



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



DEA Bioingénierie - Biomatériaux  
Sceau multiple des Universités  
Henri Poincaré Nancy 1, INPL

# Caractérisation expérimentale des propriétés optiques et rhéologiques de tissus vasculaires

-

## Etude en régime statique

Soutenu le 12/07/2004 à Nancy

**GOEBEL Jean-Christophe**

***Préparé sous la Direction du      Professeur Francis LEPAGE, P.U.***  
***et du                                      Docteur Walter BLONDEL, M.C.U.***

*Membres du JURY*

Monsieur le Professeur J.F. STOLTZ  
Monsieur le Professeur Ph. PERRIN  
Madame le Professeur D. BAGREL  
Madame le Docteur E. PAYAN



# Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à

Monsieur le Professeur Francis Lepage pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL) pour effectuer ce travail de DEA.

Monsieur le Docteur Walter Blondel pour son encadrement, sa gentillesse, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et vastes connaissances, ainsi que son aide inestimable dans toutes les étapes de ce travail.

Monsieur Christophe Choserot pour le développement du banc de test mécanique et l'instrumentation électronique associée, sa collaboration à ce travail, son soutien et sa grande sympathie.

Monsieur le Docteur Jacques Didelon pour le prêt des appareils de spectroscopie, ses conseils avisés, son soutien et sa gentillesse, Monsieur Vadzim Chalov pour le développement de la maquette du spectromètre de diffusion élastique, ainsi que toute l'équipe du laboratoire IMAC du Centre Alexis Vautrin pour l'aide apportée à l'utilisation des appareils.

Mesdames Monique Gentils et Ghislaine Cauchois, techniciennes du laboratoire Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, pour leurs services rendus, leur disponibilité et amabilité, et tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et conseils dans les domaines biologiques.

Messieurs le Professeur Jean-Pierre Carteaux, le Docteur Joseph N Loga et toute l'équipe du laboratoire de Chirurgie Expérimentale pour leur gentillesse et leur temps donné pour les prélèvements artériels.

Mademoiselle Emilie Péry, doctorante au laboratoire CRAN, pour sa compagnie et son aide inestimable au cours des expérimentations, pour son soutien, sa motivation et sa gentillesse.

Messieurs et madame les Professeurs Jean-François Stoltz, Philippe Perrin et Denyse Bagrel ainsi que madame le Docteur Elisabeth Payan pour avoir jugé ce travail.

# Résumé - Abstract

L'étude des propriétés mécaniques de la paroi artérielle est une étape importante dans la compréhension du fonctionnement physiopathologique de l'arbre vasculaire artériel. Ainsi, lors d'altérations dues au vieillissement ou à d'éventuelles pathologies vasculaires (artériosclérose, hypertension, anévrisme...), des alternatives médicales et des traitements chirurgicaux sont effectués afin de retrouver un fonctionnement acceptable. L'une de ces techniques chirurgicales consiste à remplacer le segment artériel défectueux par une allogreffe vasculaire issue de cryoconservation. Il faut savoir que la préservation de ces tissus biologiques en très basses températures peut induire des modifications biologiques et structurelles susceptibles d'entraîner des changements importants des propriétés mécaniques. Ces modifications des caractéristiques du greffon peuvent se traduire par des complications (dilatation, rupture, sténose) après réimplantation. De nombreuses méthodes de tests mécaniques (traction, dilatation) développées en recherche permettent d'appréhender et d'analyser les comportements rhéologiques de la paroi artérielle. Le sujet traité dans ce mémoire ouvre une nouvelle perspective de détection des changements des propriétés mécaniques d'échantillons artériels issus de cryoconservation. En effet, l'idée originale est de coupler à un banc de test mécanique (traction uni-axiale d'anneaux artériels) des relevés spectroscopiques (autofluorescence et diffusion élastique), afin d'ouvrir la voie d'une corrélation entre les modifications mécaniques et les variations des spectres recueillis. Cette nouvelle approche vise, à terme, le développement d'un dispositif permettant, d'après des relevés optiques atraumatiques et sans contact, de déterminer l'état mécanique d'un greffon artériel à réimplanter (test d'intégrité mécanique simple).

**Mots Clés :** biomécanique, paroi artérielle, cryoconservation, spectroscopie, autofluorescence, diffusion élastique, banc de test mécanique.

