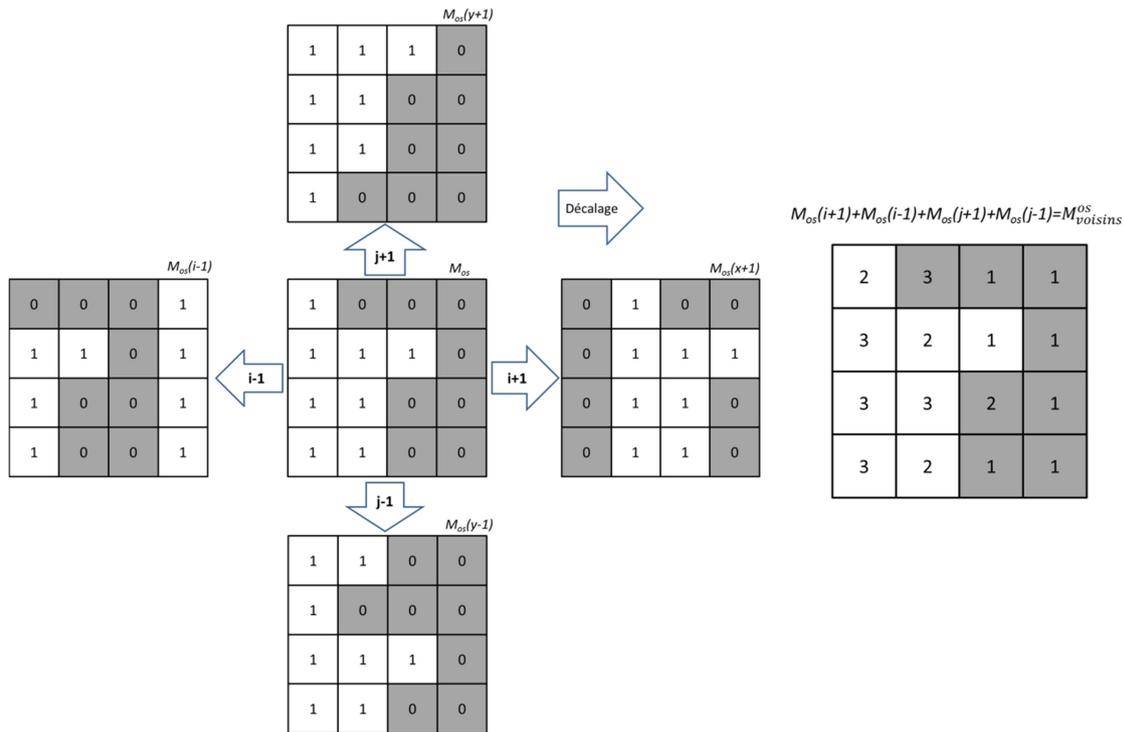


Figure 23.: Processus de fabrication de la matrice du nombre de voisins  $M_{voisins}^{os}$

Notez que le remplacement aux extrémités opposées des cellules décalées est une conséquence logique des conditions périodiques appliquées à l'automate. Le résultat de cette manipulation est la fabrication des matrices du nombre de voisins d'un état  $M_{voisins}^{état}$ .

A partir de ces matrices, il est possible de générer les trois matrices de voisins de même nature nécessaires à la mise en place de la règle sur la rugosité. Cela s'effectue par simple produit point par point :

$$M_{même\ voisins}^{état} = M_{voisins}^{état} M_{état}$$

Nous générons alors les matrices d'autorisation de transition d'état  $M_{autorisation}^{état\ init \rightarrow état\ fin}$  par comparaison en décalage. Reprenons notre matrice d'exemple  $os$  et  $sarcome$  de 4x4. Pour déterminer la possibilité de cellules de cette matrice susceptibles d'opérer une transition de l'état  $sarcome$  à l'état  $os$ , nous considérons les matrices de même voisins  $M_{même\ voisins}^{os}$  et  $M_{même\ voisins}^{sarcome}$ . La transition n'est possible pour les cellules uniquement si les cellules de contact entre les deux états possèdent au moins autant de voisins de même nature.

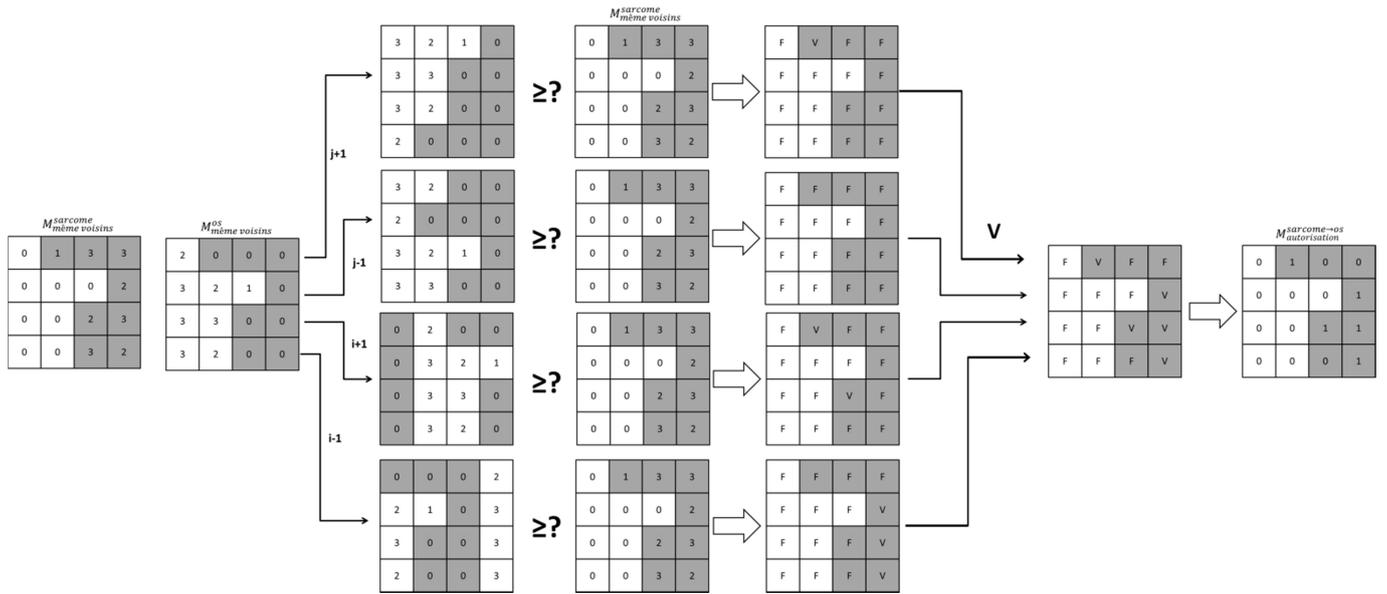


Figure 24.: Processus de fabrication de la matrice d'autorisation de changement d'état, ici de sarcome à os.

Nous obtenons à partir de ce procédé quatre matrices d'autorisation de changement d'état de valeurs 0 ou 1. Nous apportons ensuite un multiplicateur à chacune de ces matrices, afin de générer des valeurs spécifiques pour chaque cas de figure dans une seule grille de lecture des transitions d'état possibles. Cette étape est nécessaire afin de créer une notation particulière pour le cas particulier de conflit entre *os* et *sarcome* pour le changement d'état d'une cellule *tissu*. Nous générons donc  $M_{lecture\ autorisation}$  :

$$M_{lecture\ autorisation} = M_{tissu \rightarrow sarcome}^{autorisation} + 2M_{tissu \rightarrow os}^{autorisation} + 4M_{os \rightarrow sarcome}^{autorisation} + 5M_{sarcome \rightarrow os}^{autorisation}$$

Ce qui génère le cas de conflit pour la valeur 3 dans cette grille de lecture. Un ensemble de deux boucles itératives vont ensuite quadriller cette grille de lecture pour le calcul de  $P$  et tirage au sort.

### 3) Calcul et tirage au sort du changement d'état

La matrice  $M_{lecture\ autorisation}$  est lue cellule par cellule, et des valeurs 0 et 1 sont générées de manière appropriée afin de fabriquer de nouvelles matrices d'états changés  $M_{change}^{état\ init \rightarrow état\ fin}$ . Si la valeur en  $[i ; j]$  de  $M_{lecture\ autorisation}$  est 0, la boucle génère aux mêmes coordonnées des quatre matrices de changement d'état une valeur 0.

Si la valeur lue est 1, alors la transition possible est de *tissu* vers *sarcome*. Le procédé consiste à récupérer une sélection  $2R_{os}+1$  carrée débutant aux coordonnées  $[i ; j]$  de la matrice d'état étendue  $M_{os}^{étendu}$ , puis à en faire le produit par la matrice de calcul correspondante, avant de traiter le seuil :

$$P = \left( \sum M_{état}^{os} [i ; j] \rightarrow [i + 2R_{os} + 1 ; j + 2R_{os} + 1] \times M_{calc}^{tissu \rightarrow sarcome} \right) - \frac{\alpha_{tissu \rightarrow sarcome} \beta_{sarcome}}{1 - \beta_{sarcome}}$$

Et à partir de ce résultat  $P$ , nous le confrontons à un tirage au sort  $a$  compris entre 0 et 1. Si  $a < P = Vrai$ , alors une valeur 1 est générée dans la matrice  $M_{change}^{tissu \rightarrow sarcome}$  aux coordonnées  $[i ; j]$  et 0 sinon. Les autres matrices d'état changé reçoivent une valeur 0 à ces coordonnées quoi qu'il arrive. Le processus est décliné de manière similaire pour les cas codés 2, 4 et 5 sans conflits.

Pour le cas 3, les deux valeurs  $P_{os}$  et  $P_{sarcome}$  sont calculées, et le tirage au sort effectué sur la valeur la plus élevée. A la fin des boucles lisant  $M_{lecture\ autorisation}$  en  $i$  et  $j$ , nous avons nos quatre matrices d'états changés.

#### 4) Modification des matrices de présence d'état et suppression des points isolés

A partir des matrices d'états changés, nous pouvons avec de simples additions et soustractions obtenir les nouvelles matrices de présence d'état. Par exemple, la nouvelle matrice  $M_{os}(n+1)$  est telle que :

$$M_{os}(n+1) = M_{os}(n) + M_{chang}^{tissu \rightarrow os} + M_{chang}^{sarcome \rightarrow os} - M_{chang}^{os \rightarrow sarcome}$$

De même :

$$M_{sarcome}(n+1) = M_{sarcome}(n) + M_{chang}^{tissu \rightarrow sarcome} + M_{chang}^{os \rightarrow sarcome} - M_{chang}^{sarcome \rightarrow os}$$

$$M_{tissu}(n+1) = M_{tissu}(n) - M_{chang}^{tissu \rightarrow sarcome} - M_{chang}^{tissu \rightarrow os}$$

Reste juste à corriger tout pixel isolé qui aurait pu être généré par le processus d'évolution. Le procédé se base une fois de plus sur le nombre de voisins de même nature. Ce paramètre est une fois de plus calculé, puis réduit à 1 pour toute valeur supérieure ou égale à 1. La matrice binaire résultante est ensuite soustraite à la matrice de présence d'état correspondante, ce qui résulte en une matrice où seules les cellules isolées sont codées sous la forme d'un 1.

$$M_{isolées}^{état} = M_{état} \times ([M_{même\ voisins}^{état}/4]) \quad \text{où } [ ] \text{ indique un arrondi au supérieur}$$

Les trois matrices de cellules isolées sont ensuite multipliées aux matrices de voisins  $M_{voisins}^{état}$  des deux autres états pour comparaison. Prenons l'exemple des cellules isolées de *tissu* :

$$M_{voisins\ sarcome}^{tissu\ isolées} = M_{isolées}^{tissu} \times M_{voisins}^{sarcome}$$

Cellule non-nulle de  $M_{isolées}^{tissu}$  après cellule, nous comparons les valeurs en  $[i;j]$  de  $M_{voisins\ sarcome}^{tissu\ isolées}$  et  $M_{voisins\ os}^{tissu\ isolées}$ . Si la valeur de voisins *sarcome* est supérieure, alors nous opérons une écriture en  $[i;j]$  sur  $M_{tissu}$  de 0 et de 1 dans  $M_{sarcome}$ , et inversement dans le cas où la valeur de voisins *os* est supérieure. Dans le cas d'une égalité, nous procédons à un tirage au sort  $a$  compris entre 0 et 1, avec toute valeur supérieure à 0,5 favorisant l'état *sarcome*, et les valeurs inférieures ou égales favorisant l'état *os*. Le procédé est décliné de manière similaire pour les autres états.

Donc, pour chaque cellule isolée, nous changeons son état en celui du voisin le plus nombreux. Dans le cas d'une égalité, nous tirons au sort. Les  $M_{état}(n+1)$  sont prêtes pour la réinjection dans la boucle itérative, et pour la réalisation d'une image de l'itération  $n+1$ .

#### D. **Acquisition de données**

Nous avons intégré au processus itératif certaines fonctions de mesure, avant de pouvoir suivre l'évolution à travers certains paramètres de la simulation. Ce processus de mesure, afin de ne pas peser trop lourd ou rendre l'interprétation de résultats trop prohibitive, est couplé à un pas de mesure, qui assure que celle-ci ne s'opère que pour le nombre d'itérations  $n$  multiple de ce pas.

Nous avons d'une part des mesures sur le nombre de particules, de cellules suivant les différents états ainsi que le nombre d'interfaces entre espèces, d'autre part la reconstitution d'images pour la fabrication de vidéos de la dynamique de l'automate cellulaire.

### 1) Mesures

Le premier paramètre consiste à mesurer le nombre de cellules  $n_{\text{état}}$  dans l'état *os* et *sarcome*, ce qui s'opère facilement à partir des matrices de présence d'état en en faisant la somme :

$$n_{\text{état}} = \sum M_{\text{état}}$$

Le second paramètre est le fruit d'un module de LabVIEW Particle Analysis, qui va pour les deux états propagateurs, compter le nombre de particules, d'objets individuels  $n_{\text{particules}}^{\text{état}}$ .

Le dernier paramètre mesuré est le nombre d'interfaces entre différents états, comme  $n_{\text{interfaces}}^{\text{os/sarcome}}$ . Ce calcul fonctionne à partir des *matrices du nombre de voisins d'un état*  $M_{\text{voisins}}^{\text{état}}$ . A partir de ces entités qui donnent aux coordonnées  $[i ; j]$  une valeur égale au nombre de cellules voisines d'un état donné, il est possible de mesurer le nombre d'interfaces entre deux états par le calcul suivant :

$$n_{\text{interfaces}}^{\text{os/sarcome}} = \sum M_{\text{os}} M_{\text{voisins}}^{\text{sarcome}}$$

Le produit des deux matrices résulte sur une matrice où les seules valeurs non-nulles sont celles des cellules dont l'état est *os*, et dont la valeur est le nombre de voisins en état *sarcome*. La somme des valeurs de cette matrice nous donne alors le nombre d'interfaces entre ces deux états.

### 2) Sauvegarde d'images

A intervalle régulier d'itérations, des images sont fabriquées puis sauvegardées à partir des matrices de présence d'états  $M_{\text{état}}$ . D'une part, avec un pas habituel d'une fois toutes les 10 itérations, pour la fabrication de la vidéo de la dynamique évolutive de la simulation, d'autre part sous forme de .png dans le dossier de sauvegarde toutes les 500 itérations pour un accès rapide à dynamique.

Ces images sont générées en niveaux de gris tel que déjà établi, simplement en deux opérations sur les matrices d'état :

$$M_{\text{image}} = 127 \times (M_{\text{sarcome}} + 2M_{\text{os}})$$

Ce qui résulte en une matrice image dont les cases valent 127 en niveau de gris pour les cellules *sarcome*, et 254 blanc pour les cellules *os*. Ces acquisitions d'images permettent de suivre le fonctionnement de la simulation, mais offre également une base qui permet l'analyse par les techniques de la transformée de Fourier.



Figure 25.: Exemple d'image obtenue par transcription des valeurs de la matrice en niveaux de gris.

## V. Résultats de simulation

Beaucoup de simulations ont été lancées, mais une grande partie de celle-ci ont participé à la mise au point et l'élaboration de la simulation. Des essais ont été effectués pour comprendre l'impact des différents paramètres sur les comportements émergents et les structures obtenues. Différentes fonctions d'influence à distance et l'effet de leurs paramètres ont été explorées, et une part de l'impact des points de départ ainsi que des prémices d'étude de l'effet de structures permanentes abordés.

### A. Stratégie d'étude de l'automate pour l'optimisation des paramètres

Un élément important à tenir en compte tout au long de l'analyse des résultats de la simulation est l'impact décisif de la différence en nombre de dimensions entre l'automate cellulaire et la réalité. L'ostéosarcome est une pathologie qui résulte sur la fabrication d'une structure d'ostéoïde et de cellules tumorales dans l'ensemble des directions disponibles. Il s'agit d'une structure 3D bicontinue et comme nous avons pu le voir, assez désordonnée.

Le mode de propagation des *états* de la simulation est contraint à la 2D, ce qui se traduit dans un premier temps par l'impossibilité de réaliser une structure strictement bicontinue, de la même manière que les espaces ostéoïde et cellules tumorales ne présentent pas de continuité dans une tranche donnée.

Si l'absence de caractère bicontinu n'est pas forcément handicapant de la part de la simulation, en revanche l'usage des images en coupe de la tomographie en référence n'offre pas un élément reproductible par la simulation. S'il est impossible d'obtenir des résultats de même qualité en spectre de puissance ou fonction de corrélation de paire que la tranche de tomographie par la simulation, le travail sur ces éléments à partir de la simulation 2D permet de procéder à identifier les éléments et paramètres importants pour s'approcher au mieux de la réalité.

Nous nous sommes donc attachés dans un premier temps à la compréhension de l'automate cellulaire créé. Savoir comment les deux *états* propagateurs interagissent entre eux, puis l'impact des différents paramètres propres à chaque espèce.

Nous avons ensuite cherché à explorer les mécanismes du modèle de calcul déterminant la transition d'état, et comment différentes fonctions de distance sont à même d'agir sur les résultats.

Le but est au final d'approcher au mieux des analyses tomographiques. Plus que le nombre d'interface ou le ratio volumique entre ostéoïde et cellules tumorales, ce sont les éléments glanés par spectre de puissance qui forme le focus de notre étude, car ceux-ci sont révélateurs d'un certain niveau de désordre dans la structure, sans expression excessive d'une taille de structure, avec parfois des directions préférentielles. Notre choix est donc de nous concentrer sur le paramètre difficile à maîtriser du degré de désordre de la structure, pour ensuite travailler à l'imitation des autres éléments.

### B. Comportements émergents du modèle

Quels que soit les paramètres employés dans la simulation, la mise en œuvre des lois inhérentes à notre automate cellulaire résulte sur l'apparition de comportements émergents qui persistent largement au long de nos études.

Pour la plupart des simulations, nous avons pris le point de départ de cercles concentriques *sarcome* dans *os*, censé représenter une illustration la tranche transversale d'un os long dont la

cavité médullaire serait complètement envahie de cellules tumorales. Les simulations sont effectuées sur  $n=3000$  itérations, ce qui d'expérience, résulte pour des valeurs de  $\alpha$  toutes à 1 (donc n'opérant aucune modification sur  $P$ ) et des seuils  $\beta$  nuls en une structure prenant la majeure partie de l'espace de  $1024 \times 1024$  pixels disponible. Des considérations techniques nous ont amené à ce nombre, une telle simulation sur l'ordinateur de travail représentant entre deux et trois heures, la quantité de calcul à chaque itération augmentant avec le nombre d'interfaces entre états.

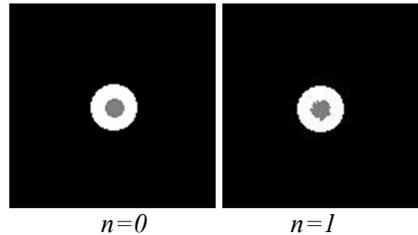


Figure 26.: Détail en  $128 \times 128$  pixels de l'image de départ (à gauche), et de la première itération (à droite) d'une simulation.

Un élément essentiel qui apparaît dans la dynamique d'évolution de la simulation est que la capacité des états *os* et *sarcome* de transiter dans l'autre état résulte en une forme de compétition. Chacun étant favorisé fortement (valeur importante de  $I$ ) par les cellules de l'état opposé en proximité, cela résulte en une forme d'instabilité forte entre les deux états aux interfaces, avec des cellules qui basculent d'un état à l'autre toutes les quelques itérations. Si ce comportement ne correspond pas à la réalité biologique que nous recherchons à reproduire, les structures formées au long terme restent intéressantes.

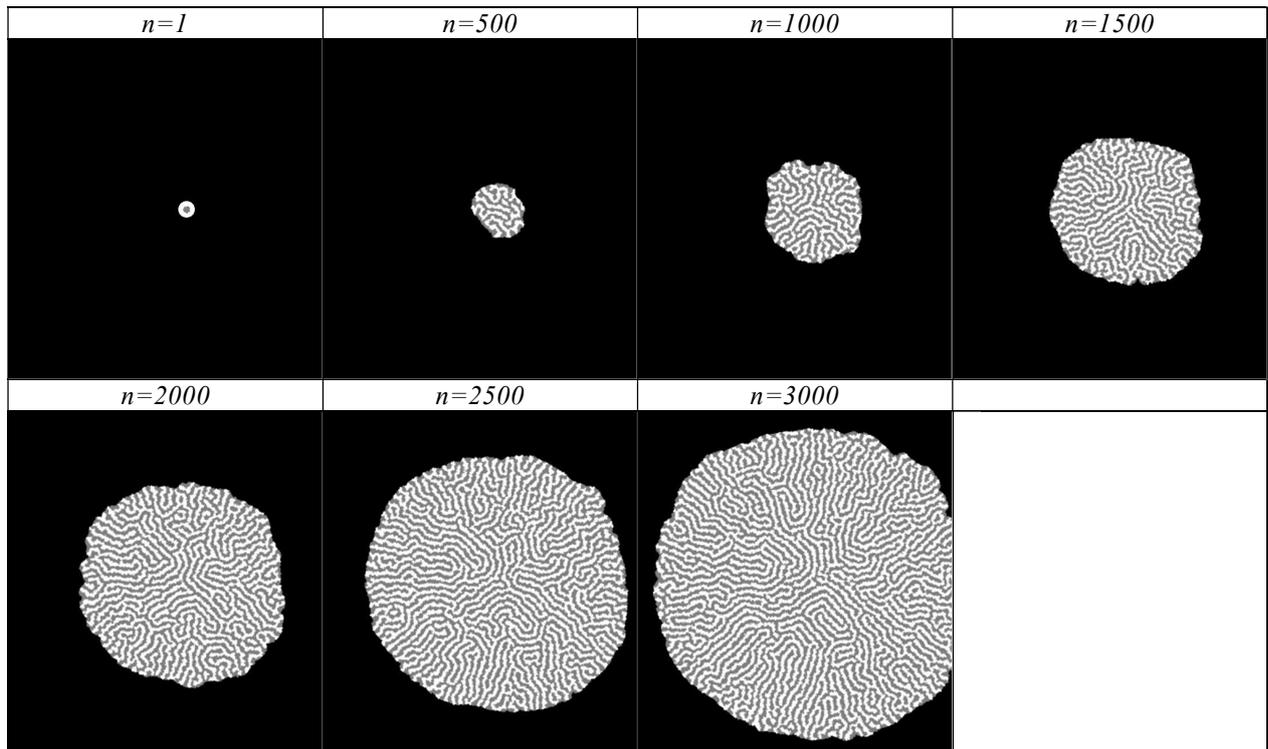


Figure 27.: Exemple de dynamique de la simulation, avec un pas de 500 itérations. Sélections de  $600 \times 600$  pixels.

Un autre effet de la stimulation couplée des deux espèces, est que toute accumulation théorique d'une structure massive d'une espèce va automatiquement favoriser sa propre transition en l'espèce concurrente. Ce qui résulte sur le cas des structures ci-dessus, à savoir une taille de structure largement homogène et similaire pour les deux espèces.

Si la loi permettant la transition d'état entre *os* et *sarcome* résulte sur une grande instabilité aux interfaces, l'effet de la portée de l'influence  $I$  exercée par chaque cellule résulte en l'effet inverse sur les plus grandes échelles. Si l'on observe le centre des images ci-dessus, on peut observer que la forme présente à l'itération  $n=1000$  reste assez peu altérée et toujours reconnaissable jusqu'à l'itération finale  $n=3000$ . La stimulation couplée à longue portée résulte en une rétroaction de toute propagation dans une direction pour les cellules dont la portée  $R_{état}$  est entièrement occupée par les espèces propagatrices. Cela résulte en une forme d'équilibre que seule une série d'évènements aléatoires consécutifs est capable d'altérer.

Si nous souhaitons créer une forme de désordre dans la taille et disposition des structures, c'est cet effet d'équilibre qu'il conviendra de chercher à attaquer. Pour cela, nous avons à notre disposition les différents paramètres et effets de fonctions de distance à notre disposition.

### **C. Impact des paramètres**

Nous avons voulu évaluer l'effet des paramètres indépendants de la fonction de distance sur le développement et les structures obtenues par la simulation. Ces paramètres sont ceux définis sous les appellations  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $R_{état}$ . Ceux-ci sont spécifiques aux différentes transitions pour  $\alpha$ , ou aux différents états pour  $\beta$  et  $R_{état}$ .

#### **1) Paramètre $\alpha$ , ajustement de vitesses relatives**

Pour étudier leurs effets, nous prenons le point de départ vu sur l'exemple précédent, et maintenons le nombre final d'itérations. A partir de là, nous avons réalisé un certain nombre de variations des paramètres à pas fixe, ce qui a permis la réalisation de diagrammes de phase. Nous ne présentons ici que les résultats finaux, soit les images des dernières itérations.

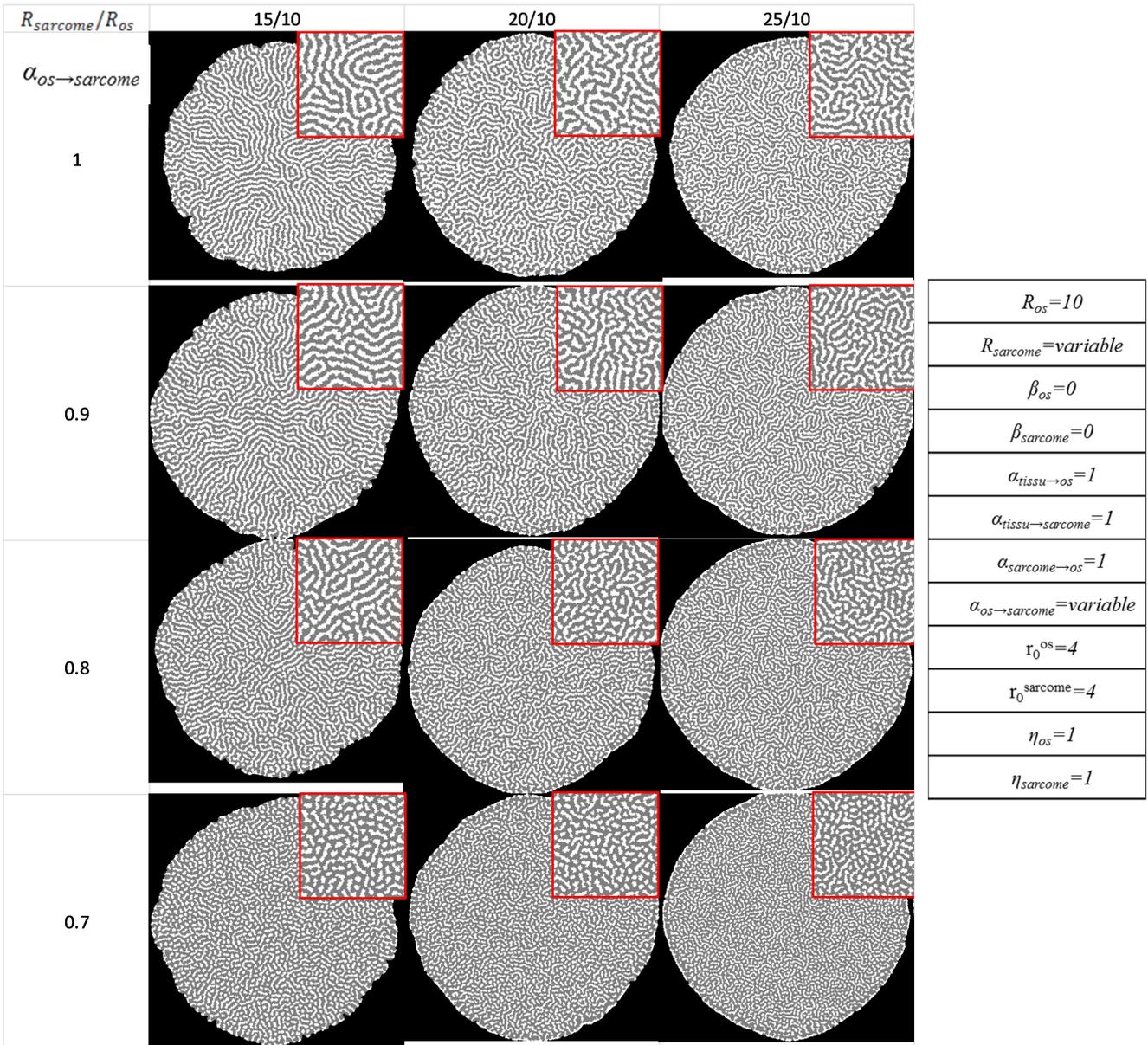


Figure 28.: Détail du diagramme de phase  $\alpha_{os \rightarrow sarcome}$  et  $R_{sarcome}$  En haut à droite de chaque image, détail central en 256x256 pixels. Diagramme complet disponible dans l'annexe 5 : Diagrammes de phase.

Les images des diagrammes sont retallées pour une occupation maximale de l'espace, mais les structures sont à la même taille dans les colonnes ci-dessus, et sensiblement les mêmes, colonne par colonne.

Le paramètre  $\alpha_{état\ init \rightarrow état\ fin}$  est un paramètre qui impacte directement la valeur  $P$ , soit la probabilité de transition d'état d'une cellule. Cela se traduit apparemment par une différence de vitesse de propagation de *sarcome* sur *os* par rapport à l'évènement inverse. Cette différence de vitesse de propagation se traduit au niveau de la structure par un ratio en faveur de l'espèce dont la valeur  $\alpha$  est la plus élevée.

Cette différence de quantité de cellules d'une espèce donnée se retrouve au niveau des structures, avec une phase continue de l'espèce avec la valeur  $\alpha$  la plus élevée, parsemée de particules de la seconde espèce. A faible différence, la phase discontinue conserve largement la structure en lignes, pour se raccourcir de plus en plus, jusqu'à atteindre une phase "granulaire" de particules en "points" en structure quasi-hexagonale. Les interdistances entre particules restent cependant à peu près constantes avec cette évolution.

Un effet secondaire de la différence de vitesse de propagation résulte dans un ralentissement général de la propagation générale sur le domaine *tissu*. L'interdépendance des deux états propagateurs fonctionne très bien, et le ralentissement de la propagation d'une espèce sur l'autre asservit la propagation de l'espèce "plus rapide" qui est limitée à l'efficacité de la portée de l'influence de l'espèce qui active sa propagation.

## 2) Paramètre $\beta$ , seuil d'activation de la transition d'état

Cet effet de ralentissement se retrouve dans l'effet du paramètre seuil  $\beta$ . Celui-ci en effet coupe toutes les transitions possibles pour les valeurs d'influence inférieures à la valeur du paramètre.

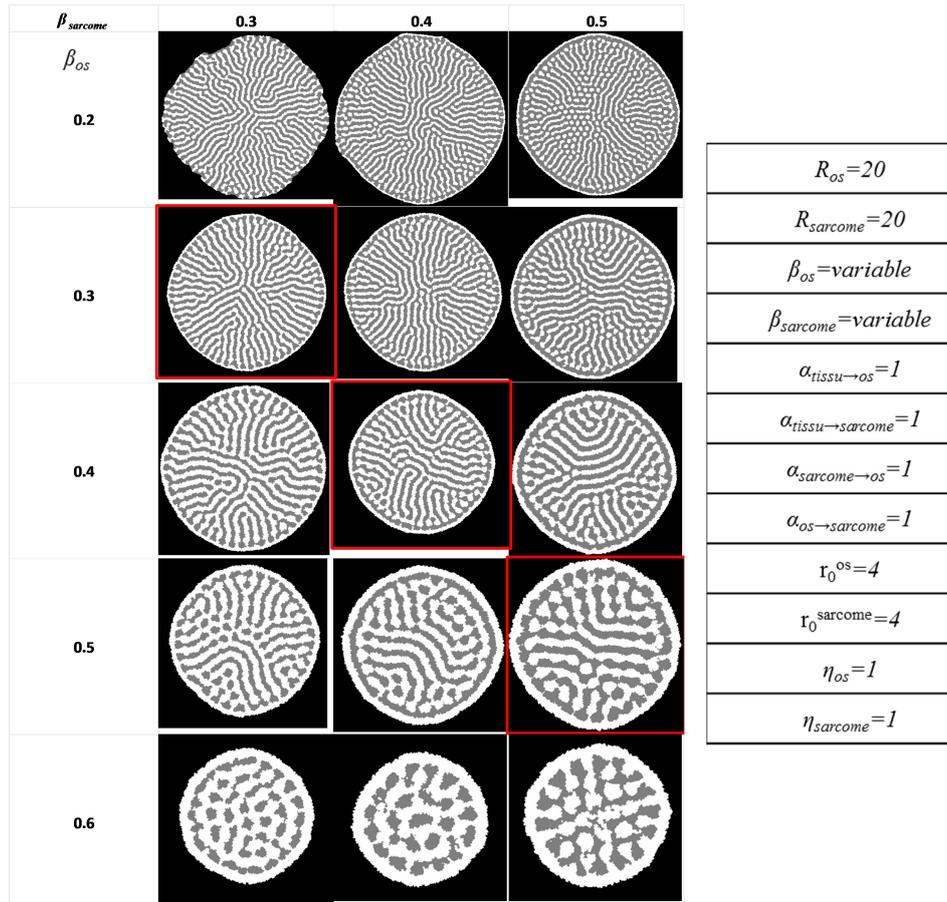


Figure 29.: Diagramme de phase de l'effet des valeurs de  $\beta$  sur la simulation.

Une fois de plus, les figures de fin de simulation ont été redimensionnées, les tailles de structure ne sont pas réellement impactées par la variation des paramètres. L'effet de ralentissement, ici avec deux valeurs actives de  $\beta$  est beaucoup plus prononcé, l'inhibition du développement des structures plus prononcé avec l'augmentation de celles-ci.

Nous pouvons constater un effet similaire à  $\alpha$ , bien que suivant la mouvance inverse, puisque  $\beta$  est une valeur soustraite, sur les ratios entre *sarcome* et *os*. L'effet sur la taille finale de la structure est ici légèrement plus prononcé pour  $\beta_{os}$ , en raison de notre configuration de départ qui résulte sur un front de propagation sur les cellules *tissu* de l'état *os*.

Le ratio entre états est ici en faveur de l'espèce dont la valeur  $\beta$  est la plus basse. Si l'on suit la diagonale  $\beta_{os}=\beta_{sarcome}$ , on peut constater que l'impact du paramètre sur les structures est entièrement le fruit des différences entre les deux valeurs, et similaire à celui de  $\alpha$ . L'augmentation de ce paramètre se traduit par une activité de transition entre les états plus faible, soit un équilibre et une staticité des structures interne plus élevé.

### 3) Paramètre $R_{état}$ , limite de l'influence à distance

Le dernier paramètre considéré est le rayon limite d'influence  $R_{état}$  des deux espèces propagatrices. Celui-ci agissant sur le rayon considéré pour l'influence exercée par les cellules dans le processus d'activation de transition d'état modélisé sous la forme de la valeur d'influence  $I$ , des effets à relatifs à la portée sont attendus.

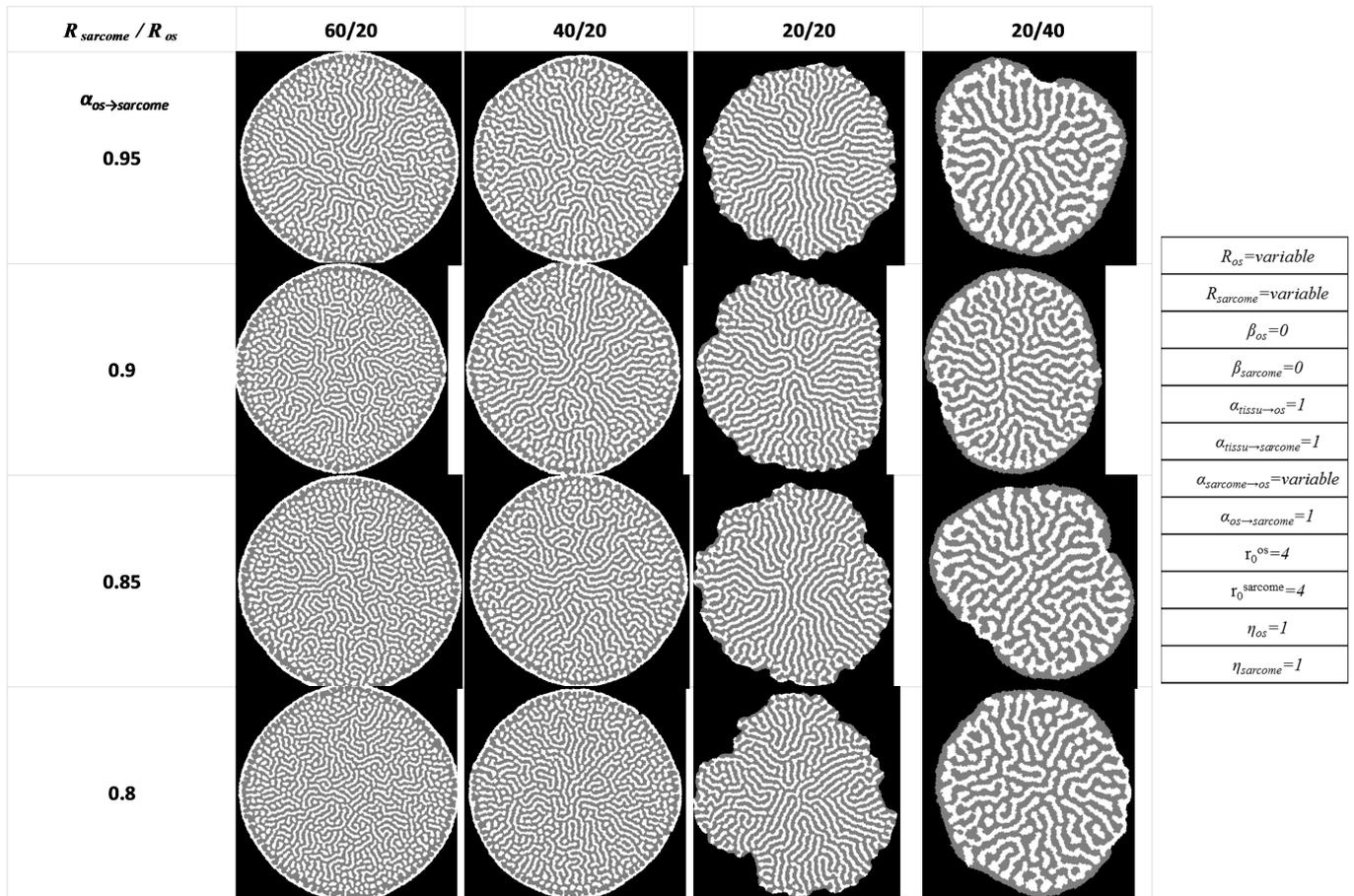


Figure 30.: Détail du diagramme de phase en partie sur l'effet des différents rayons d'influence  $R_{os}$  et  $R_{sarcome}$ .

Une fois de plus, les tailles de structure sont identiques, et apparaissent ici indépendantes de la valeur de  $R_{état}$ . Cependant, une étude rapide à  $R_{état}$  égaux montre que lorsque les deux augmentent de concert, la taille des structures augmente avec la valeur de  $R_{état}$ . On aurait pu compter sur la différence de rayon de portée de se traduire directement par des tailles caractéristiques de structure différentes pour chaque espèce. A l'opposé, il semble que les tailles des structures soient largement dépendantes de la valeur la plus basse, qui force celles-ci à une valeur proche de la moitié du rayon.

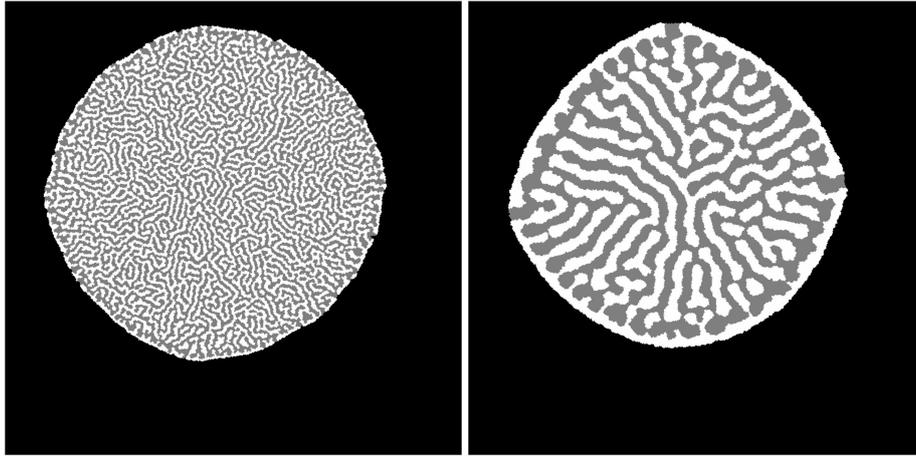


Figure 31.: Pleine image de deux simulations à paramètres égaux, excepté  $R_{état}$ . A gauche  $R_{os}=R_{sarcome}=10$ , à droite  $R_{os}=R_{sarcome}=40$

Après réflexion, la structure interne résulte sur un équilibre des vitesses de propagation d'une espèce sur l'autre qui donne des valeurs de  $P$  équivalentes pour les deux espèces. La progression de l'une des espèces favorisant sa concurrente, tout en inhibant légèrement sa propre propagation, un équilibre se fait lorsque les possibilités de transition sont à l'équilibre, toute propagation ouvrant la voie à une contre-réaction à même de l'annuler.

On constate du reste que malgré le point de départ favorisant fortement un front de progression sur le *tissu* par les cellules *os*, pour des valeurs de  $R_{état}$  égales, le front de propagation est parfaitement mixte, et passe à l'avantage de *sarcome* lorsque  $R_{sarcome} < R_{os}$ . Cela s'explique si l'on considère que pour l'espèce dont  $R_{état}$  est la plus faible, la quantité de surface en état de stimulation dans ce rayon devient plus facilement importante à l'interface, où la proportion relative de *tissu* inerte dans le calcul de  $P$  est plus importante aux valeurs de  $R_{état}$  importantes.

Un autre élément à prendre en compte est l'aspect à la fois radial et discret du calcul de l'influence totale. Si les fonctions de distance employées donnent une valeur d'influence plus forte aux cellules proche de la localisation de la transition possible, l'augmentation de la distance se couple avec une augmentation des cellules influentes, ce qui peut donner des valeurs d'influence en fonction de la distance dont le maximum se situe à moyenne ou longue portée.

Nous avons donc besoin d'étudier l'impact de ce paramètre en conjugaison des effets des fonctions de distance pour bien en comprendre les effets.

#### D. Effet de la fonction d'influence à distance sur la transition d'état

Pour l'étude de l'effet des fonctions de distance, nous avons employé les services d'un stagiaire, Karl Bourumeau. Ses travaux ont porté essentiellement sur les paramètres propres à une fonction d'influence à distance Lorentzienne (Voir Annexe 6 : Simulation d'ostéosarcome : Analyse et traitement d'image) :

$$L(r) = \frac{1}{(r^2 + r_0^2)^\eta} \quad \text{avec } r_0 \in [0 ; 60] \text{ et } \eta \in [0 ; 3]$$

Les résultats de ces travaux démontrent l'importance des fonctions de distance dans la fabrication de désordre, et que l'intégration radiale des influences offre un bien meilleur outil à la compréhension de l'effet de ces fonctions sur les distances exprimées dans la structure.

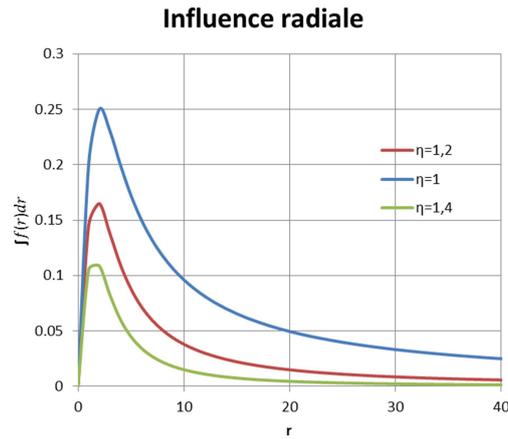


Figure 32.: Graphes d'intégrations radiales de fonctions d'influence à distance Lorentzienne avec  $r_0=2$ .

Le système de fonction d'influence à distance place chaque cellule en transition potentielle au centre d'un disque, avec l'influence individuelle exercée par chaque cellule dans ce disque décroissant avec la distance. Individuellement, les cellules les plus proches exercent l'influence la plus forte. Cependant, si l'on considère la somme des cellules à une même distance, nous obtenons comme nous pouvons le voir sur le graphe ci-dessus des distances de plus forte influence qui se détachent de la plus forte proximité.

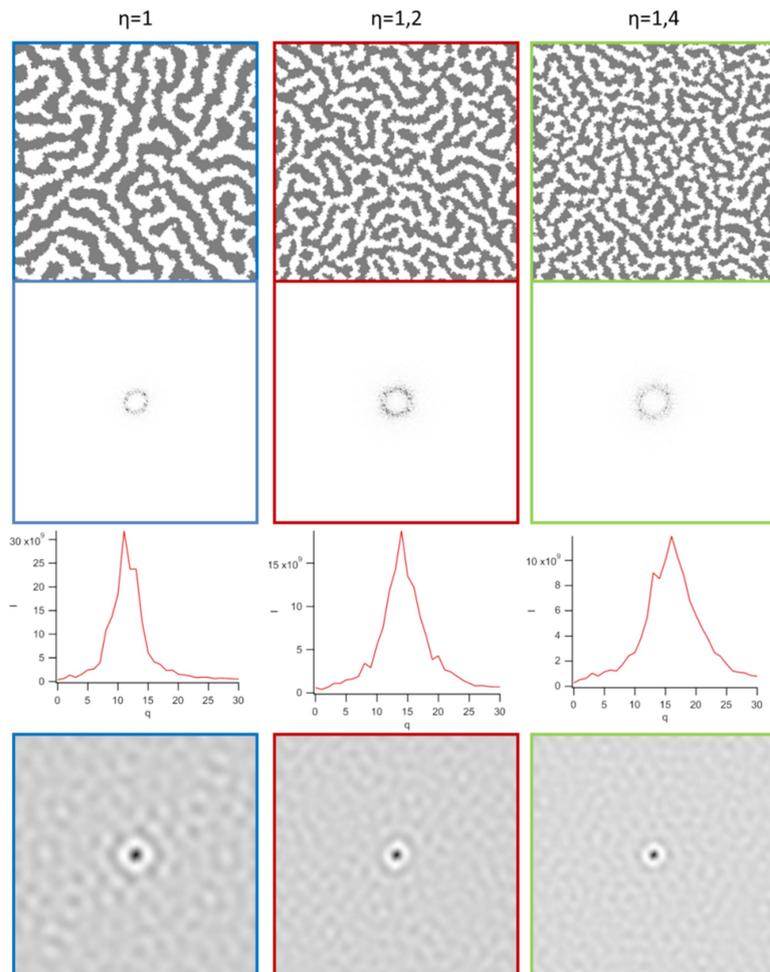


Figure 33.: Comparisons des résultats en 256x256 pixels sur trois simulations à paramètres égaux, avec une variation de  $\eta$  paramètre de la fonction de distance Lorentzienne. Spectres de puissance et fonctions de corrélation de paire en couleurs inversées.