The study of mechanical properties of the arterial wall is an important step in the comprehension of the vascular physiopathological functioning. Thus, when alterations appear due to aging or eventual pathological vascular diseases (atherosclerosis, hypertension, aneurysm...), medical options and surgical treatments are undertaken to recover a healthy working. One of these surgical technics consists in the remplacement of the defective arterial segment by a cryopreserved vascular allograft. However, cryopreserving biological tissues using very low temperatures can induce biological and structural modifications which may involve complications (dilatation, bursting, stenosis) after reimplantation. Many procedures of mechanical tests (traction, dilatation) developped in research allow us to comprehend and analyse the rheological behaviour of the arterial wall. The study presented in this report offers a new perspective to detect changes of mechanical properties of cryopreserved arterial samples. In fact, the original idea is to couple a mechanical test bed (uniaxial traction of arterial rings) with spectroscopic measurements (autofluorescence, elastic scattering) for the purpose of correlating mechanical modifications and spectral variations. Ultimately, this new approach could lead to develop a device allowing atraumatic and contactless optical examinations of arterial graft to determine its mechanical state before reimplantation.

**Keywords :** biomechanic, arterial wall, cryopreservation, spectroscopy, autofluorescence, elastic scattering, mechanical test bed.

# Table des Matières

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>2</b>
II.1	HISTOLOGIE ARTERIELLE.....	2
II.1.1	<i>Rappels généraux .....</i>	2
II.1.2	<i>Les trois tuniques .....</i>	2
II.2	MECANIQUE ARTERIELLE .....	3
II.2.1	<i>Eprouvettes, espace de représentation.....</i>	3
II.2.2	<i>Incompressibilité, homogénéité, isotropie .....</i>	4
II.2.3	<i>Déformations, contraintes, module élastique.....</i>	4
II.2.4	<i>Viscoélasticité, fluage, relaxation, hystérésis .....</i>	5
II.2.5	<i>Pathologies, cryoconservation.....</i>	5
II.3	OPTIQUE DES MATERIAUX DU VIVANT.....	6
II.3.1	<i>Fluorescence : origine, principe et applications .....</i>	6
II.3.2	<i>Diffusion élastique de la lumière : principe physique, applications.....</i>	7
<b>III</b>	<b>MATERIELS ET METHODES ET MODELE MECANIQUE.....</b>	<b>8</b>
III.1	BANC DE TEST MECANIQUE .....	8
III.1.1	<i>Description.....</i>	8
III.1.2	<i>Etalonnage de la jauge de contrainte .....</i>	9
III.1.3	<i>Eprouvettes artérielles .....</i>	10
III.1.4	<i>Détermination des paramètres mécaniques .....</i>	10
III.2	SPECTROMETRIES .....	12
III.2.1	<i>Mesures préliminaires.....</i>	12
III.2.2	<i>Dispositif de diffusion élastique .....</i>	12
III.2.3	<i>Dispositif d'autofluorescence.....</i>	12
III.3	PROTOCOLES .....	12
III.3.1	<i>Prélèvements .....</i>	12
III.3.2	<i>Cryoconservation, décongélation.....</i>	13
III.3.3	<i>Mesures mécano-optiques .....</i>	13
III.4	ANALYSE DES DONNEES .....	14
III.4.1	<i>Représentation des données et analyse statistique.....</i>	14
III.4.2	<i>Pré-traitement des spectres d'autofluorescence .....</i>	14
<b>IV</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>15</b>
IV.1	COUPES HISTOLOGIQUES .....	15
IV.2	REPNSES BIOMECANIQUES .....	15
IV.3	REPNSES SPECTROSCOPIQUES, COUPLAGES MECANO-OPTIQUES .....	17
IV.3.1	<i>Autofluorescence .....</i>	17
IV.3.2	<i>Diffusion élastique.....</i>	19
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>22</b>
<b>VI</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>23</b>

# I Introduction et Objectifs

Les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de mortalité et d'incapacités dans les pays industrialisés. Les traitements chirurgicaux actuels visant à palier les dysfonctionnements de l'arbre vasculaire (dilatation, sténose, anévrisme, plaque d'athérome) reposent sur la mise en place de substituts artériels de nature synthétique ou biologique, comme les allogreffes cryoconservées.

A moyen terme, les sites implantés font par endroit l'objet de dégradations fonctionnelles et structurelles de la paroi vasculaire, dont l'origine et les conséquences concernent les aspects biologiques et aussi mécaniques des greffons.

L'évaluation des propriétés mécaniques d'artères issues de cryoconservation présente donc un intérêt du point de vue du contrôle de la qualité du protocole de conservation mis en œuvre (test global d'intégrité), mais également du point de vue chirurgical, dans la mesure où l'implantation d'une allogreffe peut être alors envisagée en tenant compte de ces propriétés particulières (adaptation de la longueur d'allongement, test de pulsatilité...).

De nombreuses études, visant à mieux appréhender le comportement mécanique de tissus vasculaires, existent. Celles-ci sont de deux types :

- en conditions naturelles, c'est-à-dire *in vivo*, avec notamment l'utilisation de techniques d'échographie ultrasonore,
- *in vitro*, où de nombreux tests mécaniques variés peuvent être réalisés.