Sur l'exemple ci-dessus, nous pouvons comment cela affecte la distance d'effet maximum et son ratio avec les effets à longue portée. Cet effet est observable directement sur la taille des structures résultantes, et en conséquence sur la distribution en tailles caractéristiques observables à partir des méthodes d'analyse. L'ensemble des observations effectuées sur les différents paramètres nous ont permis de nous approcher de la structure observée par tomographie.

### **E. Recherche de paramètres optimums**

Notre modèle voit par les règles qui lui ont été imposées, émerger des comportements qui sont la conséquence de ces règles. La compétition en local des deux espèces propagatrices fruit de leur interchangeabilité couplée à leur modèle de stimulation couplée, qui se traduit par une forte instabilité des *états* des cellules aux interfaces.

Cette interdépendance en revanche, résulte sur une forte stabilité des structures internes par un mécanisme de contre-réaction. Cette stabilité est le fruit d'une forme d'équilibre qui se forme lorsque les probabilités de transition sont à l'équivalence entre les deux espèces pour un espace donné.

Les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  introduits dans le calcul de la probabilité de transition d'état agissent directement sur les vitesses de propagation, et la différence entre ces vitesses par espèce résulte sur des différences de ratio entre *os* et *sarcome*. Ces différents ratios se traduisent par des différences dans la structure, et une mesure des ratio en tomographie offrirait sans doute une cible à atteindre dans nos efforts de reproduction de la réalité.

Le paramètre de rayon limite d'influence pour sa part, est plus difficile à cerner, mais son action sur la taille des structures est manifeste. L'asservissement des tailles caractéristiques exprimées en lien avec les valeurs de  $R_{\text{état}}$  et plus particulièrement la valeur la plus faible nous permet de constater l'effet de la normalisation sur le mécanisme d'évolution des structures. Au final, notre système s'aligne sur la taille de structure la plus petite, plutôt que de générer deux tailles de structures différentes.

Le travail de Karl Bourumeau nous a permis de réaliser l'impact du modèle 2D sur l'effet des fonctions de distance, déplaçant le maximum d'influence aux moyennes portées, et ouvre la voie pour analyser l'effet de la forme radiale de l'influence exercée par les cellules propagatrices sur les structures de la simulation.

Nous avons pu par l'exploration des paramètres à notre disposition arriver à des résultats de simulation de plus en plus proches des images de tomographie, et recréer une forme de désordre en agissant sur les paramètres de manière à jouer sur la notion encore subjective de "vitesses relatives de propagation" des deux espèces. Les résultats en question sont cependant encore trop rigides, et l'analyse par structurelles par spectre de puissance et fonction de corrélation de paire nous révèle la grande disparité restante entre simulation et réalité.

$R_0^{sarcome}=4$	$\eta_{sarcome}=1,2$
$R_0^{os}=4$	$\eta_{os}=1,2$
$R_{os}=6$	$R_{sarcome}=40$
$\beta_{sarcome}=0$	$\beta_{os}=0,2$
$\alpha_{tissu \rightarrow sarcome}=0,5$	$\alpha_{tissu \rightarrow os}=0,7$
$\alpha_{os \rightarrow sarcome}=0,5$	$\alpha_{sarcome \rightarrow os}=0,7$

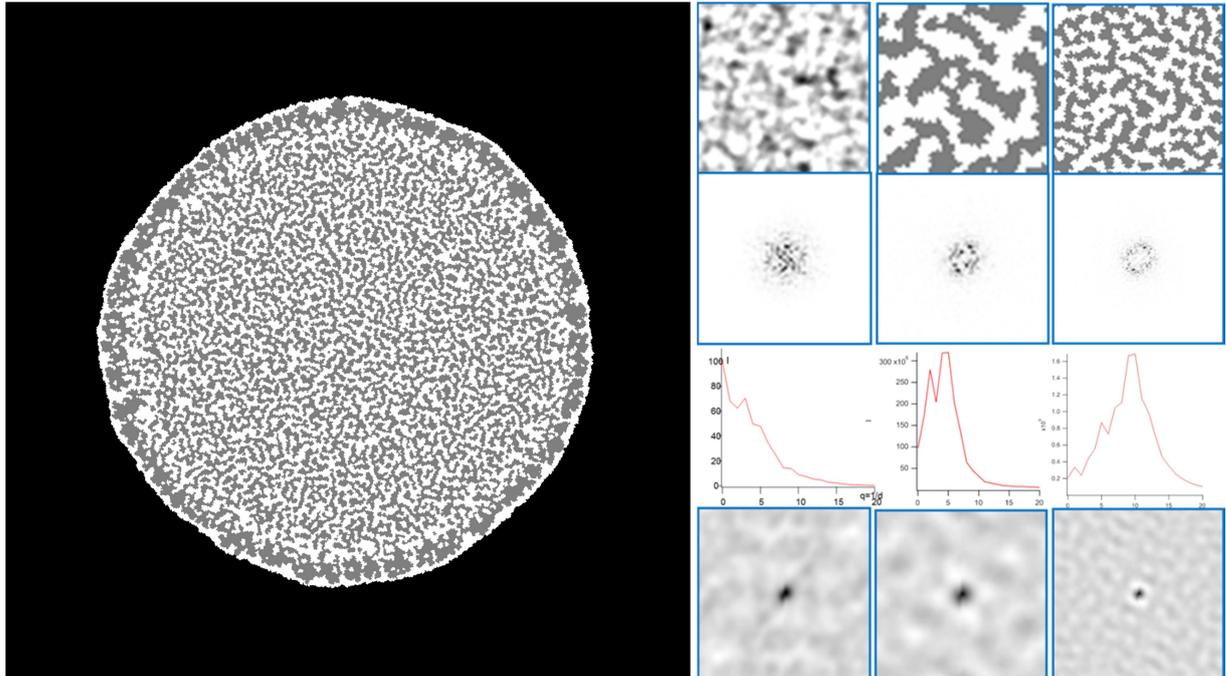


Figure 34.: En haut, paramètres de la simulation Lorentzienne. A gauche, résultat final, à droite, comparaison avec la tomographie d'une sélection 64x64 pixels, spectre de puissance, intégration radiale et fonction de corrélation de paire, échantillon en 64x64 au milieu, et 128x128 à droite. Spectres de puissance et fonctions de corrélation de paire en couleurs inversées.

Nous pouvons voir grâce à la juxtaposition des résultats en différents formats l'impact de la sélection sur les résultats par nos méthodes d'analyse. Si la taille des objets semble correspondre mieux à la tomographie sur l'échantillon mis à l'échelle en 128x128 pixels, les différences dans la distribution des tailles sont clairement plus marquées. Le modèle 64x64 est employé justement parce que plus facile à approcher et constituant ainsi une première étape à accomplir.

L'étude complète des possibilités des paramètres et des différentes fonctions d'influence à distance se heurte cependant aux limitations techniques de LabVIEW. Si un ordinateur dédié à la simulation a permis de réduire le temps d'une simulation par un facteur 5, les combinaisons et paramètres à évaluer sont nombreux, et le programme employé ne nous permet pas d'employer les ressources supérieures des clusters. D'où le travail d'une autre stagiaire, qui consistait à traduire l'automate en langage Python, mais s'est également porté sur la question de l'impact des images de départ sur la structure.

## VI. Évolutions récentes et perspectives

Avec l'aide de deux stagiaires, Pauline Thiebaud en M2 MaMaSelf et Vincent Messaoui en L3 Physique, le projet de simulation a continué d'évoluer au cours de la rédaction de cette thèse. Pauline a effectué un travail de transcription remarquable de la simulation vers le langage Python, ce qui a permis de lever la limitation de LabVIEW qui ne permettait qu'une seule

instance de la simulation de progresser, et ce par l'usage des ressources du laboratoire sous la forme de cluster de processeurs, permettant la réalisation de nombreuses simulations en parallèle.

### A. Effets des images de départ

L'effet des points de départ sur les structures est une partie connexe du stage de Pauline Thiebaud dans notre équipe (voir annexe 7 : An ultrastructural study of bone with cancer (osteosarcoma) during the tumor progression). La conclusion de ses travaux sur les points de départ est que ceux-ci affecte la morphologie générale de la structure.

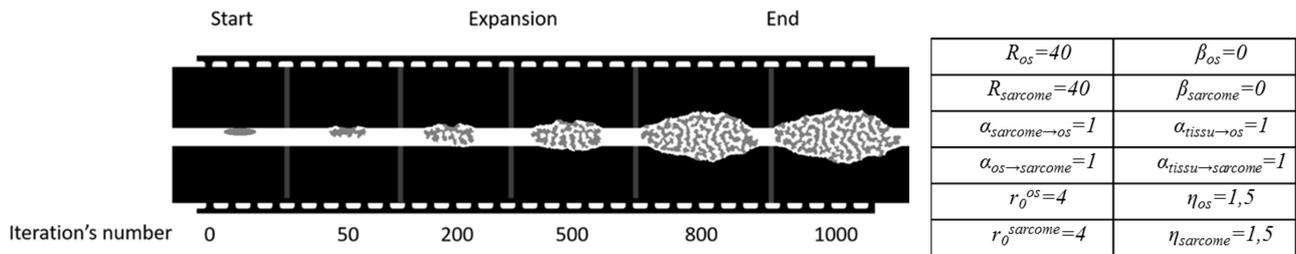


Figure 35.: Evolution de simulation avec un point de départ différent.

On observe par l'analyse de ses résultats que si la morphologie globale de la structure est affectée, à long terme les paramètres de la structure interne ne sont pas affectés de manière notable. Ceux-ci sont le fruit exclusif des différents paramètres vus précédemment.

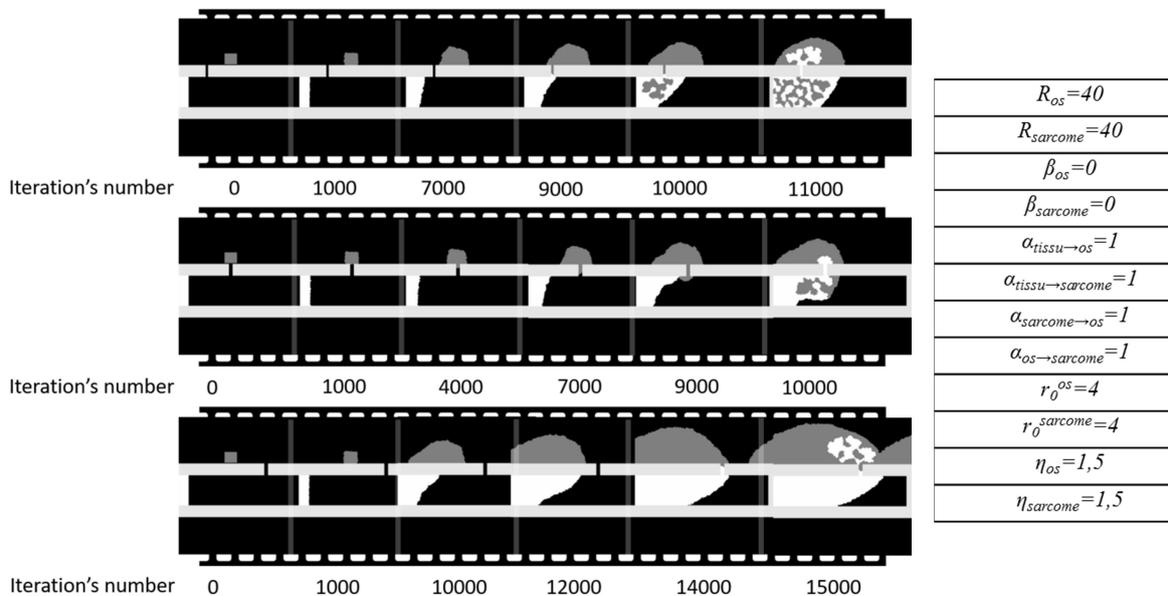


Figure 36.: Simulations avec obstacles immuables.

Certains tests ouvrent la voie pour une complexification de la simulation en introduisant des obstacles formés d'un état des cellules supplémentaires inerte. Cela offre de nouvelles perspectives, soit sous la forme de structures inertes dans la simulation et leur effet sur la morphologie, soit en poussant le concept de l'activité du remodelage osseux plus loin, en introduisant une règle qui empêcherait les transitions d'état rapides des cellules.

### B. Passage de la simulation à la 3D

Les travaux de Vincent Messaoui ont permis de tirer parti du langage Python et des nouvelles possibilités techniques afin d'opérer la transition de la simulation à un modèle 3D. Une solution simple au problème de représentation graphique des résultats de simulation 3D a été trouvée pour

l'occasion, recréer les volumes *os* et *sarcome* séparément sous la forme de stacks d'images, et effectuer des opérations de rognage avant de reformer des représentations 3D qui apparaissent en coupe, offrant une visualisation de la structure interne.

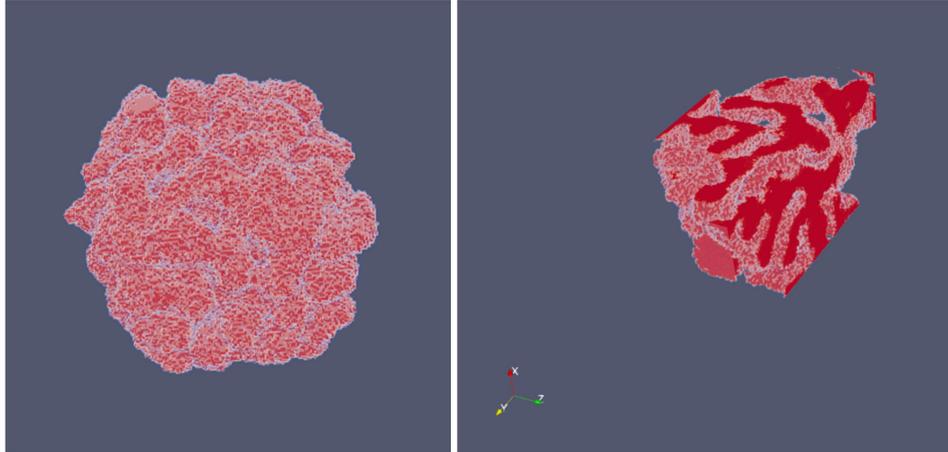


Figure 37.: A gauche, volume modélisé sous Paraview de l'état sarcome à la fin d'une simulation 3D. A droite, coupe du quart inférieur gauche du volume d'état sarcome.

L'étape suivante du procédé serait d'utiliser des intégrations radiales du spectre de puissance 3D afin de fournir des outils d'analyse de la structure 3D qui nous aideraient à poursuivre l'évolution de la simulation. Une étude de l'impact des différents paramètres permettrait également d'assurer la continuité des effets avec le passage à la 3D.

### C. Perspectives

De nombreuses perspectives quant à l'avenir de cette simulation s'ouvrent, soit en introduisant une forme de quiescence dans le procédé de transition d'état, soit en introduisant un paramètre d'acidité qui agirait sur la capacité des cellules à transiter entre *os* et *sarcome* sur plusieurs itérations. A cela s'ajoute la possibilité de passer à un modèle se basant sur la transition *os*→*sarcome* pour les calculs d'influence, remplaçant la favorisation du processus de propagation dans le cadre du cercle vicieux.

Des travaux d'analyse se basant sur les résultats précédents aideraient à l'avancement de la simulation, avec peut-être des mesures et cartographies des valeurs d'influence à chaque itération, pour comparer la pression locale sur la transition d'état, et vérifier la notion d'équilibre agissant sur la taille des structures. Une réforme du modèle probabiliste permettant de passer outre la normalisation  $I_{tot}/I_{max}$  qui entraîne la prévalence de l'espèce au rayon d'influence le plus petit pourrait également aider dans la fabrication de structures différenciées. L'exploration poussée de fonctions d'influence à distance différentes serait également souhaitable.

Enfin, la simulation opère sur un modèle couplé de favorisation de propagation, et pourrait également trouver des applications à d'autres phénomènes que la propagation de l'ostéosarcome.

## VII. Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à analyser des coupes tomographiques d'un échantillon de souris à un stade avancé de développement. Nous avons dans un premier temps confirmé pour nous-même que les images de tomographies permettaient de reconstituer efficacement le caractère bicontinu de la structure de l'ostéosarcome, faite de phase ostéoïde et de cellules tumorales.

A partir de là, nous avons choisi des méthodes d'analyse structurelle passant par la transformée de Fourier. Nous avons dégagé trois outils afin de tenter de révéler des tendances particulières d'une régularité de la structure interne, le spectre de puissance, son intégration radiale et la fonction de corrélation de paire. Ces méthodes, à partir des coupes 2D, ont au final révélé une grande disparité des tailles de structure, directions, distances de répétition, avec une faible tendance à l'orientation en local, révélé par fonction de corrélation de paire, vers l'os initialement infecté.

Nous avons ensuite mis au point une simulation par automate cellulaire dans l'espoir de recréer au plus proche la dynamique de propagation de l'ostéosarcome. L'objectif de cette démarche est de recréer à partir d'un mécanisme dynamique la structure de l'ostéosarcome, afin de déterminer les lois et mécanismes de propagation de la pathologie. A partir de ces lois, l'espoir est de pouvoir identifier le vecteur de la propagation, pour ensuite offrir des pistes aux chercheurs médicaux pour inhiber le développement tumoral.

Nous nous sommes pour cela basé sur quatre hypothèses :

**- La présence de cellules tumorales stimule la fabrication d'ostéoïde, et la présence d'ostéoïde favorise en retour la propagation des cellules tumorales, dans un système intercatalytique.**

**- Les structures internes de la tumeur, ostéoïde et cellules tumorales, ne sont pas fixes, et le remodelage se poursuit en interne.**

**- La fabrication d'ostéoïde et la propagation des cellules tumorales s'effectuent par contact, sous l'effet des cellules du type opposé suivant une fonction d'influence à distance.**

**- La rugosité des interfaces entre os et sarcome est limitée.**

A partir de ces hypothèses, nous avons dérivé les lois régissant la simulation, avant d'en étudier les différents comportements émergents. Nous avons cherché à comprendre l'impact des paramètres établis dans la simulation, les effets de différentes fonctions de distance et points de départ, afin de posséder les outils nécessaires à la recréation de la structure ostéosarcome, dans la limite des contraintes imposées par le modèle 2D.

Le paramètre sur lequel nous nous sommes concentrés dans cette démarche s'est trouvé être le niveau de désordre, qui se traduit par la distribution large du signal des spectres de puissance, car il nous est apparu comme le paramètre essentiel le plus difficile à maîtriser. Nous avons analysé certains de nos meilleurs résultats par les méthodes établies, avant de les confronter aux résultats issus de la tomographie. A partir de ces comparaisons, nous avons petit à petit affiné les différents paramètres, dans le but de nous approcher de la structure tomographique.

Le travail effectué au cours de cette thèse sur l'automate a ensuite été repris, traduit en langage Python pour en lever les limitations techniques et décupler la capacité à fournir des résultats, ce qui a ouvert la voie pour la mise au point d'un modèle 3D. Ces éléments permettront de faire progresser la simulation encore plus avant, et fourniront une base pour toute continuation du projet.

## VIII. Bibliographie

1. Harburn, G., Taylor, C. & Welberry, T. R. *Atlas of Optical Transforms*. (Cornell University Press, 1975).
2. Panizza, P. *et al.* Order-Disorder Structural Transitions in Mazes Built by Evaporating Drops. *Phys. Rev. Lett.* **121**, 078002 (2018).
3. Bouligand, Y. Fibroblasts, Morphogenesis and Cellular Automata. in *Disordered Systems and Biological Organization* (eds. Bienenstock, E., Soulié, F. F. & Weisbuch, G.) 367–379 (Springer, 1986). doi:10.1007/978-3-642-82657-3\_36.
4. Predictive modeling of disease propagation in a mobile, connected community using cellular automata: *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*: Vol 30, No 8.
5. Schönfisch, B. Propagation of fronts in cellular automata. *Physica D: Nonlinear Phenomena* **80**, 433–450 (1995).
6. Wolfram, S. Cellular automata as models of complexity. *Nature* **311**, 419–424 (1984).
7. Lamora, A. *et al.* TGF- $\beta$  Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *Journal of Clinical Medicine* **5**, 96 (2016).
8. Lamoureux, F. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat Commun* **5**, 1–14 (2014).

## Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'utiliser des techniques d'analyse de la physique des matériaux pour étudier l'ostéosarcome et son développement, dans le but d'offrir de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes de cette pathologie.

Les techniques de la microscopie en lumière polarisée nous ont permis d'observer d'une part la structuration du collagène déposé en interface de construction osseuse suivant un modèle déjà pré-organisé de contreplaqué. D'autre part, les observations effectuées sur du collagène en milieu confiné, avec ou sans microtextures, ont révélé l'extrême complexité des structures prises par le collagène en auto-assemblage sous l'effet d'un gradient de concentration par séchage.

Bien que n'ayant pas été mise en œuvre de manière satisfaisante sur des échantillons d'os infectés par l'ostéosarcome, nous considérons la microscopie en lumière polarisée comme une technique qui permettrait une analyse efficace et facile du niveau d'organisation de l'os sous l'action de l'ostéosarcome. Nous avons de plus achevé une bonne compréhension des mécanismes de la microscopie en lumière polarisée lors de la mise en œuvre d'un montage portatif, et des structures des phases nématiques et cholestériques des cristaux liquides.

L'analyse nanoscopique des structures du collagène et de l'apatite s'est essentiellement reposée sur les mesures de diffraction des rayons X effectuées au synchrotron SOLEIL, avec les études complémentaires sur la réponse mécanique des échantillons et des techniques de microscopie.

Nous avons employé des échantillons aux temps courts de développement de l'ostéosarcome (7 et 13 jours) pour observer la phase initiale d'activité de la tumeur. Au sein des échantillons étudiés, une évolution de l'organisation des tropocollagènes et de la morphologie des cristaux d'apatite en gradients apparemment liés depuis le cartilage de croissance dans la diaphyse. Les échantillons réalisés aux temps courts de développement de l'ostéosarcome à partir d'un dépôt effectué à 1/3 proximal du tibia présentent une surproduction d'os trabéculaire dans la cavité médullaire à 7 jours. Par opposition, les échantillons à 13 jours présentent une structure trabéculaire beaucoup plus dégradée, résultat renforcé par l'étude mécanique et les résultats d'observation en microscopies.

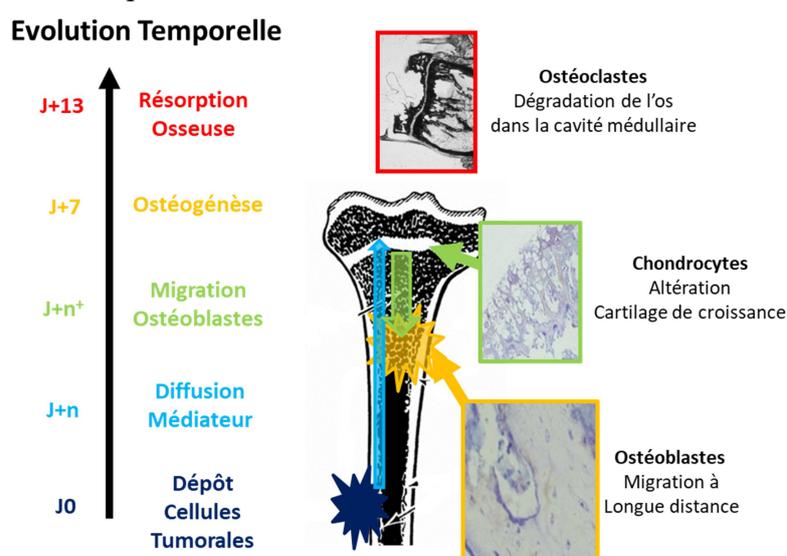


Figure 1.: Modèle d'action des cellules tumorales sur le mécanisme de production de l'os du cartilage de croissance.

Un modèle sur le mode de développement de l'ostéosarcome aux temps courts a été suggéré en conséquence. Les cellules tumorales libèrent un médiateur encore inconnu que va diffuser jusqu'au cartilage de croissance où la production endochondrale d'os est activée tout en entraînant une migration des ostéoblastes. Le médiateur déclenche une surproduction d'os trabéculaire endochondrale dans le temps à 7 jours, qui est ensuite dégradé par l'activation des mécanismes ostéoclastes par la tumeur dans l'intervalle séparant de la date à 13 jours de développement.

Les perspectives de cette méthode d'analyse semblent prometteuses, avec des résultats distincts aux temps courts. Une nouvelle série de mesure sur de nouveaux échantillons, sur des temps de développement plus rapprochés avec des techniques de coupe désormais mieux établies, permettrait de confronter ce modèle et de poursuivre la compréhension des mécanismes de développement de l'ostéosarcome. L'ensemble des outils d'analyse des résultats de SAXS ont été mis au point et permettent une analyse extensive des paramètres d'organisation du collagène et de morphologie des cristaux d'apatite. Nous avons pu voir l'impact sur la morphologie à grande échelle de l'activation de l'ostéogénèse par l'ostéosarcome, et avons cherché à reproduire les effets de celle-ci à l'échelle macroscopique en simulation.

L'étude préalable de la structure osseuse produite par l'ostéosarcome à partir des images de scanner n'a pas permis de dégager d'élément général d'orientation ou d'interdistance au sein de la structure de l'ostéosarcome. En revanche nous avons identifié un ensemble de méthodes d'analyse d'image à même de permettre la comparaison objective entre réalité et résultat d'automate cellulaire.

Les résultats de l'automate cellulaire n'ont pas atteint de niveau de similitude avec la structure de l'ostéosarcome suffisante pour tirer des conclusions, mais offre une nouvelle approche de l'analyse du processus de développement et de propagation de l'ostéosarcome. Notre modèle est de plus en plus abouti, ayant opéré la transition en trois dimensions, et pourrait être exploitable pour simuler le développement d'autres sarcomes produisant une importante matrice de collagène. De plus, la simulation d'un modèle de développement conjoint de deux domaines en interaction suivant des lois de diffusion pourrait être exploitée pour simuler d'autres systèmes.

Nous avons pu proposer un modèle de l'activité de l'ostéosarcome lors de sa phase initiale à partir des analyses complémentaires en diffraction des rayons X et en microscopie en lumière polarisée d'échantillons de modèles souris. Afin de pouvoir approfondir notre connaissance de cette pathologie, cette étude mériterait d'être poursuivie sur des temps de développement plus variés, et d'être étendue à des résections humaines.

L'étude multi-échelle d'un modèle ostéosarcome nous a permis de développer une stratégie d'analyse généralisable dans les cadres des tumeurs des tissus riches en collagène. La généralisation de ces méthodes d'analyse à d'autres tumeurs produisant des matrices extracellulaires, comme les autres sarcomes, est une perspective pleine de promesses pour comprendre le développement de ces tissus cancéreux jouant une fonction mécanique.



# Origin of transparency in scattering biomimetic collagen materials

Chrystelle Salameh<sup>a,b,1,2</sup>, Flore Salviat<sup>a,b,c,1</sup>, Elora Bessot<sup>b</sup>, Miléna Lama<sup>b,d</sup>, Jean-Marie Chassot<sup>e</sup>, Elodie Moulongui<sup>b</sup>, Yan Wang<sup>b</sup>, Marc Robin<sup>b</sup>, Arnaud Bardouil<sup>f</sup>, Mohamed Selmane<sup>g</sup>, Franck Artzner<sup>f</sup>, Alba Marcellan<sup>d</sup>, Clément Sanchez<sup>a,b</sup>, Marie-Madeleine Giraud-Guille<sup>b</sup>, Marco Faustini<sup>b</sup>, Rémi Carminati<sup>e</sup>, and Nadine Nassif<sup>a,b,e,3</sup>

<sup>a</sup>Collège de France, PSL University, 75231 Paris Cedex 05, France; <sup>b</sup>Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), F-75005 Paris, France; <sup>c</sup>Cornea, External Disorders and Refractive Surgery, Fondation Ophtalmologique Rothschild, 75019 Paris, France; <sup>d</sup>Sciences et Ingénierie de la Matière Molle, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris (ESPCI) Paris, Paris Sciences et Lettres (PSL) University, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France; <sup>e</sup>Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS, PSL University, 75005 Paris, France; <sup>f</sup>CNRS, Institut de Physique de Rennes, UMR 6251, Université de Rennes, F-35000 Rennes, France; and <sup>g</sup>Institut des Matériaux de Paris Centre, Sorbonne Université, 75252 Paris Cedex 05, France

Edited by Lia Addadi, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, and approved April 10, 2020 (received for review January 21, 2020)

**Living tissues, heterogeneous at the microscale, usually scatter light. Strong scattering is responsible for the whiteness of bones, teeth, and brain and is known to limit severely the performances of biomedical optical imaging. Transparency is also found within collagen-based extracellular tissues such as decalcified ivory, fish scales, or cornea. However, its physical origin is still poorly understood. Here, we unveil the presence of a gap of transparency in scattering fibrillar collagen matrices within a narrow range of concentration in the phase diagram. This precholesteric phase presents a three-dimensional (3D) orientational order biomimetic of that in natural tissues. By quantitatively studying the relation between the 3D fibrillar network and the optical and mechanical properties of the macroscopic matrices, we show that transparency results from structural partial order inhibiting light scattering, while preserving mechanical stability, stiffness, and nonlinearity. The striking similarities between synthetic and natural materials provide insights for better understanding the occurring transparency.**

collagen | self-assembly | photonic materials | mechanical properties | transparency

Aside from structural colors and pigmentation, and the usual strong scattering generated by biological tissues, optically transparent or translucent organisms are found in nature. They are quite abundant in aquatic environments (e.g., medusa and planktonic organisms) but rare on land (e.g., the butterfly *Greta oto*). The biological role of transparency appears to be related to protection from predators (1–3). The physical basis of biological transparency is not straightforward. Living tissues are heterogeneous at the submicron and micrometer scales, resulting in spatial fluctuations of the refraction index that are expected to produce light scattering. Deciphering the relation between light scattering and the structure of disordered or partially ordered materials is challenging. However, it is a key step in understanding the appearance of transparency in living organisms, and more generally in natural materials.

Among the few reported transparent biological materials, cornea is a connective tissue that forms the front part of the eye. It works as a refracting lens possessing dioptric properties. Light transmission in healthy corneas occurs through the tissue containing collagen fibrils, proteoglycans, and cells, and scattering from collagen is suppressed by interferences induced by partial order in the fibrillar network. Interestingly, disorders opacifying the cornea are a major cause of refractive errors but also blindness (4). Suppression of scattering is generally a key issue encountered at different levels in the mechanism of vision (5). Hence, particular attention has been paid to the distribution of type I collagen, the principal constituent of the corneal stroma, and the link between the fibrillar network and the unexpected high transmittance (6–9).

Collagen type I, a major structural protein in the body, displays an assembled fibrillar organization in numerous connective

tissues such as bone, dermis, and cornea. Depending on the tissue, collagen organizes differently, which leads to specific mechanical properties (from hard to soft) and optical properties (from opaque to transparent) (10). For instance, a cholesteric structure is observed in the compact bone that contributes to its mechanical properties (11), while the tendon is composed of unidirectional collagen fibrils (12). For cornea, collagen fibrils organize in a general lamellar orientation with some local plywood forms (4). Hence, an interesting correlation exists between the collagen phase diagram and the tissue ultrastructure, although the occurrence of collagen liquid-crystal (LC) phases was never demonstrated in vivo (13).

In addition to cornea and fish scales (14), transparent collagen matrices were recently reported in natural tissues, elephant ivory (15) and teeth of the deep-sea dragonfish (16), and in synthetic collagen scaffolds (17). Transparency of such heterogeneous

## Significance

Disordered materials with heterogeneities at scales ranging from nano- to micrometers usually scatter visible light and become opaque beyond a certain thickness. However, transparent materials are found in nature. The physical origin of transparency in natural and artificial biopolymer materials is still not fully understood. Here, a gap of transparency is found in synthetic fibrillar collagen matrices within a very narrow range of concentration. The transparency results from structural partial order inhibiting light scattering, while preserving mechanical stability, stiffness, and nonlinearity. The potential to produce biomimetic hydrogels with such striking optical properties by self-assembly opens an interesting route in the study of photonic materials and provides new elements in the understanding of the appearance of transparency in natural materials.

Author contributions: N.N. designed research; C. Salameh, F.S., E.B., M.L., J.-M.C., E.M., Y.W., M.R., A.B., M.S., A.M., M.F., and N.N. performed research; C. Salameh, F.S., E.B., M.L., J.-M.C., F.A., A.M., C. Sanchez, M.-M.G.-G., M.F., R.C., and N.N. analyzed data; and C. Salameh, F.S., M.L., J.-M.C., F.A., A.M., R.C., and N.N. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>C. Salameh and F.S. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Present address: Institut Européen des Membranes (IEM), UMR 5635, Univ Montpellier, CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM), 34095 Montpellier, Cedex 5, France.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: nadine.nassif@sorbonne-universite.fr.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2001178117/-DCSupplemental>.

First published May 18, 2020.

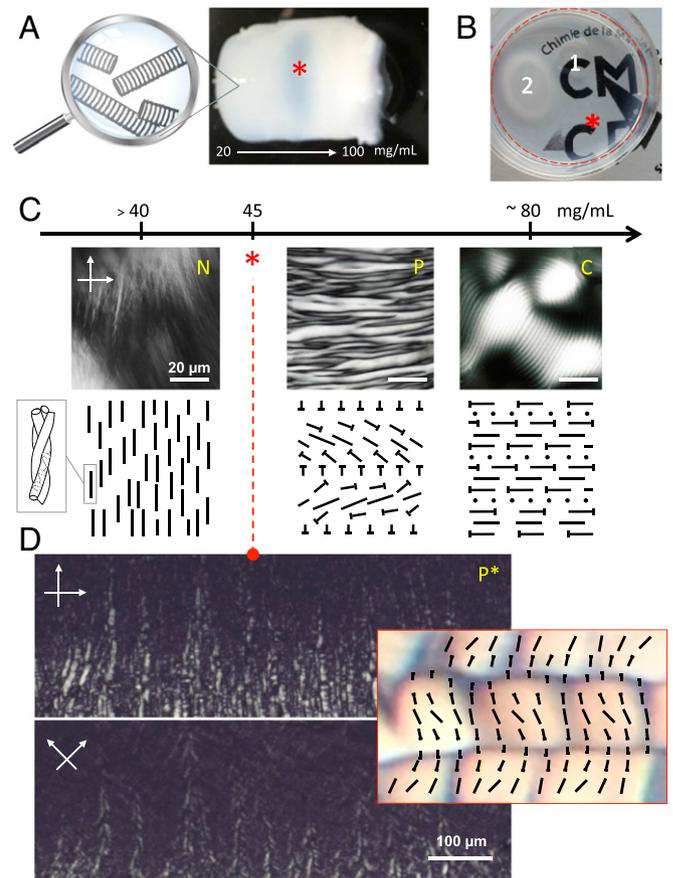
complex materials remains an intriguing property. It can be present in different degrees, measured by the optical thickness  $L/\ell$ , with  $L$  the sample thickness and  $\ell$  the scattering mean free path, the latter being the average distance a photon travels between subsequent scattering events. Understanding whether transparency ( $L/\ell \ll 1$ ) results from a change in the intrinsic parameter  $\ell$ , correlated to the microstructure, or merely from a small physical thickness  $L$  of the observed sample, is crucial. To quantitatively address this issue, it is important to shape the collagen matrices into a design permitting a measurement of  $\ell$  independently of the physical thickness  $L$ .

Here, we report on the existence of a transparent domain in the phase diagram of fibrillar collagen, observed in a narrow range of concentration. Below and above this transparency gap, scattering increases substantially. The stability of the matrices over time made it possible to produce three-dimensional (3D) collagen materials up to 1 cm in thickness by different processes. This ensures that a change in transparency is linked to a change in the scattering mean free path  $\ell$ , thus revealing a change in the matrix ultrastructure that depends on the collagen concentration. Around the critical concentration producing the gap in transparency, the material exhibits locally the corneal collagen microstructure, together with optical and mechanical features close to that of real corneas. Before the fibrils' precipitation (fibrillogenesis *in vitro*), a metastable LC phase with facets ordered into a 3D network forms between the nematic and the precholesteric phases in the lyotropic molecular collagen diagram. The optical microscopy of this phase recalls the DNA precholesteric phase (18) which exhibits a 3D orientational order (19) similar to that observed in transparent decalcified elephant ivory (15). This observation strengthens the hypothesis of the existence of biological LC analogs (20). The resulting 3D fibrillar transparent matrix may be of interest for studying the relationship between the materials structure and the occurring transparency, which remains difficult to assess with natural corneas, for example (21–23), but also for developing keratoprosthesis models. Finally, our understanding of transparency may provide a new approach to the design of photonic materials manufacturable using self-assembly processes.

### Collagen Concentration Gradient and Gap in Transparency

Two types of matrices were prepared, characterized by gradient in collagen concentration ranging from  $\sim 20$  to  $\sim 100$  mg/mL. For this purpose, two setups were used: 1) the continuous injection/reverse dialysis process (Methods and SI Appendix, Extended Supporting Methods) described previously for preparing pure or composite materials (24, 25) (Fig. 1A) and 2) the evaporation process (26) (SI Appendix, Fig. S1) but without homogenization of the acidic collagen solution. A gap of transparency was observed for both matrices after the fibrils' precipitation (Fig. 1A and SI Appendix, Fig. S1, arrows). Nevertheless, a slight difference in terms of opacity was observed between the two samples. Noticeably, the thicker material (i.e., 1 cm large) synthesized by injection/reverse dialysis was more opaque. The collagen concentration in the transparent domain was determined from quantifying the amount of hydroxyproline by titration. The same concentration was found whatever the process adopted (evaporation or continuous injection/reverse dialysis), which was around 45 mg/mL. Such a gap of transparency found in the fibrillar collagen diagram appears quite counterintuitive since the increase in collagen concentration leads to an increase in fibrillar density and order: the isotropic/anisotropic transition occurring slightly above 40 mg/mL (27). An increase in density and ordering are competing mechanisms that can lead to a suppression of scattering and the appearance of transparency beyond a given concentration threshold. Here, the recovery of opacity at even larger densities, and therefore the nonmonotonic behavior of the scattering mean free path versus concentration, proves the crucial role of the ultrastructure on the optical properties.

This is easily highlighted as follows. A diluted soluble-acidic collagen (2 mg/mL) was concentrated by a slow evaporation (26–28) up to 45 mg/mL. This technique permits an accurate estimation of the concentration during evaporation by simple weighing. The fibrillar collagen matrix in the Petri dish is shown in Fig. 1B, red asterisk. A part of the collagen matrix has been removed locally (area 1) to demonstrate the presence of a transparent matrix in the Petri dish. Area 2 shows a fibrillar collagen matrix where a shear stress was applied using a spatula before fibrillogenesis *in vitro*. This area becomes opaque after the precipitation of the fibrils, indicating a change in the material's properties. The collagen concentration's being above 40 mg/mL, this should be due to the destabilization of the LC geometry. This observation clearly shows that, in addition to the collagen density, the ultrastructure is of primary importance for the occurring transparency.



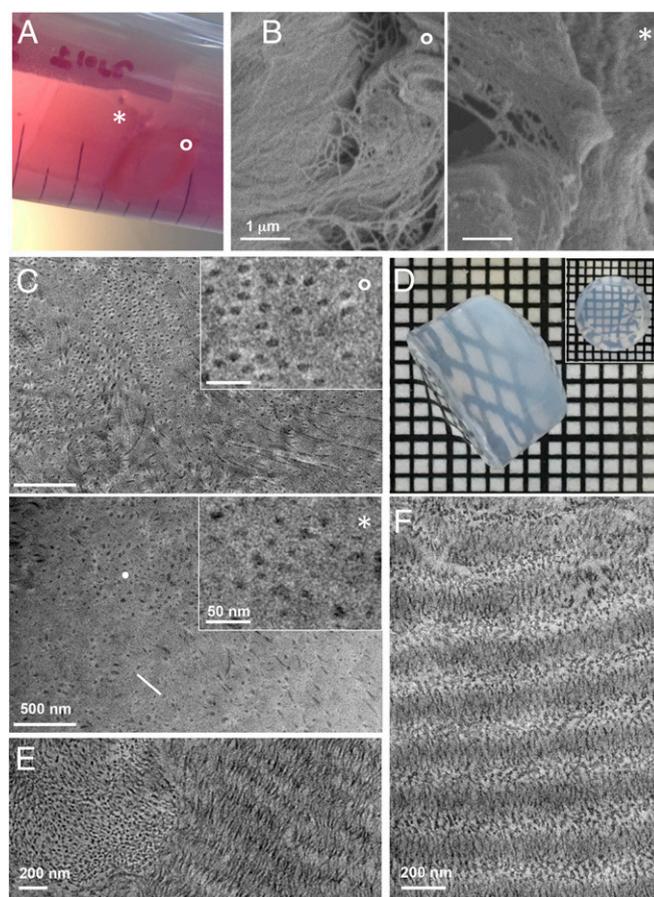
**Fig. 1.** Optical relationships between collagen fibrillar gradient and LC phase diagram. Images of a fibrillar collagen matrices (A and B). (A) The matrix is characterized by a gradient in concentration (20 to 50 to 100 mg/mL range) and exhibits a gap of transparency. (B) The matrix (red asterisk) which is delimited by the red dotted circle is fully transparent in the Petri dish; the final concentration of collagen is  $\sim 45$  mg/mL. Two other areas are observed: 1 is vacant and 2 is opaque after shearing. (C) Classical collagen phase diagram (scheme and polarized optical micrograph) from nematic (N) to cholesteric (C) observed between crossed polarizers (0 to  $90^\circ$ ). Segments are molecules in the section plane; dots are molecules normal to this plane; nails are molecules in oblique position with the head representing the molecular extremity pointing toward the observer. The collagen phase diagram is implemented with a new precholesteric phase ( $P^*$ ) for which concentration is found around 45 mg/mL. For the  $P^*$ , the birefringent texture appears as cubic platelets (D). This faceted pattern is still observed after a  $45^\circ$  polarizer rotation; the organization of collagen molecules for  $P^*$  is presented schematically in the red framed image at higher magnification (SI Appendix, Fig. S2 A and B). The precholesteric phase (P) occurs by increasing the collagen concentration in the solution.

The phase diagram of collagen molecules has been extensively studied (29) (Fig. 1C) and exhibits three arrangements: nematic (above 40 mg/mL) (N in Fig. 1C), precholesteric (P in Fig. 1C), and cholesteric (above ~75 mg/mL) (27) (C in Fig. 1C). None of them was described to lead to transparent collagen materials, although thermotropic nematic liquid crystals tend to be relatively translucent (liquid-crystal displays).

The fact that the physical properties recorded on the transparent matrices remain similar whatever the source of collagen (the porcine clinical grade and the one extracted from rat tails tendons; *SI Appendix, Extended Supporting Methods*) ensured that the concentration protocols are 1) reproducible for generating the transparency and 2) that geometry, at a certain collagen concentration, is the key factor for the matrix transparency. Previous work in the literature described the formation of transparent but very thin collagen matrices (30, 31) for which the transparency appears stable at acidic pH (3.5) and is only related to a specific ionic strength, thus rendering comparison with our work difficult.

Further investigations of the collagen phase diagram were done handling the solutions with care. For this purpose, an acidic solution of collagen concentrated at 40 mg/mL was deposited between slide and coverslip and studied by polarized light microscopy, the concentration of collagen occurring at the air/solution interface through a slow evaporation of solvent. The evaporation of solvent being not homogeneous over the drop, the precise concentrations remain uncertain. Acidic collagen solutions with a 2-mm thickness are transparent under ~100 mg/mL (32). As expected, first a nematic phase is observed where the molecules orient themselves in the same direction (Fig. 1C, N). Second, when we slowly evaporate the collagen solution reaching 44 mg/mL, a faceted pattern starts to appear (Fig. 1D and *SI Appendix, Fig. S2*) with the presence of stripes in some domains (*SI Appendix, Fig. S2A and B*). The facets are polydisperse in size and organize mostly as a mosaic (*SI Appendix, Fig. S2C–C'*). Nevertheless, the bigger ones locally arrange in layers reminding the fibrillar collagen arrangement in mice corneal stroma (33) and coelacanth scales (14). The faceted organization of collagen molecules seems different from the “staggered dots” texture described previously in the literature for collagen since it was observed over the cholesteric phase (34) and not related to any optical property. Finally, controlling the sample thickness and the conditions of observations (temperature, humidity, and time under the microscope light) slowed down its systematic transformation into the most common precholesteric phase with a “banded” structure but did not avoid it (*SI Appendix, Fig. S2D*). Note that a color phase possessing a filament texture was sometimes observed (35) (*SI Appendix, Fig. S3A*), but only with the highly purified clinical-grade collagen (*SI Appendix, Fig. S3B*). The transition between the nematic and the precholesteric phases occurs around 46 to 47 mg/mL. The fact that the mosaic phase appears in a very narrow range of concentrations (~44 to 45 mg/mL) may explain why it was never identified before. Interestingly, after a 45° polarizer rotation, some vertical areas (Fig. 1D) remain gray, indicating a vanishing birefringence, while the intensities of areas within these lines are very sensitive to the cross-polarizer orientation. Note that with one polarizer blue and brownish colors were observed, remaining unchanged locally when the stage was rotated (*SI Appendix, Fig. S2B*). Such observations indicate a 3D orientational order that has been characterized in blue phases of chiral thermotropic liquid crystals (36) and shortened lyotropic doubled-strand DNA solutions (19). The size of the biomacromolecules (DNA and collagen) is noticeably much longer than the thermotropic molecules. Finally, the local arrangements of nonfluid analogs in annelid cuticle (37) and boxfish scutes (38) reports on the analogy between the 3D fibrils' order and a blue phase geometry, although the existence of an LC state is not demonstrated. The polarizing light microscopy images are not in agreement with these previously observed phases. Indeed, all these models exhibit a cubic symmetry and are thus incompatible with the experimental

observations of a preferential direction of low birefringence lines. A new model is consequently required. It should exhibit 1) 3D orientational order and 2) large oscillations (>40°) of the orientation of the birefringence director. Such a model is proposed in Fig. 1D (scheme) and is in agreement with all optical microscopy observations. This is an intermediate organization between the twisted nematic (39) and the helicoidal instability observed in the cholesteric phase (40). Interestingly, the molecular orientation is continuous at long range, and the 3D orientational order of collagen matrices recalls that of the structure in decalcified elephant ivory (15), although the scale is different. The organization here does not present any defects that are required between the double-twist cylinders in 3D-ordered chiral mesophases, ensuring the high optical transparency of the fibrillar matrix. Indeed, such defects in blue phases exhibit huge refractive index variation and are at the origin of light interferences (color) and scattering (turbidity).



**Fig. 2.** Ultrastructure investigations of optically transparent collagen-based materials by electron microscopies. (A) The collagen matrix (\*) and the cornea (\*) stored in Cornea Cold as classical storage medium. Both samples remain transparent when stored in the medium. (B) SEM and (C) TEM images of the biological cornea (\*) and the synthetic transparent collagen matrix (\*). (Scale bars, 1  $\mu\text{m}$  [B] and 500 nm [C].) Insets in C are observations at higher magnification. (Scale bars, 50 nm.) The fibrils lay parallel (white line) or perpendicular (white dot) to the section cut. (D) Thick 3D fibrillar collagen matrix (1 cm in diameter) with a narrow gradient of concentration prepared by using the injection/reverse dialysis process to reach a final concentration around 45 mg/mL over the bulk. An optical gradient of transparency is observed going from opalescent (higher concentration) to transparent (lower concentration) from the curve side but is entirely transparent when observed from the flat end (*Inset*). (E and F) TEM images of the opalescent collagen matrix showing orthogonal arrangements of the fibrils reminding that of the corneal stroma.

To improve our understanding of the origin of transparency in collagen structures, observations were performed on pig corneas without polarization (SI Appendix, Fig. S4A). Corneal birefringence is known and varies within a single cornea. Birefringent domains are observed under physical constraints (SI Appendix, Fig. S4B) which at higher magnification appear as a layered texture (SI Appendix, Fig. S4C), in agreement with the birefringence texture in mice corneal stroma (33).

In summary, as previously described for transparent collagen matrices of elephant ivory (15), collagen appears to form a precholesteric phase which presents a 3D orientational order. This phase can be interpreted as a subtle equilibrium between double-twist trend for the radial structure of collagen fibrils (41) with only bending deformation, and a helical deformation with a splay deformation. However, due to the lack of crystallographic evidence and physical properties, we will refer to it as precholesteric\* phase, P\*.

To help identify the physicochemical factors for the origins of the transparency, structural, optical, and mechanical characterization are required.

### Ultrastructure of Transparent Collagen Matrices and Analogy with Cornea

Before sample preparation for electron microscopy observations, the synthetic and the biological materials were stored in a classical storage medium for cornea (i.e., Cornea Cold; SI Appendix, Extended Supporting Methods). Both were stable and remain transparent in the medium (Fig. 2A). This step allows a safe comparison of the materials in discarding any potential effect that would have been induced by different ionic forces, pH, and so on on the observed ultrastructure.

Scanning electron microscopy (SEM) observations were performed on a pig cornea (Fig. 2B, °) and compared to a transparent collagen matrix (~45 mg/mL) (Fig. 2B, \*). Both exhibit dense network with thin collagen fibrils ( $\leq 100$  nm). Transmission electron microscopy (TEM) investigations confirm the high similarity in appearance between the two samples (Fig. 2C). Higher magnification (Fig. 2C, Inset) shows that fibrils are monodisperse in diameter, which is a main characteristic of biological tissues. The diameter is ~25 to 30 nm and classical for corneal tissue (42). The extrafibrillar space also appears in the same range of order ( $\leq 100$  nm) with an average interfibrillar spacing of ~45 nm in both samples. It is worth mentioning that the formation of biomimetic self-assembled gel needs both an attractive force to gather together the collagen molecules into fibrils and a repulsive force to freeze the fibrils into liquid crystalline order. The balance between the two forces prevents the fibrils from agglomeration, allowing the formation of tissue-like matrices (43). The lack of the other organic constituents (mainly proteoglycans) present in the corneal extracellular matrix may be the reason for the difference in aspects of the collagen. Collagen fibrils appear mostly aligned parallel (line) or perpendicular (dot) to the section plane, recalling previous observations performed with clustered DNA bundles (19), although a periodic pattern is difficult to draw (SI Appendix, Fig. S5). This is in fact also the case for cornea when the section plane is not perfectly performed perpendicular (SI Appendix, Fig. S6A) avoiding the observation of the organized orthogonal plywood (SI Appendix, Fig. S6B). This is quite intriguing since transparency of cornea is usually related to the arrangement of fibrils in a lattice with a high degree of order (6–8). Although short-range order is certainly a key ingredient for transparency, the microstructure of cornea on a large scale appears to be more complex.

To improve our understanding of the correlation between the microstructure of the collagen material and its transparency, further investigations were performed on a material larger in size (cylinder  $\sim 0.5 \times 1$  cm<sup>2</sup>) with a final concentration of ~45 mg/mL. Although the material is indeed transparent from the flat end (Fig. 2D, Inset), a gradient of transparency forms going from opalescent to completely transparent when observed from the curve

side as depicted in Fig. 2D. This indicates a slight difference in concentration in the collagen material ( $\Delta C \leq 1$ ). The ultrastructure was investigated by TEM, revealing two other orthogonal arrangements of fibrils in the opalescent domain (Fig. 2E and F). Their spatial distribution appears heterogeneous over the domain but we cannot exclude that there is in fact a link between their position and a specific concentration. Both domains are denser in collagen fibrils.

One presents two types of bundles of fibrils (Fig. 2E), each showing a constant orientation, but abrupt angular changes at the transition from one bundle to the next one. Interestingly, this arrangement recalls that of fish scutes (SI Appendix, Fig. S7A) where an analogy with a blue phase geometry is made (14, 38). This original architecture can also be compared to the arrangement found in decalcified ivory of elephant (15, 44). Noticeably, the 3D helical arrangement is observed at higher scale but remains optically transparent (SI Appendix, Fig. S7B).

The other domain presents two types of layers of fibrils. Each layer shows a constant orientation. As for the two other domains, the collagen fibrils are observed either in cross-section or in longitudinal section being systematically at approximate right angles to the surrounding layers. Thus the synthetic opalescent domain exhibits high similarities in terms of structure (i.e., local orthogonal plywood of lamellae) and size (i.e., fibril diameter, intermolecular packing [SI Appendix, Fig. S8], and thickness of layers) (45) with the corneal stroma (SI Appendix, Fig. S6B). Although the orientation of the collagen fibrils in longitudinal section is perpendicular to the usual but very local observations found in the literature as discussed above, it is also found in cornea (SI Appendix, Fig. S6A, rectangle).

In summary, three domains exhibit very thin and regular fibril diameter with orthogonal arrangements (from single fibril to layers or bundles of fibrils). The domains coexist in the gap of transparency in the fibrillar collagen diagram. According to this noticeable difference in the domains' size, it may be proposed that the ratio between the unit (whatever its nature, e.g., collagen fibril or empty tubule) and an associate orthogonal arrangement is the key for building transparent materials. To go further on the understanding of the structural–property relationship, the intrinsic degree of transparency (scattering mean free path) was investigated on materials evolving from transparent to opaque and compared to the cornea biological tissue. In addition, mechanical investigations were performed to help identify the physicochemical parameters involved in the formation of such optical properties.

### Correlation Between Microstructure and Optical and Mechanical Properties

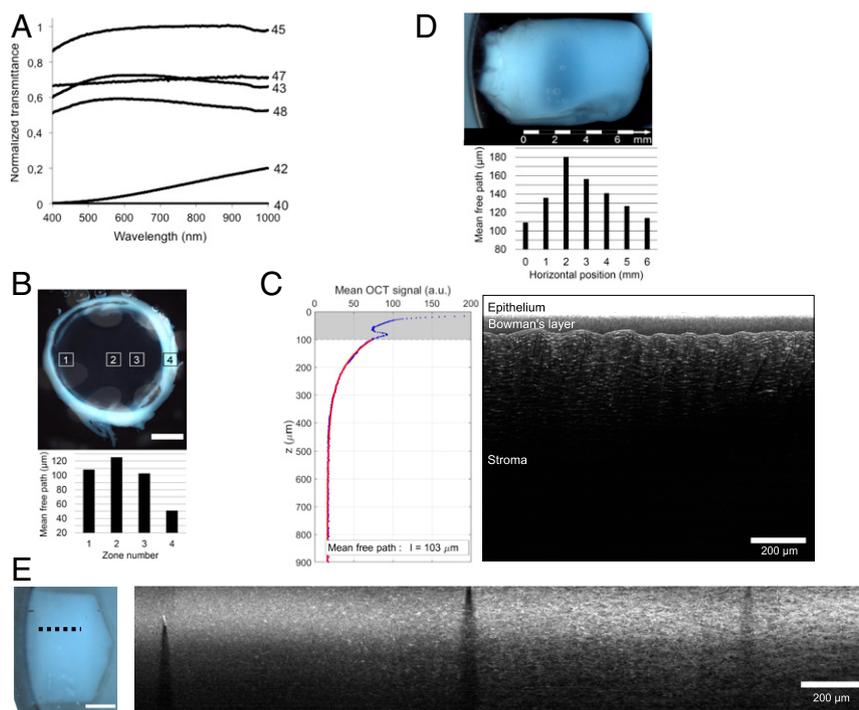
A set of homogeneous matrices with a thickness of ~2 mm was prepared using the slow evaporation process described above (SI Appendix, Extended Supporting Methods), with concentrations ~40, ~42, ~43.5, ~45, ~47, and ~48 mg/mL, covering a narrow range around the critical concentration 45 mg/mL. Transmittance spectra of hydrated fibrillar collagen matrices recorded in the visible and near-ultraviolet, and normalized by the transmittance of the more transparent sample (SI Appendix, Extended Supporting Methods), are shown in Fig. 3A. Increased transmittance of the ~45 mg/mL matrix is observed over the full wavelength range, which provides qualitative support to the change in transparency. For a quantitative assessment of the degree of transparency, we measured the scattering mean free path  $\ell$  using full-field optical coherence tomography (OCT) (46) (Fig. 3B–E). The spatially averaged OCT signal decays exponentially with depth within the material, with a characteristic decay length  $\ell$ , thus providing a direct measurement of this intrinsic parameter in scattering materials (SI Appendix, Extended Supporting Methods). First, measurements were performed on an ex vivo pig cornea (Fig. 3B). A typical in-depth OCT cross-section (Fig. 3C) clearly shows the decreasing OCT signal from which the value of  $\ell$  is extracted.

Measurements in four different zones (indicated as square regions in Fig. 3B) are presented in a bar graph, showing an increased transparency in the center, consistent with the visual appearance of the cornea. Second, investigations were conducted on the matrix made with the broad gradient in collagen concentration as shown in Fig. 1A (Fig. 3D and E). The scattering mean free path  $\ell$  was measured in seven different zones, with decreasing concentration in collagen, resulting in the bar graph in Fig. 3D. Substantial changes, by almost a factor of 2, are observed along the collagen concentration gradient, and thus by moving through different fibrillar microstructures. Larger values of  $\ell$  at the center indicate an increase in transparency, in agreement with visual appearance and the transmittance curves. This substantial change in  $\ell$  is a signature of the crucial role of partial short-range order in disordered scattering materials. Indeed, it is known that variations of partial order in the fibrils positions can lead to smaller or larger values of  $\ell$  (47, 48), up to transparency (49). Interestingly, the value  $\ell = 125.4 \mu\text{m}$  found in the center of the pig cornea (Fig. 3B) is on the order of the values  $\ell \sim 120$  to  $140 \mu\text{m}$  measured at the edges of the transparency gap of the gradient matrix (zones 1 and 4 in Fig. 3D). This correspondence is supported qualitatively by the in-depth OCT cross-section images (Fig. 3E) of the 3D synthetic bulk ( $\sim 45 \text{ mg/mL}$ ; Fig. 2D). Indeed, we observe that the collagen fibrils are parallel and superimposed in the opalescent part (corresponding to the edge of the transparency gap), recalling the structure of the corneal stroma (Fig. 3C). This strengthens the hypothesis that increased partial order at a concentration  $45 \pm$

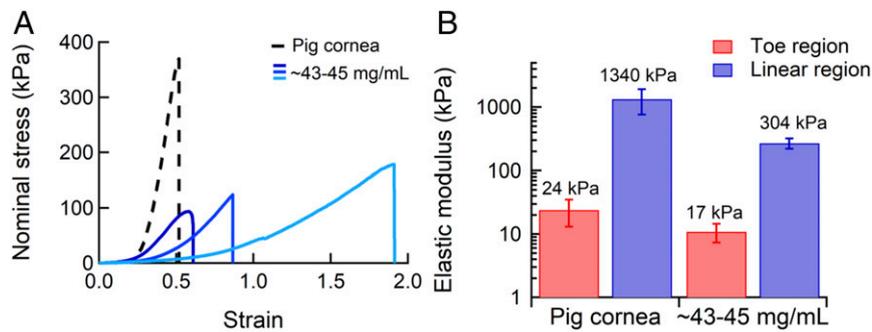
$1 \text{ mg/mL}$  is responsible for enhanced transparency. This also suggests that the structure of cornea may not correspond to the maximum of transparency, presumably since other properties (e.g., mechanical) also need to be optimized.

Based on the evidence of the crucial role of the ultrastructure on the optical properties, the mechanical properties of the collagen matrices were also investigated. The transparent matrix at  $\sim 45 \text{ mg/mL}$  is tough and easy to handle (Movie S1). It remains transparent upon mechanical handling and shearing, suggesting that fibrillar rearrangements do not operate at the scale of visible wavelengths (from  $\sim 100 \text{ nm}$  to a few micrometers). However, gel stability is very sensitive to slight differences in concentration (SI Appendix, Fig. S9). This suggests that the assumed improvement of mechanical properties of collagen fibrillar matrices with concentration described in the literature (30, 50) does not necessarily apply around the concentration leading to transparency.

More quantitative assessment of the mechanical response of optically transparent materials with concentrations in the range  $\sim 43$  to  $45 \text{ mg/mL}$  was obtained at large strains in tension and compared to freshly extracted cornea. The general mechanical response of the matrices exhibits biomimetic mechanical behavior. Tensile behavior of the fibrillar matrices is strongly nonlinear (Fig. 4), with extreme compliance at the lower stretches and hardening at intermediate strains, as expected for biological tissues (51–53) and more especially for cornea (54). From this “J-shaped” mechanical response, elastic moduli were defined in the toe and linear region, respectively.



**Fig. 3.** Transparency of a freshly extracted pig cornea and of collagen matrices investigated by transmittance (A) and full-field OCT (B–E). (A) Transmittance spectra of collagen matrices for visible and near-infrared wavelengths are provided for concentrations ranging from 40 to 48 mg/mL. (B) Pig cornea over the black background of the sample holder (Top), and bar graph of the measured values of the scattering mean free path  $\ell$  (Bottom) in four  $1.3 \times 1.3\text{-mm}^2$  zones in the stroma (zones 1 through 3) and in the sclera (zone 4). Larger values of  $\ell$  correspond to an increase in transparency. (C) In-depth OCT cross-section image in zone 3 (Right) from which  $\ell$  is extracted by fitting the average OCT signal versus the depth  $z$  (Left, blue dots) with an exponential decay  $\exp(-z/\ell)$  (Left, red curve; values in the gray zone are discarded in the fitting procedure). (D) Collagen matrix (characterized by a gradient in concentration [20 to 50 to 100 mg/mL range; see Fig 1A]) over the black background of the sample holder (Top), and measured values of  $\ell$  (Bottom) in seven  $100 \times 100\text{-}\mu\text{m}^2$  zones, evenly spaced along a horizontal line, parallel to the collagen concentration gradient in the matrix. The general shape of the bar graph and the maximum value of  $\ell$  measured in the third zone are consistent with the visual observation of maximum transparency in the center of the matrix. (E) Collagen matrix (with a narrow gradient of concentration around 45 mg/mL over the 1-cm bulk; see Fig. 2D) over the white background of the sample holder (Left), and in-depth OCT cross-section image (Right) along the collagen concentration gradient (black dashed line in E, Right). The change in the structural appearance of the matrix is clearly visible (from left to right in the OCT cross-section), with an increasing textured aspect.



**Fig. 4.** Mechanical behavior (tension mode) of transparent collagen matrices and of freshly extracted pig cornea. (A) The three fibrillar collagen gels prepared by injection/reverse dialysis approach at concentrations in the range ~43 to ~45 mg/mL exhibit a “J-shaped” stress–strain response, as observed for biological tissues. As a guideline, the mechanical response of the pig cornea is given. No preconditioning was applied, that is, curves correspond to the first loading. Note that the maximal stress value before rupture, usually defined as the ultimate tensile strength (UTS), is only indicative since gel (as cornea) failure systematically occurred in the clamps, suggesting that clamps involve local premature damage. (B) Modulus increasing with extension, elastic moduli are given in the toe and linear region, respectively. Gel rigidities display moduli of same order of magnitude.

Performing such large strain characterizations on hydrated materials is delicate due to their intrinsic softness and wetness that necessitate preventing any slippage in the jaws and drying during the tests (55). Besides, their potential drying can induce a collapse of the fibrillar collagen network, dramatically enhancing the stiffness (56). The elastic moduli in the linear region of the transparent collagen matrices in the range ~43 to 45 mg/mL ( $304 \pm 50$  kPa) are consistent with the higher values found in the literature after the critical concentration threshold for anisotropic fibrillar arrangement (50, 57). However, the stiffness of the transparent matrices in the linear regime is about fourfold lower than that of the pig cornea ( $1,340 \pm 580$  kPa) (30). These differences can be explained by the presence of components in the cornea that play an important role in ensuring the mechanical performance (56). The presence of a “nonfibrillar organic matrix” (including proteoglycan), which resists the separation of the fibrils during shearing, was reported in bone tissue (58) and may exist for the synthetic collagen matrix made of residual components not extracted from the purification step (*SI Appendix, Fig. S3B*) and/or collagen molecules that did not precipitate. Furthermore, our process does not enable a precise spatial control of the anisotropy in 3D at the microscale, which increases the variability of the mechanical behavior even in a narrow concentration range. Note that ultimate stages of the stress-strain curves were truncated when macroscopic damage (crack) appeared in the sample. Ultimate tensile stresses and strains at break were not investigated, as failure systematically occurred in the clamps. It is worth mentioning that a pretreatment of collagen-based materials is quite systematically used in the literature to reinforce their mechanical properties by means of reticulant agents (59, 60).

In conclusion, we have demonstrated the existence of a gap of transparency in synthetic collagen matrices, around a critical collagen concentration of 45 mg/mL. Transparency is observed for a narrow range of concentrations, below a few milligrams per milliliter, that corresponds to a specific precholesteric phase in the molecular collagen diagram. This phase presents a 3D orientational order without collagen director linear singularity such

as disclination. The intimate connection between the degree of optical transparency and the microstructure has been addressed quantitatively. Transparency emerges from structural correlations in the fibrillar collagen network that inhibit light scattering and coexists with a biomimetic mechanical response. The possibility to produce hydrogels by biopolymer self-assembly with such striking optical properties opens a very interesting route in the study of photonic materials. The synthetic collagen matrix also bears deep resemblance to natural corneal stroma, in terms of microstructure and macroscopic optical and mechanical properties. This strengthens the hypothesis of the existence of biological LC analogs to form 3D tissue architectures with specific emerging properties.

## Methods

Full details of sample preparation and characterization techniques (polarized light microscopy, SEM, TEM, small-angle X-ray scattering, transmittance, full-field OCT, and tensile testing) are presented in *SI Appendix, Extended Supporting Methods*. This includes the collagen and cornea sources, the collagen gradient matrices synthesis (evaporation procedure and injection/reverse dialysis), and the collagen matrices storage and stability. Briefly, two sources of type I collagen were used either extracted from rat tail tendons or purchased from Syntese. The synthesis of collagen gradient matrices was performed by either slow evaporation under a laminar flow hood or by injection/reverse dialysis.

**Data Availability.** The data supporting the findings of this study are available within the paper and *SI Appendix*.

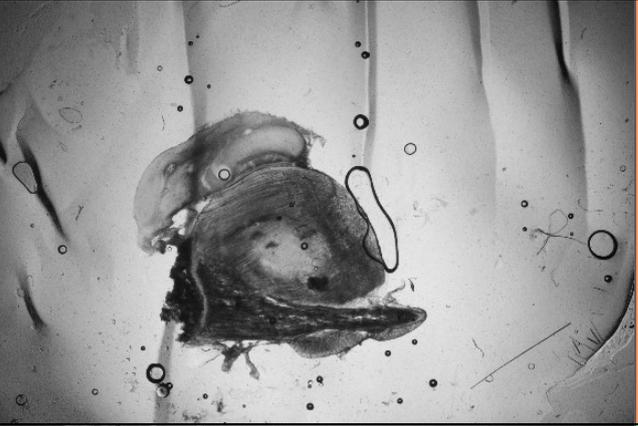
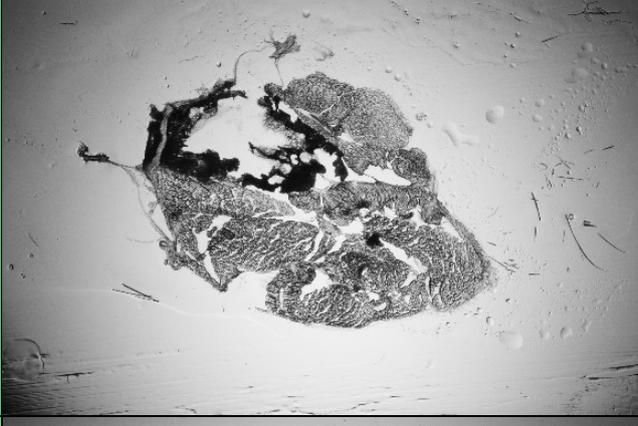
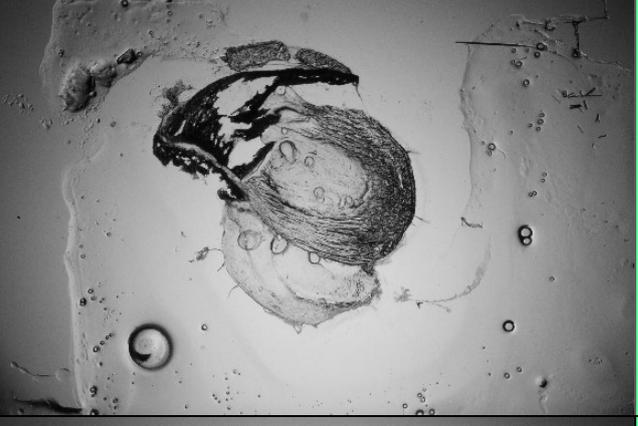
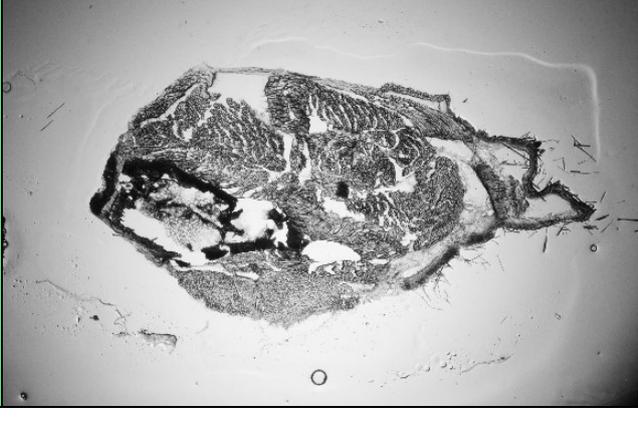
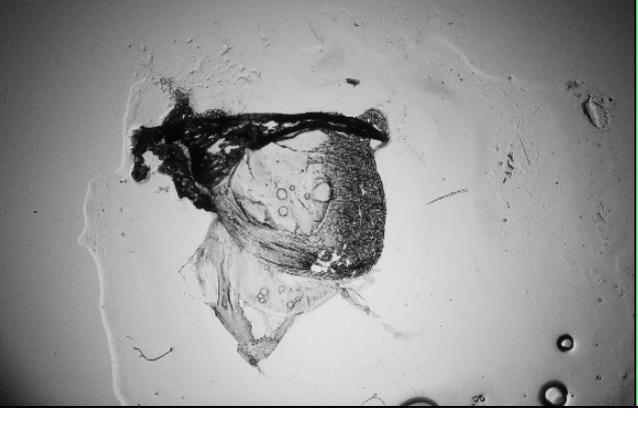
**ACKNOWLEDGMENTS.** N.N. thanks the Fondation Collège de France and Fondation Electricité de France for financial support, especially Marie Cheron for sharing opinions and her trust, Jean-Baptiste Hennequin (Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris [ESPCI Paris]) for the spark that led to the collaboration of the coauthors, and Niki Baccile (Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris [LCMCP]) for fruitful discussion about small-angle X-ray scattering data. We thank Josette Legagneux (Institut de Chirurgie, Paris) for providing pig cornea; Christophe Helary (LCMCP) for help with electrophoresis; and Bernard Haye (LCMCP) for preparation of some TEM samples.

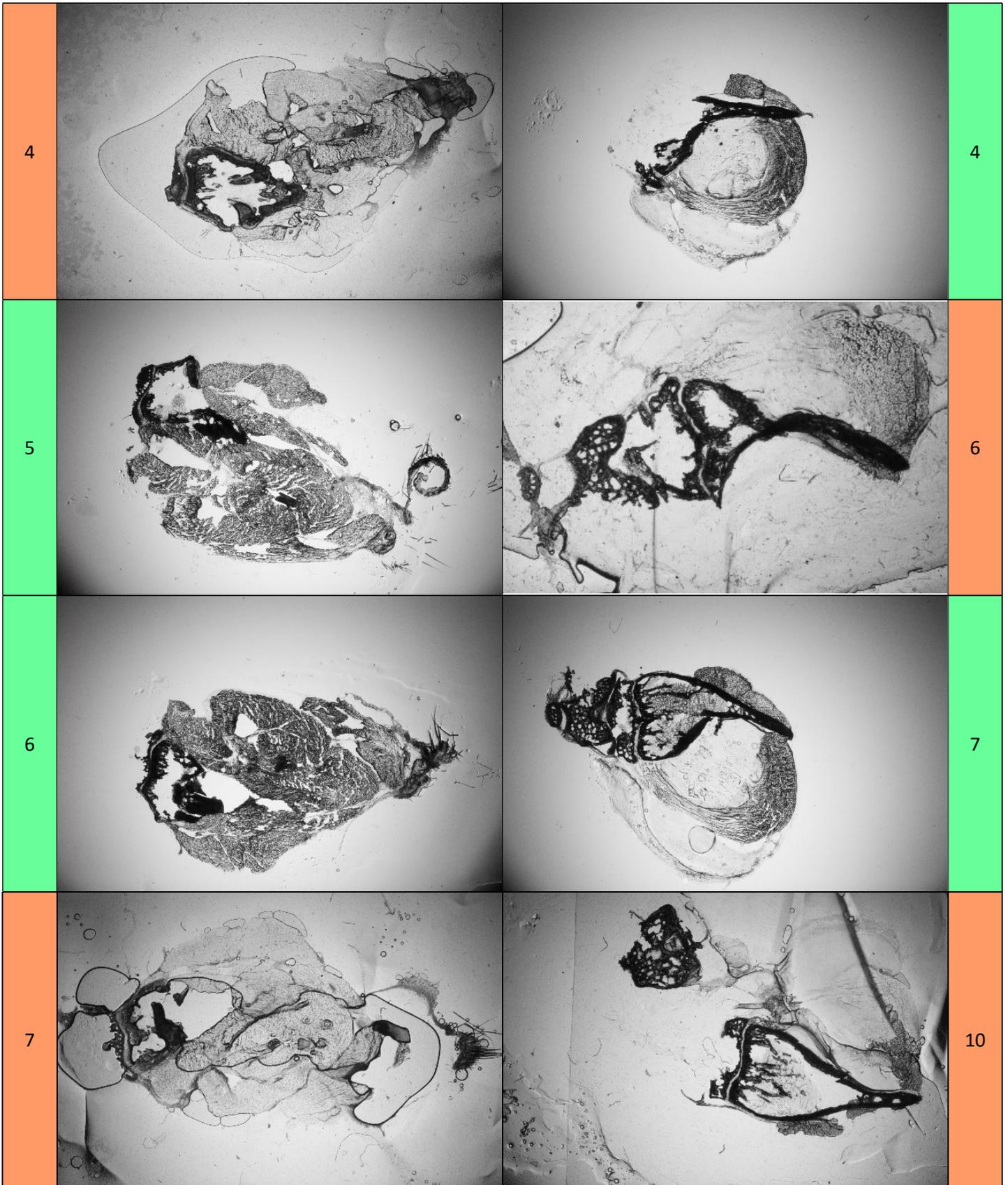
1. W. C. Kerfoot, A question of taste: Crypsis and warning coloration in freshwater zooplankton communities. *Ecology* **63**, 538–554 (1982).
2. J. R. M. Langsdale, Developmental changes in the opacity of larval herring, *Clupea harengus*, and their implications for vulnerability to predation. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **73**, 225–232 (1993).
3. A. Tsuda, S. Hiroaki, T. Hirose, Effect of gut content on the vulnerability of copepods to visual predation. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1944–1947 (1998).
4. K. M. Meek, C. Knupp, Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* **49**, 1–16 (2015).
5. M. Kreysing, L. Boyde, J. Guck, K. J. Chalut, Physical insight into light scattering by photoreceptor cell nuclei. *Opt. Lett.* **35**, 2639–2641 (2010).
6. D. M. Maurice, The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.* **136**, 263–286 (1957).
7. R. W. Hart, R. A. Farrell, Light scattering in the cornea. *J. Opt. Soc. Am.* **59**, 766–774 (1969).
8. G. B. Benedek, Theory of transparency of the eye. *Appl. Opt.* **10**, 459–473 (1971).
9. T. J. Freegard, The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond.)* **11**, 465–471 (1997).
10. D. J. Prockop, What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol.* **16**, 519–528 (1998).
11. M.-M. Giraud-guille, Cholesteric twist of collagen in vivo and in vitro. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Incorpor. Nonlin. Optics* **153**, 15–30 (1987).

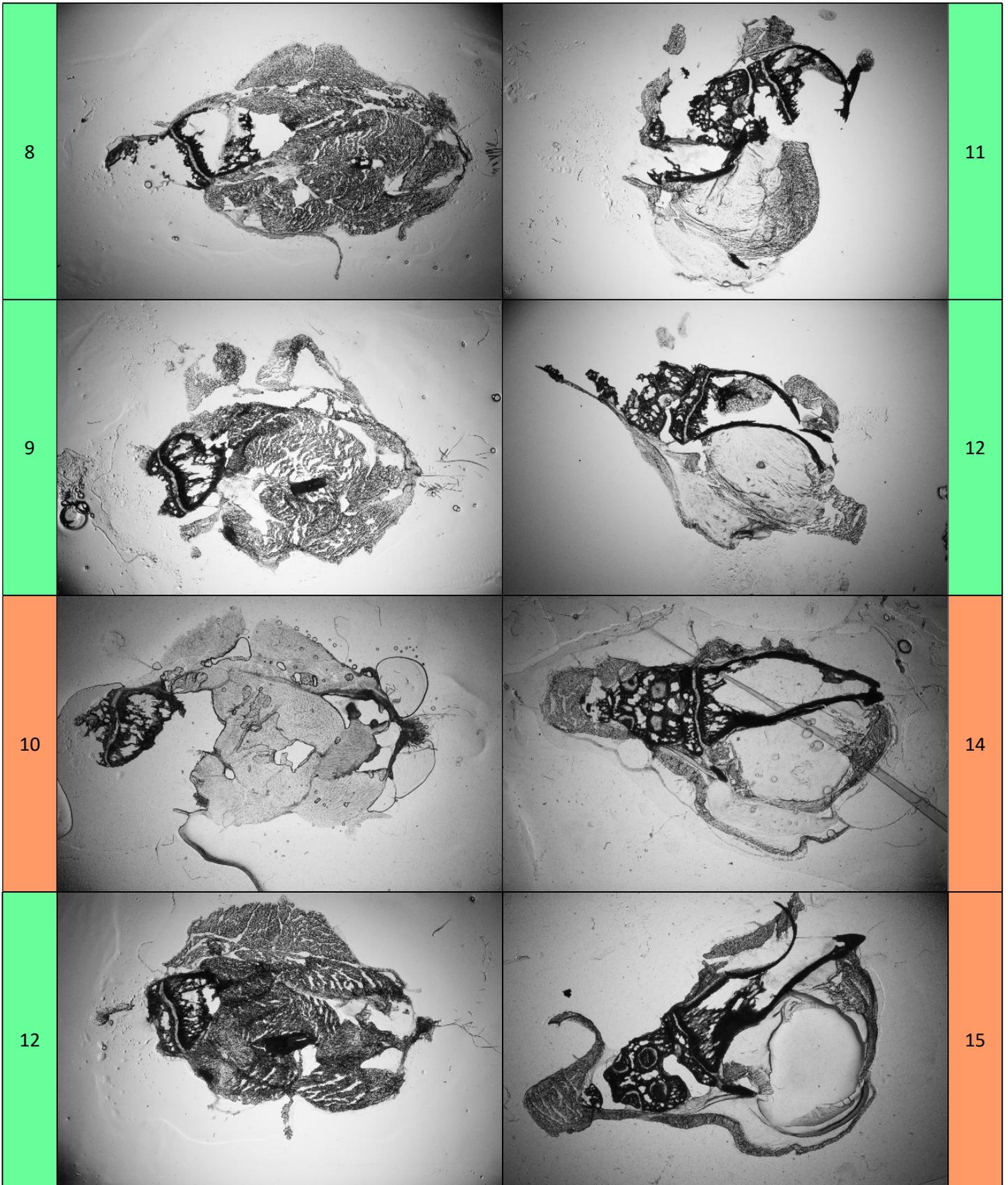
12. S. Weiner, W. Traub, H. D. Wagner, Lamellar bone: Structure-function relations. *J. Struct. Biol.* **126**, 241–255 (1999).
13. M. Mitov, Cholesteric liquid crystals in living matter. *Soft Matter* **13**, 4176–4209 (2017).
14. M. M. Giraud, J. Castanet, F. J. Meunier, Y. Bouligand, The fibrous structure of coe-lacanth scales: A twisted “plywood”. *Tissue Cell* **10**, 671–686 (1978).
15. M. Albéric, A. Gourrier, W. Wagermaier, P. Fratzl, I. Reiche, The three-dimensional arrangement of the mineralized collagen fibers in elephant ivory and its relation to mechanical and optical properties. *Acta Biomater.* **72**, 342–351 (2018).
16. A. Velasco-Hogan *et al.*, On the nature of the transparent teeth of the deep-sea dragonfish, *Aristostomias scintillans*. *Matter* **1**, 235–249 (2019).
17. A. Tidu *et al.*, Highly concentrated collagen solutions leading to transparent scaffolds of controlled three-dimensional organizations for corneal epithelial cell colonization. *Biomater. Sci.* **6**, 1492–1502 (2018).
18. F. Livolant, Precholesteric liquid crystalline states of DNA. *J. Phys. France* **48**, 1051–1066 (1987).
19. A. Leforstier, F. Livolant, DNA liquid crystalline blue phases. Electron microscopy evidence and biological implications. *Liq. Cryst.* **17**, 651–658 (1994).
20. Y. Bouligand, Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell* **4**, 189–217 (1972).
21. K. M. Meek, Corneal collagen-its role in maintaining corneal shape and transparency. *Biophys. Rev.* **1**, 83–93 (2009).
22. R. L. Trelstad, A. J. Coulombre, Morphogenesis of the collagenous stroma in the chick cornea. *J. Cell Biol.* **50**, 840–858 (1971).
23. V. M. Borderie *et al.*, Banding patterns: Exploring a new feature in corneal stroma organization. *ARVO Annu. Meet.* **58**, 3906 (2017).
24. Y. Wang *et al.*, Controlled collagen assembly to build dense tissue-like materials for tissue engineering. *Soft Matter* **7**, 9659–9664 (2011).
25. Y. Wang *et al.*, The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat. Mater.* **11**, 724–733 (2012).
26. L. Bessea, B. Coulomb, C. Lebreton-Decoster, M.-M. Giraud-Guille, Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* **23**, 27–36 (2002).
27. M.-M. Giraud-Guille, Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions. A clue to the packing of collagen in extracellular matrices. *J. Mol. Biol.* **224**, 861–873 (1992).
28. C. Helary, A. Foucault-Bertaud, G. Godeau, B. Coulomb, M. M. G. Guille, Fibroblast populated dense collagen matrices: Cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials* **26**, 1533–1543 (2005).
29. F. Gobeaux *et al.*, Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state. *Langmuir* **23**, 6411–6417 (2007).
30. A. Tidu *et al.*, Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater.* **22**, 50–58 (2015).
31. P. D. S. Peixoto *et al.*, Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: Clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter* **9**, 11241–11248 (2013).
32. F. Gobeaux *et al.*, Fibrillogenesis in dense collagen solutions: A physicochemical study. *J. Mol. Biol.* **376**, 1509–1522 (2008).
33. M. Aldrovani, A. M. A. Guaraldo, B. C. Vidal, Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice. *Vision Res.* **47**, 3229–3237 (2007).
34. P. D. S. Peixoto, A. Deniset-Besseau, M.-C. Schanne-Klein, G. Mosser, Quantitative assessment of collagen I liquid crystal organizations: Role of ionic force and acidic solvent, and evidence of new phases. *Soft Matter* **7**, 11203–11210 (2011).
35. I. Dierking, Chiral liquid crystals: Structures, phases, effects. *Symmetry* **6**, 444–472 (2014).
36. C. Bahr, H.-S. Kitzerow, *Chirality in Liquid Crystals*, (Springer, 2001).
37. L. Lepescheux, Spatial organization of collagen in annelid cuticle: Order and defects. *Biol. Cell* **62**, 17–31 (1988).
38. L. Besseau, Y. Bouligand, The twisted collagen network of the box-fish scutes. *Tissue Cell* **30**, 251–260 (1998).
39. V. Borshch *et al.*, Nematic twist-bend phase with nanoscale modulation of molecular orientation. *Nat. Commun.* **4**, 2635 (2013).
40. F. Lequeux, M. Kléman, Helicoidal instability in cholesteric capillary tubes. *J. Phys. France* **49**, 845–855 (1988).
41. A. I. Brown, L. Kreplak, A. D. Rutenberg, An equilibrium double-twist model for the radial structure of collagen fibrils. *Soft Matter* **10**, 8500–8511 (2014).
42. Y. Komai, T. Ushiki, The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 2244–2258 (1991).
43. M. M. Giraud-Guille, G. Mosser, E. Belamie, Liquid crystallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13**, 303–313 (2008).
44. M. Albéric *et al.*, Relation between the macroscopic pattern of elephant ivory and its three-dimensional micro-tubular network. *PLoS One* **12**, e0166671 (2017).
45. T. Sibillano *et al.*, Interfibrillar packing of bovine cornea by table-top and synchrotron scanning SAXS microscopy. *J. Appl. Cryst.* **49**, 1231–1239 (2016).
46. L. Vabre, A. Dubois, A. C. Boccara, Thermal-light full-field optical coherence tomography. *Opt. Lett.* **27**, 530–532 (2002).
47. L. F. Rojas-Ochoa, J. M. Mendez-Alcaraz, J. J. Sáenz, P. Schurtenberger, F. Scheffold, Photonic properties of strongly correlated colloidal liquids. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 73903 (2004).
48. K. Vynck, M. Burreli, F. Riboli, D. S. Wiersma, Photon management in two-dimensional disordered media. *Nat. Mater.* **11**, 1017–1022 (2012).
49. O. Leseur, R. Pierrat, R. Carminati, High-density hyperuniform materials can be transparent. *Optica* **3**, 763–767 (2016).
50. S. Ramtani, Y. Takahashi-Iniguez, C. Helary, D. Geiger, M. M. G. Guille, Mechanical behavior under unconfined compression loadings of dense fibrillar collagen matrices mimetic of living tissues. *J. Mech. Med. Biol.* **10**, 35–55 (2010).
51. Y. C. Fung, Elasticity of soft tissues in simple elongation. *Am. J. Physiol.* **213**, 1532–1544 (1967).
52. J. D. Humphrey, Continuum biomechanics of soft biological tissues. *Proc. R. Soc. London. Ser. A* **459**, 3–46 (2003).
53. S. Rose *et al.*, Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature* **505**, 382–385 (2014).
54. S. Kling, F. Hafezi, Corneal biomechanics A review. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **37**, 240–252 (2017).
55. S. Rose, A. Dizeux, T. Narita, D. Hourdet, A. Marcellan, Time dependence of dissipative and recovery processes in nanohybrid hydrogels. *Macromolecules* **46**, 4095–4104 (2013).
56. D. A. Hoeltzel, P. Altman, K. Buzard, K. Choe, Strip extensometry for comparison of the mechanical response of bovine, rabbit, and human corneas. *J. Biomech. Eng.* **114**, 202–215 (1992).
57. N. Nassif *et al.*, Self-assembled collagen–apatite matrix with bone-like hierarchy. *Chem. Mater.* **22**, 3307–3309 (2010).
58. G. E. Fantner *et al.*, Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat. Mater.* **4**, 612–616 (2005).
59. E. Khor, Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials* **18**, 95–105 (1997).
60. M. E. Nimni, Glutaraldehyde fixation revisited. *J. Long Term Eff. Med. Implants* **11**, 151–161 (2001).

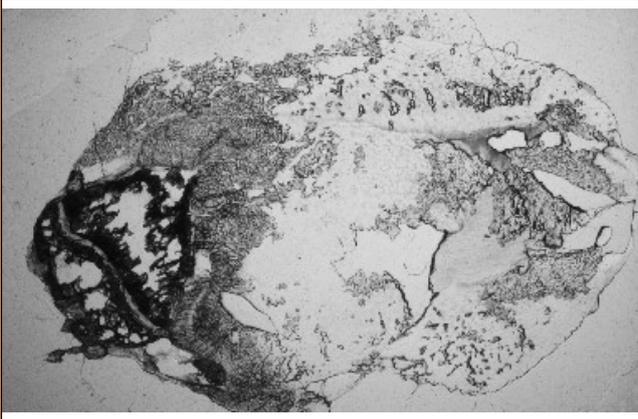
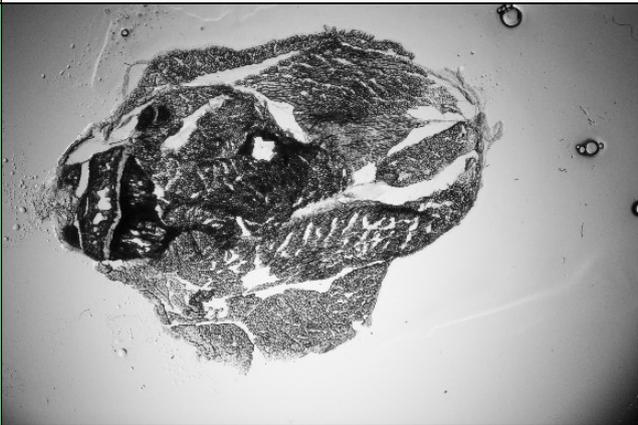
## ANNEXE 2 : ECHANTILLONS

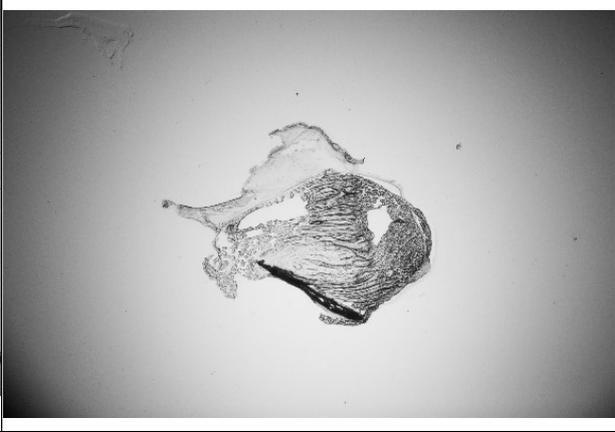
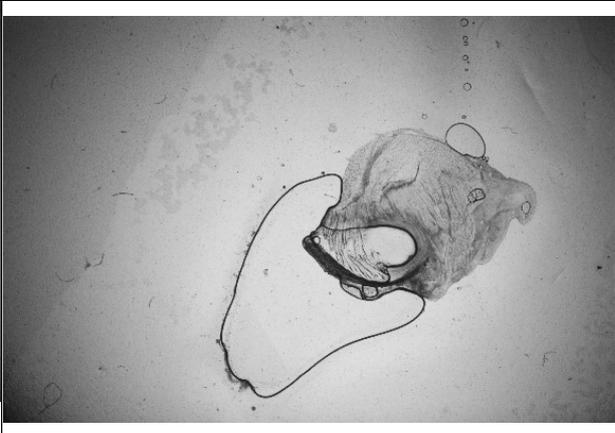
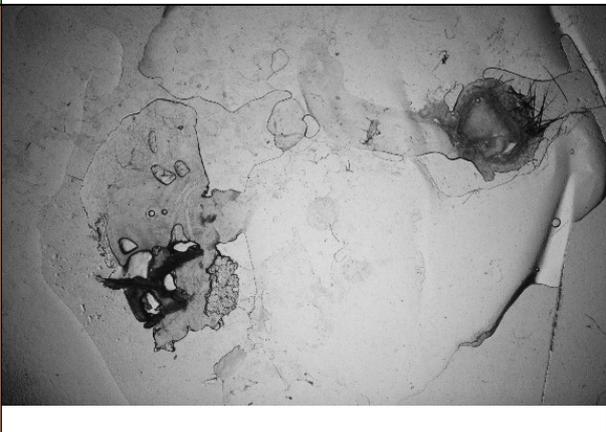
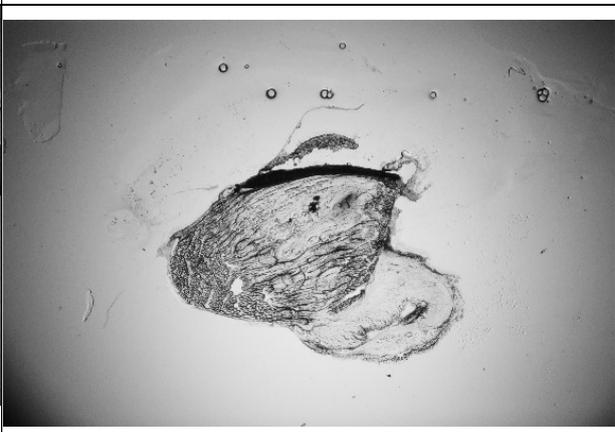
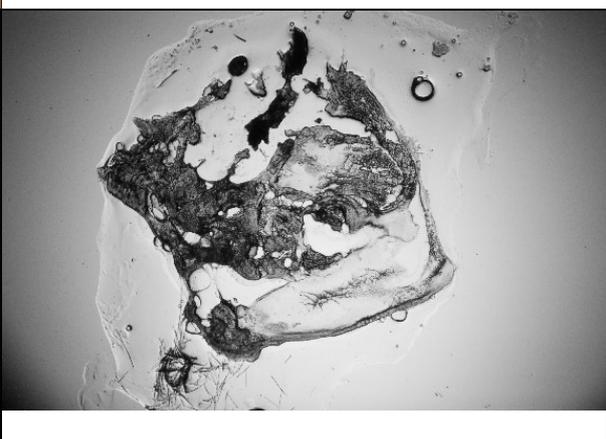
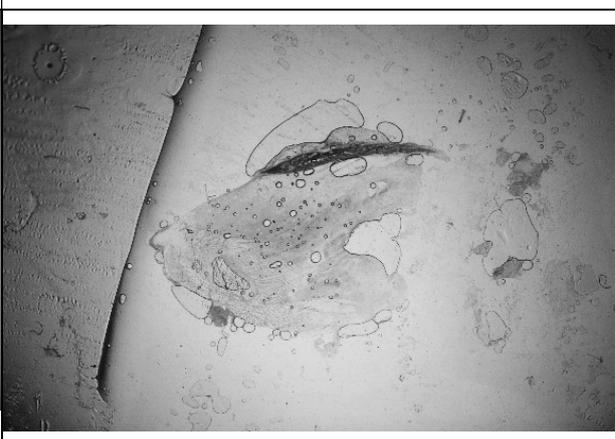
Support verre	Support nalophane RX
---------------	----------------------

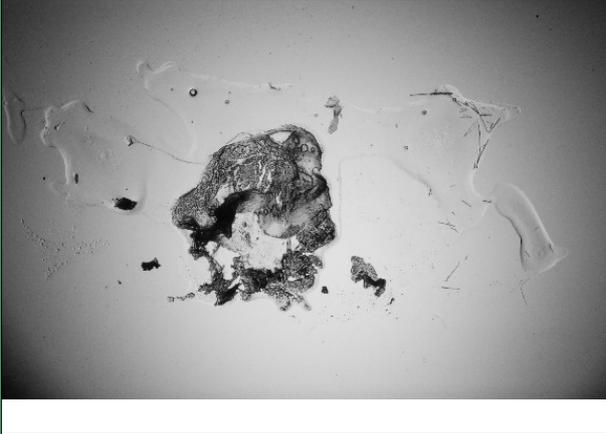
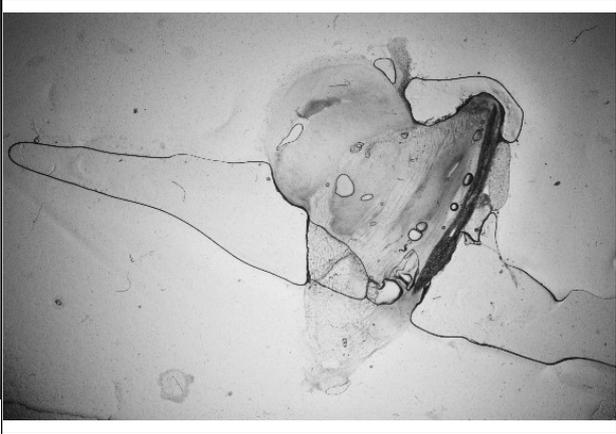
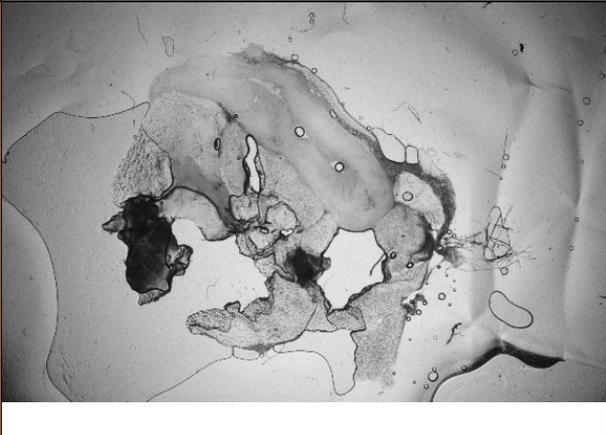
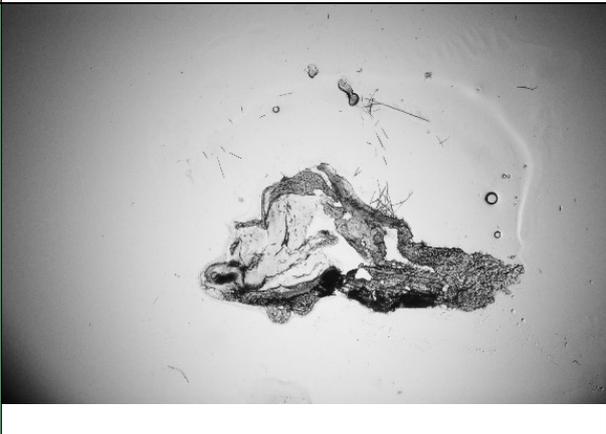
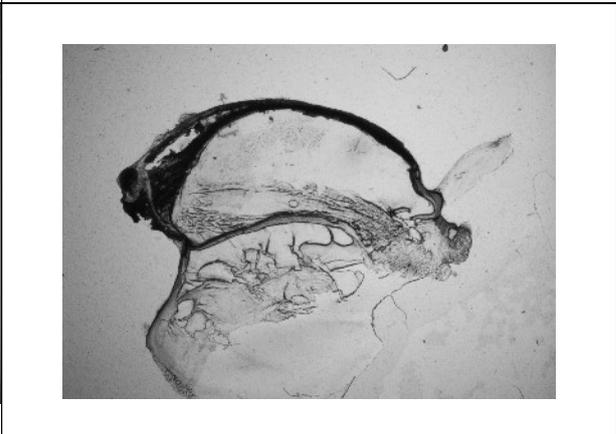
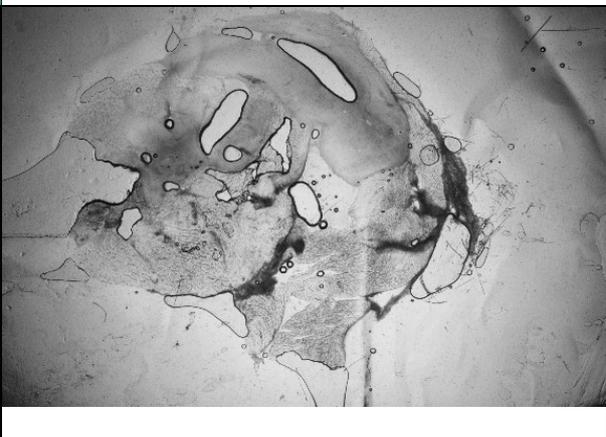
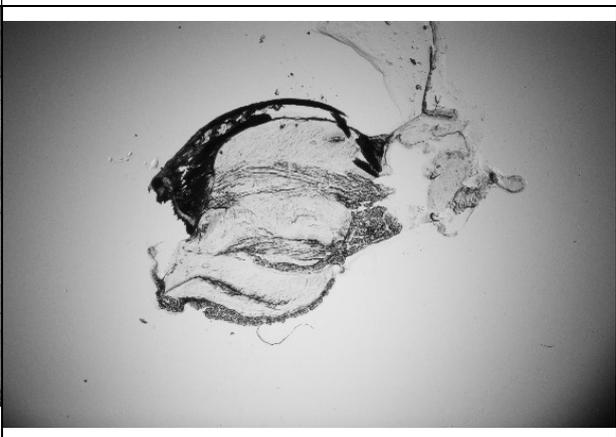
N° coupe	J+13 Con Echantillon 696 Droite	J+13 Sarc Echantillon 696 Gauche	N° coupe
1			1
2			2
3			3

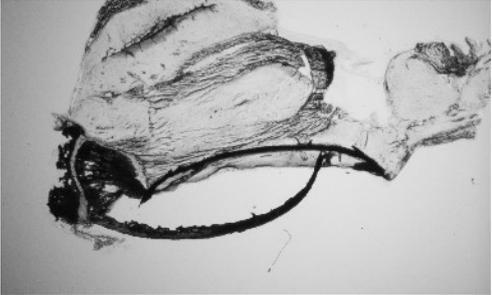
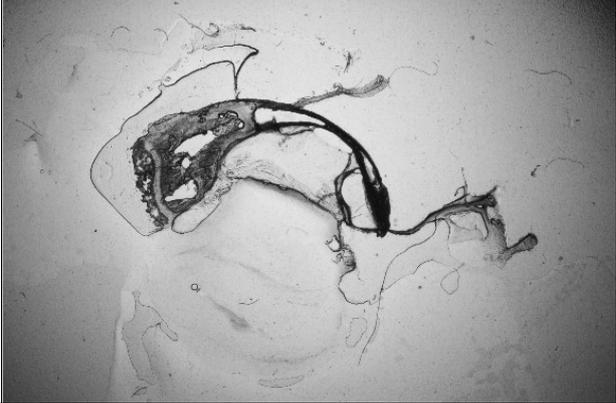
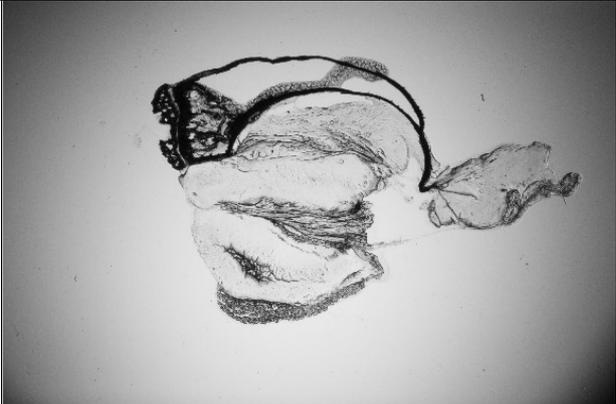
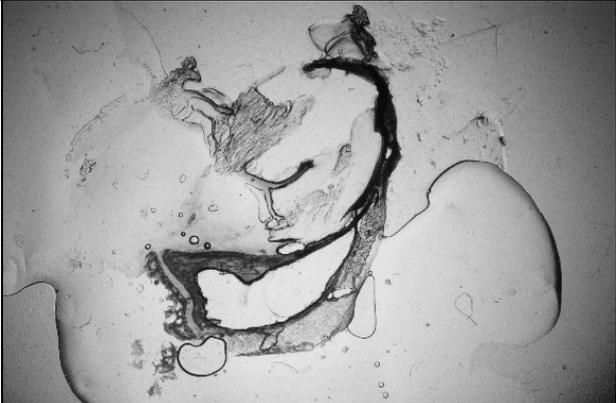


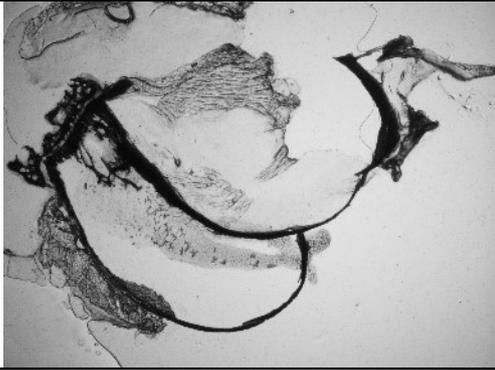
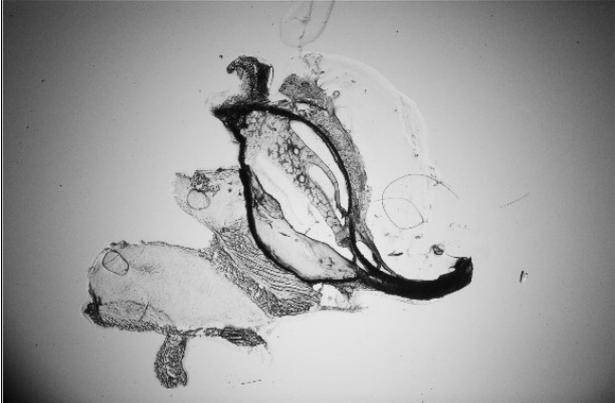
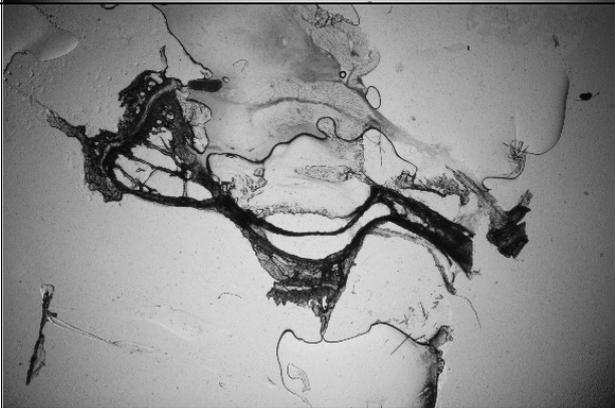


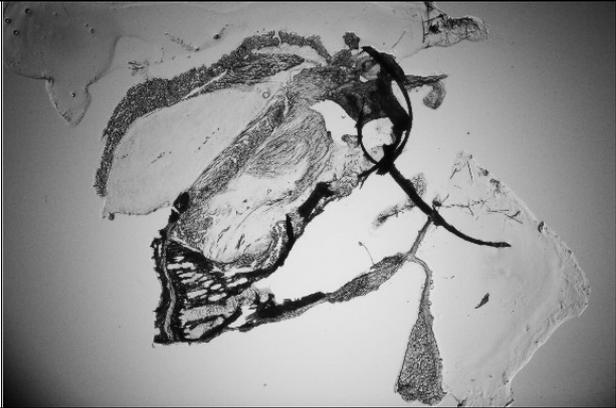
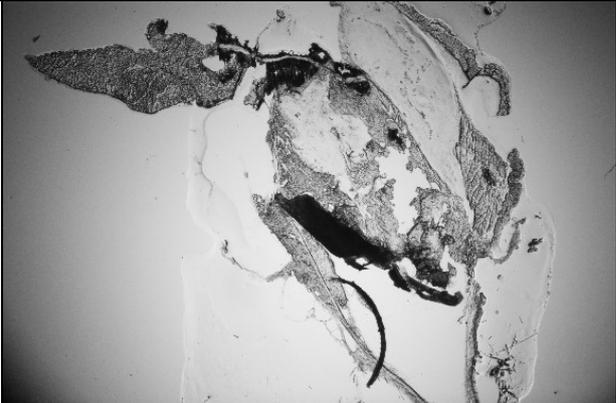
13			16
15			17
			18
			19

N° coupe	J+7 Sarc Echantillon 690 Gauche	J+7 Sarc Echantillon 689 Gauche	N° coupe
1			3
2			4
5			5
6			6

7			7
8			9
9			11
10			12

			13
			14
			15
			16
			17

			18
			19
			20
			21

			22
			23
			24

## ANNEXE 3 : PROPRIETES MECANIKUES



**Mention Mécanique et Sciences pour l'Ingénieur**  
**Spécialité : MGC - Mécanique et Génie Civil Année 2016-2017**

*“Evolution Of Structure And Mechanical Properties Of Bone  
At The Early Stages Of Osteosarcoma Development On An  
Animal Model”*



**Presented by:**

"Iman ALMAROUK"

**Training place:**

"Institut de Physique de Rennes"

**Supervised by:**

"Tanguy ROUXEL"

"Franck ARTZNER"

Defended on: 19 June 2017

Jury members: Mustapha HELLOU  
Yann GUEGUEN  
Meftah FEKRI

**a. Mechanical properties of bone**

i. Normal bone(S.Pal, 2014)

Properties of bone change between wet and dry specimens, so it is important to keep them wet when doing tests if it is a factor important in the measurement, for example the ultimate strain of cortical bone is 1.2% in wet bone and 0.4% in dry bone. (S.Pal, 2014)

Material properties can be determined using mechanical tests and ultrasonic techniques.

Mechanical tests consist of applying loads to bone specimens such tensile, compressive, torsional or shear loads and measuring the deformation obtained.(S.Pal, 2014)

Property	Cortical Bone	Cancellous Bone
Compressive strength (MPa)	100-230	2-12
Flexural, tensile strength (MPa)	50-150	10-20
Young's (tensile) modulus (GPa)	7-30	0.05-0.5
Fracture toughness (MPa m <sup>1/2</sup> )	2-12	-
Stain to failure	1-3	5-7

Table 1: Mechanical properties of bone (Hench, 1989)

Geometry of bone used in tensile test is shown in [Figure 1-a], stress increases with strain in [Figure 1-b] that helps to determine the young’s modulus from the slope of the curve

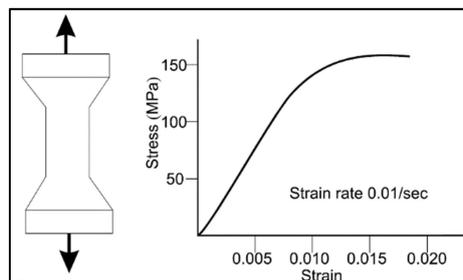


Figure 1: a) bone test specimen and b) stress-strain curve resulting from a tensile test (S.Pal, 2014)

From [Figure 2], it is clear that glass and steel are stronger than bone.

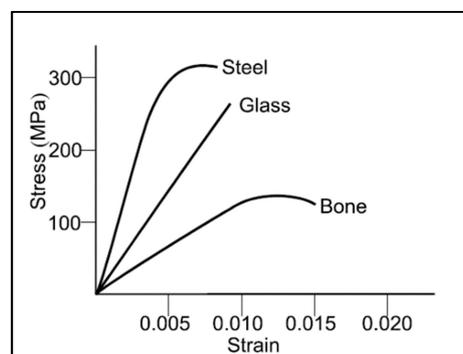


Figure 2: Material properties of bone relative to glass and steel (S.Pal, 2014)

Bone is sensitive to strain rate [Figure 3], as the strain rate increases, the ultimate stress increases but the ultimate strain decreases with optimal strain rate 0.1 and 1/second for energy absorption.

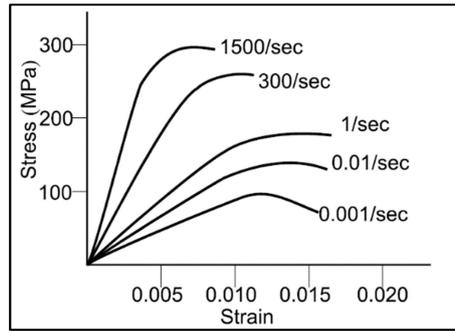


Figure 3: Strain-rate sensitivity of cortical bone (S.Pal, 2014)

There are three parameters important to determine mechanical properties of bone:

1. Ultimate force: maximum load sustained by bone before failure, it depends of type of load and of loading rate
2. Maximum deformation to failure: depends on direction and loading rate
3. Energy that it is absorbed before failing: it is determined from force-deformation curve, that energy is higher in children’s bones compared to adults

Comparison of material properties between cortical bone and cancellous bone:

Cortical bone	Cancellous bone
Stiffer	weaker
Sustains greater stress before failure	Sustains less stress before failure
Sustains less strain before failure (2%)	Sustains greater strain before failure (75%)
Less capacity to store energy	Greater capacity to store energy

Table 2: Comparison of material properties between cortical bone and cancellous bone (S.Pal, 2014)

ii. Factors influencing the mechanical properties of bone(J. Currey, 2009)

Bone wet or dry, it is important to know if the specimen is wet or dry when it is tested, as it is known that bone get tougher when it is wet. (J. Currey, 2009)

Size effect:

1. as the crack can initiate in a weak volume and as the specimen become larger as it has more weak volumes, so the large specimen will fail at stresses that are lower than those of small specimen (J. Currey, 2009)
2. To determine the size effect, Weibull equation is used to analyze the distribution of strengths of specimens from a bone (J. Currey, 2009)

Damage is undergone by bone before it breaks, this found by Frost (J. Currey, 2009)

Aging:

1. Mass of bone increases with age to a maximum at age 25-30 years, then it starts to decrease with age (J. Currey, 2009)
2. From the age of 30 to 90, ultimate tensile strength decreases from 130 MPa to 110 MPa for cortical bone from femur in longitudinal loading, and elastic moduli decreases from 17 to 15.6 GPa (J. Currey, 2009)
3. Reduction of energy absorbing capacity is about 7% per decade (J. Currey, 2009)

4. Stiffness of bone decreases and its brittleness increases with aging ([J. Currey, 2009](#))

## **b. Measurement of the mechanical properties of bone**

It is so difficult to study and understand the bone that is a very complicated material because of its hierarchical structure, so, for that, advanced techniques are needed.

Techniques used depend from the level of bone studied, for example electron microscopy is used at the nanometer level, FTIR and x-rays at the angstrom level, light microscopy at few microns level and conventional mechanical testing is at hundreds of microns level. ([Jae-Young Rho a, 1997](#))

An idea about elastic moduli of bone at specific conditions:

$E = 14\text{-}20$  GPa for large tensile cortical specimens (wet, macro level),  $E = 5.4$  GPa for microbending cortical specimens (wet, micro level),  $E = 22$  GPa for osteon lamellar bone determined by nanoindentation (dry, sub-micro level). ([Jae-Young Rho a, 1997](#))

The elastic modulus of bone tissue (its resistance to deformation) can be determined by the range of mineralization ([J. D. Currey, 1984](#); [van Ruijven, Mulder, & van Eijden, 2007](#))

Testing methods:

There are advances in old methods especially in: ([J. Currey, 2009](#))

1. Ultrasonic measurements : different histological types of bone can be distinguished nowadays from their ultrasonic signature ([Sasso, Haiat, Yamato, Naili, & Matsukawa, 2008](#))
2. Nanoindentation:
  - consists of pressing a probe in the surface to measure simultaneously load and deformation usually using the method of Oliver and Pharr for determining the Young's modulus of small parts of materials,
  - it is used to determine changes in modulus of calcified cartilage in human patella by Gupta et al. ([Gupta et al., 2005](#))
  - As bone is anisotropic, there is limitation on the method by Oliver and Pharr used because it gives an average young modulus
  - Tang B et al. proposed modifications to the method considering the bone as viscoelastic ([Tang B, 2006](#))
3. Finite element analysis: computer method to determine strain in loaded models, it can allow two young's modulus or more depending from the anisotropy of the material, its problem is more parameters you have more time is needed by the computer to calculate, Richmond et al. work on it
4. Finite element analysis with computer-aided tomography (CT): to study very complex shapes of bones, it's inconvenient is the highly intensive computer ([Richmond et al., 2005](#))
5. Optical methods: Digital image correlation and interferometry (ESPI, or electronic speckle pattern interferometry) to measure small displacements.
6. New Methods for Characterizing Bone:
  - a) spectroscopic methods:

- Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR): determine the differences in mineral/organic ratios and the crystal sizes
- Raman spectroscopy: specimen should not be dried so it can be used to in vivo measurements
- NMR spectroscopy: determine amount of water in bone

b) Synchrotron radiation

### c. Conclusion

To understand more the bones and bone diseases, there is more to do with the increasing power of the techniques available to understand more the complicated bone at the different hierarchical levels.

It seems as it known to us that there is not in the literature works similar to the work we want to do in the experimental part.

## 1 Part B: Experimental study

### a. Introduction

Our goal is to study the evolution of structure and mechanical properties of bone at the early stages of osteosarcoma development on an animal model, so we use samples frozen from 2 mice prepared at the laboratory of Françoise RÉDINI and her team in Nantes, for both of them tumor cells were injected at 1/3 proximal of the tibia of left paw, for first one after 13 days of cells injection, both left and right tibia were frozen in ice, right tibia is used as control sample and left tibia as day 13 considered as the first of tumor initiation, and for second mouse only left tibia is sacrificed at seventh day after cells injection, used as sample at day 7 to see the intermediate evolution before tumor initiation.

Then, sacrificed tibias were cut at the laboratory of Alain FAUTREL in Rennes using LEICA CM3050 S diamond saw usually used to obtain thin sections of tissues and soft materials, we got a lot of cuts from each sample with thickness 100  $\mu\text{m}$  each that we put them either on glass slide (used for mechanical tests) or on film of nalophan (used for x-rays). After that, we take photos of samples using a high resolution camera at IPR, depending on these photos, we chose best samples to do mechanical and optical tests on them.

For mechanical test, we had 3 principle samples representing control, day 7 and day 13, then we used micro-indenter Fischerscope at IPR to test the hardness of bone at specific zones of the samples.

For X-ray test, we prepare samples in IPR in a way to be able to do SAXS tests at synchrotron SOLEIL on them. There at the SWING line, we did SAXS tests on 5 samples and we got the necessary information about structure and orientation of bone.

Also, we used polarized light microscopy POLSCOPE at IPR to know information about the orientation and intensity, in fact, the results obtained by POLSCOPE did not add new information but verified the results we get by SAXS tests.

At the end, we compare the results and see if our hypothesis were verified or not, and we present some perspectives for this project.

## **b. Materials and methods**

### **i. Bone Samples**

Our investigation were focused on the head and 1/3 proximal of the tibia, samples were brought from the laboratory of Françoise RÉDINI and her team in Nantes where they launched the development of Osteosarcoma.

All information about mice used are in [Table 3Table 3].

- Species: mouse
- Kind: C57BL/6
- Tissues: right and left paws
- Type of tumor: MOSJ
- Technique used: Freezing
- Quantity: 26

To be noticed, that we use samples embedded in resin and they seem better for mechanical tests, but they do not fit to other tests such x-rays.

### Annexe 3 : Propriétés mécaniques

N° de souris	Patt e	Conditions expérimentales			Processus histo				
		Groupe	Timing	Date sacrifice	N° histo	Fixation	Décalcification	Cyprotection	Congélation
684	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia	J0	13/04/2017	2017-40 A1	non	non	non	13/04/2017
	G	Contrôle os sain			2017-40 A2				
685	Dt	Contrôle os sain	J2		2017-40 B1	13/04/2017 en PFA 4 %	14/04/2017 en EDTA 4.13%		
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 B2				
686	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 C1				
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 C2				
687	Dt	Contrôle os sain			2017-40 D1	non	non	non	13/04/2017
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 D2				
688	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 E1				
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 E2				
689	Dt	Contrôle os sain	J7	18/04/2017	2017-40 F1	non	non	non	18/04/2017
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 F2				
690	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 G1				
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 G2				
691	Dt	Contrôle os sain			2017-40 H1	18/04/2017 en PFA 4 %	19/04/2017 en EDTA 4.13%		
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 H2				
692	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 I1				
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 I2				
693	Dt	Contrôle os sain	J13	24/04/2017	2017-40 J1	24/04/2017 en PFA	25/04/2017 en EDTA		
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 J2				

694	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 K1	4 %	4.13%		
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 K2				
695	Dt	Contrôle os sain			2017-40 L1	non	non	non	24/04/2017
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 L2				
696	Dt	Avivement périoste 1/3 proximal du tibia			2017-40 M1				
	G	Avivement + 4.5M cellules dans 50µL			2017-40 M2				

Table 3: Information about mice used

## ii. Cuts used

After sacrifice of animals (mouse N° 689 and 696), bone is fixed and frozen. At the laboratory of Alain FAUTREL at university of Rennes 1 Campus Santé de Villejean.

2. The samples are frozen and stored at -80°C Figure 4.A.
3. We get out the sample Figure 4.B. corresponding to the tibia shown in Figure 4.C.
4. We glue it and start to have very thin layers using LEICA CM3050 S used to obtain thin sections of tissues and soft materials Figure 4.D. E. F.
5. We obtain a lot of cuts from each sample with thickness 100 µm each that we put them either on glass slide (used for mechanical tests) or on film of nalophan ( used for x-rays) Figure 4.G
6. We let them to dry in air flow dryer for an hour Figure 4.H
7. We took photos for the samples to choose the best between them for the tests

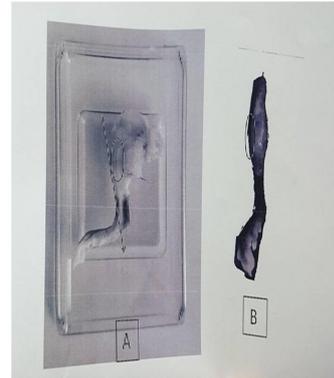
(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



(H)



Figure 4: Bone samples preparation

### iii. Mechanical test (micro-indentation)

The samples are locally mechanically tested by micro-indentation.

- **History of indentation**

The indentation is a mechanical test that derive from the typical hardness test and consist of pressing a hard tip in a material to measure some mechanical properties.

Indentation experiments started to develop carefully at the beginning of the nineteenth century.

Two principle categories of methods used:

1. First category consists of pressing a steel ball or cone into a surface under a known load
2. Second category consists of pressing sharp diamonds of various shapes into a surface also under a known load.

Principle of indentation is to find the relation between hardness and tensile strength of a material.

- **Principle**

We did the experiments of micro-indentation using the Fischerscope H100C XYp. Figure 5 at the Lab. of Université de Rennes 1 – Institut physique de Rennes – Département Mécanique et Verres. Its description is at Figure 6



Figure 5: Micro-indenter Fischerscope H100C XYp.

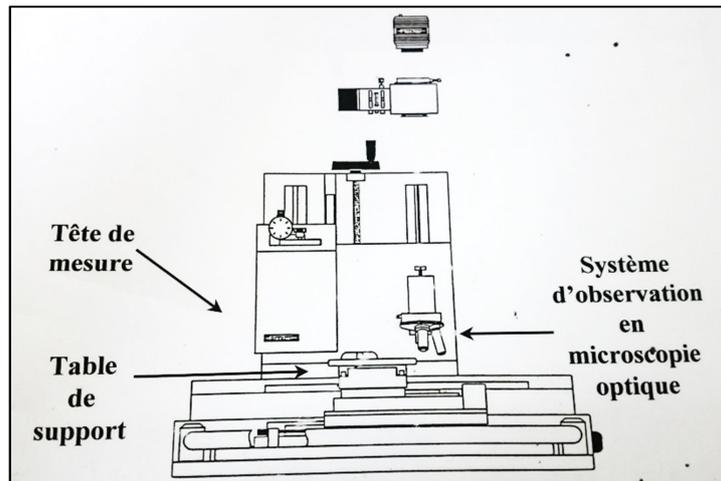


Figure 6: Synopsis of the machine

The Fischerscope is:

- A commercial indentation system
- it is equipped with sensors measuring the amplitude of the force and the depth of penetration
- So that the indentation curve is plotted instantaneously after the measurement which takes place at ambient temperature
- The prints are observable by optical microscopy
- The type of the micro-indenter tip is the Vickers with a 136 ° face angle (standard)
- This indenter is controlled by a microscope that has 3 objectives x4,x20 and x40
- The stage holder of the sample is an XY table
- The indentation machine is controlled by a computer using special software WIN-HCU
- This software is used to automatically analyze the indentation curves
- By analyzing the curves, the young's modulus and the hardness are calculated

The test consists of applying a point load to the surface of a material using a Vickers Diamond tip.

- **Characteristics of Fischerscope H100C XYp.**

Load applied to the indenter is from 0.4 mN to 1 N with measurement uncertainty equal to 0.02 mN.

Maximum displacement is 700 micrometers with measurement uncertainty equal to 2 nm.

Measurement times for creep at maximum load: min. 1 s; max. 60 s

- **Measured parameters**

- Depth Of Penetration: h
- Meyer Hardness: HIT
- Martens Hardness: HM
- Vickers Hardness: HV
- Reduced Elasticity Modulus: Er

- Total Work:  $W_t$
- Elastic Work:  $W_e$
- Reversible Work:  $W_r$

iv. Structural test: X-ray diffraction: SAXS Small-angle X-ray scattering at SYNCHROTRON SOLEIL in Paris Line SWING

- **Description**

**SWING**: Small and wide angle X-ray scatter**ING** for the study of samples with complex structure: macromolecules, nanomaterial, tissues ...

**Principle**

Range of energy covered by SWING: 5000 to 17000 eV

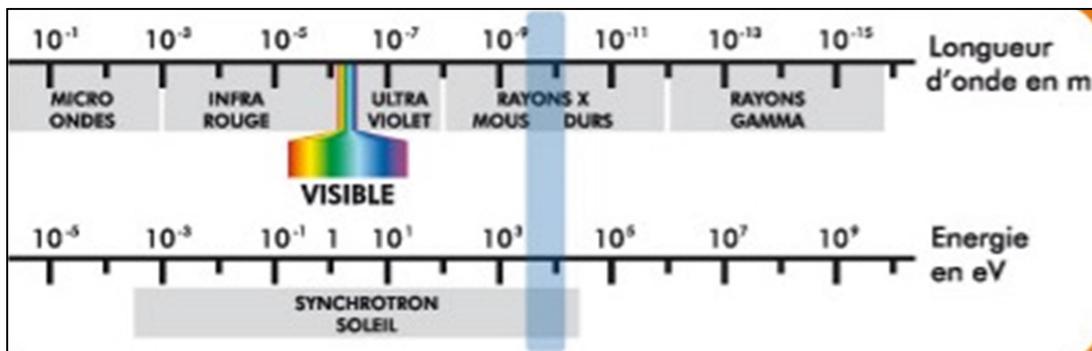


Figure 7: Range of energy and wave length (SOLEIL, 2010)

**Light source**: U20 inverter, whose "vacuum" technology is essential to provide a strong flow of hard X-rays from an intermediate energy machine like that of SOLEIL. The air gap between the two rows of magnets must be modified at each change in wavelength (SOLEIL, 2010)

**Detection tunnel**: One of the most spectacular elements of the SWING line is the vacuum enclosure which will shelter the two-dimensional detector, known as "detection tunnel", it is a cylinder of 7 meters in length and 2 meters in diameter, equipped with a pumping system capable of installing a primary vacuum in less than one hour, inside of it there is a truck moving the detector in the three directions x, y, z. Why so long? The beam of x-rays is quasi-parallel, it is enough to retract the detector in order to reach increasingly smaller scattering angles, which constitutes one of the major criteria for the value of the whole device. Why so wide? In order to be able to easily center the detector with respect to the direct beam and to double the angular range on a single image. (SOLEIL, 2010)

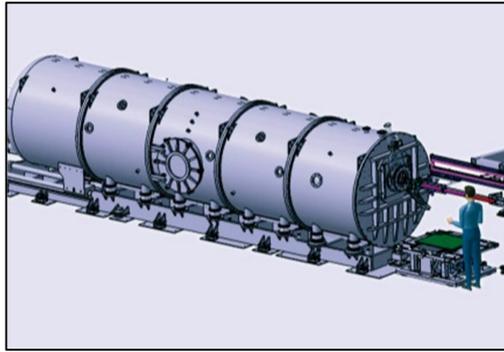


Figure 8: Detection tunnel (SOLEIL, 2010)

### Areas of application

The SWING beamline provides information on the structure of matter on a nanometer to micrometer scale, and it helps in answering questions relating to soft condensed matter, the conformation of macro-molecules in solution and composite materials in material sciences. (SOLEIL, 2017)

### Disciplines (SOLEIL, 2017)

- Structural biology and chemistry of soft-matter
- Low-resolution 3D structure in solution.
- Membrane proteins.
- Protein and nucleic acid complexes.
- Aggregate discrimination.
- Conformational changes.
- Characterization on the nanometric scale and kinetics of nucleation -growth,
- catalytic nanoparticles,
- rheological properties of nanomaterials,
- self-assembly mechanisms,
- zeolites and mesoporous materials,
- biovectors, organization of colloidal suspensions and nanocomposite structure/function relationships.

### SAXS Characteristics

SAXS: this was performed on the high brilliance SWING beam line (12 KeV) at the Soleil Synchrotron Facility using sample-detector distances of 0.5–3 m depending on the experiments. The diffraction patterns were therefore recorded for reciprocal spacing  $q$  ( $\text{\AA}^{-1}$ ) from 0.007 to  $2.1 \text{\AA}^{-1}$ , that is, a range of repetitive distances  $d=2\pi/q$  from 990 and  $3 \text{\AA}$ . The X-ray patterns were detected and recorded via a chip charge-coupled device camera detector, AVIEX.(Valery et al., 2015)

To be noticed, the range of repetitive distances  $d=2\pi/q$  in the experience done during this training were from 990 and  $4 \text{\AA}$ .

The size of beamline used is  $17*17$  microns.

## a. Results

### i. Control sample

- *Mechanical result*

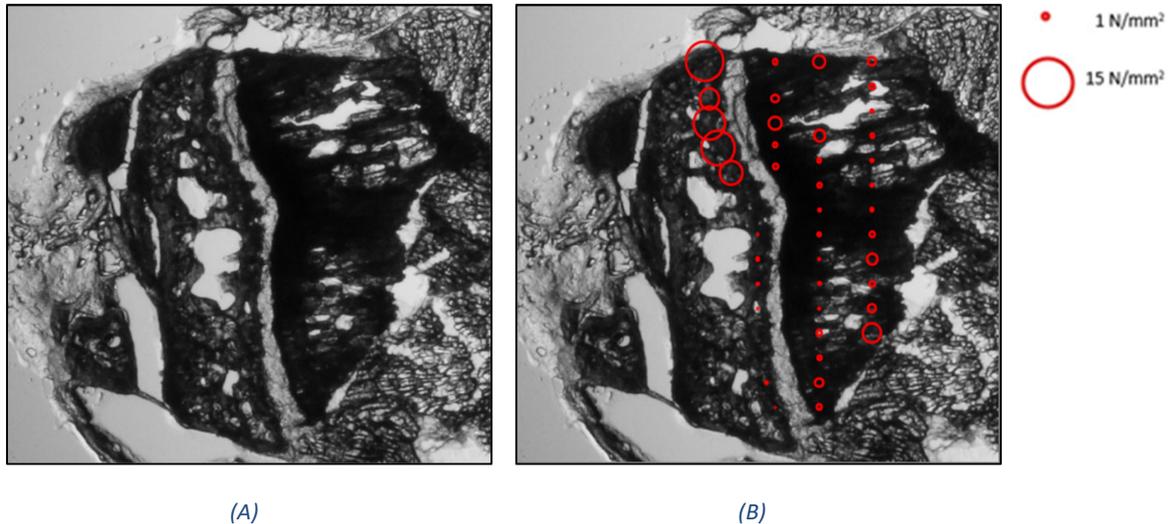


Figure 9: (A) Image of cut number 15 taken from the tibia of the right paw of mouse number 696 placed on glass plate, image number 18, (B) Circles proportional to the penetration hardness (Martens Hardness) values

Different values of penetration hardness (Martens Hardness), ranged from  $1\text{ N/mm}^2$  to  $15\text{ N/mm}^2$ , obtained by micro-indentation, at specific points distributed around the growth plate of tibia head of sample, used as **control**, are represented by proportional circles, shown in Figure 9.B, larger circles shows higher values.

This figure shows that large circles are located along the growth plate in the upper part of the bony head (left side) while small circles are located to the right, in the growth zone of bone.

This indicates that the hardness is greater, then bone is tougher in the upper part. There is a difference in bone age between the two zones, **old bone is found in the upper part and young bone in the growth area.**

Gives an idea about Martens hardness of other materials.

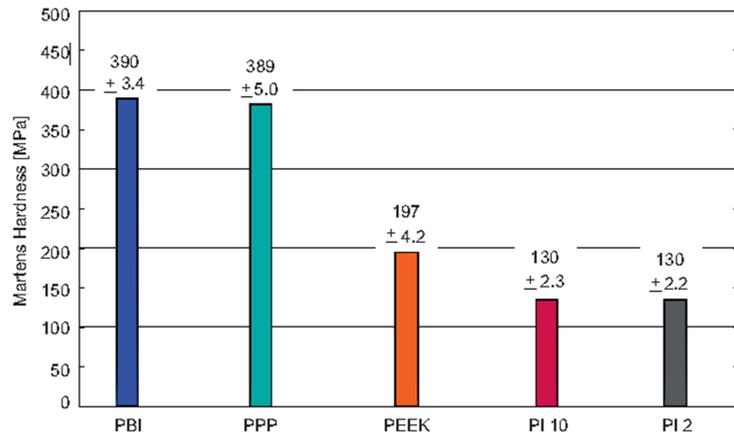
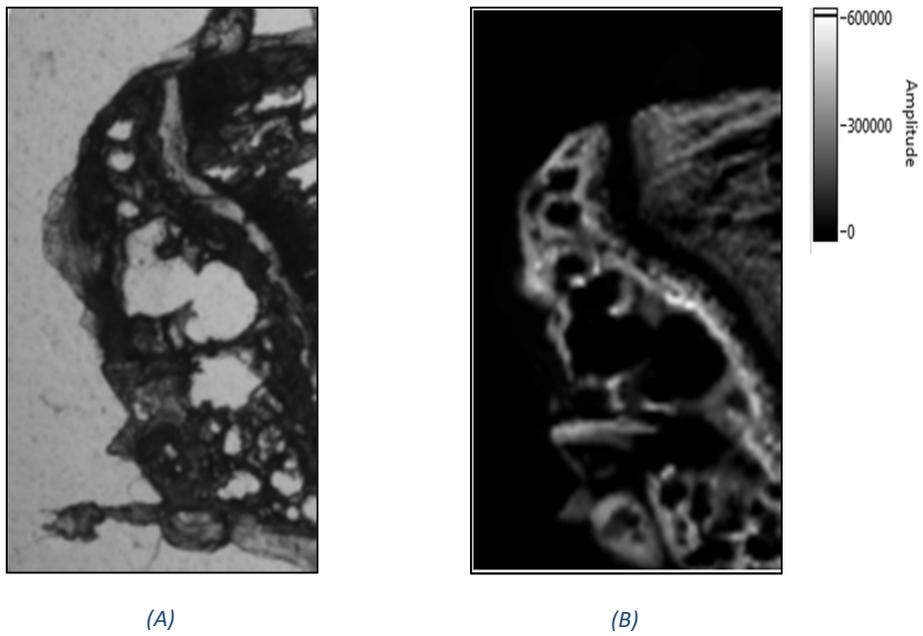


Figure 10: Martens hardness values of different polymers. ([K. Friedrich 2011](#))

- **SAXS result**



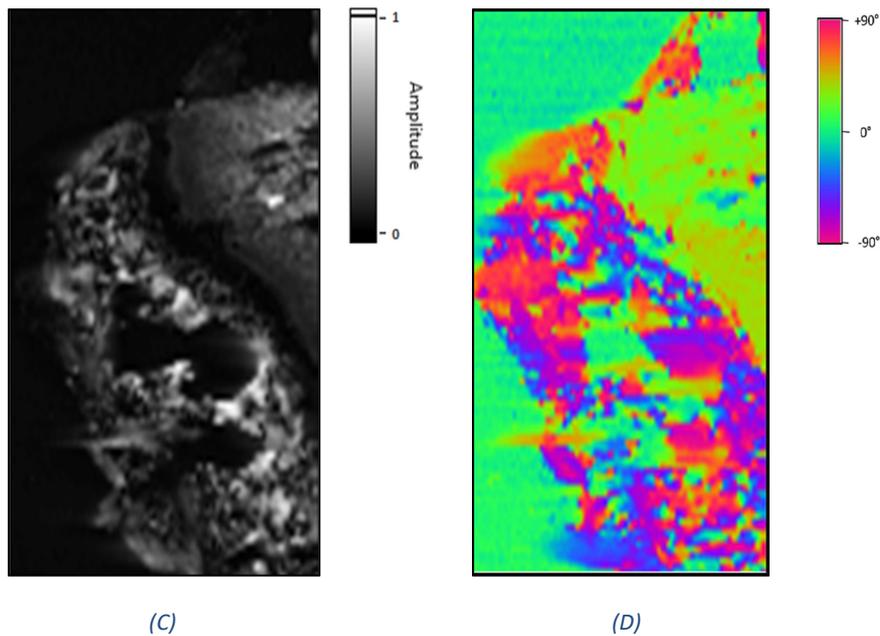


Figure 11 : (A) Image of cut number 13 taken from the tibia of the right paw of mouse number 696 placed on nalophan, image number 96, (B) Intensity, (C) Anisotropy, (D) Orientation obtained by SAXS

Intensity, anisotropy and orientation images are represented respectively in Figure 11. B, C, D, obtained by SAXS measurements done at SWING beamline at synchrotron SOLEIL, for sample used as **control**.

Figure 11.B. makes it possible to locate perfectly with respect to the card of the Figure 11.A, and it shows that lighter zones are found in upper part of the bony head (left side). As the intensity is proportional to the bone quantity, there is difference in bone quantity which is higher in upper part.

In Figure 11.C. Brightness indicates the age of bone, lighter areas correspond to isotropy close to 1 that indicate old bone while darkness areas correspond to isotropy close to 0 that indicate young bone. In this figure, in the growth zone, there is a gradient of anisotropy at first simple then it increases longitudinally. This gradient start from growth plate, then from cells that reorganize to form the extracellular matrix.

In Figure 11.D. Angle orientation of collagen and crystals of bone and the extracellular matrix is shown. In the green are of the growth zone, there is same color distribution that indicates an angle orientation about  $25^\circ$  to  $30^\circ$ . So, **bone and extracellular matrix are oriented**.

ii. Sample sacrificed after 7 days of tumor cells injection

- **Mechanical result**

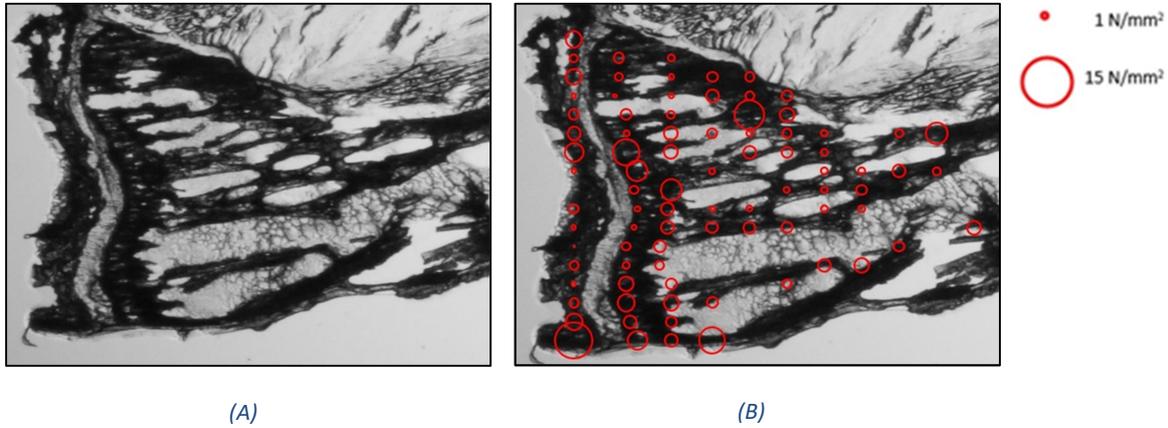
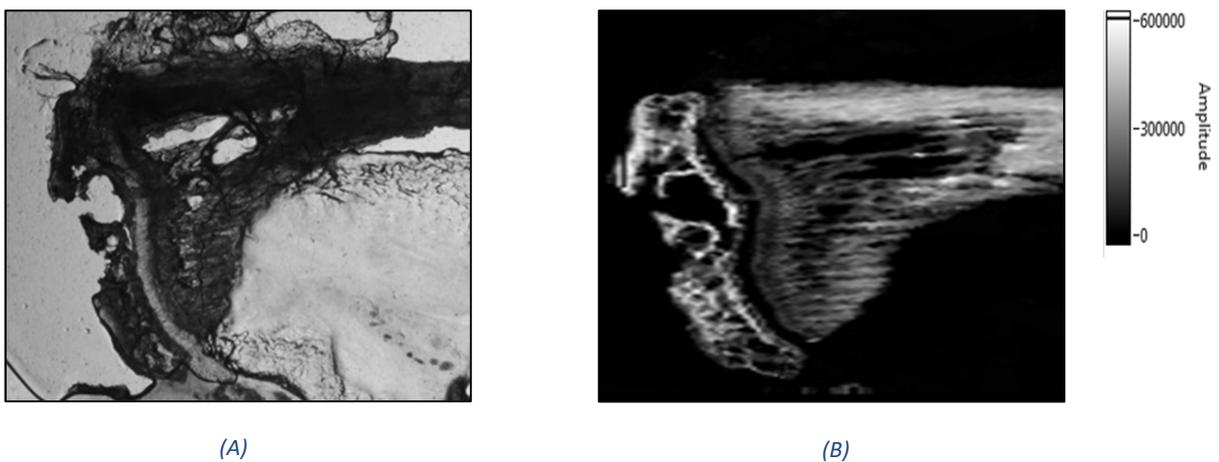


Figure 12: (A) Image of cut number 22 taken from the tibia of the left paw of mouse number 689 at day 7 placed on glass plat, image number 41, (B) Circles proportional to the penetration hardness (Martens Hardness) values

Different values of penetration hardness (Martens Hardness), ranged from  $1\text{ N/mm}^2$  to  $15\text{ N/mm}^2$ , obtained by micro-indentation, at specific points distributed around the growth plate of tibia head of **sample sacrificed after 7 days of tumor cells injection**, are represented by proportional circles, shown in Figure 12.B, larger circles shows higher values.

This figure shows that there is approximately no difference between sizes of circles in both zones. This indicates no difference between the hardness. So, **bone is getting older in the growth area.**

- **SAXS result**



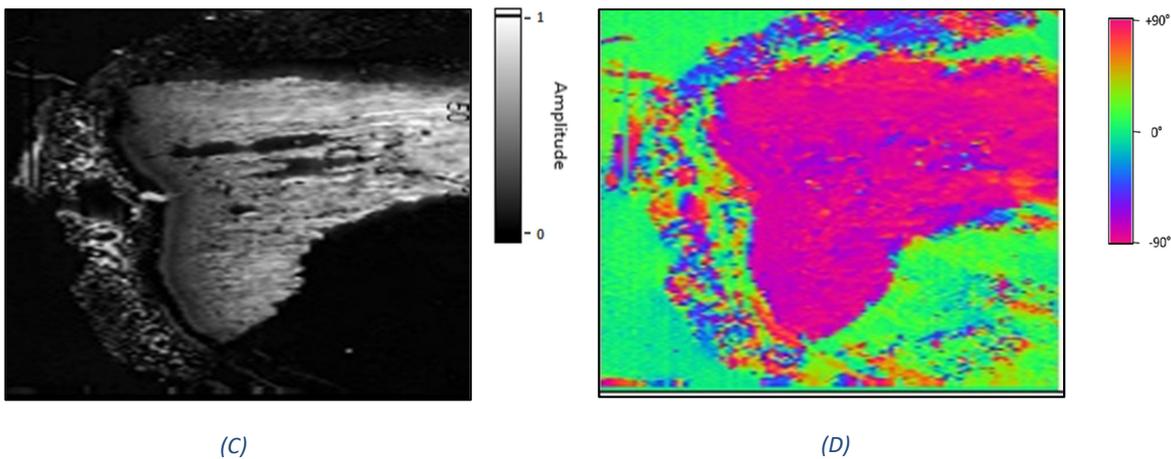


Figure 13: (A) Image of cut number 23 taken from the tibia of the left paw of mouse number 689 at day 7 placed on nalophan, image number 208, (B) Intensity, (C) Anisotropy, (D) Orientation obtained by SAXS

Intensity, anisotropy and orientation images are represented respectively in Figure 13. B, C, D, obtained by SAXS measurements done at SWING beamline at synchrotron SOLEIL, for **sample sacrificed after 7 days of tumor cells injection**.

Figure 13.B. makes it possible to locate perfectly with respect to the card of the Figure 13.A. and indicates that there is **total structure change**.

In Figure 13.C. Brightness indicates the age of bone, lighter areas correspond to isotropy close to 1 that indicate old bone while darkness areas correspond to isotropy close to 0 that indicate young bone. In this figure, there is higher anisotropy in the growth zone, **bone is completely anisotropic here**. So, **bone is older in this zone**.

In Figure 13.D. Angle orientation of collagen and crystals of bone and the extracellular matrix is shown. In the growth area, there is same color distribution that indicates an angle orientation about 90°. So, **bone is highly oriented**.

## iii. Sample sacrificed after 13 days of tumor cells injection

- *Mechanical result*

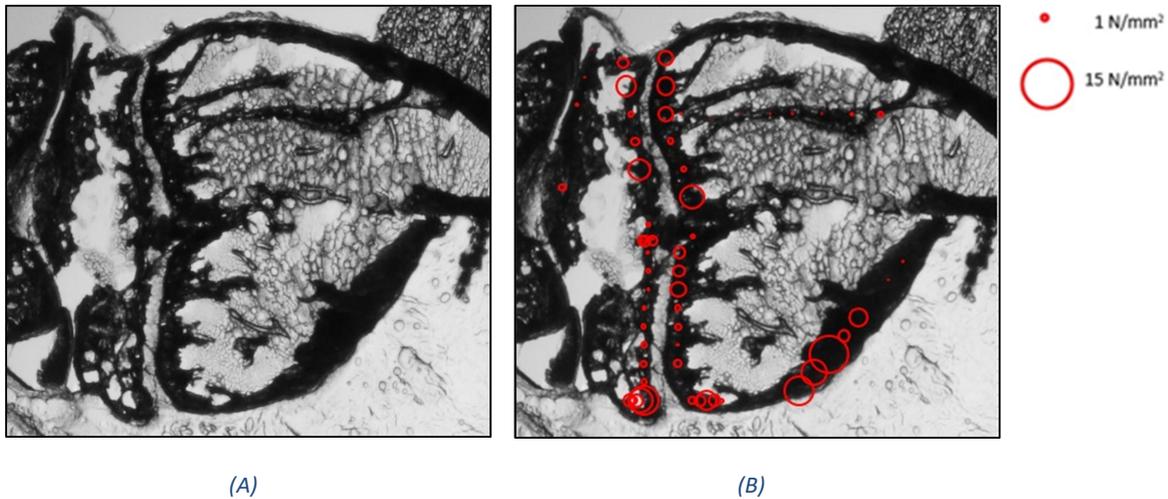


Figure 14: (A) Image of cut number 7 taken from the tibia of the left paw of mouse number 696 at day 13 placed on glass plate, image number 4, (B) Circles proportional to the penetration hardness (Martens Hardness) values

Different values of penetration hardness (Martens Hardness), ranged from  $1\text{N/mm}^2$  to  $15\text{N/mm}^2$ , obtained by micro-indentation, at specific points distributed around the growth plate of tibia head of **sample sacrificed after 13 days of tumor cells injection**, are represented by proportional circles, shown in Figure 14.B, larger circles shows higher values.

This figure shows that there is approximately no difference between sizes of circles in both sides of the growth plate, indicating no difference between hardness. But larger circles exist at the outer shell of cortical bone, indicating that bone is getting rigid in this zone. So, bone is getting older at the outer shell with remarkably disappearance of bone in the growth zone.

• *SAXS result*

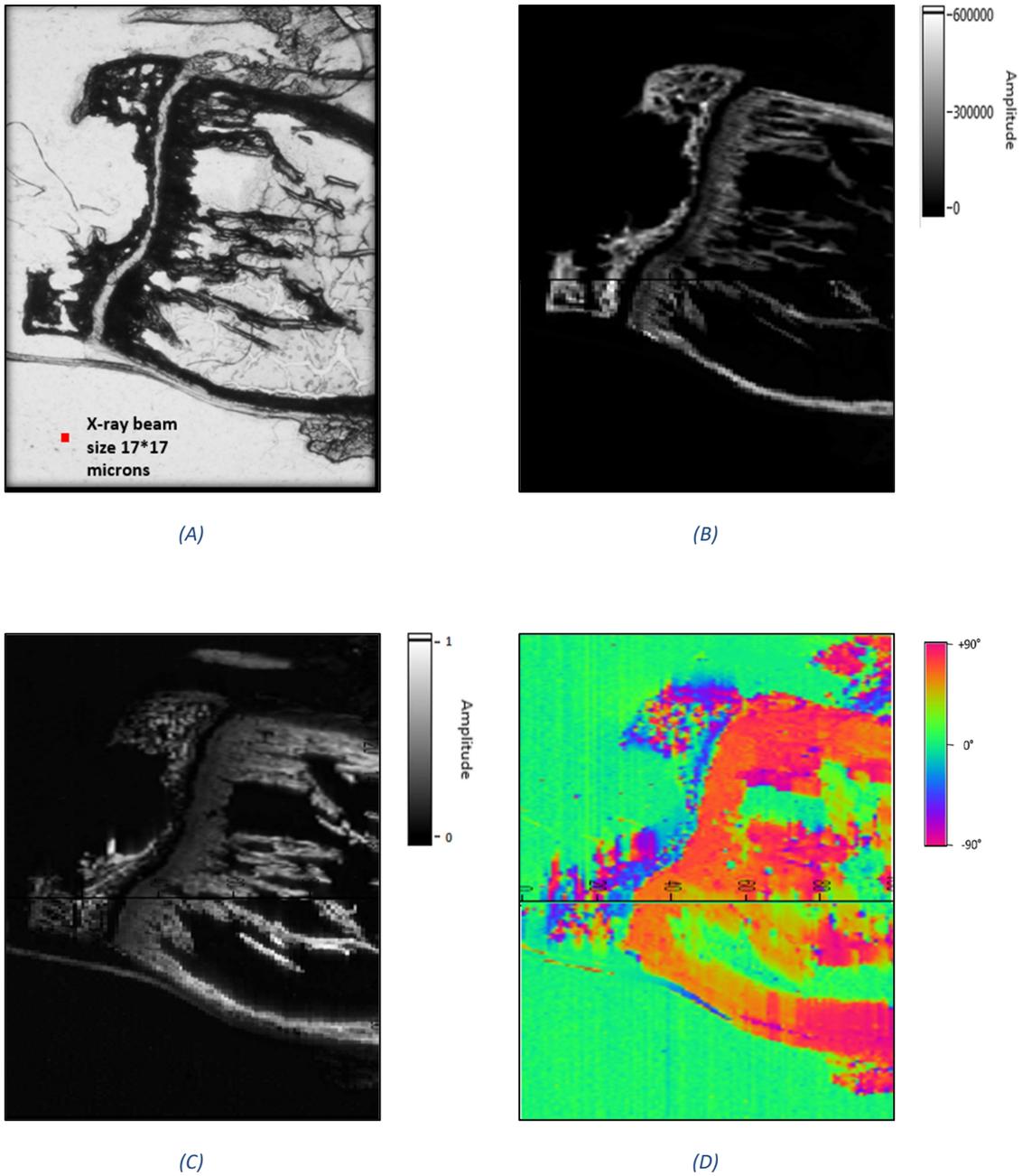


Figure 15: (A) Image of cut number 10 taken from the tibia of the left paw of mouse number 696 at day 13 placed on nalophan, image number 87, (B) Intensity, (C) Anisotropy, (D) Orientation obtained by SAXS

Intensity, anisotropy and orientation images are represented respectively in Figure 15. B, C, D, obtained by SAXS measurements done at SWING beamline at synchrotron SOLEIL, for **sample sacrificed after 13 days of tumor cells injection.**

Figure 15.B. makes it possible to locate perfectly with respect to the card of the Figure 15.A. and indicates that there is **impression that no bones in the growth area.**

In Figure 15.C. Brightness indicates the age of bone, lighter areas correspond to isotropy close to 1 that indicate old bone while darkness areas correspond to isotropy close to 0 that indicate young bone. In this figure, **the anisotropy is less strong in the growth zone.**

In Figure 15.D. Angle orientation of collagen and crystals of bone and the extracellular matrix is shown. We realize that there is angle orientation about  $90^\circ$  in the right zone.

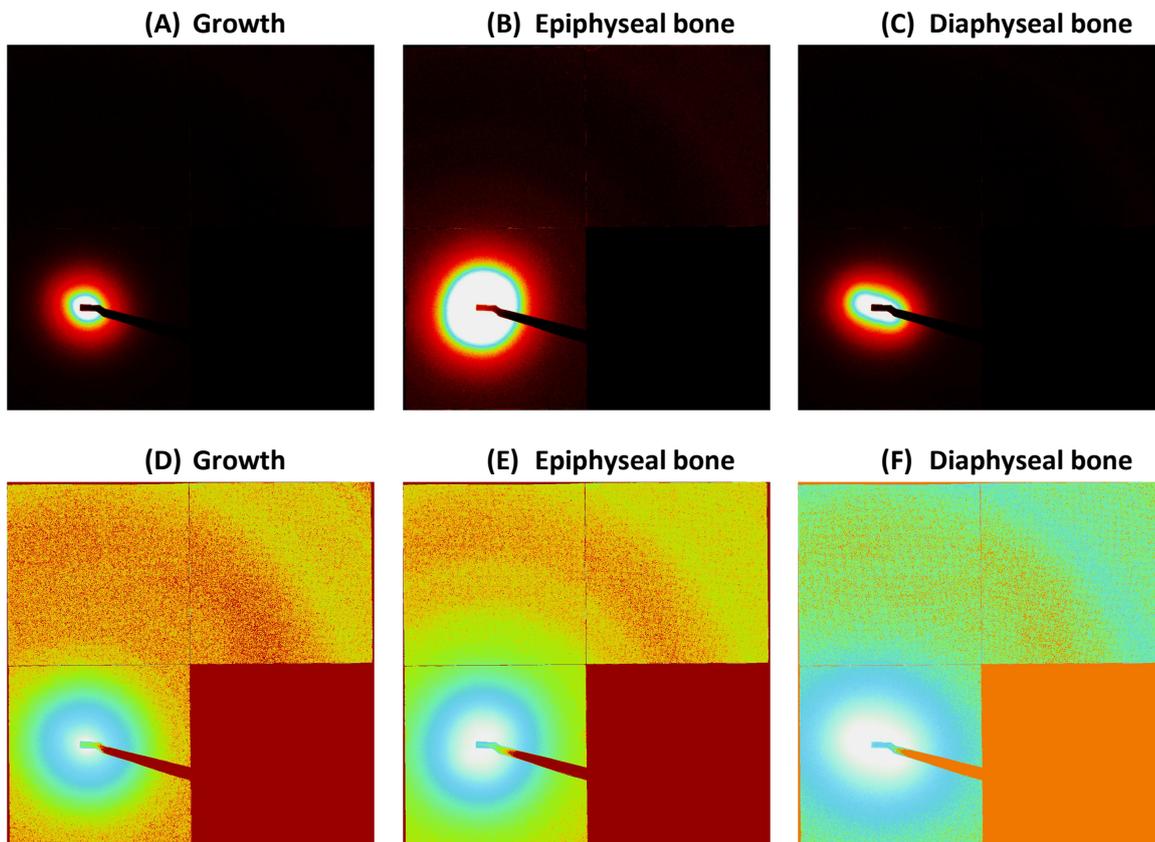


Figure 16: Pictures (Clichés) of different areas in linear mode (A) (B) (C) and logarithmic mode (D) (E) (F) of control sample

Figure 16 shows pictures obtained by SAXS tests in linear mode and logarithmic mode of control sample.

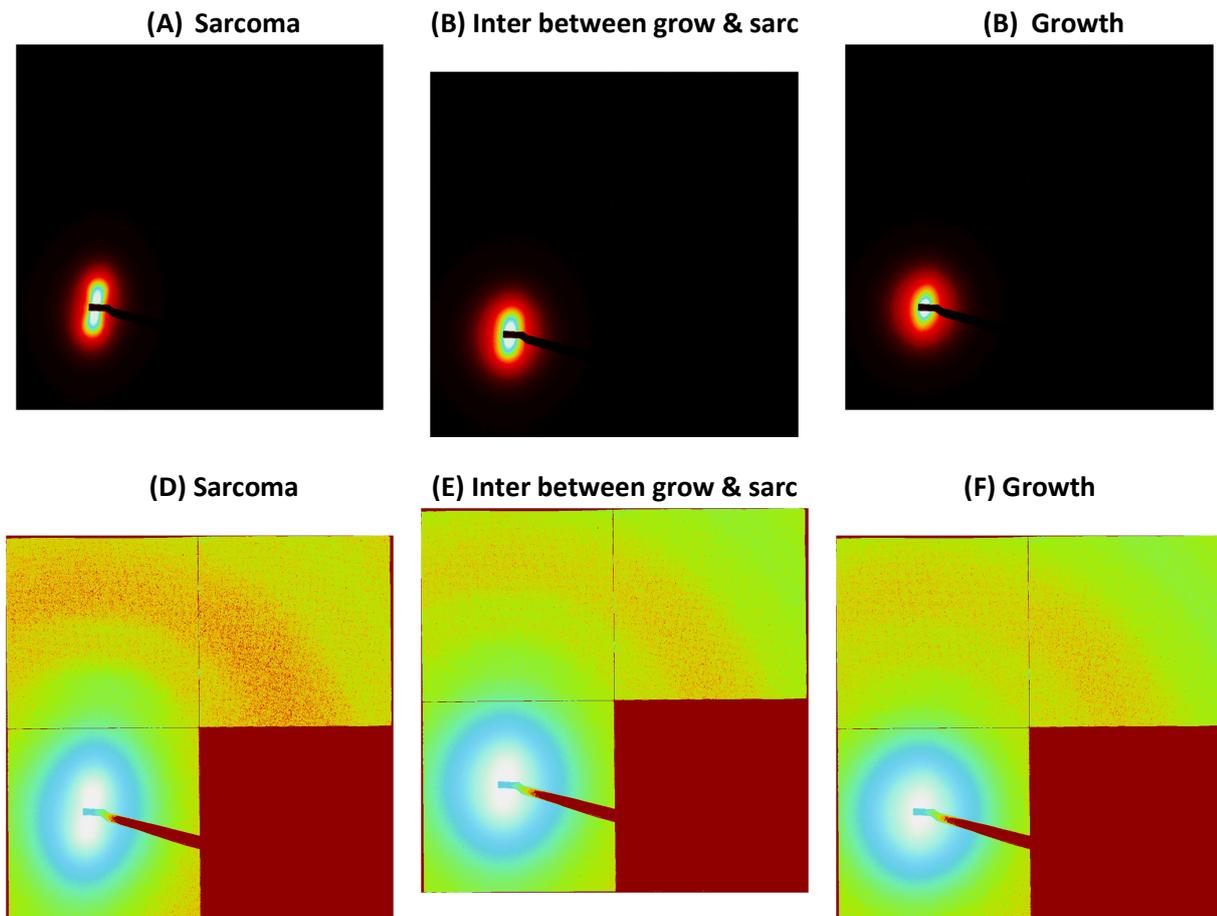


Figure 17: Pictures (Clichés) of different areas in linear mode (A) (B) (C) and logarithmic mode (D) (E) (F) of sample sacrificed after 7 days of tumor cells injection

Figure 17 shows pictures obtained in linear and logarithmic mode of sample sacrificed after 7 days of tumor cells injection.

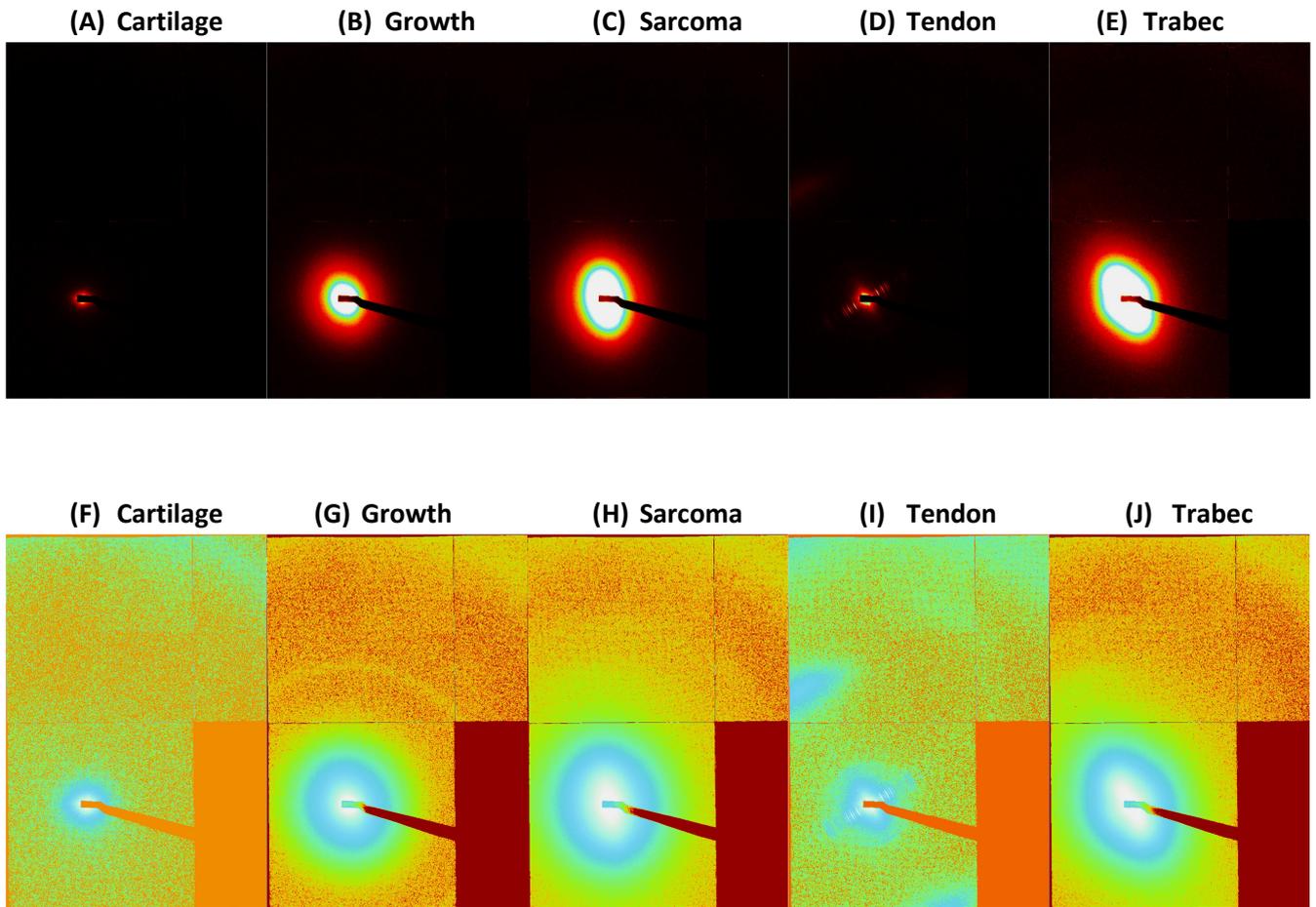


Figure 18: Pictures (Clichés) of different areas in linear mode (A) (B) (C) (D) (E) and logarithmic mode (F) (G) (H) (I) (J) of sample sacrificed after 13 days of tumor cells injection

Figure 18 shows pictures obtained in linear and logarithmic mode of sample sacrificed after 13 days of tumor cells injection.

These pictures can be used as clichés, and they indicate that the spectra are very different especially for the sarcomas. The crystals of apatites are very elongated and much aligned. Small peaks in the center perpendicularly to the diffusion of the bone are visualized at sarcomas zones.

## b. Discussions

- 1) There is correlation between mechanical and X-ray structure
- 2) Localize at the control sample, results are logical
- 3) Overproduction of bone in sample of disease at day 7
- 4) Disappear of bone in growth plate in sample at day 13
- 5) There is a mechanical bloc unobserved usually
- 6) In term of samples preparation, difficulty with mechanical tests due to change in thickness, samples embedded in resin better than samples on glass plate, samples on glass plate help to make X-rays and optical measurements.

- 7) Results from POLSCOPE, birefringence: orientation and anisotropy, confirmed same information obtained by SAXS tests.

**c. Conclusion**

The methodologies used: mechanical test, X-ray and sample preparation verified some phenomena.

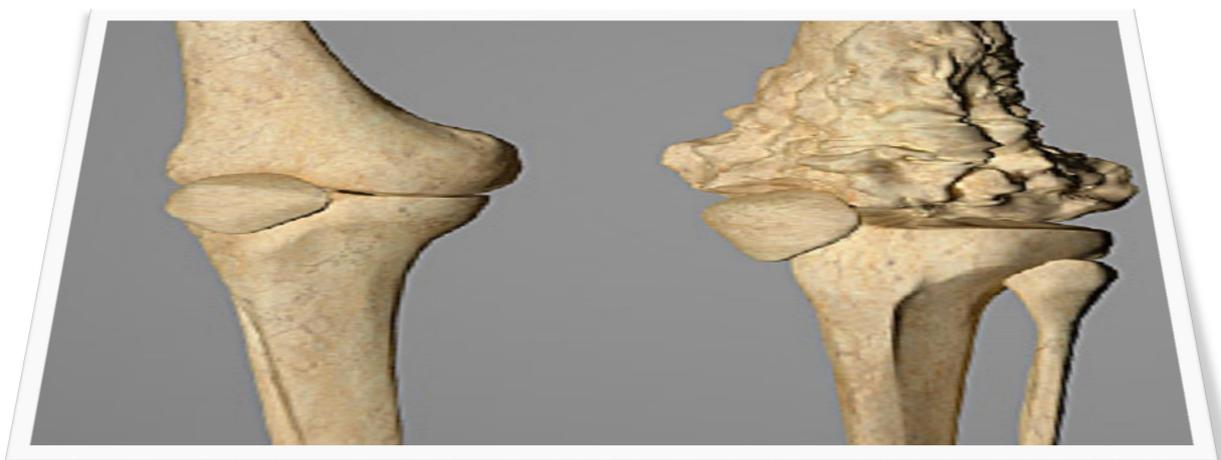
The perspective is to use other techniques to verify the results like RAMAN test, fluorescence test and samples with bone decalcified, already prepared in Nantes, to test them by polarized light microscopy to study more the biological nature of the system.



Master 1 Physique fondamentale et applications Parcours  
Physique Médicale  
Année Universitaire 2017 - 2018

*Rapport de Stage*  
*Yoann JEGAT*

Analyse d'Images en Coupe de Tomographie  
d'Ostéosarcome



Maître de Stage: Franck ARTZNER

Juin - Juillet 2018

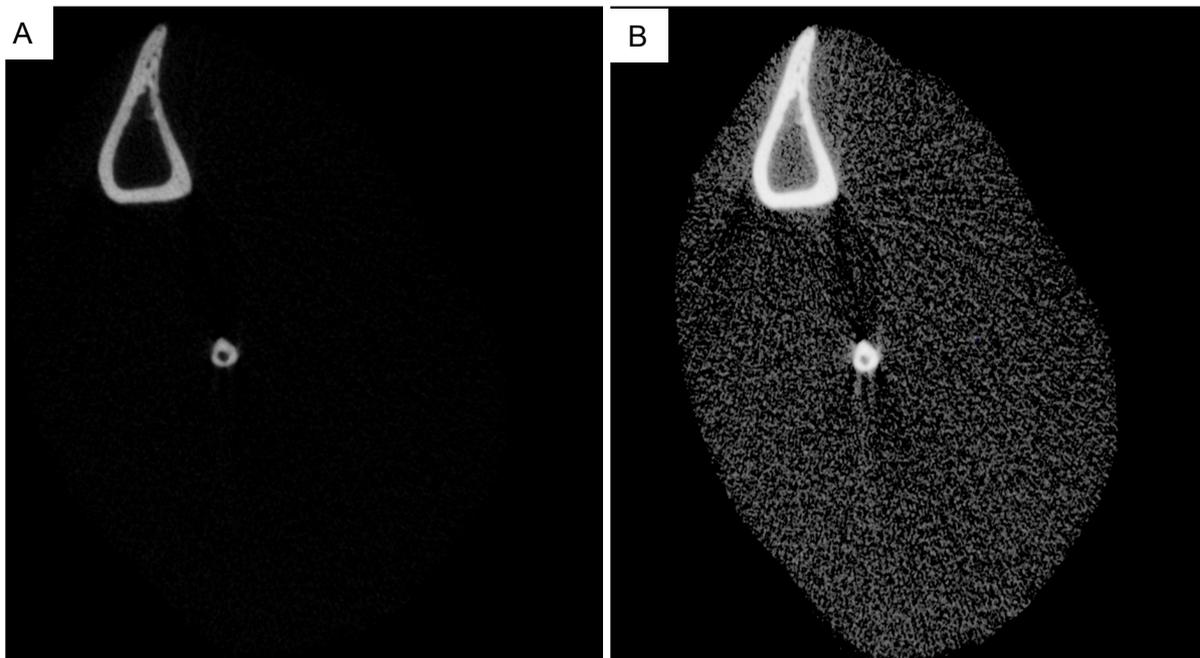
## II/ Traitement de L'image

### 1/ NI Vision

Le but de mon stage était de traiter des coupes de tomographie d'ostéosarcome pour rendre l'analyse possible. Comme nous pouvons le voir sur l'image 3A, nous n'apercevons pas le sarcome en question mais la structure ostéoïde fabriquée par l'ostéosarcome.

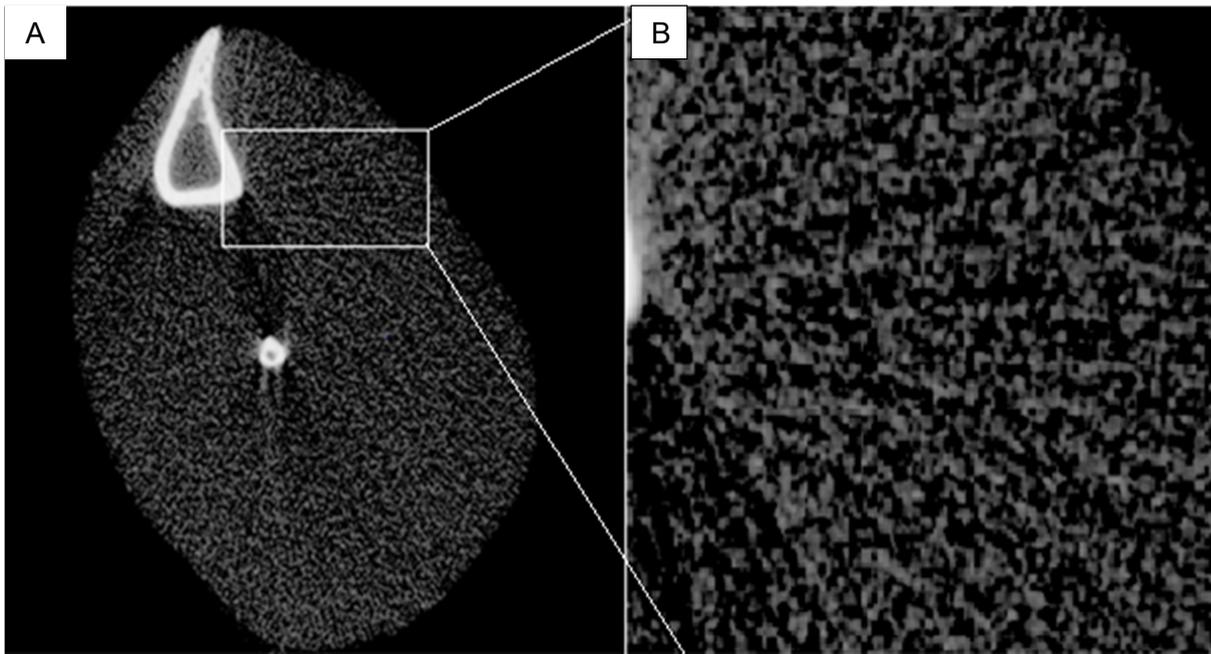
Mon premier objectif a donc été de faire apparaître la structure produite par le sarcome grâce au logiciel NI Vision, ce logiciel permet d'appliquer sur une image de nombreuses modifications comme un filtre, une extraction de couleurs. Je devais trouver les paramètres à appliquer aux images tout en ayant le moins d'erreurs possibles par rapport à l'image initiale.

Premièrement, il a fallu modifier le contraste, la luminosité de l'image pour faire apparaître la structure ostéoïde. Après de nombreux essais pour essayer d'obtenir l'image la plus parlante visuellement et claire, nous avons trouvé que le meilleur rendu était avec un Lookup logarithmique. C'est une fonction qui a des valeurs de luminosité, contraste préenregistré qui favorise les faibles luminosités. Ci-dessous le résultat du rendu pour une image.



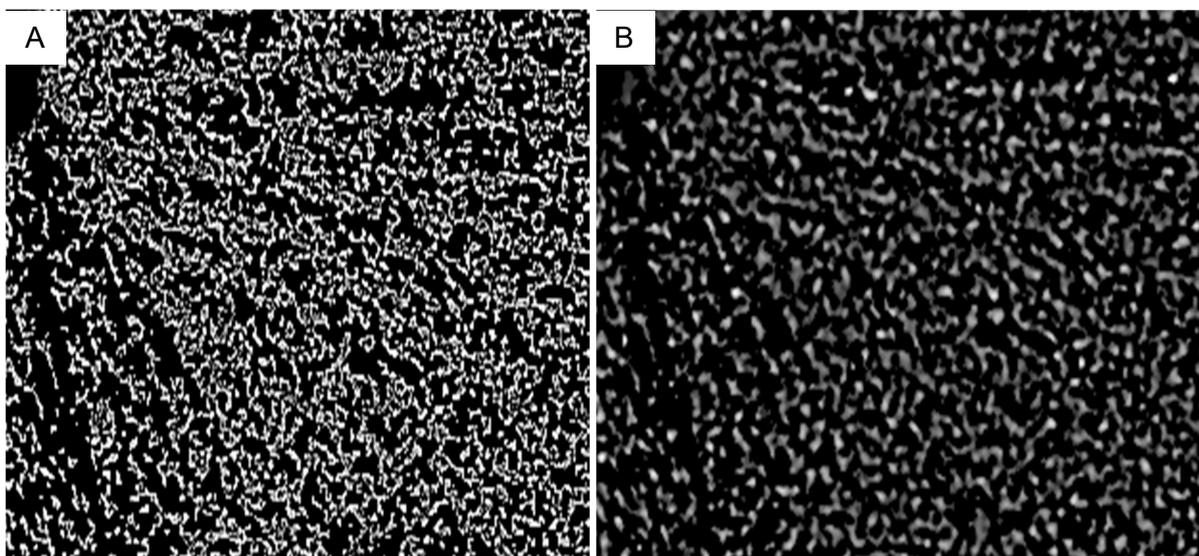
*Image 3: A) Coupe tomographique sans l'application du Lookup pour l'image 1478  
B) Coupe tomographique avec l'application d'un Lookup pour l'image 1478*

Nous voyons qu'après application du lookup, une immense masse grise apparaît et de taille assez importante autour de l'os, c'est la structure ostéoïde. Celle-ci, en zoomant, paraît être composée de particules indépendantes (**Image 4**), c'est en réalité une mousse dense et compacte, par contre nous utilisons cet aspect particulière résultant de la structure 2D de la coupe tomographique pour l'étudier, pour exploiter les différents paramètres que nous voulons en tirer.



*Image 4: A) Coupe tomographique – Rectangle blanc correspondant à l'endroit du zoom  
B) Zoom sur une partie de la coupe tomographique du sarcome pour l'image 1478*

Ensuite il a fallu enlever l'os (la partie blanche) de l'image pour que lors de l'obtention des paramètres, ses valeurs n'interviennent pas. Pour cela, il nous a fallu jouer avec le seuil d'intensité pour ne garder que des valeurs dans un intervalle donné. Nous nous sommes aussi rendu compte au cours des tests sur l'image, que le meilleur rendu que nous avons pu obtenir était en appliquant un *filtre laplacien* avant la fonction seuil (c'est un filtre de convolution qui met en valeurs les détails qui ont une variation rapide de luminosité).



*Image 5: A) Zoom sur l'image 3 traitée sans filtre Laplacien  
B) Zoom sur l'image 3 traitée avec un filtre Laplacien*

Ces images (**Image 5**) proviennent d'un traitement de l'image 4A, nous pourrions nous dire que l'image A ci-dessus est la plus nette, la plus claire tandis que l'image B est plus sombre, plus difficile à analyser. Par contre si nous regardons au niveau des particules, nous remarquons que celles de l'image 5A ne sont pas identiques à celles de l'image 5B, elles ont

été déformées. Il y a donc une modification des particules lors d'un traitement sans filtre Laplacien.

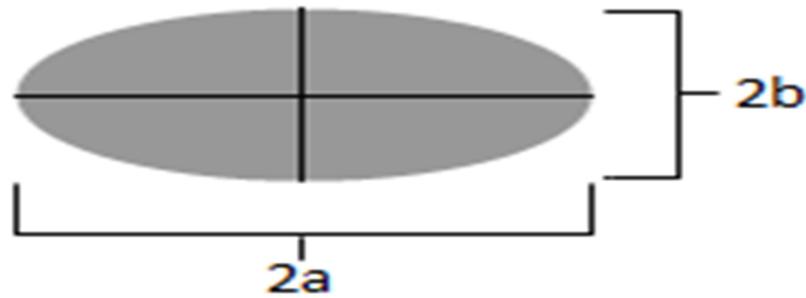
Nous souhaitons maintenant obtenir les données des particules de l'image, pour d'une part les traiter, et d'autre part affiner le seuil appliqué sur l'image. Nous avons tout d'abord effectué un filtrage des particules pour enlever celles plus petites que 5 pixels car cela nous donnait un nombre de données trop important à traiter de l'ordre des millions, que les logiciels comme Excel n'arrivent pas à traiter. Nous avons utilisé la fonction *Analyse des particules* de NI Vision pour obtenir les valeurs des paramètres des particules. Ces modifications ont été appliquées pour une seule image, nous avons adapté ce processus en une boucle répétable sur LabVIEW pour les 1920 images restantes.

## 2/ LabVIEW

LabVIEW est un logiciel de développement de systèmes pour les applications de test, de mesure et de contrôle/commande, qui permet d'accéder rapidement au matériel et aux informations sur les données. Il nous a permis d'automatiser le traitement des images, l'acquisition des données et l'enregistrement de celles-ci dans des bloc-notes. Ce logiciel est une extension de NI Vision, les modifications créées précédemment sur les images ont été transféré sur LabVIEW pour la création d'un programme. Ce programme a été en perpétuelle évolution au cours de mon stage, dû aux modifications que nous voulions appliquer aux images et aux nouveaux paramètres voulus. Voir en **Annexe 1 page 23-24**, une des dernières versions de ce programme.

Ce programme peut être séparé en 3 parties distinctes, la première partie est le traitement de l'image, l'application du seuil (IMAQ Threshold), du Lookup (IMAQ MathLookup), cette partie a été en changement constant car à un certain moment du stage, nous avons voulu enregistrer les images après chaque étape de traitement. La deuxième partie du programme est l'acquisition des paramètres par l'application de *particle analysis*, et l'organisation de ces paramètres, d'un tableau où ils étaient initialement enregistrés pour les sauvegarder dans des bloc-notes séparés. Cette partie est à la fin de la boucle, les deux parties sont comprises dans une boucle *while* qui répète tout le processus de traitement d'image et de séparation de colonne autant de fois que nous le souhaitons, ici nous le voulons pour chaque image, donc 1921 itérations. La dernière partie qui est en dehors de la boucle *while* est l'enregistrement des données de chaque paramètre dans un bloc-notes séparé et nommé par le nom du paramètre.

Les paramètres qui ont été calculés et trouvés les plus pertinents parmi tous les paramètres que proposait le logiciel NI vision sont: la **Surface** (taille particules en pixel), le **Périmètre** (contour de la particule en pixel), l'**Équivalent ellipse majeur** (longueur totale du grand axe de l'ellipse qui a la même surface et le même périmètre qu'une particule, égale à  $2a$  (**Image 6**)), l'**Équivalent ellipse mineur** (égale à  $2b$  - **Image 6**), l'**Orienta-tion** et la **Compacité** ( $S/B*H$ ).

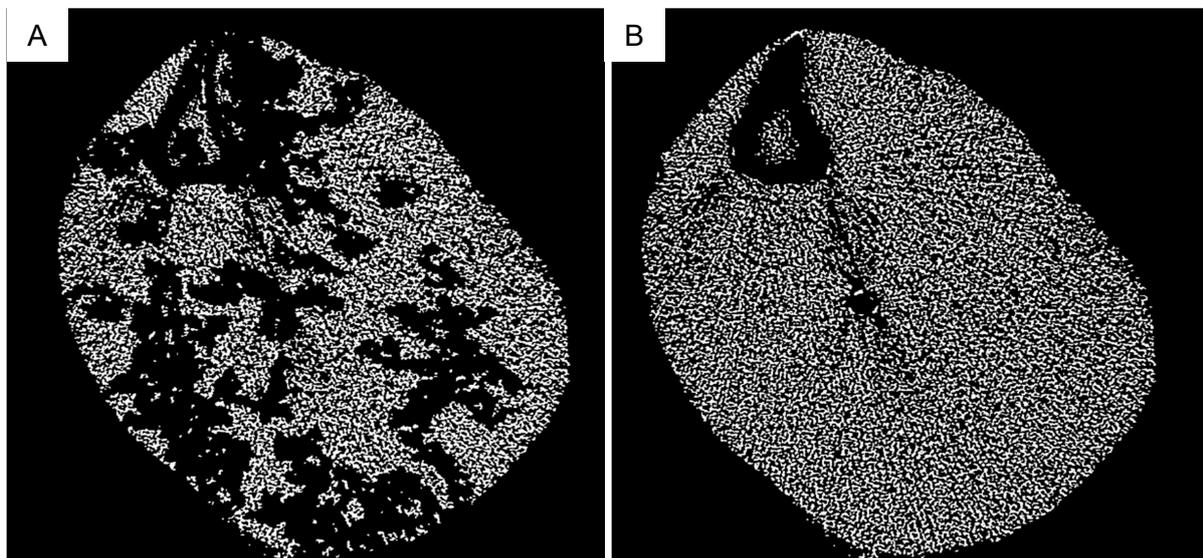


*Image 6: Schéma de L'Équivalent ellipse majeur et mineur*

### 3/ Le seuil

Nous avons remarqué que la fonction *seuil* nous permettait de binariser l'image, ce qui permettait d'y appliquer la fonction *analyse de particules*. Le seuil nous permet aussi de limiter, lors de l'analyse des particules, les grosses particules faisant 2000 pixels sur 2000 pixels par exemple. Ces particules n'étant qu'une erreur de calcul, il fallait à tout prix les limiter. Donc un des problèmes majeurs lors du traitement d'image, était "Quel seuil appliquer à l'image?". Ce seuil est extrêmement important puisqu'il va déterminer la taille des particules. Si la valeur du seuil est bonne, nous avons un ensemble constitué de 2000 particules. Par contre, si le seuil est mauvais, nous avons la structure ostéoïde qui ne sera composé que de grosses particules avec des surfaces dépassant les 1000 pixels, l'image ne comporterait plus que 300 particules.

Pour nous rendre compte de ce problème, nous avons appliqué un filtre qui enlève les particules supérieures à 1000 pixels (**Image 7**) et nous pouvons observer la différence de qualité des résultats dans les images ci-dessous.



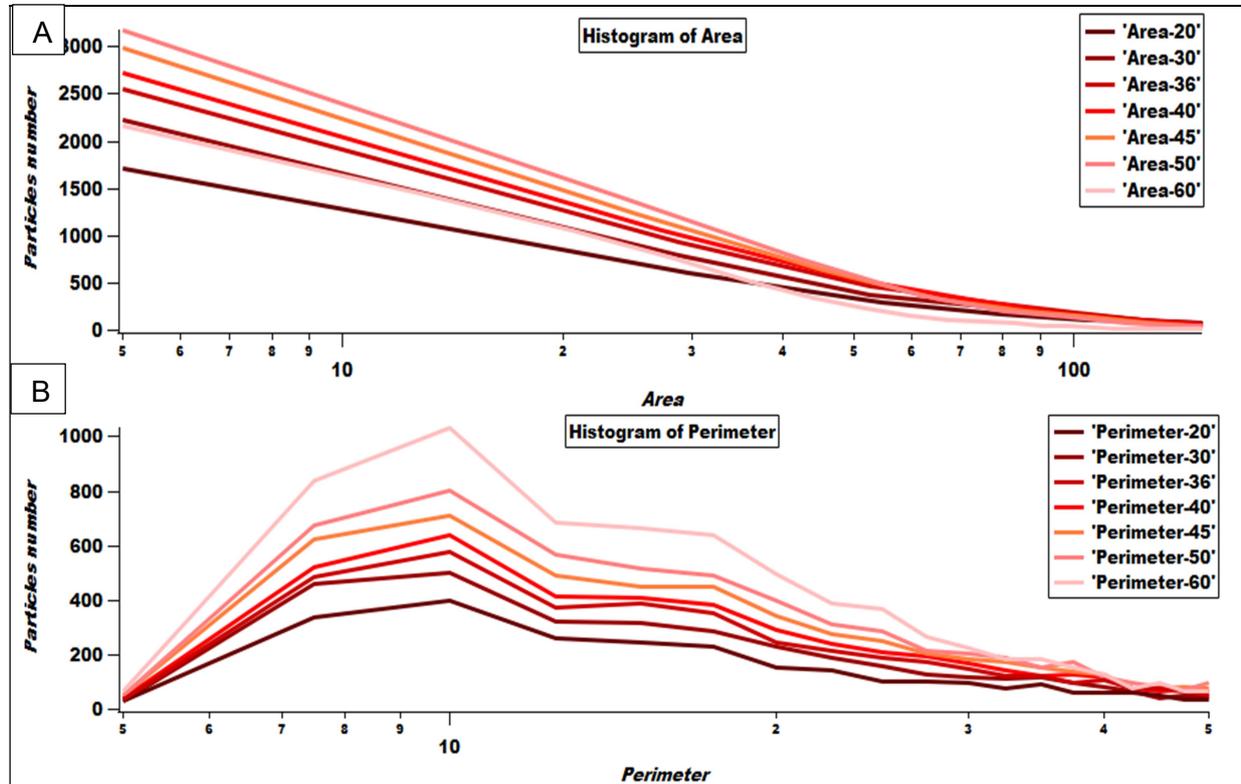
*Image 7: A) Résultats après un filtre de particules pour un mauvais seuil pour l'image 1478*

*B) Résultats après un filtre de particules pour un bon seuil pour l'image 1478*

Nous remarquons que nous avons une perte de données très importante dans l'image 7A et à quel point le seuil est important dans l'obtention de nos résultats. Pour réussir à trouver le bon intervalle, il nous a fallu appliquer plusieurs seuils aux images tout en exportant leurs données, et comparer leurs valeurs via des histogrammes. En mettant une

valeur maximum du seuil à 255 et en ne modifiant que le minimum, une gamme d'échantillons allant de 0 jusqu'à 254 avec un pas de 10 a été effectuée.

Par méthode empirique, la gamme de 36 à 50 a été choisie, cette gamme était la plus appropriée et celle avec le moins de pertes. Nous avons élargi la gamme de 20 à 60 pour prouver le constat empirique. Nous avons donc étudié les paramètres des images à ces différents seuils pour trouver le bon.



*Image 8: A) Histogramme de la surface pour des seuils différents pour l'image 1848*

*B) Histogramme du périmètre pour des seuils différents pour l'image 1848*

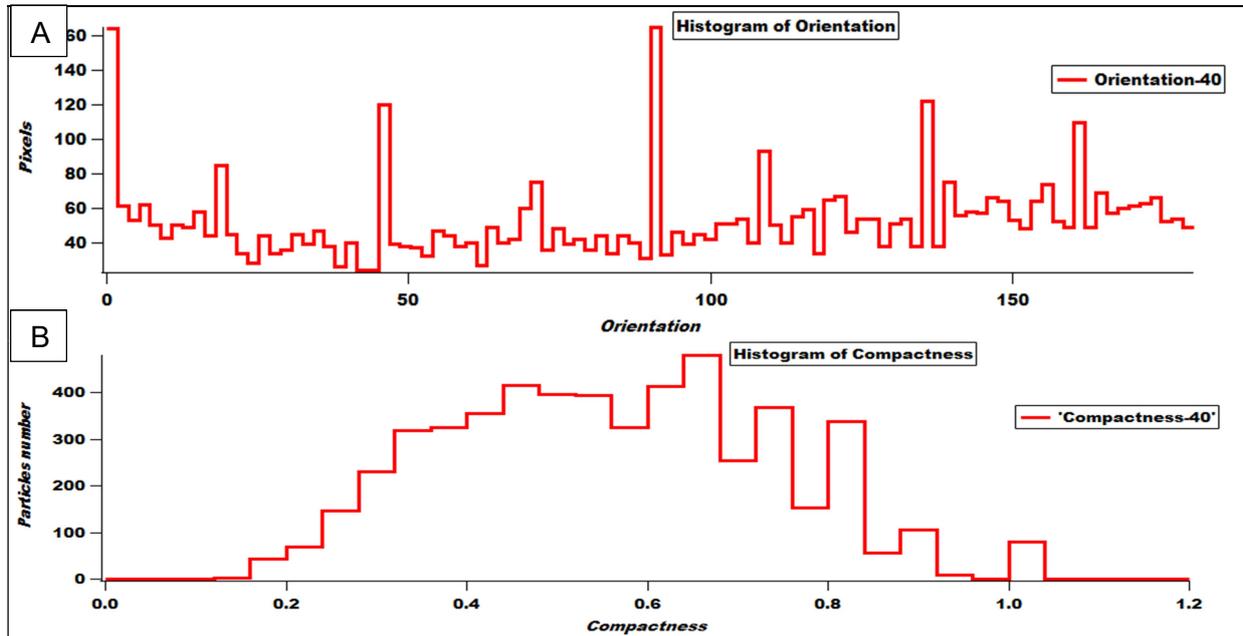
Nous obtenons des histogrammes en points reliés et pas en colonnes, les valeurs sont données en pixels. Grâce à ces histogrammes (**Image 8**), nous avons pu déterminer quel seuil serait le plus adapté, nous avons directement écarté 60 car il possède des valeurs trop importantes pour leur périmètre, nous voyons aussi au niveau de la surface que pour 60, le nombre de petites particules s'effondre. Nous avons aussi enlevé 20 et 30 car nous voulions le plus de particules possible pour l'étude statistique et c'est eux qui en ont le moins. 36 et 50 étant les valeurs limites de la gamme initiale, nous les avons écartés par mesure de sécurité. Il ne nous restait plus qu'à décider entre 40 et 45, nous avons pris 40 car c'est la valeur de seuil qui enlevait le moins de pixel à l'image traitée. Une fois le seuil de 40-255 est défini, nous avons pu l'appliquer à toutes les images et comparer les valeurs des paramètres introduit précédemment de toutes les images.

### III/ Traitement des données

#### 1/ Tri des données

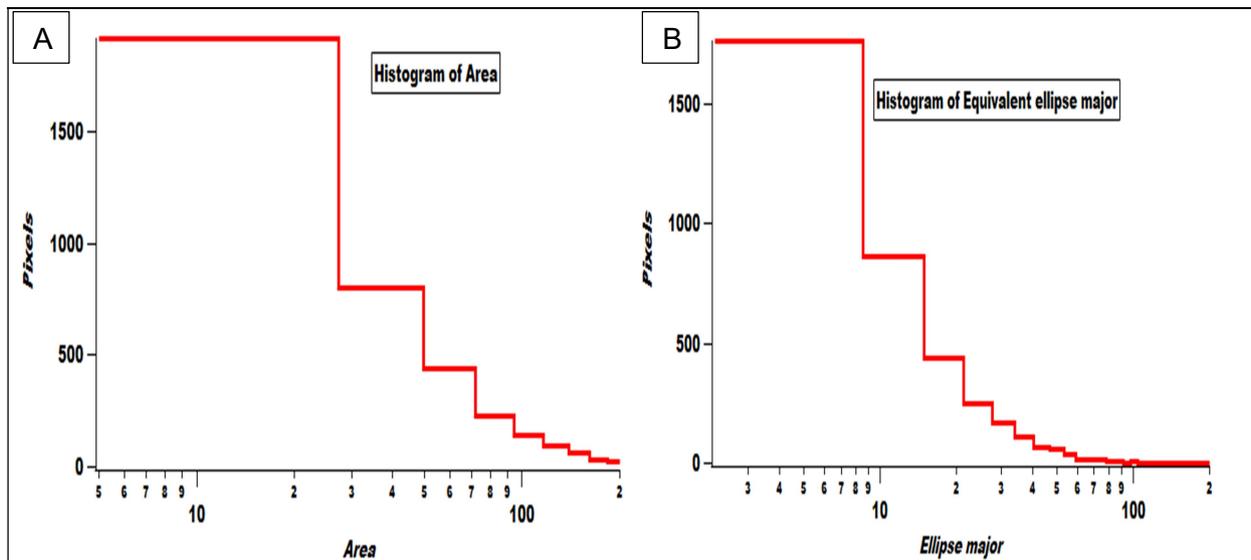
Pour commencer, nous avons traité les données sur Igor en construisant un histogramme pour chaque paramètre. Malheureusement Igor ne pouvant pas faire un histogramme regroupant les données des 1921 images, nous avons dû faire un histogramme seulement pour une fraction des images.

Tout d'abord, nous avons étudié en particulier certains paramètres pour établir si les données prenaient une forme exploitable, comme la compacité et l'orientation des particules.



*Image 9: A) Histogramme de l'orientation pour l'image 1848  
B) Histogramme de la compacité pour l'image 1848*

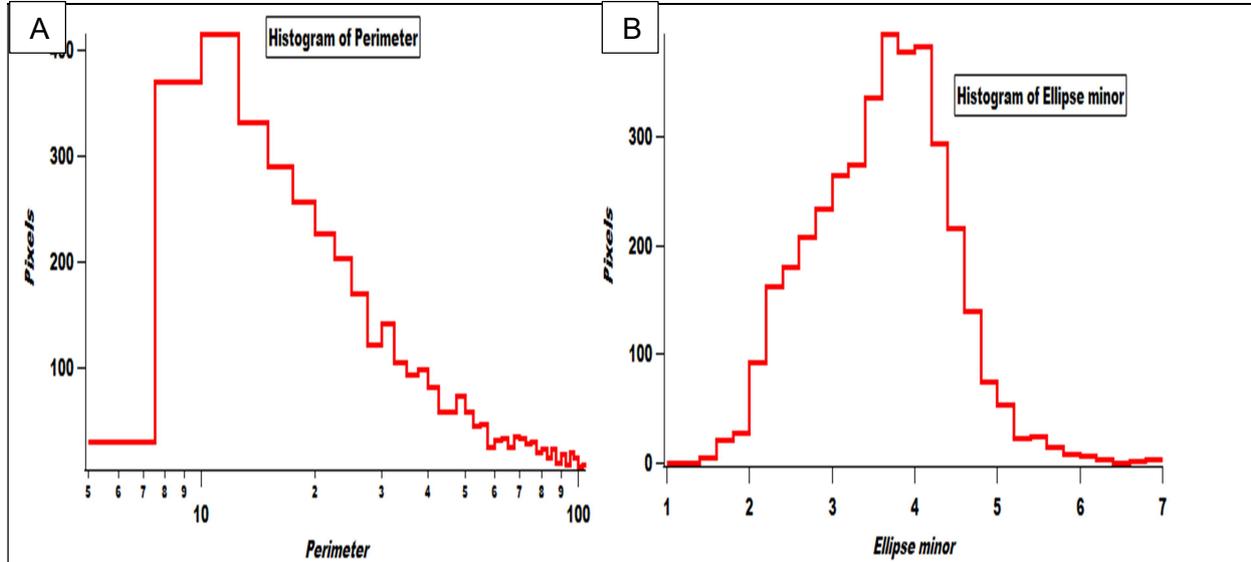
Au vu des résultats sur ces paramètres qui sont consistants sur l'ensemble des échantillons (**Image 9**), nous nous sommes rendu compte que l'orientation n'était pas un paramètre pertinent à visualiser. Nous pouvons voir que l'orientation présente plusieurs pics, dispersés et inconstants suivant les images. Nous pouvons mettre ces effets sur le compte de la pixellisation des petites particules, ou d'un effet d'ombre sur certaines images modifiant les mesures, certaines particules sont sans orientation. La compacité est elle aussi écartée à cause du calcul dont elle est issue. Nous ne savions pas exactement quelles valeurs le logiciel utilisait comme base et hauteur. En regardant la compacité, et au vu du calcul dont elle est issue, nous n'avons observé aucune tendance particulière que nous puissions exploiter. Maintenant, nous allons regarder les résultats pour l'image 1478 qui correspond au tibia.



*Image 10: A) Histogramme sur les résultats de la surface pour l'image 1478*

*B) Histogramme sur les résultats d'équivalent ellipse majeur pour l'image 1478*

Nous avons une distribution de la surface des particules (**Image 10**) où les petites surfaces dominent. Les valeurs de la surface commencent à 5 car nous avons enlevé toutes les particules inférieures. Le comportement de l'histogramme d'équivalent ellipse majeur est similaire à celui de la surface.



*Image 11: A) Histogramme sur les résultats du périmètre de l'image 1478*

*B) Histogramme sur les résultats de l'Ellipse mineur de l'image 1478*

Le périmètre (**Image 11**) augmente jusqu'à un pic à 12 pour presque 400 particules puis diminue, le périmètre commence à des valeurs de 10 puisque nous avons enlevé toutes les particules de moins de 5 pixels pour la surface, dont le périmètre est de minimum 10. Nous avons aussi l'équivalent ellipse mineur qui est centré autour d'un seul pic de 3.8. Pour rappel l'équivalent ellipse mineur est la longueur totale du grand axe de l'ellipse qui a la même surface et le même périmètre qu'une particule, égale à  $2b$  (**Image 6**). Nous voyons que nous avons un lien entre la surface et le périmètre qui n'offre pas de disparité en dehors d'une certaine plage. Nos particules ont des paramètres de déformations limités.

A la vue de ces constatations sur les 4 paramètres restants, nous avons décidé de faire une étude statistique de ces paramètres en calculant: la **moyenne**, la **médiane** (valeur  $x$  permettant de couper l'ensemble des valeurs en deux parties égales), le **1<sup>er</sup> quartile** et **3<sup>ème</sup> quartile** ainsi que l'**écart type** (mesure de dispersion de données) pour chacun des paramètres introduit précédemment et pour toutes les images que nous possédons, soit les 1921 coupes. Nous introduisons aussi un nouveau paramètre que nous avons calculé pour remplacer la compacité précédemment enlevée, ce nouveau paramètre est la surface sur le périmètre.

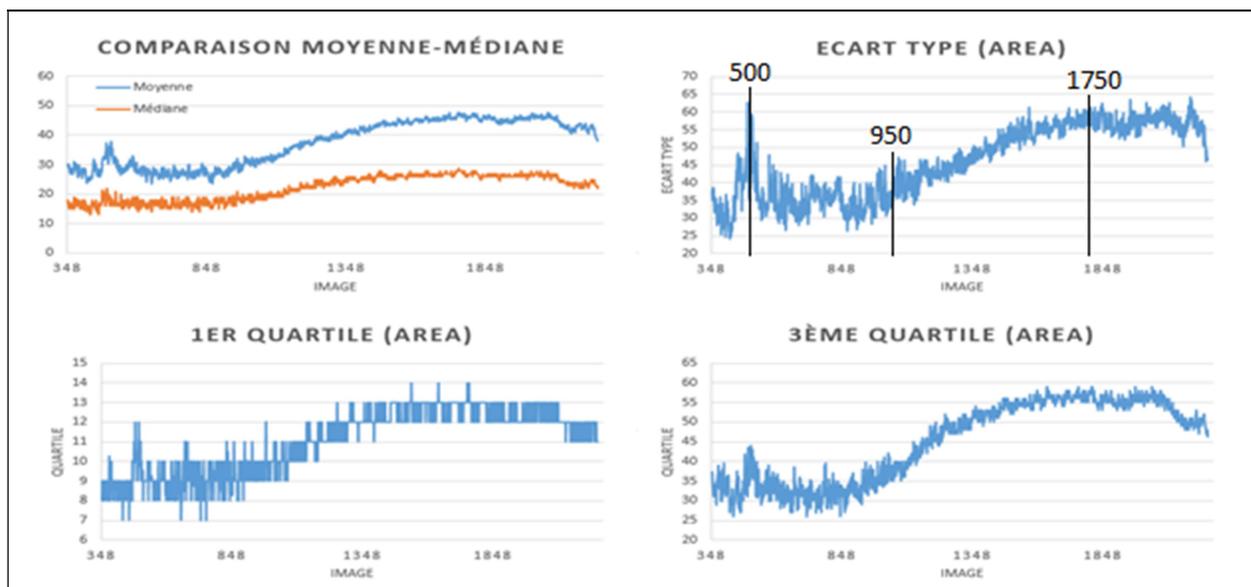
## 2/ Etude Statistique

Nous allons d'abord observer le nombre de particules en fonction de l'image concernée, pour nous aider à la compréhension des résultats qui vont être obtenus.



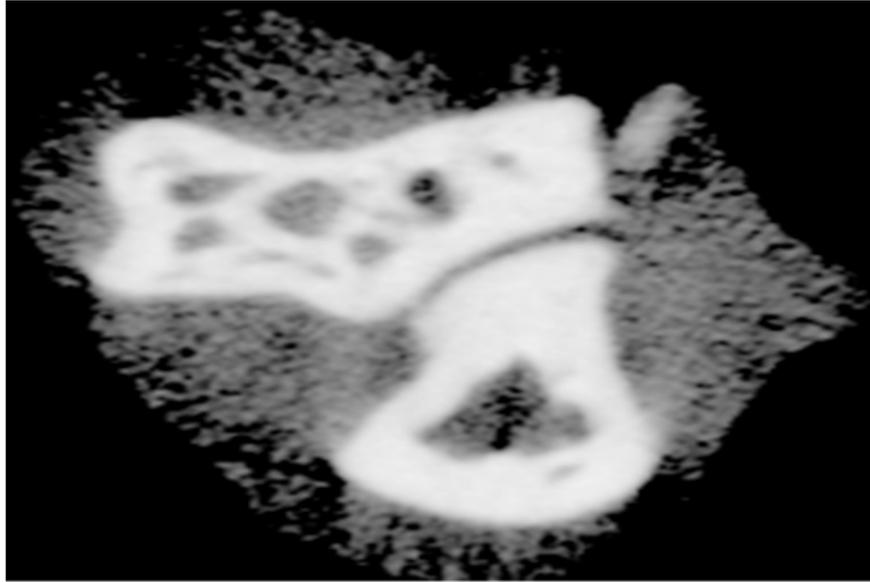
*Image 12: Graphique du nombre de particules en fonction de l'image correspondante*

Nous voyons sur le graphique (**Image 12**) que le nombre de particules augmente à partir de l'image 950 après une longue stagnation depuis l'image 348 et avec un très faible nombre de particules. Il se stabilise à un maximum vers 1750, s'ensuit une chute du nombre de particules après cette image et jusqu'à la dernière. Nous voyons donc un maximum au niveau de l'image 1750, nous avons donc tiré la conclusion que cette image correspond à l'endroit du site d'injection des cellules cancéreuses sur la souris, étant donné que l'image correspond à la zone située à 1/3 de la hauteur du tibia.



*Image 13: Résultats des nouveaux paramètres pour la surface*

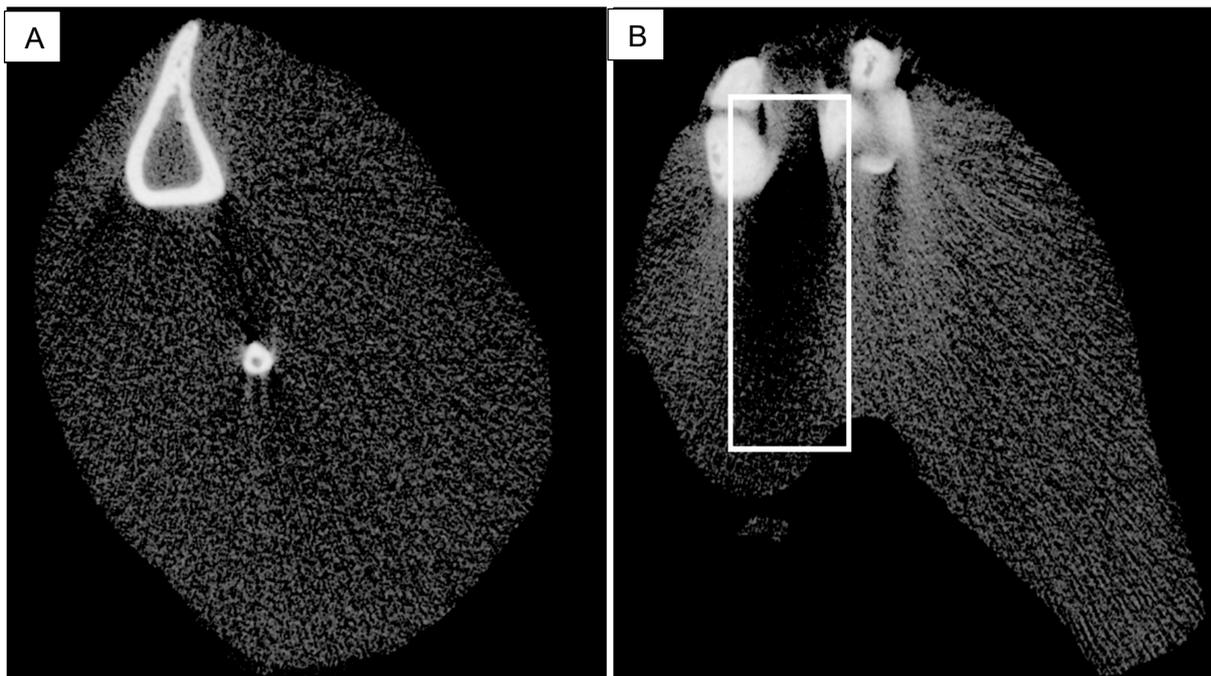
Nous pouvons voir (**Image 13**) que les graphiques obtenus ont un comportement similaire, en effet nous avons des valeurs quasi constantes au début mais avec un pic vers l'image 500 et une pente ensuite commençant vers l'image 950 pour se stabiliser vers l'image 1750, s'ensuit un léger creux et une descente après l'image 2100. Nous avons presque le même comportement que sur l'image 12 sauf au niveau du pied (entre l'image 348 et 950) où nous avons un gros pic, au contraire de l'image 12 où c'est constant, nous pouvons par contre remarquer qu'à cet endroit il y a moins de 500 particules.



*Image 14: Coupe tomographique du pied pour l'image 417*

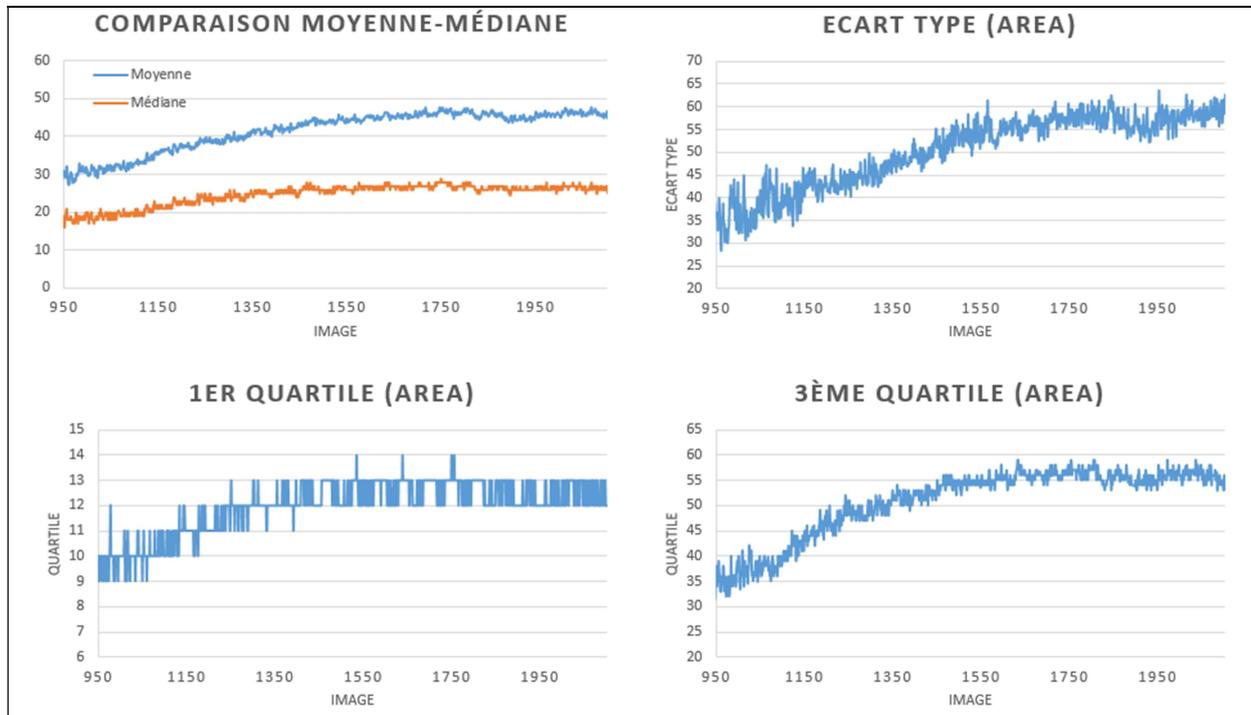
En effet le pied (**Image 14**) étant constitué essentiellement de tendons, l'ostéosarcome ne peut s'étendre autant qu'il le fait dans le genou ou le tibia, donc les résultats obtenus à cet endroit ne peuvent être pertinents. Ça nous pose la question de savoir "Quand est ce que les valeurs obtenues sont fiables?", en effet le pic observé aurait pu nous laisser entendre une anomalie et nous amener vers un mauvais raisonnement.

Nous avons donc étudié les résultats à partir de l'image 950, au début de la pente ascendante. Cette pente correspond à l'augmentation du nombre de particules et s'arrête lorsque nous avons atteint la valeur maximale (Image 1750). Après quoi nous avons des valeurs constantes puis une pente descendante, une chute sur tous les paramètres à partir de l'image 2100. Nous n'avons pu expliquer au premier abord ce comportement mais c'est en visualisant les images dont sont tirés ces résultats que l'explication a été trouvée.



*Image 15: A) Coupe tomographique du tibia pour l'image 1478  
B) Coupe tomographique haut du genou pour l'image 2220*

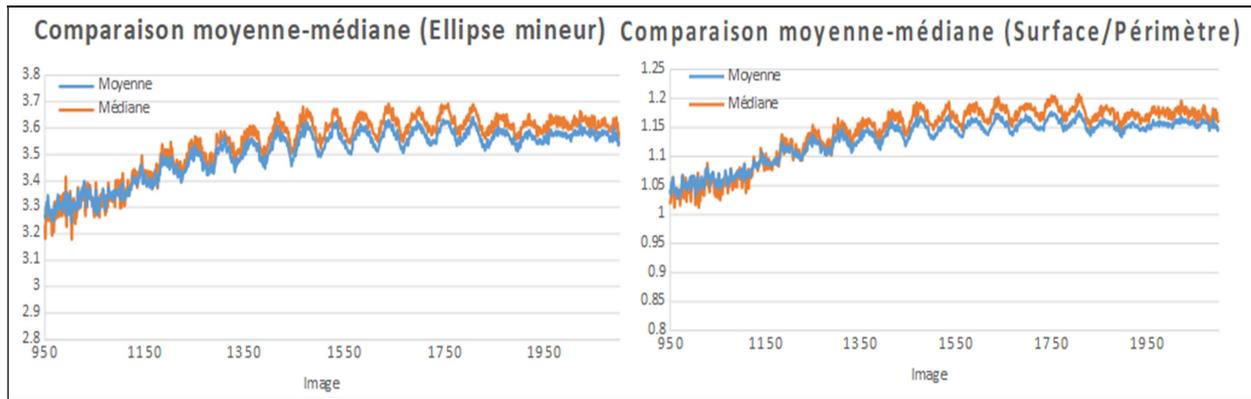
Nous voyons ici, dans l'encadré blanc (**Image 15**), une ombre. Nous avons remarqué qu'après l'image 2100, un effet d'ombre apparaissait couvrant de nombreuses particules. Cet effet d'ombre explique pourquoi nous avons une diminution sur les paramètres à cet endroit précis. Elle est due à la mesure et plus particulièrement à l'os qui a empêché la tomographie à cet endroit, nous n'avons pas ce problème avant car l'os étaient moins important, moins dense. Nous avons donc enlevé les données après l'image 2100 en plus de celle du pied.



**Image 16:** Résultats des paramètres pour la surface sur les images pertinentes

En regardant ces résultats un par un (**Image 16**), nous pouvons déterminer plusieurs choses. Tout d'abord nous voyons que plus nous montons dans la patte de la souris, plus nous avons de particules avec de grandes surfaces avec une dispersion importante. Nous remarquons aussi que le 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartile se ressemblent, la seule différence observable est due à la différence d'amplitude.

Nous pouvons aussi remarquer sur le graphique "comparaison moyenne-médiane" (**Image 16**) que ceux-ci sont similaires au niveau du comportement mais ils ne se superposent pas, c'est le signe d'une anisotropie de la répartition des particules. Etant donné que nous avons la médiane qui est inférieure à la moyenne, cela signifie que nous avons de plus en plus de petites particules. Les résultats que nous observons sur l'image 16 ne sont que pour la surface, nous avons aussi ces résultats pour le périmètre, l'équivalent ellipse majeur et mineur ainsi que le rapport surface/périmètre. Tous les résultats sont dans l'**Annexe 2 page 25-29**, nous voyons que l'apparence des graphiques d'un paramètre à l'autre ne fluctuent pas mis à part dans le cas de l'équivalent ellipse mineur et le rapport surface/périmètre (**Image 17**) où nous avons une nette fluctuation des valeurs.



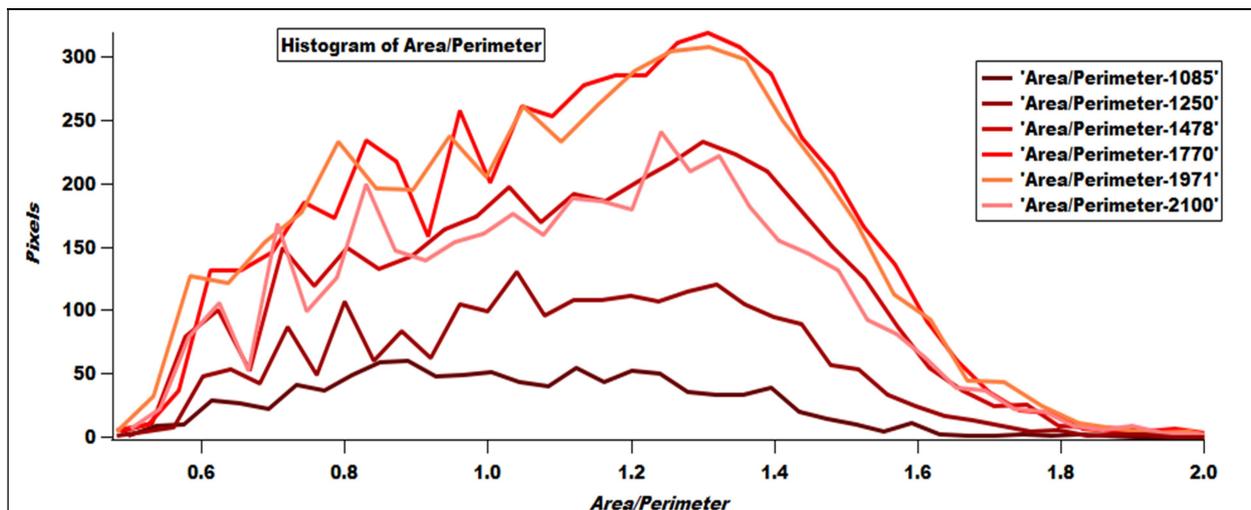
*Image 17: Graphiques comparant la moyenne et la médiane pour équivalent ellipse mineur et la Surface/Périmètre*

Nous avons constaté et vérifié par le calcul que ces fluctuations sont périodiques, c'est une information importante mais en regardant sur les images, nous n'avons observé aucun élément visuel prouvant cette répétition. Donc pour le moment, nous n'avons pu expliquer la cause de ces fluctuations.

Si nous revenons sur la comparaison de la moyenne-médiane, nous pouvons voir que pour l'équivalent ellipse mineur et pour le rapport surface/périmètre que les deux courbes se superposent à l'inverse des autres paramètres où ce n'est pas le cas. Cela impliquerait que nous avons une symétrie de la répartition du rapport surface/périmètre des particules. Or, nous avons dit que nous avons une anisotropie des particules d'après les résultats comparant la moyenne-médiane pour la surface, il nous faut donc savoir si nous avons une symétrie.

Nous avons décidé de retirer le paramètre Equivalent ellipse majeur car le logiciel d'acquisition des données, faisait correspondre les valeurs de l'ellipse majeur à celle de la surface. Equivalent ellipse mineur a aussi été retiré car son comportement correspond à celui de la surface/périmètre, étant donné que nous savons d'où provient ce paramètre ci au contraire d'ellipse mineur, nous ne gardons que le paramètre surface/périmètre.

Pour résoudre le problème de symétrie, nous avons étudié les paramètres sur différentes images prises à différents endroits caractéristiques de la patte de souris.



*Image 18: Histogramme du paramètre Surface/Périmètre pour 6 images de positions différentes de la patte*

Nous voyons sur cet histogramme (**Image 18**) que nous n'avons pas de symétrie visible pour les différents graphiques, nous pouvons donc rester sur l'idée que la répartition est asymétrique. Nous pouvons constater aussi que pour des valeurs de surface/périmètre inférieur à 1, nous avons des fluctuations assez importantes, avec plusieurs pics. Si le rapport est inférieur à 1, cela indique que la surface est plus petite que le périmètre, mais étant donné que nous avons supprimé toutes les valeurs de surface plus petite que 5, nous avons une limite de la valeur du périmètre.

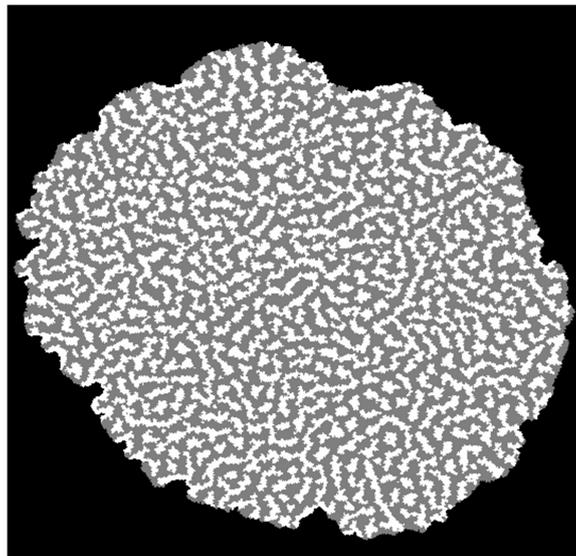
Comme nous l'avons dit précédemment, les particules qui en résultent sont très compactes. Nous nous rendons compte que plus nous remontons dans la patte, plus le nombre de particules compactes augmentent. En rappelant que le site d'injection est fait vers l'image 1750, correspondant à 1/3 du tibia en partant du haut de l'os, nous pouvons émettre l'hypothèse que nous avons des particules compactes qui se forment au départ de l'ostéosarcome et que plus nous nous éloignons du site de propagation, vers le pied et vers le genou, moins le nombre de particules compactes est important. Il pourrait aussi avoir une anisotropie radiale des particules, mais nous n'avons pas été en mesure de le déterminer.

## Conclusion

Au cours de ce stage, nous avons pu remarquer que nous avons de nombreuses données à traiter sur l'ostéosarcome, de nombreux paramètres à étudier. Malheureusement, une bonne partie d'entre eux se sont finalement retrouvés inutiles lors de l'exploitation. Nous avons pu néanmoins tirer plusieurs conclusions.

Tout d'abord, nous avons remarqué que nous avons des particules compactes au centre de l'infection, de grosses particules. Par contre, nous avons des particules moins compactes, plus petites et moins nombreuses aux extrémités verticales de l'ostéosarcome. Nous avons aussi une répartition globalement homogène en tranche des particules ainsi qu'une continuité des paramètres tout au long des images.

En parallèle avec ces mesures, une simulation mathématique d'après des calculs sur la structure de l'ostéosarcome (**Image 19**) a été faite par Arnaud BARDOUIL, doctorant à l'IPR. Nous voyons en noir le tissu sain, en blanc l'os et en gris l'ostéosarcome. Cette simulation semble fidèle aux observations faites sur les coupes mais il reste à vérifier que ce soit bien le cas pour l'analyse de particules.

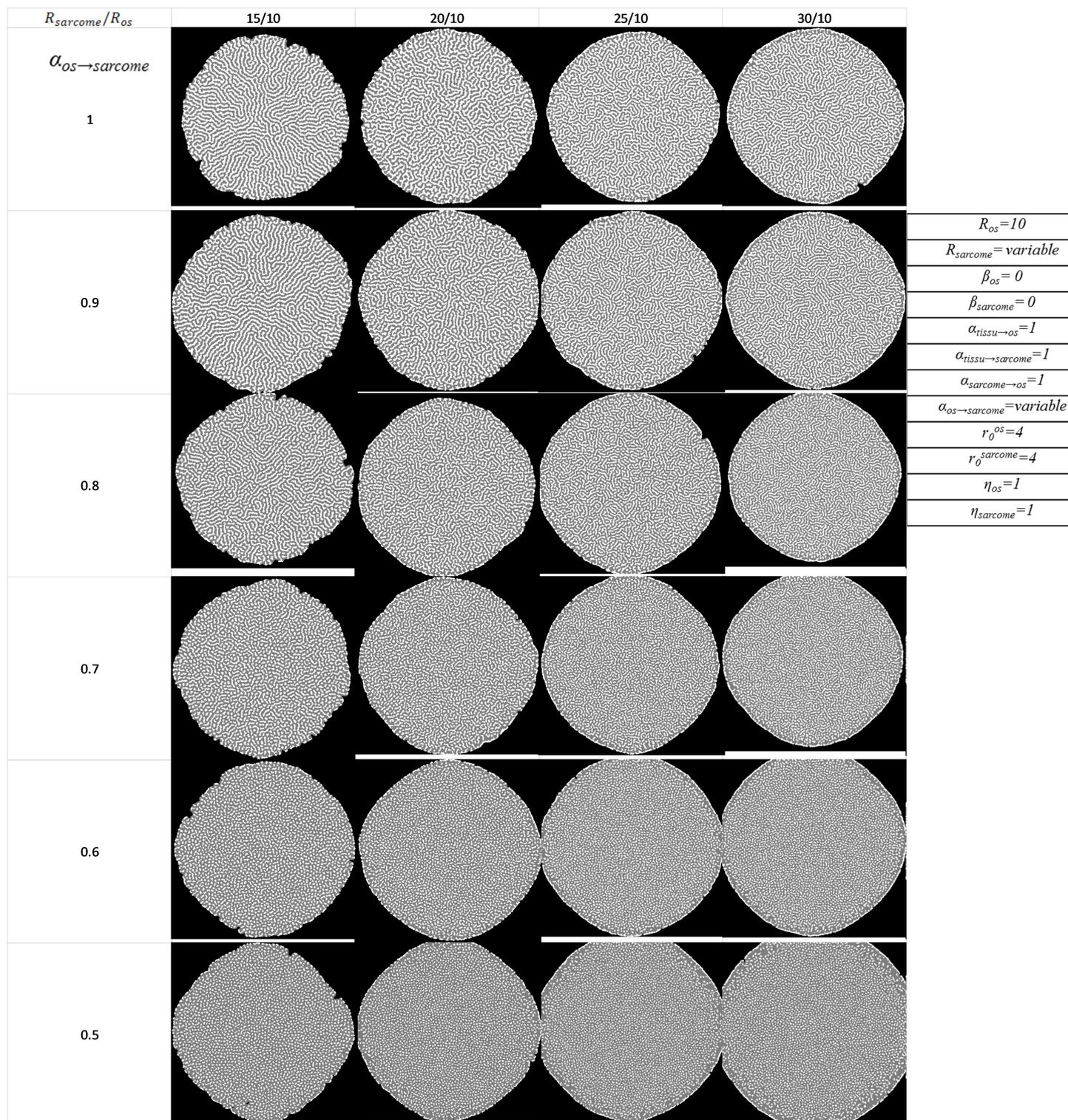


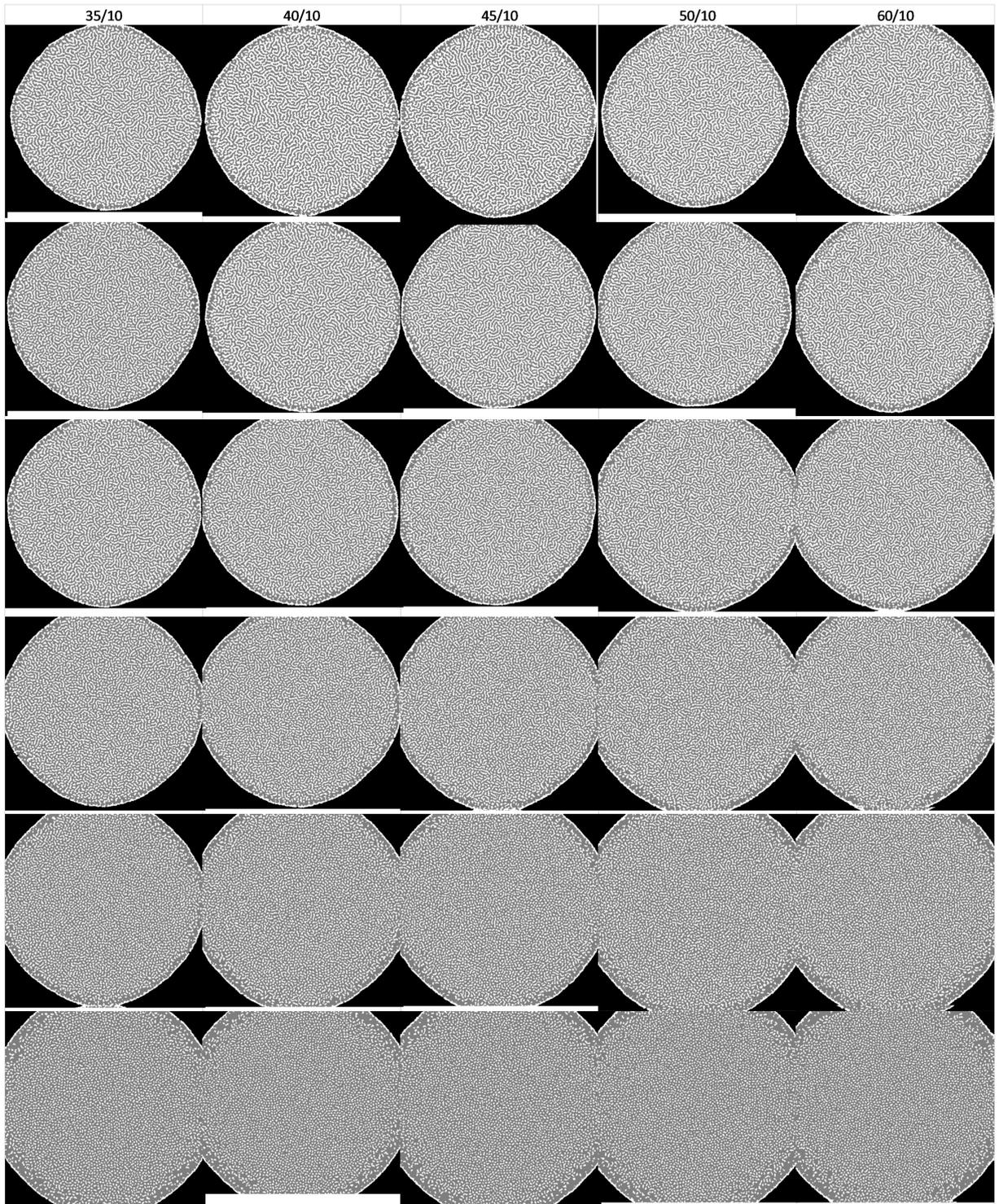
*Image 19: Simulation mathématique de l'ostéosarcome*

Pour finir, nous pouvons affirmer que nous avons besoin de faire de nouvelles observations sur de nouveaux sujets pour confirmer les résultats obtenus, de plus ce travail participe à un projet d'analyse de l'ostéosarcome qui nécessite une étude sur de nombreuses années.

## ANNEXE 5 : DIAGRAMMES DE PHASE

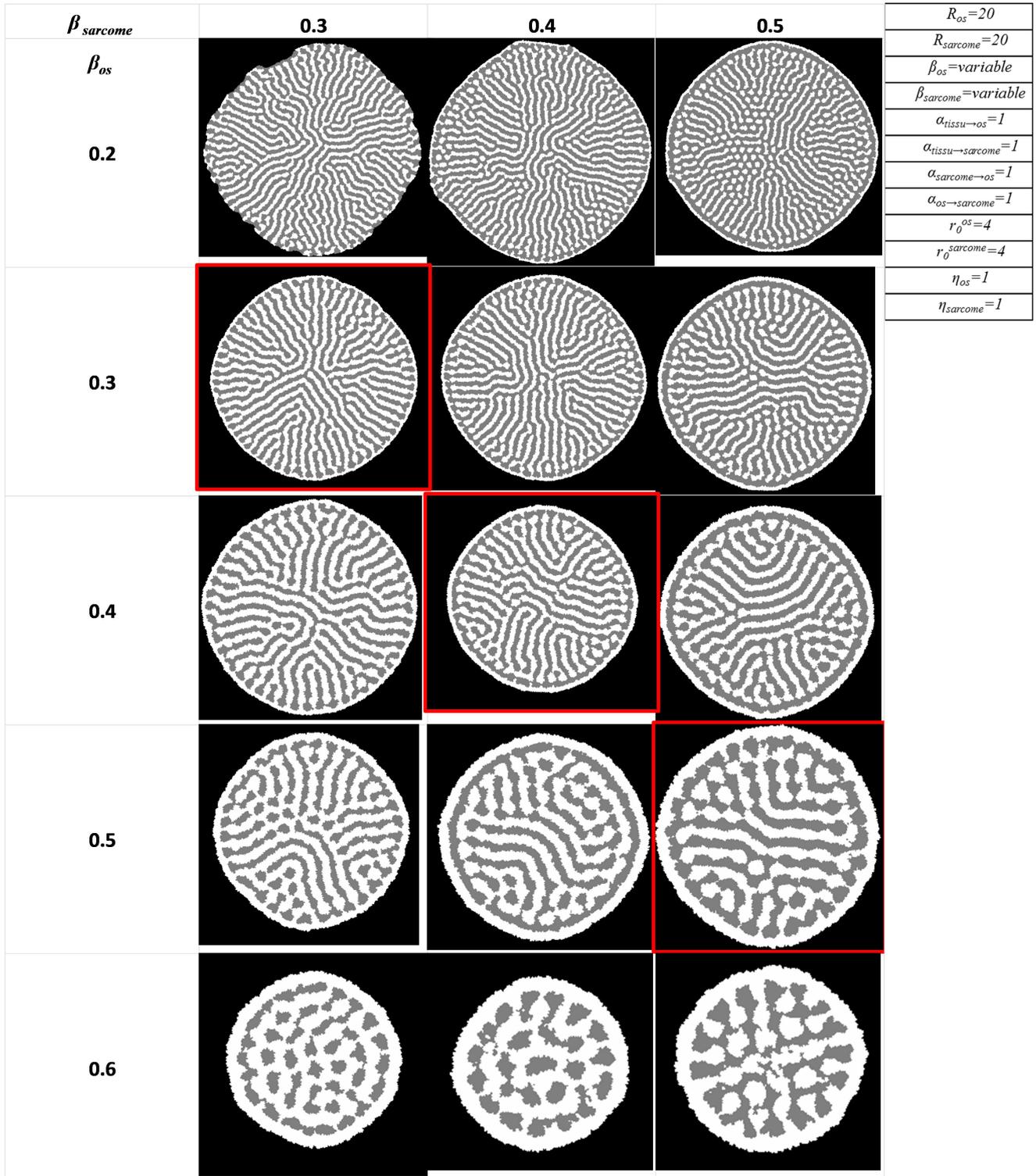
**Effets des rayons de portée  $R_{état}$  et d'un paramètre  $\alpha$**





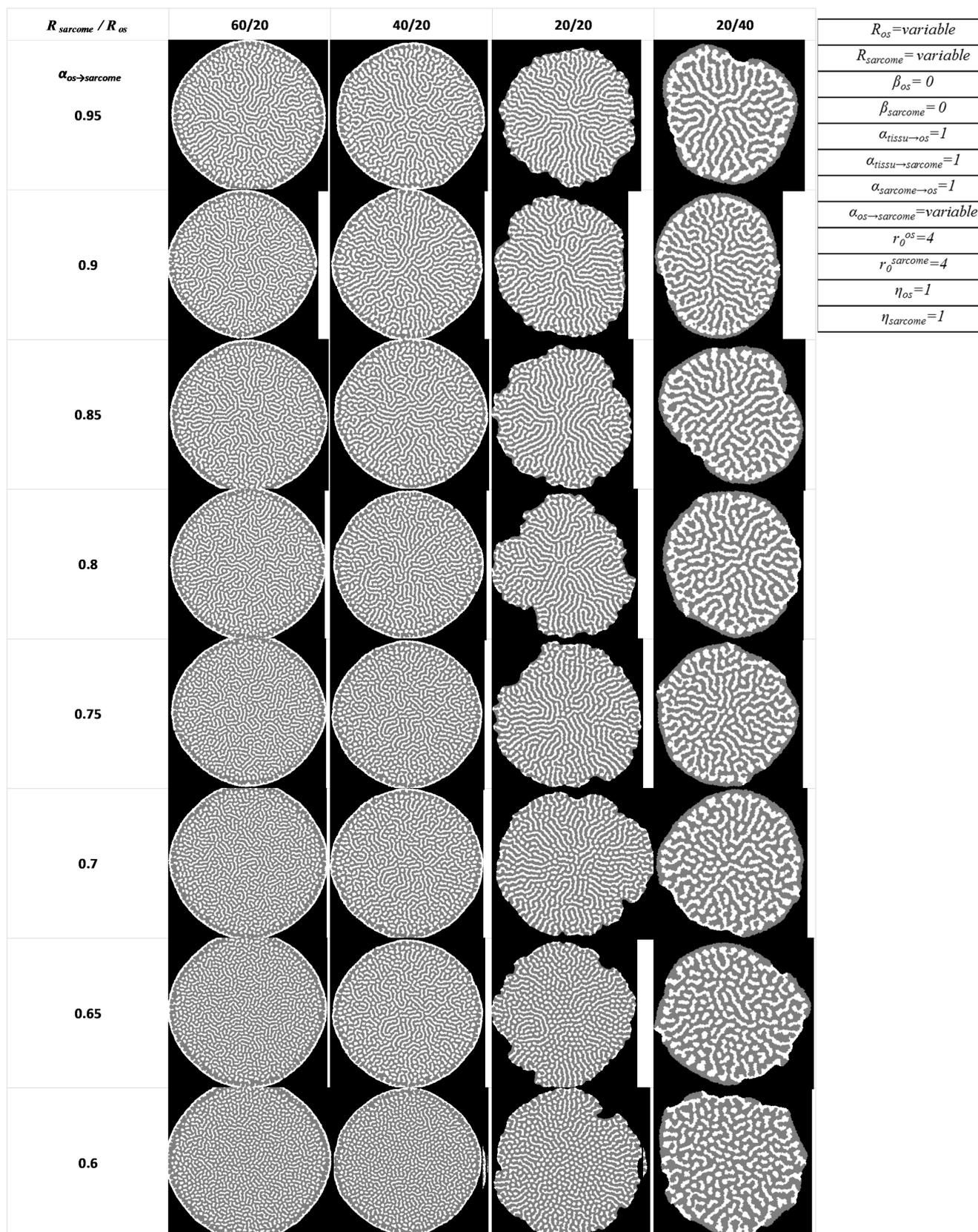
## Effets des seuils $\beta$ de transition d'état

Les structures des images finales sont identiques, le zoom est différent pour chaque image afin de maximiser la lisibilité.



## Effets des rayons d'influence $R_{état}$

Les structures des images finales sont identiques, le zoom est différent pour chaque image afin de maximiser la lisibilité.



# Simulation d'ostéosarcome : Analyse et traitement d'image

Par Karl BOURUMEAU

Sous la direction de Mr. Franck ARTZNER et de Mr. Arnaud BARDOUIL



*Figure 1 : Os de bras d'une femme inca momifiée d'une trentaine d'année datant de l'ère précolombienne*

## 1. Loi de distance

Dans un premier temps, la loi de longue distance appliquée est à action proche, elle diminue en fonction de la distance à l'espèce.

La nécessité d'une influence à longue distance est due à l'hypothèse inter catalytique, qui, sous son action exclusive sur l'automate, ferait progresser des lignes d'os et de sarcome, voir des surfaces unies progressant après des fronts de l'autre espèce : Le mécanisme de contact seul n'est donc pas suffisant. Pour cela, le modèle se base sur la diffusion d'une espèce chimique.

Nous nous intéressons à différentes lois de distance  $f(r)$  ; La première loi de distance utilisée est  $f(r) = 1 - \frac{r}{R}$  car simple à modéliser. Il s'agit d'une fonction affine décroissante de forme  $ax - b$ , qui a effet à proche distance : Plus la distance  $r$  (en pixel) s'approche de la valeur de son rayon d'influence limite  $R$ , plus son action est faible, jusqu'à devenir nulle pour  $r = R$  (Fig. 7).

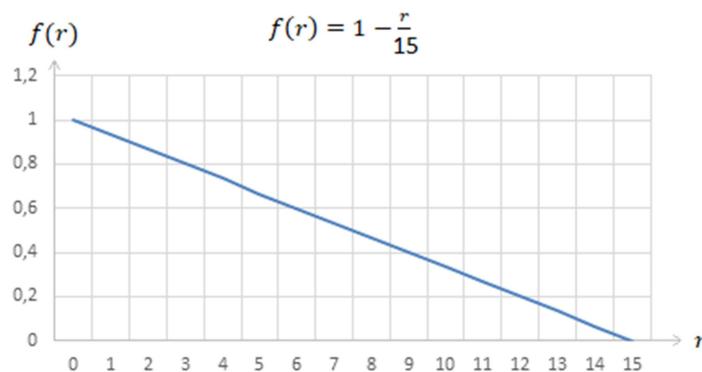
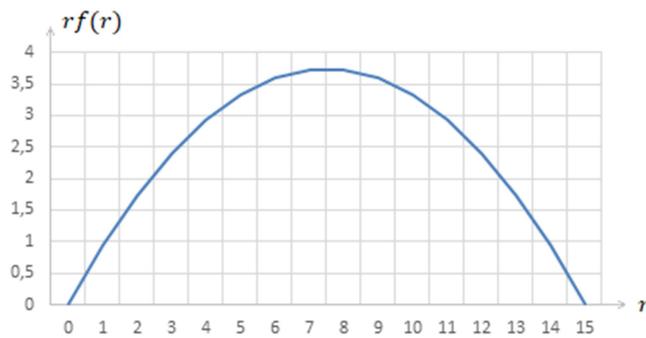


Figure 2 : Première fonction de distance pour un rayon d'influence  $R=15$

Nous nous intéressons également à la fonction  $rf(r)$  qui correspond à une forme simplifiée de la fonction  $2\pi r \times f(r)$  nous donnant la somme des influences des cases en fonction de leur distance à la case influencée. Dans le cas de notre exemple précédent, la distance d'influence maximale est située entre  $r = 7 \text{ pix.}$  et  $r = 8 \text{ pix.}$ , ce qui correspond à la moitié de notre rayon limite d'influence.

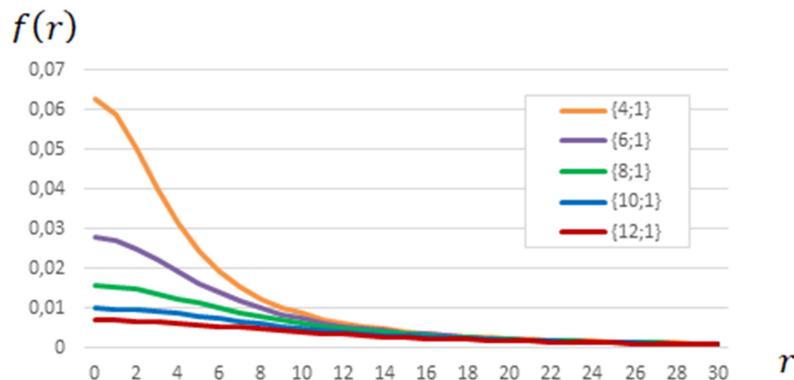
Figure 3 :  $rf(r)$ 

Ce modèle s'avère rigide dans la mesure où nous ne contrôlons ni la position, ni l'intensité de notre pic d'influence : Notre choix se porte alors sur les fonctions de forme Lorentzienne, L'étude de cette fonction de distance est un des objets de ce stage, la forme de cette fonction de distance s'écrit :

$$f(r) = \left( \frac{1}{(r^2 + R_0^2)} \right)^\eta$$

avec  $R_0$  paramètre Lorentzien,  $\eta$  paramètre de puissance de la Lorentzienne.

On définit un couple aux valeurs d' $R_0$  et d' $\eta$  comme :  $\{R_0; \eta\}$ . Nous déterminons l'influence des paramètres sur l'allure de la courbe pour  $R_0 = \{4; 6; 8; 10; 12\}$  avec  $\eta = 1$  (fig. 9).

Figure 4 : Allure de la Lorentzienne pour différentes valeurs de  $R_0$  avec  $\eta=1$  (noté  $\{R_0; \eta\}$ )

On remarque sur la courbe que  $R_0$  change l'influence à courte portée mais pas à longue portée. On donne également l'allure des Lorentziennes pour différentes valeurs de  $\eta$  avec  $R_0$  fixé à 8 :

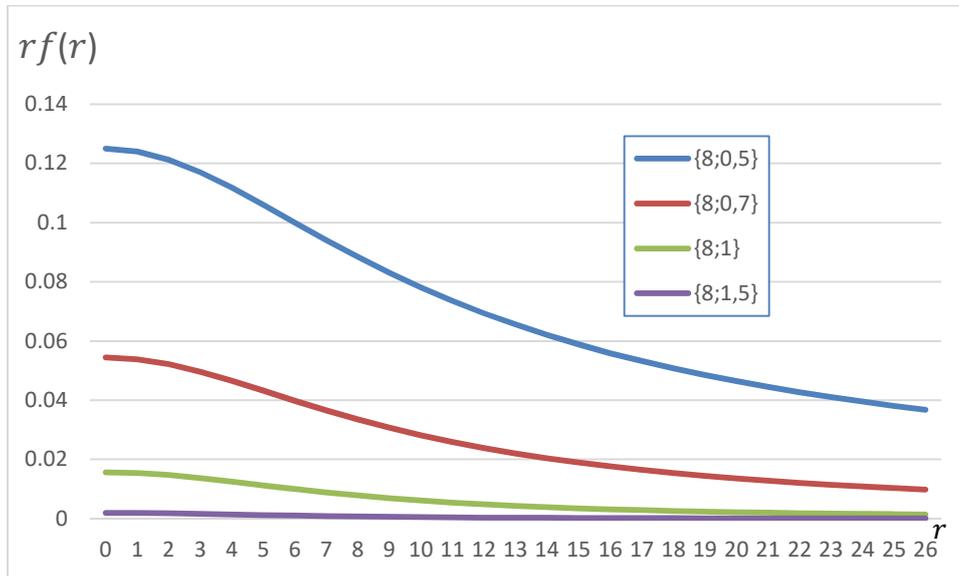


Figure 5 : Allure de la Lorentzienne pour différentes valeurs de  $\eta$  avec  $R_0=8$

On remarque que l'influence à courte portée augmente considérablement lorsque le paramètre  $R_0$  diminue ; On remarque également que plus  $\eta$  est petit, plus l'influence augmente à chaque point de distance. L'influence à longue portée diminue rapidement quels que soient les paramètres  $\eta$  et  $R_0$  utilisés.

La forme  $rf(r)$  de la Lorentzienne ci-contre nous renseigne sur l'intérêt de son utilisation : Lorsque  $R_0$  est le paramètre variable, on remarque un déplacement de la position du maximum d'influence, avec une diminution significative de l'influence à courte portée lorsque  $R_0$  augmente.

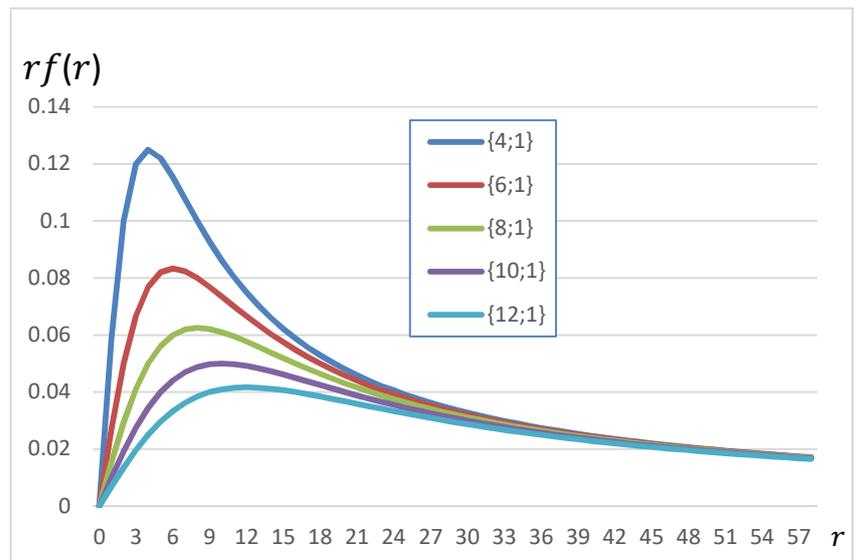


Figure 6 : Action du paramètre  $R_0$  sur la forme des  $rf(r)$

Lorsque le paramètre variable est  $\eta$ , on observe un comportement similaire, à  $R_0$  fixé : pour des variations de 3/10ème de  $\eta$ , l'amplitude est multiplié d'un facteur 6, tandis que la distance du maximum d'influence passe de 9 à 14 pixels.

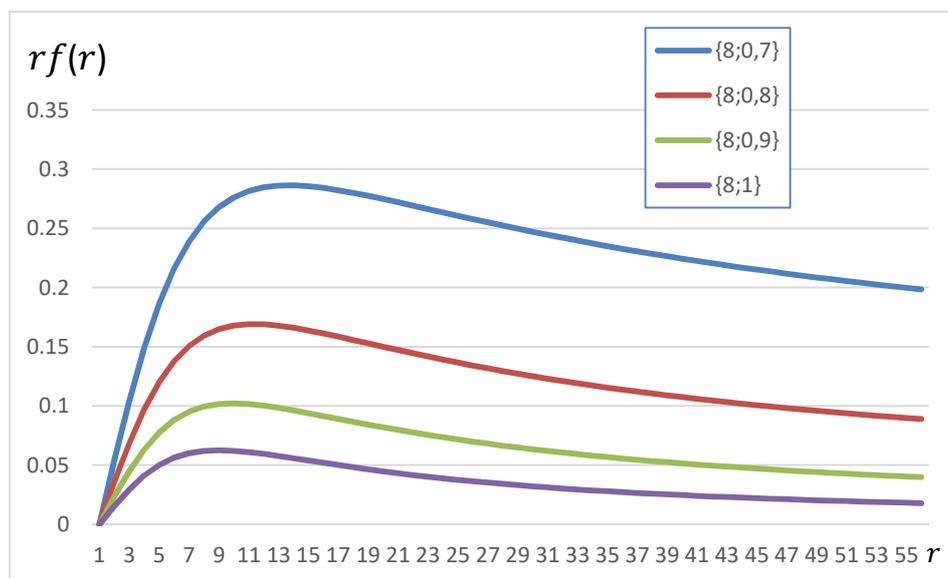


Figure 7 : Action du paramètre  $R_0$  sur la forme des  $rf(r)$

On remarque que  $\eta$  a un effet prépondérant sur l'influence à longue distance. Les formes  $rf(r)$  permettent d'observer la non nullité de l'influence à grande distance, ce que les Lorentzienne ne nous permettait pas d'observer.

Le modèle Lorentzien correspond davantage au processus biologique dans la mesure où il nous offre une vraie plasticité sur notre loi de distance avec seulement deux paramètres, ce qui nous permet, à l'aide de nos outils d'analyse, de dresser autant de comparaisons entre les résultats de la tomographie et ceux de la simulation qu'il y a de combinaisons différentes de  $(R_0 ; \eta)$ .

## 2. Outils d'analyse

On utilise pour analyser nos résultats certains outils nous permettant d'obtenir des comparaisons objectives et quantifiables. L'analyse se concentre essentiellement sur deux points : Le spectre de puissance<sup>(4)</sup> de notre résultat de simulation 2D ainsi que l'intégration radiale du spectre de puissance.

- **Le spectre de puissance** est une technique nous permettant d'obtenir les informations concernant l'organisation des cellules osseuses, leur orientation et l'agencement de ses voisins. Ces caractéristiques s'expriment à travers l'intensité dans l'espace réciproque, qui correspond aux distances caractéristiques entre éléments. Cette technique conserve uniquement la composante de puissance, et non la composante de phase. Elle s'exprime schématiquement comme :

$$TF \times \overline{TF}, \text{ avec TF : Transformée de Fourier.}$$

- **L'intégration radiale du spectre de puissance** nous donne la mesure de la distance caractéristique entre particules ainsi que le niveau d'ordre du système (largeur du pic). L'intensité du pic peut trouver son équivalent dans la fréquence spatiale de réapparition de la distance caractéristique au sein de notre structure.
- **La fonction de corrélation de paires** est l'outil qui nous fournit l'information concernant la forme moyenne des particules, leur orientation et leur organisation générale.

Nous partons des résultats obtenus par tomographie et par simulation et nous leur appliquons les traitements d'image susmentionnés. Nous prenons un exemple au hasard avec les paramètres  $R_0 = 4$  et  $\eta = 2$ .

Dû aux effets de bord, on sélectionne uniquement les zones que l'on juge représentatives de chacun des échantillons, zones que l'on soumet ensuite à l'analyse.

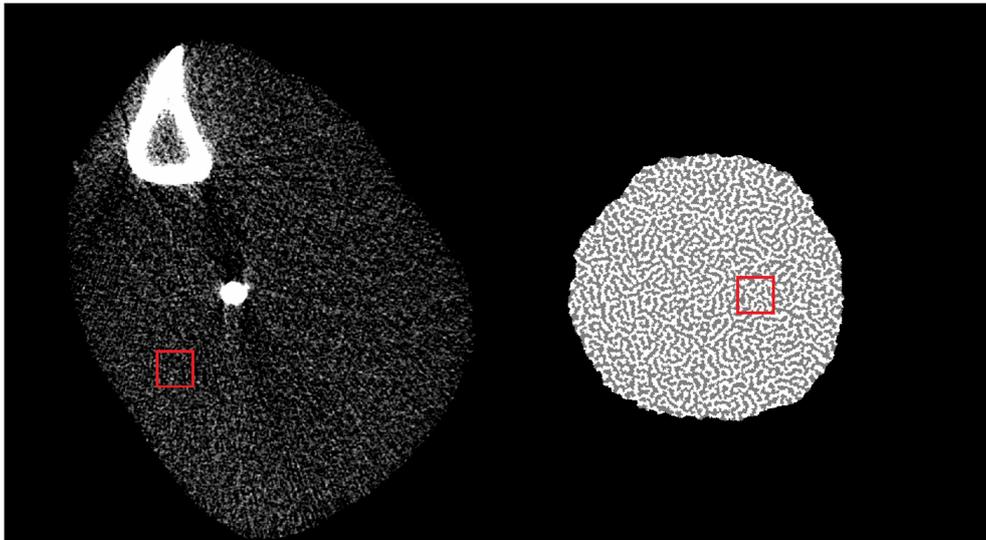


Figure 8 : A gauche le résultat de la tomographie, à droite celui de notre simulation pour  $\eta=2$  et  $R_0=4$

On utilise des puissances de 2 en sélection car le programme utilise des transformées de Fourier rapides.

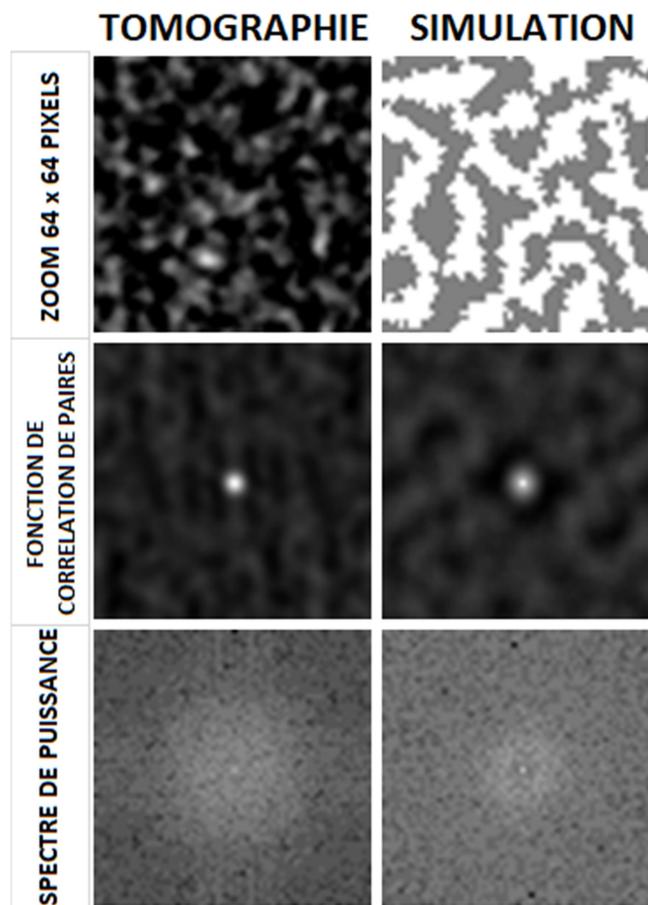


Figure 9 : Résultats d'analyse pour une sélection de 64x64 pixels

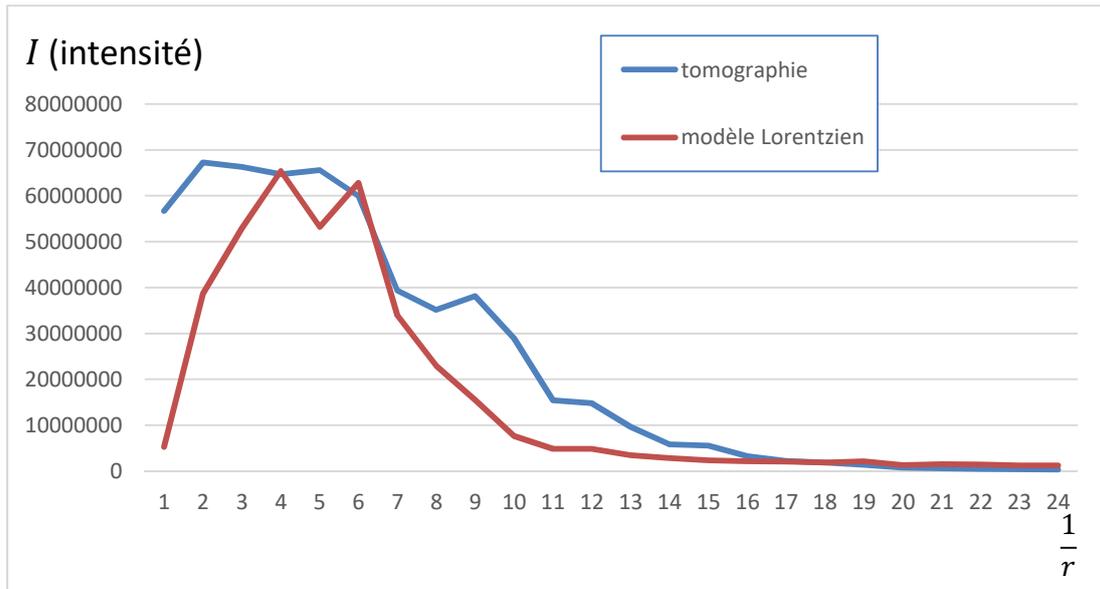


Figure 10 : Intégrations radiales de la tomographie et de la simulation (64x64p)

On peut également sélectionner une surface de 256x256 pixels pour observer l'influence de la taille sur nos traitements d'analyse.

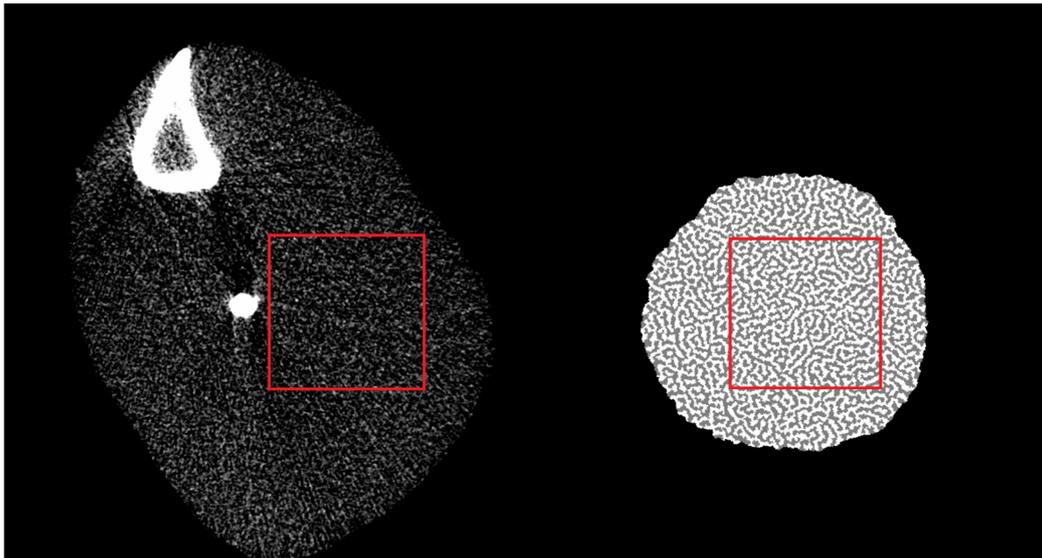


Figure 11 : Echantillons de 256x256p choisis pour l'analyse

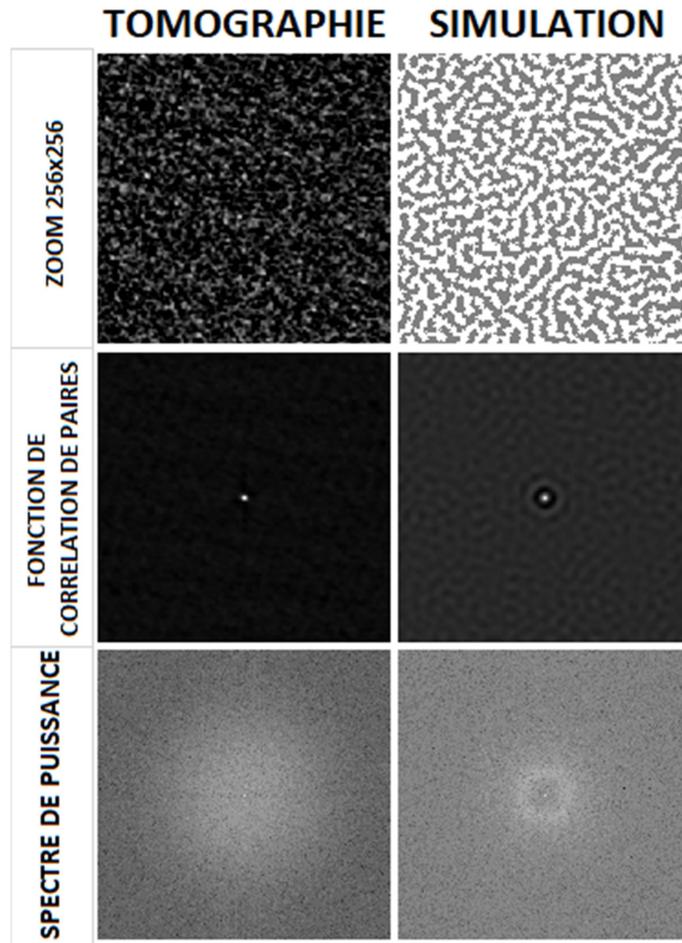


Figure 12 : Résultats d'analyse pour un zoom de 256x256p

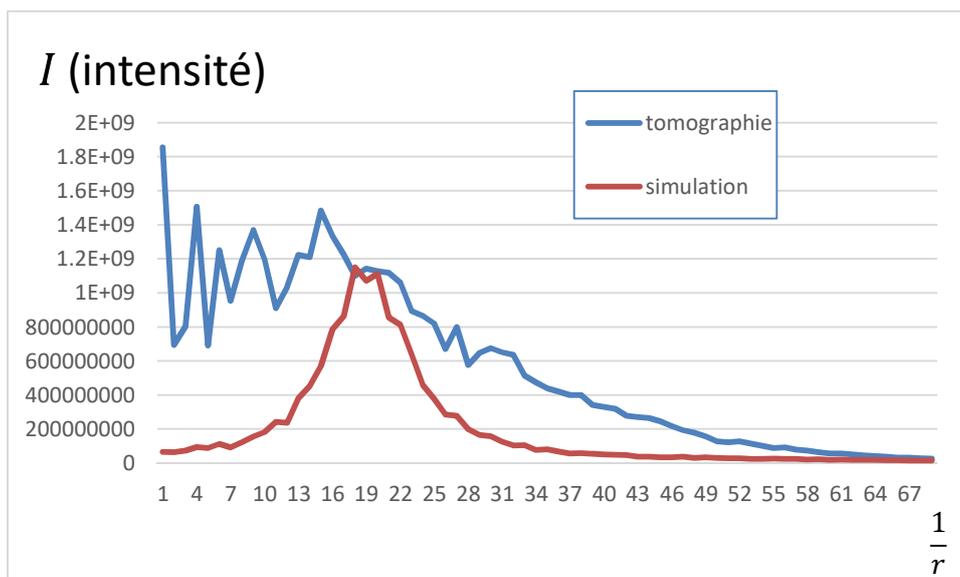


Figure 13 : Intégrations radiales (256x256p)

A ce stade, l'intégration radiale du spectre de puissance est notre meilleur outil de comparaison dans la mesure où nous pouvons attribuer un sens physique à sa forme : la position de son maximum correspond à la distance caractéristique entre particule de notre image, l'épaisseur du pic nous renseigne sur l'ordre de notre simulation. Plus la distance caractéristique est piquée, plus le système est ordonné, si le pic est large, aucune distance caractéristique particulière ne se dégage de notre système, qui est alors désordonné.

Le spectre de puissance et la fonction de corrélation de paires quant à eux nous permettent uniquement d'observer qualitativement les différences d'orientation, d'agencement, etc. L'intégration radiale est par la suite l'outil principal sur lequel nous basons nos analyses, seul objet suffisamment clair et efficace pour apprécier les caractéristiques nous intéressant.

On compte également le nombre de particules d'os présentes dans notre système, particules qui correspondent à des quantités d'os isolées par du sarcome ou du tissu et qui nous renseigne sur la complexité de notre structure (figure 19). On ne considère pas les quantités inférieures à 10 pixels.

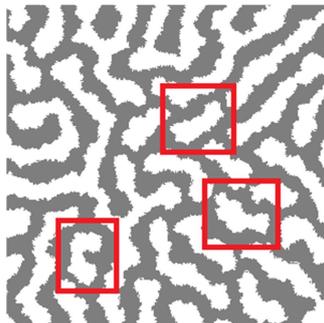
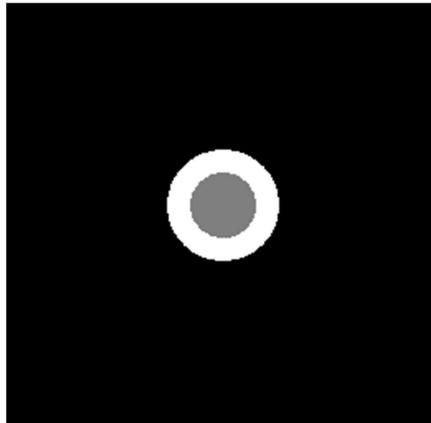


Figure 14 : Comptage des particules isolées

### 3. Analyse

Le rayon d'influence limite maximal de notre simulation pour l'os comme pour le sarcome est entre 120 et 130 pixels, à partir de cette distance l'ostéosarcome ne progresse pas et l'image de départ reste inchangée quel que soit les paramètres d'entrée : Il s'agit d'un passage sous un certain niveau de précision qui empêche la simulation de démarrer (La condition pour que la simulation ne progresse pas est que les deux rayons d'influence limite soient maximisés  $R_{sarc} = R_{os} = 120/130p$ ). Nous disposons d'un certain nombre d'images de départ, qui correspondent à des situations hypothétiques de départ du développement de l'ostéosarcome.

Notre image de départ principal correspond à deux disques concentriques, l'un représentant le sarcome et l'autre l'os, dans un environnement de tissu sain (Fig. 19). Le cercle le plus grand fait 68p de diamètre, tandis que le plus petit fait 40p de diamètre. Les dimensions de la surface de tissu sain sont de 1024x1024p.

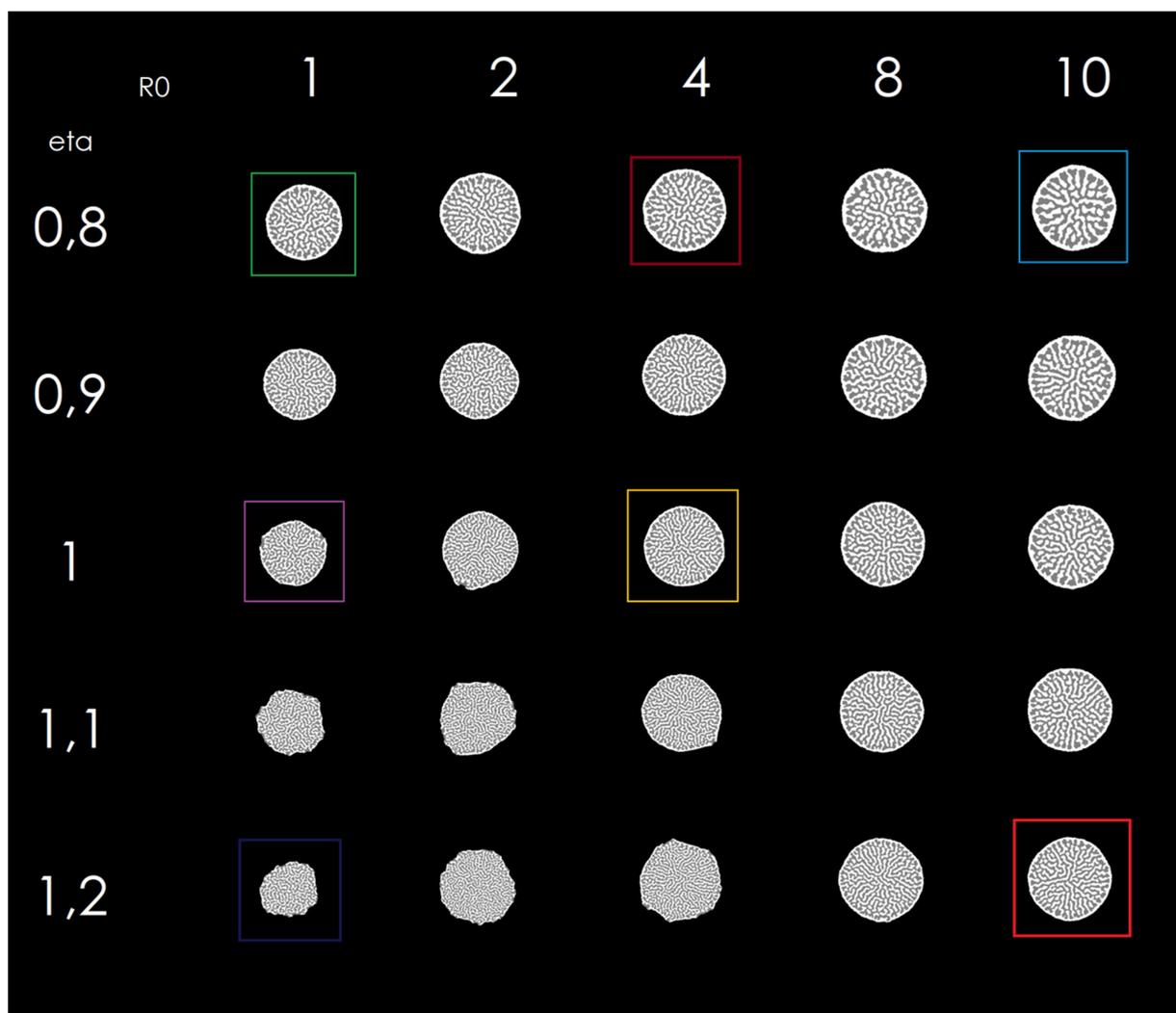


**Figure 15** : Image de départ concentrique  
(le sarcome en gris, l'os en blanc, le tissu sain en noir)

## a- Modèle à loi de distance unique

Notre premier modèle prend en compte une loi de distance (*Lorentzienne*) unique pour l'os et le sarcome : Il s'agit d'observer le comportement de la simulation lorsque les cellules d'os et de sarcome partagent les mêmes paramètres d'évolution *Lorentzien*  $R_0$  et  $\eta$  : Notre premier modèle correspond donc à la situation où  $R_0^{os} = R_0^{sar.}$  et  $\eta^{os} = \eta^{sar.}$  .

On commence par faire varier  $\eta$  de 0.8 à 1.2 par pas de 0.1 avec  $R_0 = \{1; 2; 4; 8; 10\}$ . Le nombre d'itérations pour ces premières manipulations est fixé à 4000. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous (*Fig.20*).



**Figure 16 :** diagramme de phase avec  $R_0^{os} = R_0^{sarcome}$  et  $\eta^{os} = \eta^{sarcome}$  ( Les résultats de configuration encadrés correspondent aux résultats auxquels on précise par la suite l'intégration radiale)

- Comportement à  $\eta$  petit et  $R_0$  grand : La structure est très développée (grande taille) car l'os pousse autant que le sarcome. Plus  $R_0$  est grand, plus la taille caractéristique des particules

d'os est importante. On observe également que le nombre de particules à  $R_0=10$  augmente avec  $\eta$ , respectivement :

- $N_{particules} = 9$  pour  $\eta = 0.8$
- $N_{particules} = 16$  pour  $\eta = 0.9$
- $N_{particules} = 20$  pour  $\eta = 1.0$
- $N_{particules} = 25$  pour  $\eta = 1.1$
- $N_{particules} = 31$  pour  $\eta = 1.2$

Il faut cependant mettre ces résultats en perspective, le nombre de particules ne suivant pas, dans tous les cas à  $R_0$  fixe, une croissance constante en fonction de l'augmentation d' $\eta$  (Le comptage de particules n'est pas l'outil le plus significatif pour caractériser la complexité de notre structure).

- Comportement à  $\eta$  grand et  $R_0$  petit : On remarque que la structure est peu développée : Certaines quantités de sarcome parviennent à percer jusqu'à l'interface os-tissu et se développent sur le tissu en catalysant parallèlement de l'os (hypothèse inter catalytique) : A partir de cet instant, la catalyse permet une progression conjointe et plus rapide des deux éléments. La taille caractéristique des particules d'os est également nettement plus petite avec l'augmentation d' $\eta$ .

On s'intéresse également aux résultats obtenus par nos outils d'analyse pour nous permettre d'affirmer ou d'infirmes les caractéristiques visuelles que l'on observe : On effectue l'analyse sur une coupe carrée de 256x256p centrée au milieu de notre image. Par soucis de simplicité, on ne présente ici que les intégrations radiales des cas extrêmes et de leur transition, c'est-à-dire pour les couples  $\{R_0; \eta\} = (1; 0.8), (1; 1.0), (1; 1.2), (4; 0.8), (4; 1.0), (4; 1.2), (10; 0.8), (10; 1.0), (10; 1.2)$ .

Dans le cas  $(1; 1.2)$ , la structure n'étant pas suffisamment développée pour sélectionner un carré de 256x256p, on choisit une définition de 128x128p. Les fonctions de corrélation de paires et les intégrations radiales sont présentés ci-dessous.

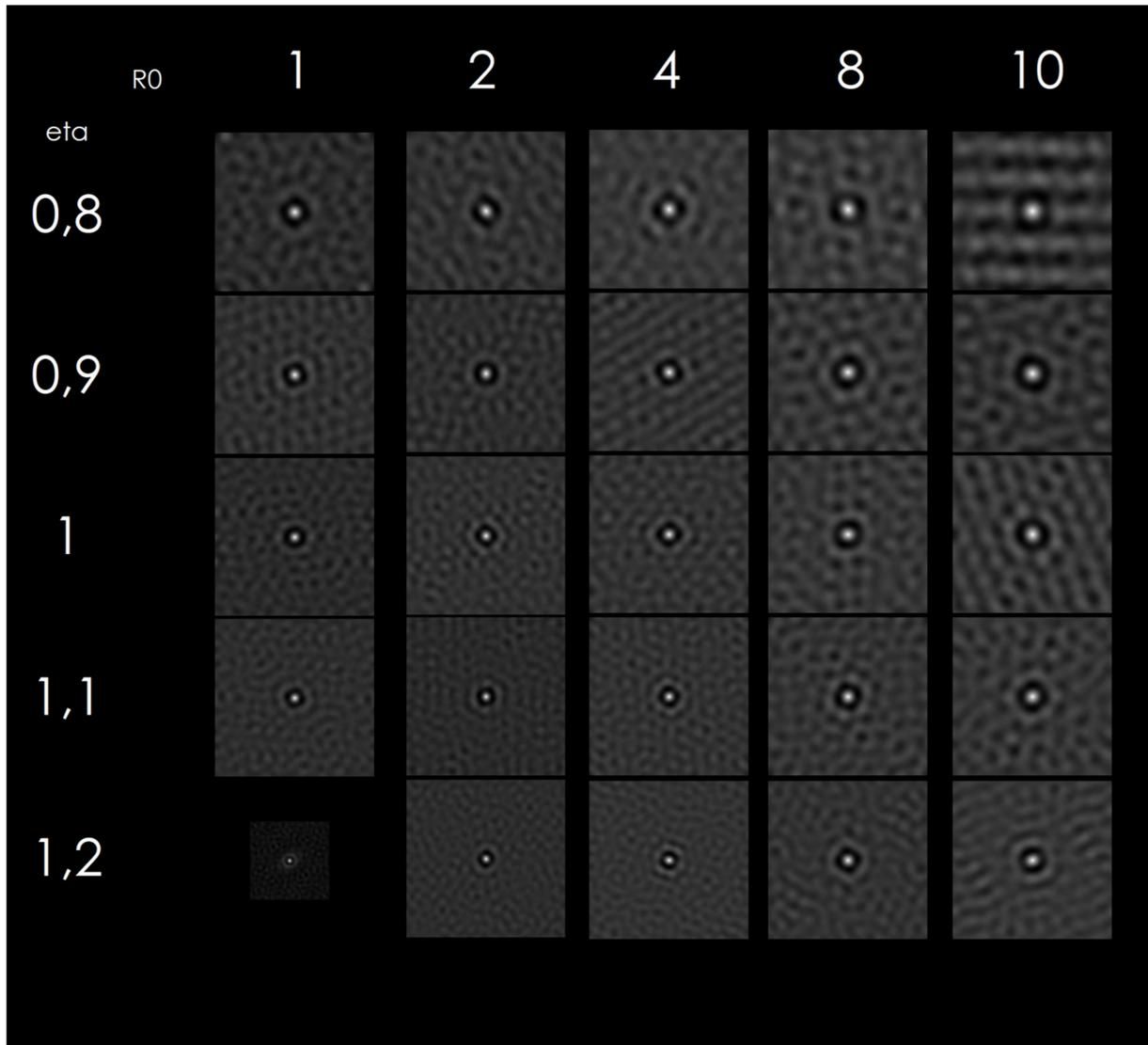


Figure 17 : Fonctions de corrélation de paires

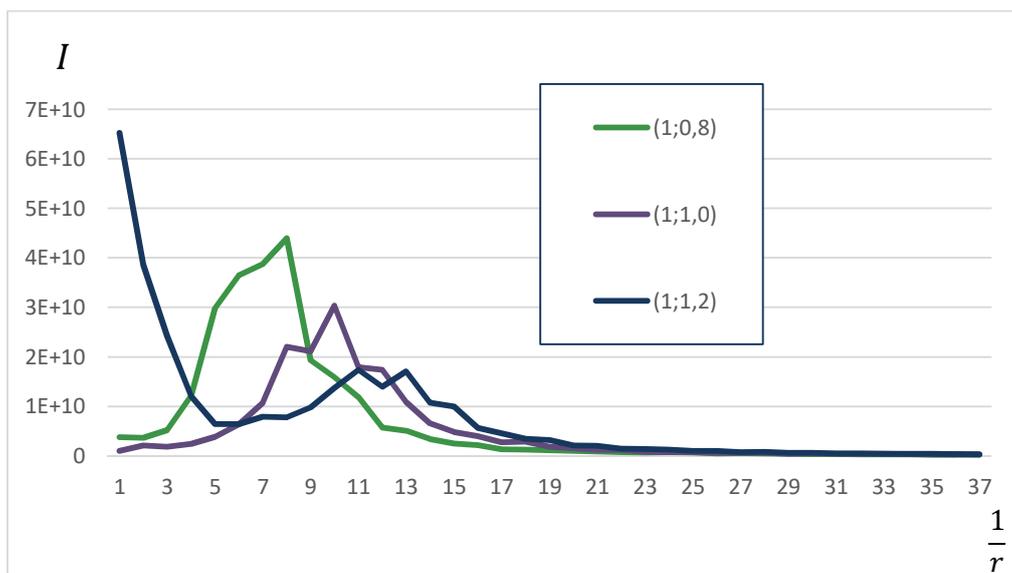
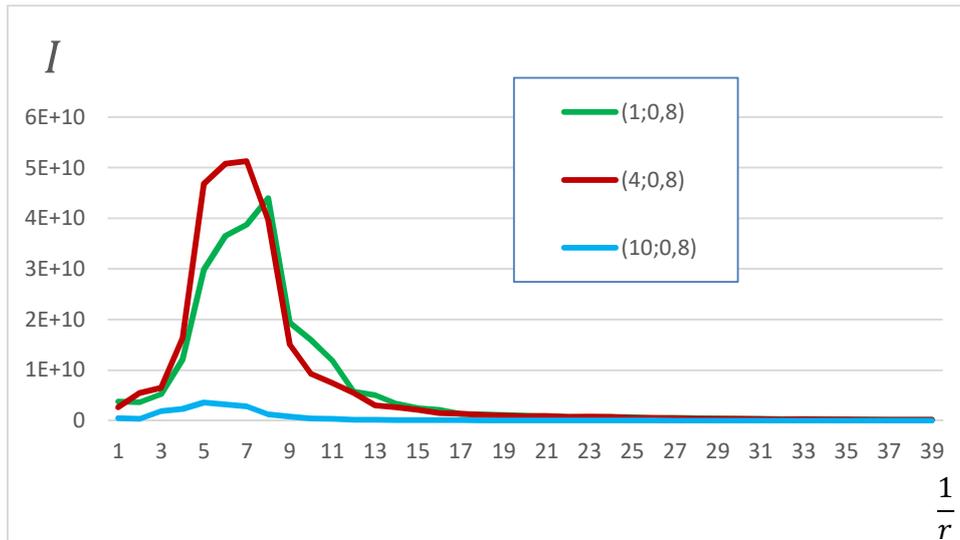
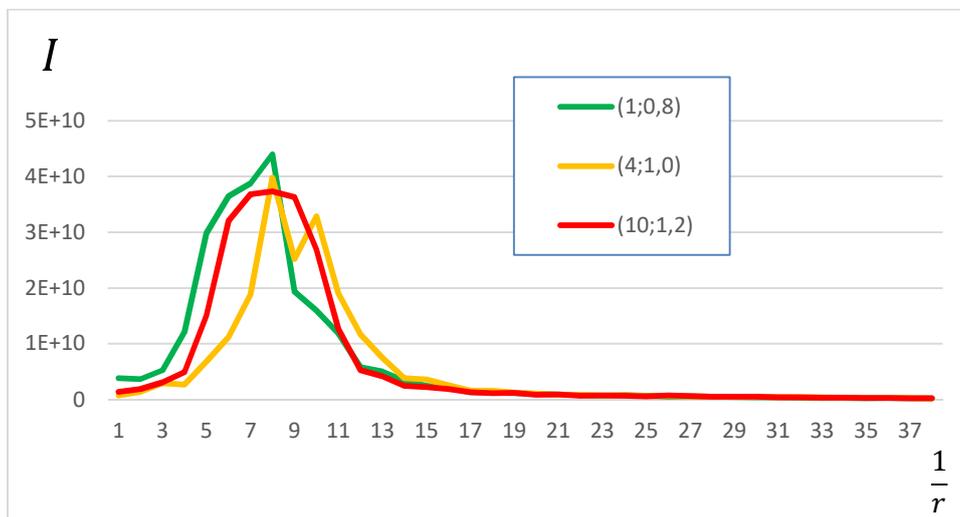


Figure 18 : Intégrations radiales pour  $R_0 = 1$

Figure 19 : Intégrations radiales pour  $\eta = 0.8$ Figure 20 : Intégrations radiales pour  $\eta$  et  $R_0$  croissants

Les trois diagrammes d'intégration radiale témoignent des transitions possibles ainsi que du comportement de notre structure lors de ces transitions : On remarque que la distance caractéristique s'agrandit et que l'intensité diminue avec la croissance d' $\eta$ . On peut également faire l'observation que notre pic s'élargit avec la croissance d' $\eta$ , ce qui revient à augmenter le désordre de notre système car plusieurs distances caractéristiques se dégagent de notre intégration radiale ce qui amène nécessairement l'équilibrage des intensités de chaque  $d_{carac}$ . (Fig.23). A  $\eta$  fixé, On observe un léger pic pour (10; 0.8) : Cela est dû au peu de particule d'os présent dans ce système (9 particules) avec aucune distance caractéristique particulière ne se dégagent (Fig.24). Enfin, on remarque une similitude relative entre les couples (1; 0.8) , (4; 1.0) et (10; 1.2) dans la mesure où les intensités de leur pic sont très rapprochées tout comme leur distance caractéristique ( Fig. 25).

## b- Modèle à double loi de distance

Par la suite, on utilise un modèle dans lequel l'os et le sarcome n'obéissent pas à la même loi de distance, c'est-à-dire que des paramètres *Lorentzien*  $R_0$  et puissance  $\eta$  différents sont attribués à l'os et au sarcome : Cela revient schématiquement à  $R_0^{os} \neq R_0^{sar}$  et  $\eta^{os} \neq \eta^{sar}$ . L'observation qu'il n'y a pas, à priori, de justification particulière au fait que les cellules d'os et de sarcome obéissent à la même loi de distance nous a amené à ce modèle à double loi de distance, dans l'objectif de favoriser une évolution désordonnée de notre système. Sur le modèle d'analyse précédent, on observe l'influence de la variation des paramètres  $\eta^{os}$  et  $R_0^{os}$  pour  $R_0^{sar}$  et  $\eta^{sar}$  fixé (Fig.26).

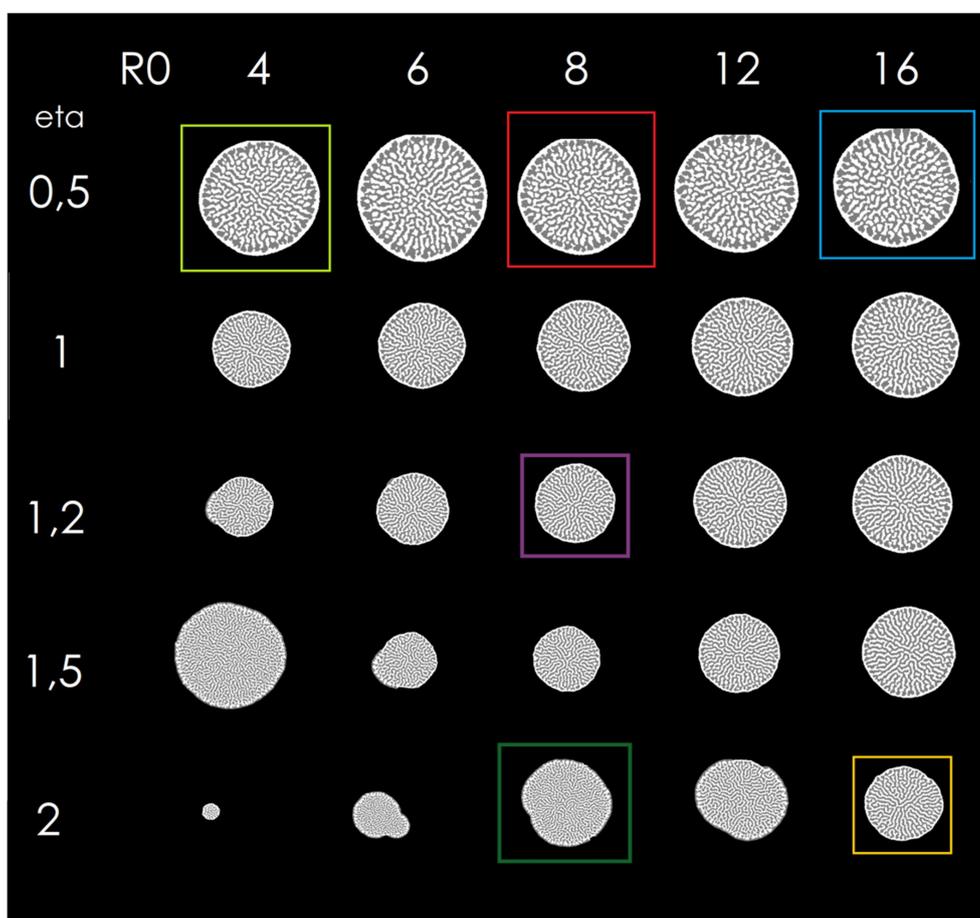


Figure 21 : Variation de  $(R_0, \eta)_{os}$  pour  $(R_0, \eta)_{sar} = (8, 1)$

On remarque principalement le fait que l'avancée du développement des différentes structures ne suit aucune évolution particulière d'un paramètre d'entrée, que ce soit  $\eta_{os}$  ou  $R_0^{os}$ . On observe toujours une tendance des cellules de sarcome à percer la couche d'os pour des valeurs d' $\eta$  fortes. On effectue à nouveau les fonctions de corrélations de paires en 256x256p pour les configurations suffisamment grandes (Fig. 27).

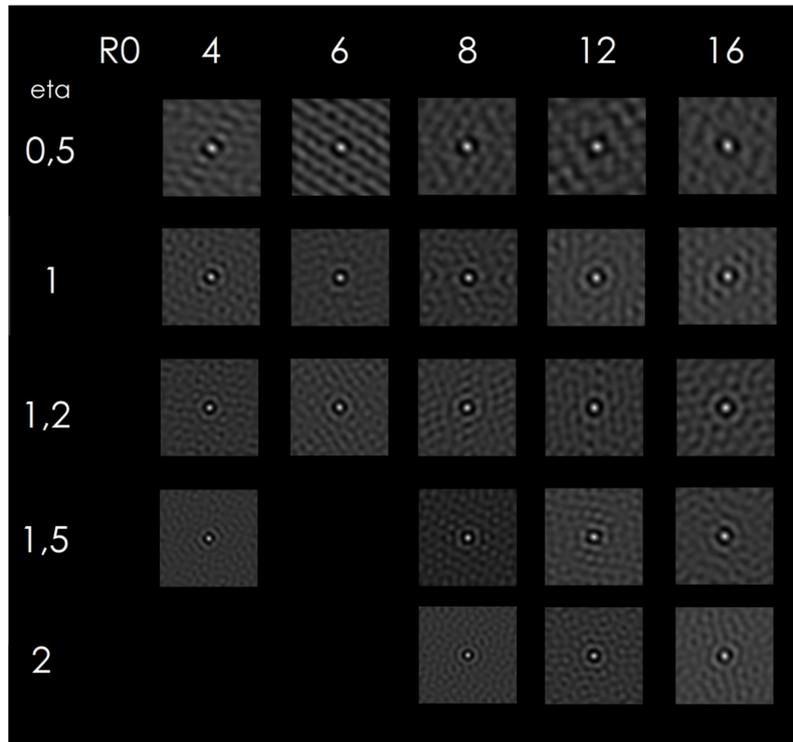


Figure 22 : Fonctions de corrélation de paires

On observe des régularités dans l'orientation des particules, qui varient entre résultats.

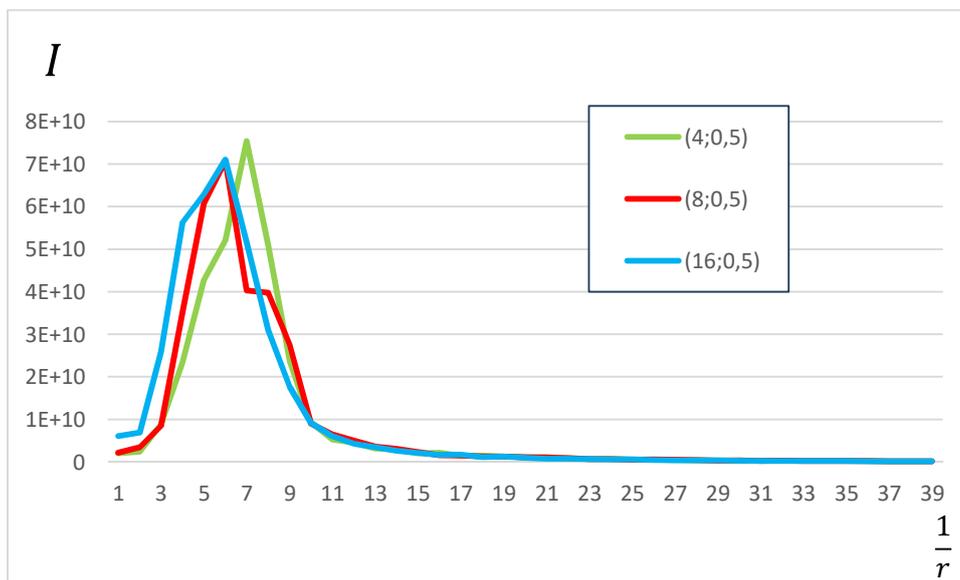


Figure 23 : Intégrations radiales pour  $\eta = 0.5$

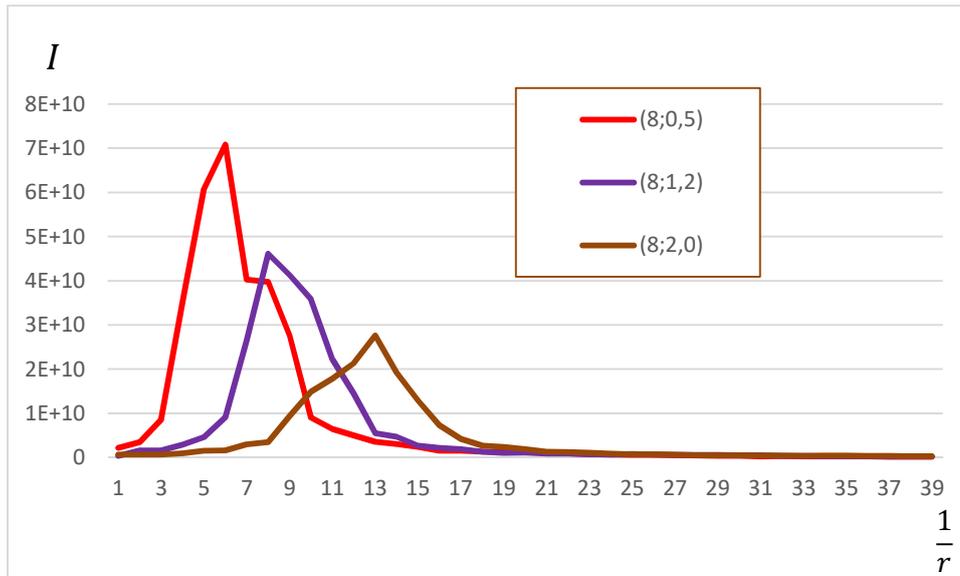


Figure 24 : Intégrations radiales pour  $R_0 = 8$

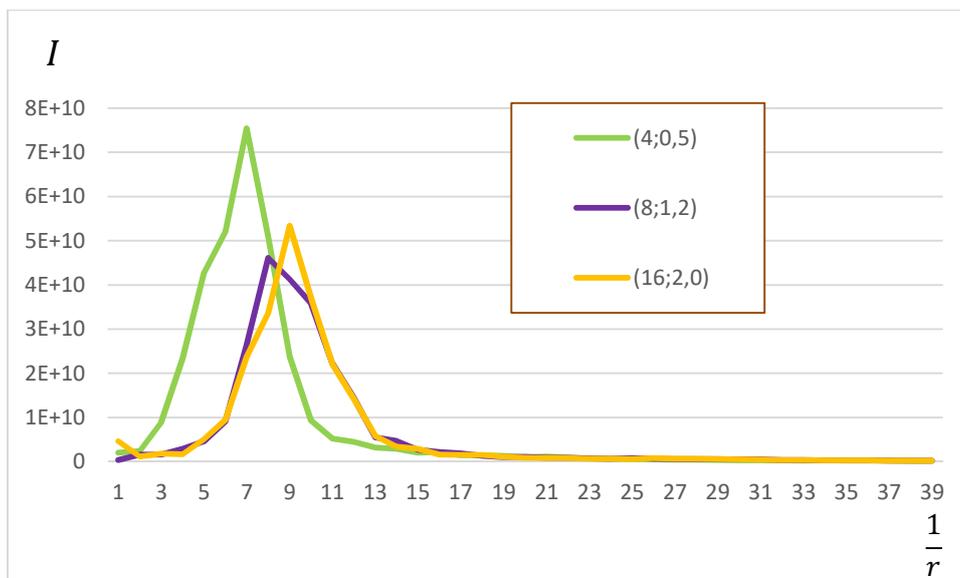


Figure 25 : Intégrations radiales pour  $R_0$  et  $\eta$  croissants

A  $\eta$  fixe on remarque que ni la distance moyenne ni l'intensité ne semblent varier en fonction de  $R_0$  (Fig. 28). A  $R_0$  fixe cependant une tendance nette se dégage de notre résultat d'intégration : L'intensité et la distance caractéristique évoluent proportionnellement à  $\eta$  :  $\eta_{os} \nearrow \Rightarrow I \searrow d_{carac} \nearrow$  (Fig.29). Quant à l'évolution diagonale (Fig.30), on observe bien le phénomène de décalage en distance caractéristique avec la croissance d' $\eta$  : Il n'est pas évident qu'un tel comportement soit observable vis-à-vis de l'évolution de l'intensité ( entre les valeurs (8; 1.2) et (16; 2.0) l'intensité diminue).

### c- Recherche de transition de phase à l'interface

Pour un couple  $(R_0, \eta)_{\text{sarcome}} = (8,1)$ , on étudie, à l'interface Os-Tissu, la transition d'une phase osseuse dominante à celle d'une phase sarcome dominante. Pour cela, on s'intéresse en premier lieu aux  $rf(r)$  de nos couples  $(R_0, \eta)_{\text{os}}$  et  $(R_0, \eta)_{\text{sar}}$  : Plus précisément, il s'agit de trouver, à partir d'un couple  $(R_0, \eta)_{\text{sar}}$  donné et pour un  $R_0^{\text{os}}$  fixé, la valeur d' $\eta^{\text{os}}$  pour laquelle  $rf(r)_{\text{os}}$  passe sous  $rf(r)_{\text{sar}}$  et d'analyser, avec les paramètres  $(R_0^{\text{os}}, \eta^{\text{os}})$  en entrée de notre simulation, si un tel phénomène de transition de phase se produit. On présente ci-dessous le résultat obtenu pour  $R_0^{\text{os}} = 4$  avec  $(R_0, \eta)_{\text{sarcome}} = (8,1)$ .

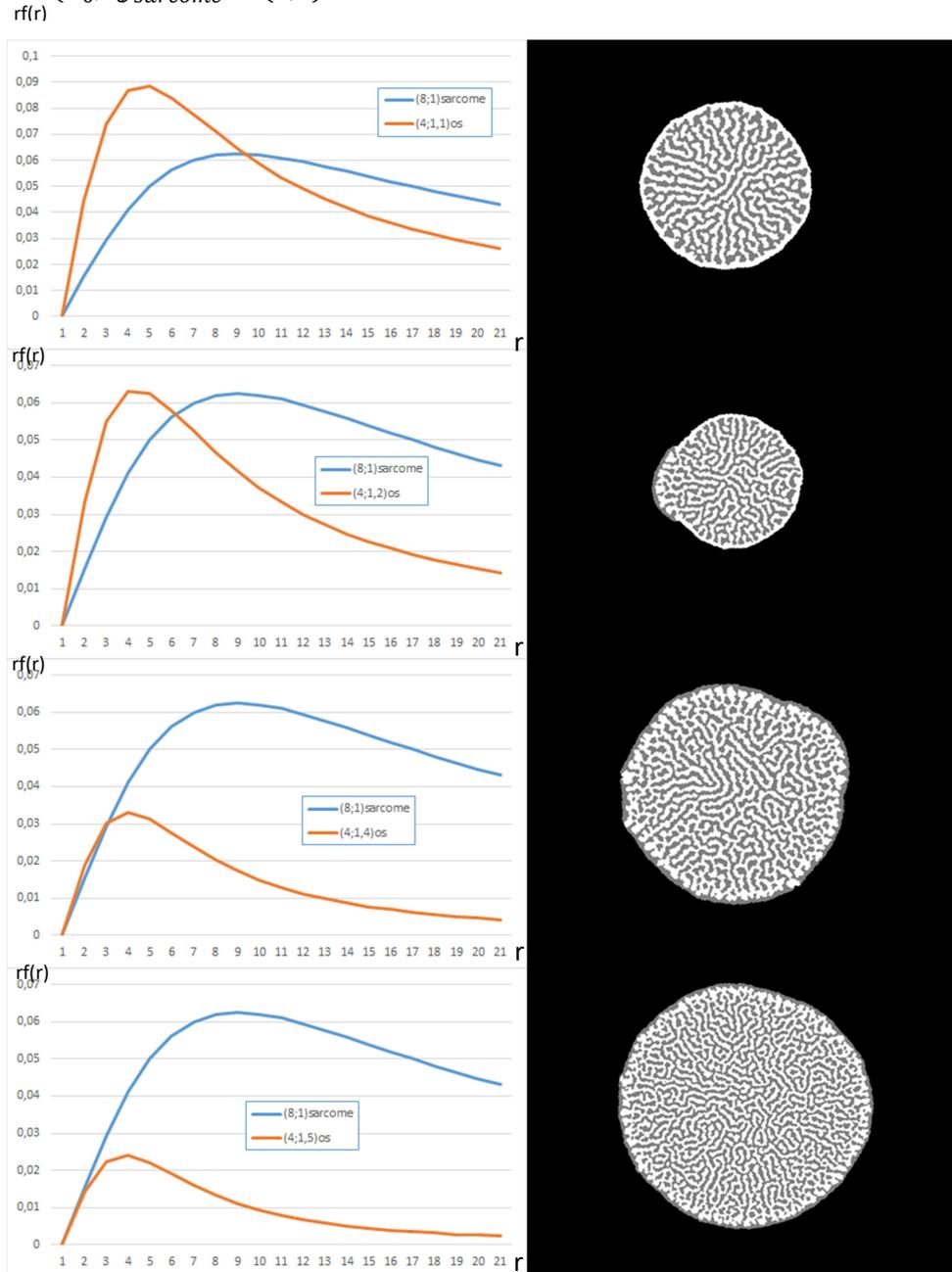


Figure 26 : A gauche, intégrations radiales des fonctions de distance ( $rf(r)$ ), à droite résultat de simulation pour les paramètres correspondant aux  $rf(r)$

A des  $R_0$  plus grands on observe ce phénomène de transition pour des différences entre intégrations radiales bien plus importantes. Sur la figure 32, on observe ce comportement pour  $R_0 = 6$  et  $\eta = 1.5$ , ce qui correspond à une fonction  $rf(r)_{os}$  dont l'aire totale sous la courbe est bien inférieure à celle de  $rf(r)_{sarcome}$  aux paramètres  $(R_0; \eta) = (8; 1)$ , alors que le sarcome n'a percé que sur une surface mineure du résultat.

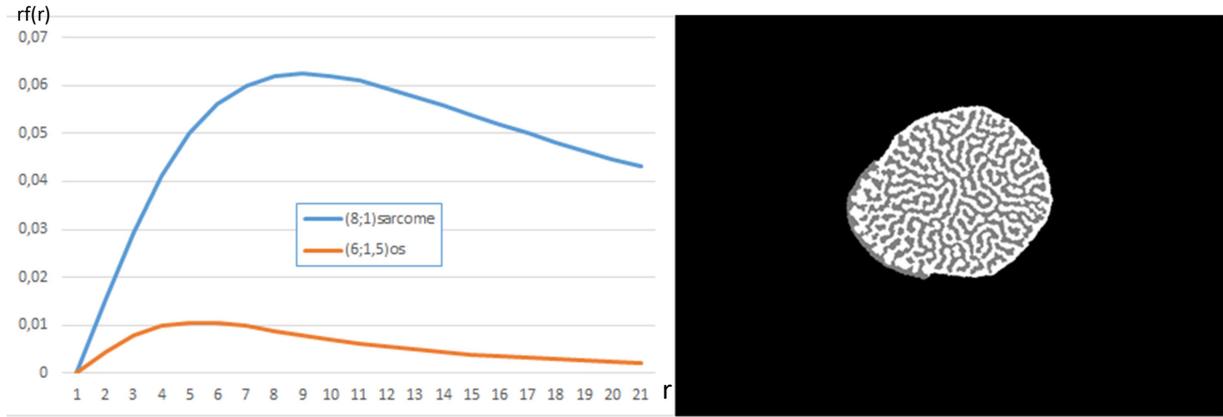


Figure 27 :  $rf(r)$  à gauche, simulation à droite

On représente ci-dessous la courbe  $R_0 = f(\eta_{transition})$  qui représente la valeur de  $R_0^{os}$  en fonction de la valeur d' $\eta$  pour laquelle il y a transition de phase (perçage de la couche d'os par les cellules de sarcome).

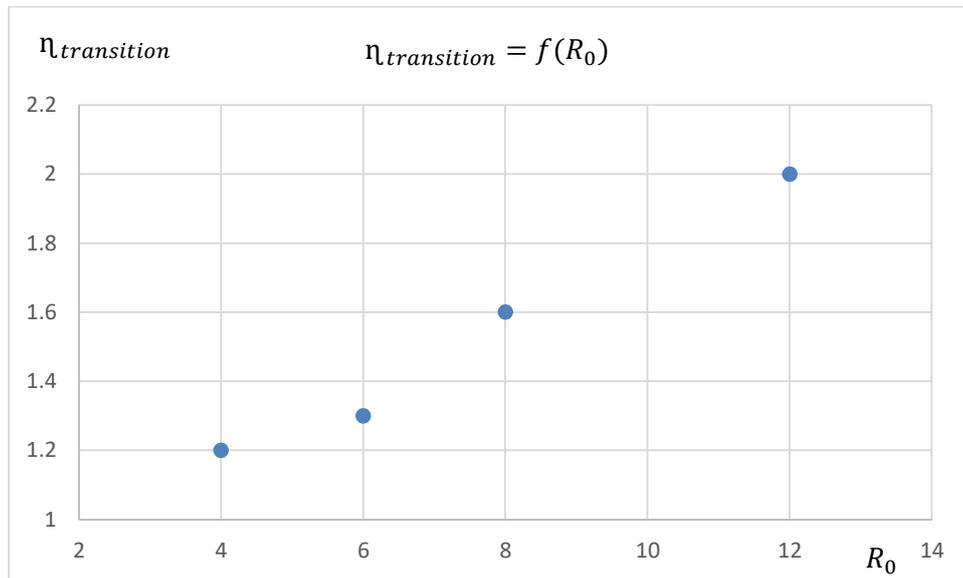


Figure 28 : Valeurs d' $\eta_{os}$  de transition pour chaque  $R_0^{os}$  avec  $(R_0, \eta)_{sar} = (8, 1)$

On remarque immédiatement que l'évolution croissante de  $R_0$  amène une augmentation significative du paramètre de puissance Lorentzien de transition de phase à l'interface  $\eta_{transition}$ . Cela peut s'interpréter par le fait que l'augmentation de  $R_0$ , en augmentant la taille de l'interface os/sarcome-tissu, impose pour le perçage de la couche d'os par le tissu et la transition de régime à l'interface une valeur d' $\eta_{transition}$  plus importante.

## 5.Conclusion

Notre modèle à double Lorentzienne nous donne un impact amorti d' $\eta$  et  $R_0$ , malgré un comportement similaire à celui de la Lorentzienne unique. Pour notre étude de l'interface, nos résultats avec des combinaisons de  $R_0$  et  $\eta$  nous permettent d'avancer que le perçage à l'origine des transitions de phases interfaciales peuvent se prédire à partir du passage d'une Lorentzienne sous l'autre, pour des valeurs différentes d' $\eta_{transition}$  en fonction de  $R_0$ , qui suivent à priori une loi linéaire (Fig.33) : Une étude plus poussée de  $\eta_{transition} = f(R_0)$  nous permettra à l'avenir d'affirmer ou d'infirmer ce comportement.

On dresse un comparatif entre l'ancien modèle de notre simulation et notre nouveau modèle Lorentzien (Figure 34).

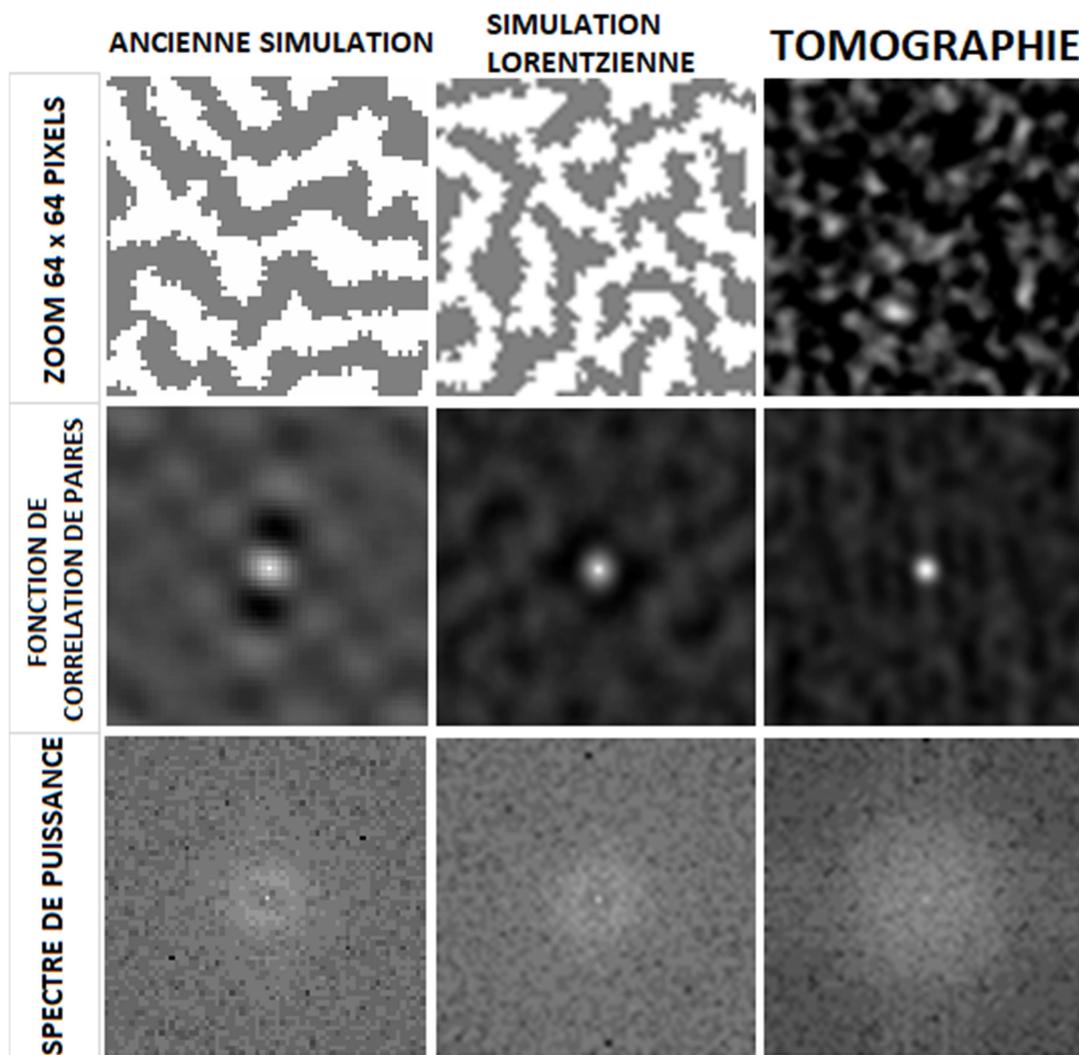


Figure 29 : Comparaisons entre les résultats de la tomographie, ceux de l'ancien modèle de simulation et ceux du nouveau modèle Lorentzien de simulation

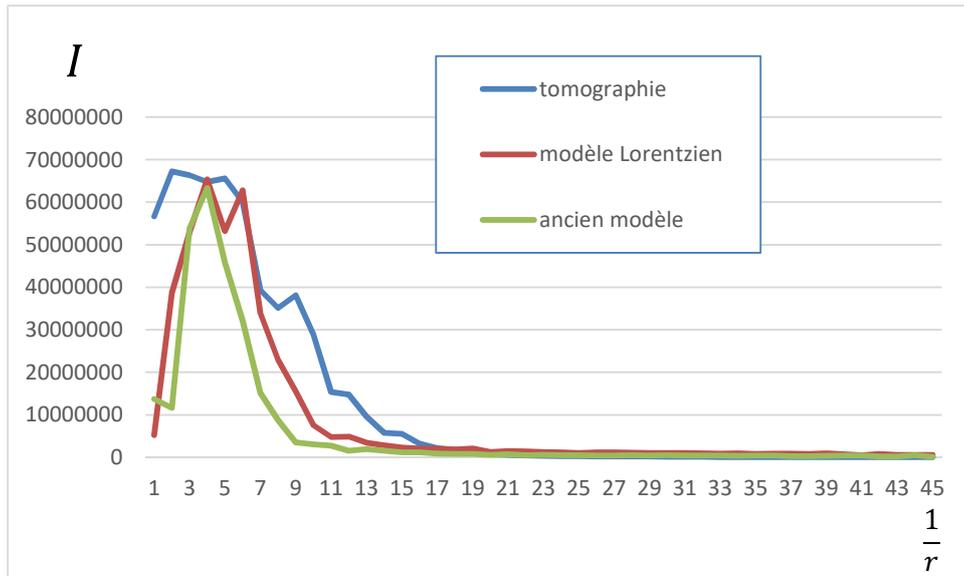


Figure 30 : Intégrations radiales du résultat de la tomographie et des deux versions de simulation

On observe sur le graphique des intégrations radiales (Fig. 35) que le nouveau modèle apporte plus de désordre que l'ancien et rapproche un peu plus la simulation de l'échantillon de tomographie à notre disposition.

Le modèle à double distance à l'avenir pourra donner des résultats plus pertinents en combinant sa version actuelle avec de nouveaux paramètres afin d'observer des résultats plus proches de la tomographie qu'à loi de distance unique. Il pourra aussi être utilisé à travers une disparité plus importante entre les paramètres des deux espèces, mais également en partant de paramètres d'origines différents de ceux utilisés durant ce stage. D'autres analyses non présentées sur ce rapport ont été effectuées avec des coupes de grandes tailles (512x512p) à grandes valeurs d'itérations.



UNIVERSITÉ DE RENNES 1  
Rennes, 4 September 2020

# An ultrastructural study of bone with cancer (osteosarcoma) during the tumour progression

*Pauline Thiébaud*

*Supervisors: Franck Artzner and Arnaud Bardouil*

*Matriculation number: 18013749*

Master's thesis in material science

Master in Material Science Exploring Large scale Facilities

Institut de Physique de Rennes

i. Influence of the starting image

The starting's image has been modified to try to simulate different possible conditions and try to better understand the mechanism of the osteosarcoma's development. The first objective was to reproduce the shape of the bone with few cells of osteosarcoma injected (Figure 17).

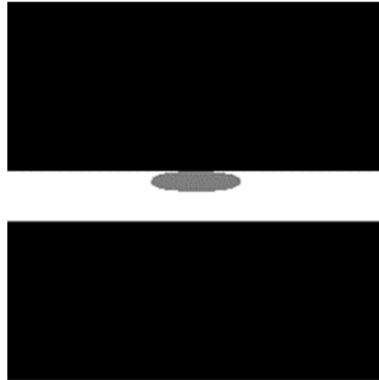


Figure 1: Starting image resembling to a long bone with osteosarcoma.

From the evolution in Figure 18, we can observe that the osteosarcoma is developing without causing a big deformation of bone until 200 iterations. The osteosarcoma is propagating faster in the existing bone than on the healthy tissue confirming the synergy mechanism of the simulation. At the end, the entanglement of bone and osteosarcoma can be well observed as well as a bigger deformation around the position of origins of the cells of osteosarcoma.

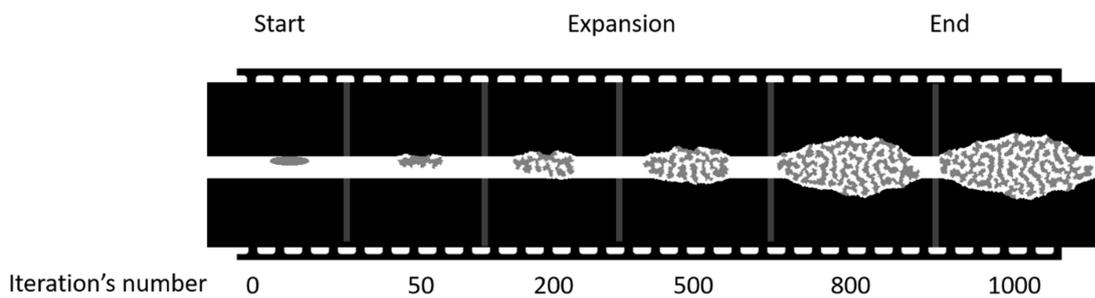
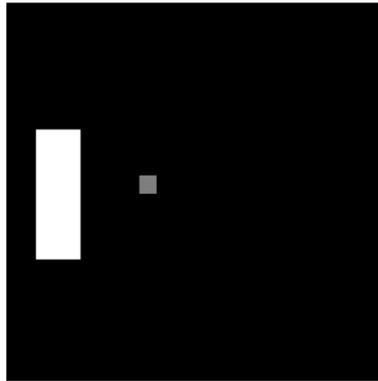


Figure 2: Evolution of the simulation with the parameters  $R_0=4$  and  $\eta=1.5$ .

However, one main element is missing using this starting image. Indeed, with this configuration, it is not possible to notice the idea that bone fabrication is activated at distance by osteosarcoma. To do so, a new image has been used (Figure 19), with a piece of bone and few cells of osteosarcoma separated by healthy tissue.



*Figure 3: Starting image to observe the development at distance of bone.*

A new hypothesis has been added: bone and osteosarcoma would be sensitive to one another in a different way, bone at long distance and osteosarcoma at shorter. This hypothesis has been supplemented by the team's research using SAXS experiment. In a simpler way, bone can develop at long distance which means it can feel the influence of osteosarcoma at long distance. Therefore, the maximum influence radius emitted by osteosarcoma  $R_{\text{sarc}}$  will be large ( $R_{\text{sarc}}=250$ ). On the contrary, osteosarcoma can only develop at short distance when bone surrounds it so the maximum influence radius emitted by bone  $R_{\text{bone}}$  will be shorter. Several simulations have been run letting  $R_{\text{bone}}$  varying. The results are presented in Figure 20, showing the evolution of the simulation depending on the number of iterations for a temporal comparison and on  $R_{\text{bone}}$ .

From these simulations, we can first see that the smaller  $R_{\text{bone}}$ , the more bone has time to develop before being in contact with the osteosarcoma as indicated by the red lines. Moreover, we can notice that a smaller radius increases the time of development. Indeed, there is no synergic growth for a longer time. However, once the contact is done the development is quicker because of the normalisation of the total influence.

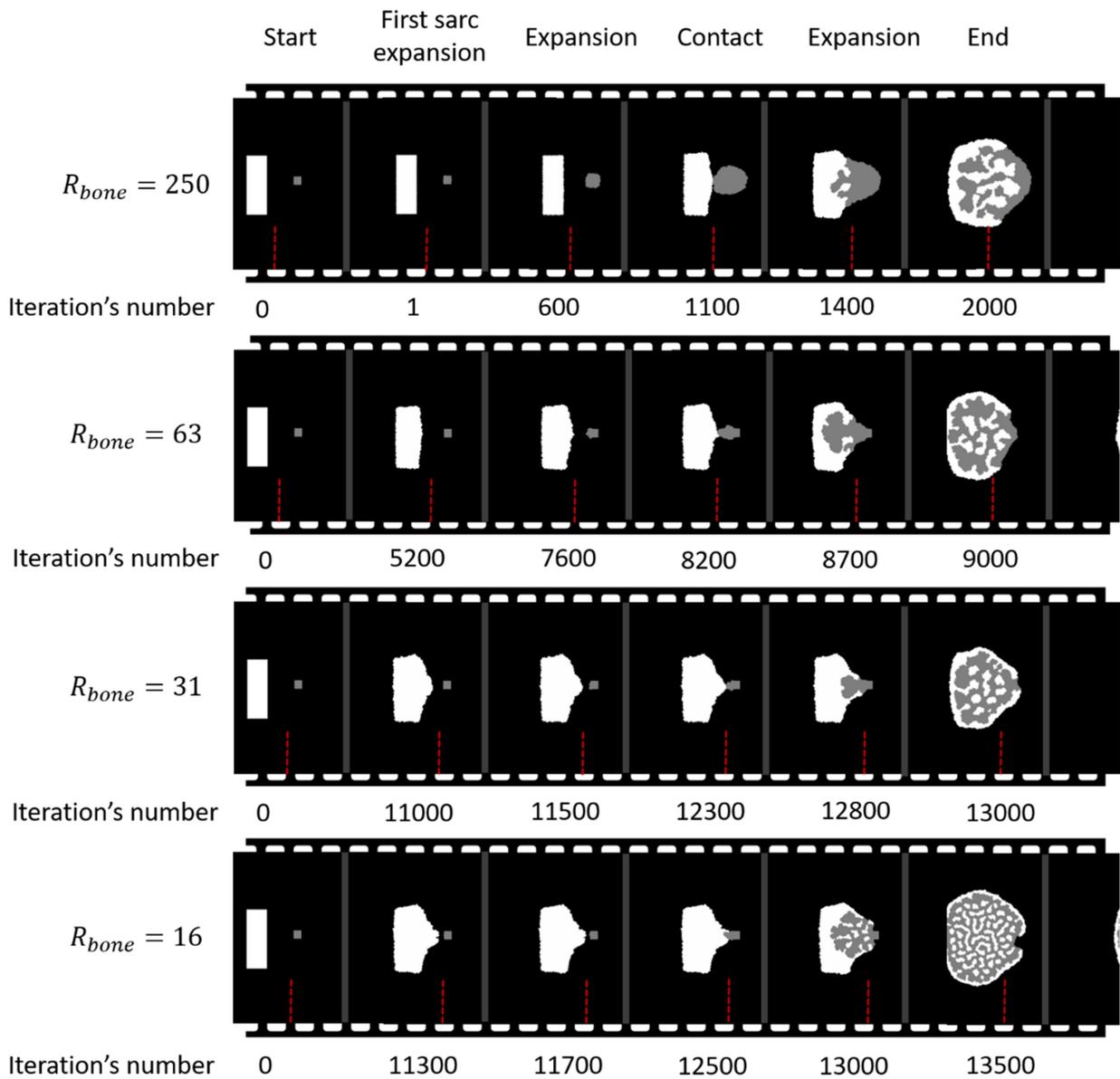
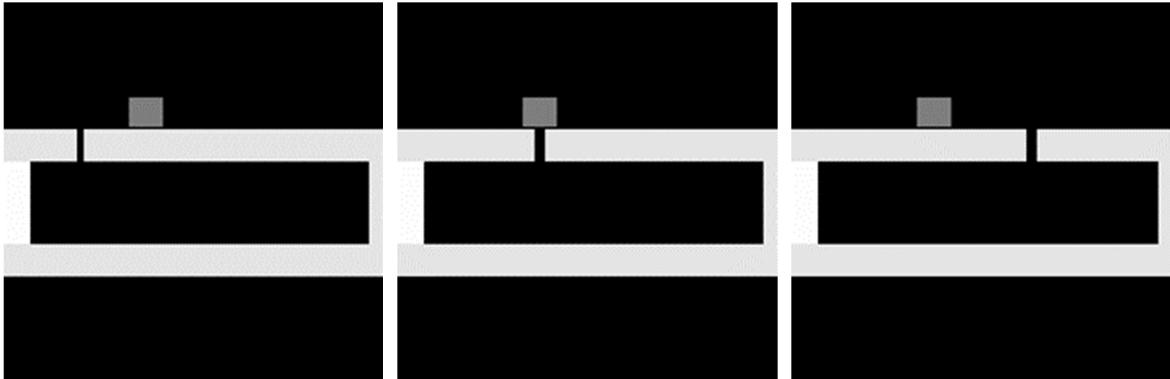


Figure 4: Simulation's evolution for fixed  $R_{sarc}=250$  and varying  $R_{bone}$ .

From the simulations above (Figure 20), the possibility that the difference in surface at the starting point in between bone and osteosarcoma made us thought that the results were probably distorted. Therefore, we reproduced the simulation with iso surface for both components with a starting image in Appendix 3, but the results have not been analysed yet.

The last hypothesis simulated has been to try to reproduce an old bone that would be less sensitive to osteosarcoma than young bone. However, the simulation of old bone would require a modification of the actual program and for a sake of time this was not

possible. Nevertheless, instead of a less sensitive bone, a non-modifiable bone has been coded delimiting the area of development.



*Figure 5: Starting images to simulation cortical bone with a microfracture.*

Thanks to this, a simple reproduction of cortical bone outer shell with osteosarcoma outside has been done (light grey on Figure 21) imitating the preparation of the mice's samples during the project. A system of slot has been added mimicking the possible microfracture allowing osteosarcoma to overcome the barrier of cortical bone or to let an extra bone tumour develop. The slot has been placed at different strategic position: before, under and after the injected cell of osteosarcoma (Figure 21).

First, from the simulations below (Figure 22), it is clearly notable that the bone and osteosarcoma are attracted to one another. Additionally, we can observe which one of the tumour or the bone is going to respectively develop first. However, no study of repeatability has been realized so there are no certitudes for this result. With other simulations from this type it could be possible to try to predict the kind of tumour, intra- or extraosseous, would result knowing the microfracture positions.

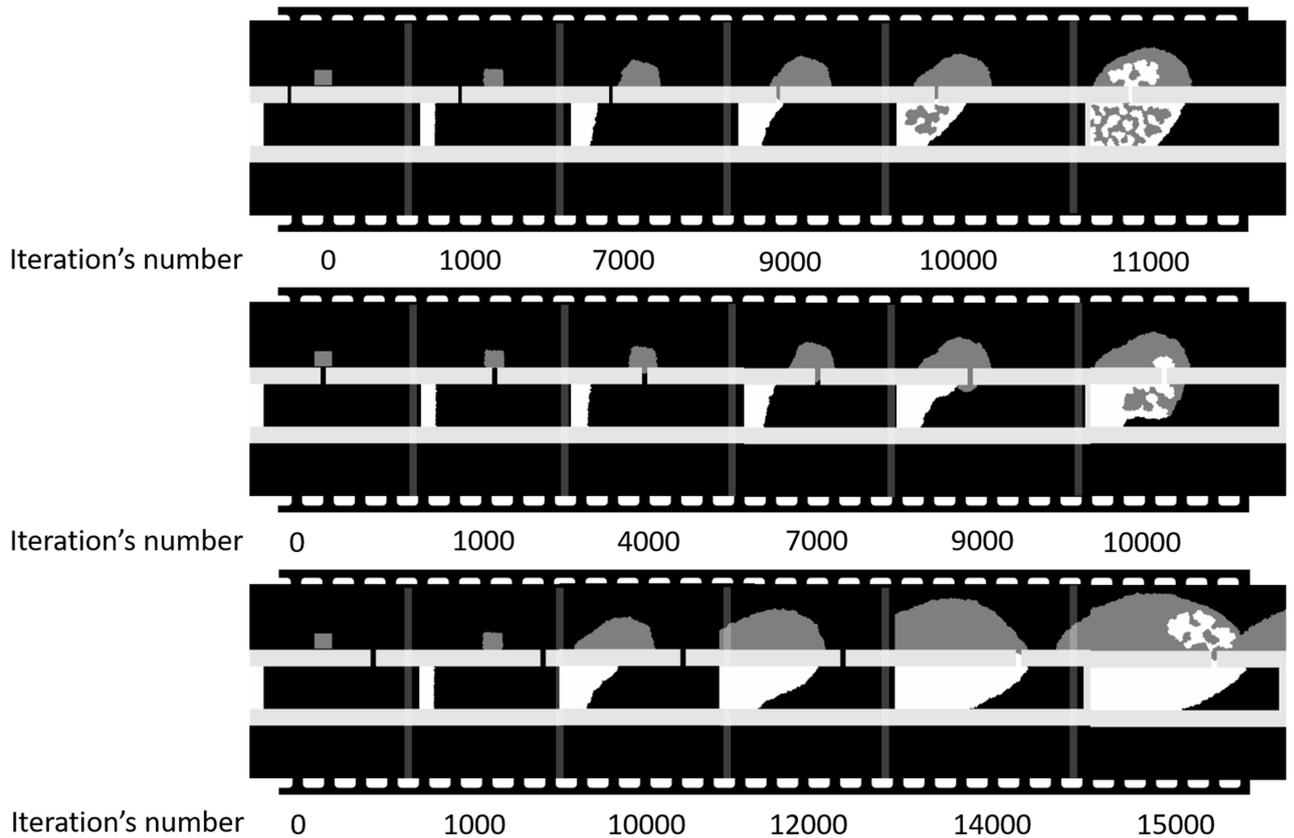


Figure 6: Evolution of the simulation for the cortical bone with a microfracture at different position with  $R_{sarc} = R_{bone} = 250$ .

## b) Conclusion

We can see that we succeed to reproduce the simulation of the development of osteosarcoma using Python. Testing several starting images, enables to analyse the behaviour of the simulation. The morphology of the tumour is also affected by the starting image. The variety of image that can be started are huge but several ideas for future simulations are already planned and are expressed below:

- A young and old bone which would allow to determine if the osteosarcoma's development is more favoured by the presence of osteoblast or only of bone.
- A non-sensitive and sensitive bone to osteosarcoma
- A bone in remodelling or a bone neosynthesized

A more detailed analysis of the influence of the various parameter of the mathematical model could be also useful to refine the mathematical model currently used. This simulation will be later used in order to run a 3D modelling and hopefully learn more about the origins and development of the cancer of osteosarcoma.

## CONCLUSION

In conclusion, considering bone as a material, it is possible to give a material scientist approach to the understanding of osteosarcoma development.

A numerical simulation attempting to reproduce the development of osteosarcoma in bone has been successfully coded in Python. It can be used to predict the structure of the tumour of osteosarcoma. Several configurations have been tested with the idea to approach as much as possible the reality of development and the morphology of the tumour. Regarding the simulation, a future work will be to parallelise the program for faster calculation and facilitate the future project of 3D modelling. Others starting image will be tested to follow the investigation on going.

A microscale study of osteosarcoma will be continued during the end of the thesis. Mice's bone cutting with osteosarcoma at different stages will be studied under polarised light microscopy. The objective will be to look at the cellular organization of bone and see an eventual disorganization during the tumour progression and trace the source of development of osteosarcoma. It can be imagined that both the numerical simulation and the microscopy could be used together to refine the hypothesis about the development of the cancer.

---

**Titre :** Caractérisation structurale multi-échelle de l'os à l'état précoce de l'ostéosarcome et modélisation de la morphologie tumorale à l'état avancé : Observations de l'activation tumorale dans l'ostéogénèse

**Mots clés :** Sarcome, Collagène, Structure hiérarchique, Diffusions des rayons X, Microscopie en lumière polarisée, Automate cellulaire

**Résumé :** L'ostéosarcome est la principale tumeur primaire de l'os, affectant principalement une population jeune. Bien que la pathologie reste rare, les conséquences sont graves, avec encore aujourd'hui des marges d'excision de 2cm et un taux de décès après traitement de l'ordre de 30% sur le long terme.

L'ostéosarcome se caractérise par la production d'une structure osseuse sous la forme d'un réseau qui se développe en conjonction de la progression des cellules tumorales. Le cancer entraîne une dégradation et une production de tissu osseux suivant un mécanisme de détournement du remodelage osseux par les cellules tumorales appelé "cercle vicieux".

Dans cette thèse, nous abordons la question de l'ostéosarcome avec les méthodes d'analyse de la physique, dans le but d'explorer de nouvelles

opportunités d'étude de cette pathologie. Nous avons étudié la structure de l'os à différents temps de développement, différentes échelles et suivant différentes techniques.

Nous avons participé à la mise en évidence de la structure Bouligand à l'interface de construction de l'os en microscopie à lumière polarisée. Nous avons utilisé la structure nanoscopique des phases minérale et biologique mise en évidence par diffraction des rayons X pour proposer un modèle de l'activité de l'ostéosarcome aux temps courts. Et nous avons établi un protocole d'analyse d'image tomographiques de l'ostéosarcome à un stade avancé qui permet la comparaison objective avec les résultats de l'automate cellulaire mis au point dans une recherche des lois de propagation de l'ostéosarcome.

---

**Title :** Bone multi-scale characterisation of early stage osteosarcoma and late stage tumoral morphology modelling : Observations of tumoral activity in osteogenesis

**Keywords :** Sarcoma, Collagen, Hierarchical structure, X-ray diffusion, Polarized light microscopy, Cellular automaton

**Abstract :** Osteosarcoma is the main bone primary tumor, mainly afflicting a young demographic. Though the illness is remains rare, consequences are dire, with still to this day 2cm margins of excision and a long-term death rate after treatment of the order of 30%.

Osteosarcoma is characterized by the creation of a mesh-like bone structure which grows alongside tumor cells progression. This cancer causes a degradation and production of bone tissue through a mechanism of bone remodelling hijacking called "vicious circle".

In this thesis, we approach the study of osteosarcoma through physics analysis methods, the goal being to explore new opportunities to study this illness.

We studied the bone structure at different development times, different scales and with different technical approaches.

We participated in the uncovering with polarized light microscopy of the Bouligand structure of the bone construction interface. We used the nanoscopic structure of mineral and biological phases, revealed through X-ray diffraction, to put forward a model of early stage osteosarcoma activity. And we established a late stage osteosarcoma tomography acquisitions analysis protocol, which enables objective comparison with the results from the cellular automaton developed for the search of the osteosarcoma propagation laws.