Cependant, à ce jour, dans le cadre d'actes chirurgicaux, aucune méthode simple de tests pré-implantatoires n'est proposée pour déterminer les caractéristiques mécaniques du greffon artériel à réimplanter.

Les segments artériels frais et cryoconservés se caractérisent par des différences de viabilité cellulaire et de structure pouvant se traduire par des modifications de leurs propriétés bio-optiques (absorption, diffusion, fluorescence). Ainsi, en ouvrant la voie d'une corrélation entre les propriétés optiques des tissus vasculaires et leur état de contrainte, il est possible d'envisager le développement de nouvelles méthodes sans contact et atraumatiques de caractérisation des propriétés mécaniques.

Les objectifs de ce mémoire sont donc de proposer et de mettre en œuvre une méthode simplifiée et fiable de caractérisation expérimentale des propriétés « bio-opto-mécaniques » de tissus artériels en vue de déterminer des paramètres pertinents corrélant propriétés optiques et état mécanique du tissu.

Une application potentielle concerne les tests d'intégrité mécanique pré-implantatoires de greffons vasculaires issus de cryoconservation.

Cette approche nécessite d'investiguer en parallèle les problèmes liés à l'instrumentation, au traitement des données et à la modélisation des phénomènes bio-mécaniques et optiques.

# II Etude bibliographique

## II.1 Histologie artérielle

### II.1.1 Rappels généraux

Pour introduire notre sujet d'étude, nous allons procéder à quelques rappels histologiques de l'appareil circulatoire sanguin.

Cet appareil, constitué d'un domaine artériel et d'un domaine veineux, constitue le mode principal de transport des gaz (oxygène, dioxyde de carbone), des nutriments et des produits du catabolisme cellulaire.

Il existe trois sous-classifications du système circulatoire sanguin :

- la grande circulation, encore appelée circulation systémique, qui permet, par l'intermédiaire de la pompe cardiaque, d'amener les éléments nécessaires aux tissus de l'organisme, et d'en évacuer les déchets.
- La petite circulation, ou circulation pulmonaire, dont le rôle est de créer une boucle entre le cœur et les poumons, qui permettent ainsi les échanges gazeux nécessaires au métabolisme cellulaire.
- Les systèmes portes, permettant des transports de substances entre différents organes, sans intermédiaire cardiaque. Nous pouvons citer, en guise d'illustration, le système porte hépatique qui existe entre l'intestin et le foie.

Au sein de la grande circulation, c'est notamment le domaine artériel, siège des hautes pressions et des contraintes mécaniques fortes qui intéresse nos travaux.

### II.1.2 Les trois tuniques

L'étude histologique de l'arbre vasculaire met en lumière une constante dans la constitution des parois des vaisseaux sanguins [Stevens A., Lowe J., 1997]. En effet, ceux-ci présentent toujours une organisation en trois couches, aussi appelées tuniques, qui sont, de la lumière du vaisseau vers sa périphérie, l'intima, la média et l'adventice. L'importance respective de ces couches varie en proportion suivant le type de vaisseaux (artères ou veines), mais aussi au sein d'un même type, en fonction du calibre des vaisseaux et de leurs caractéristiques hémodynamiques.

L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales aplaties : elles constituent l'endothélium qui repose sur une lame basale en contact d'une fine couche de fibrocollagène et de quelques fibres élastiques.

Les cellules endothéliales ont un rôle essentiel dans les phénomènes de la coagulation, de l'agrégation plaquettaire, de la régulation de la fibrinolyse, de la vasodilatation, ou encore de la transmigration des lymphocytes [Stoltz J.F. et al., 2000]. Ces cellules sont sensibles aux molécules à caractère informatif circulant dans le sang, grâce à des récepteurs membranaires spécifiques. Les cellules endothéliales sont aussi le siège de phénomènes dits de mécano-transduction, qui selon le flux sanguin, viennent modifier l'activité métabolique, la géométrie et l'orientation de ces cellules [Fung Y.C., Liu S.Q., 1993].

La média est la couche la plus développée dans les artères de gros calibre, dites artères élastiques. Elle est constituée de cellules musculaires lisses ainsi que d'un ensemble conséquent de fibres d'élastine et de collagène.

Ce réseau fibrillaire, disposé de façon lamellaire et concentrique par-rapport à l'axe du vaisseau, est en majeure partie responsable des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire [Roach M.R., Burton A.C., 1957]. Le rôle de ces constituants est notamment de résister à la



distension lors de la systole cardiaque et d'amortir le flux pulsatile, mais aussi de maintenir une certaine pression artérielle résiduelle lors de la relaxation des structures pariétales pendant la diastole.

De plus, les fibres élastiques joueraient aussi un rôle important dans la morphogénèse artérielle [Li D.Y. et al., 1998], ce qui confèrerait une action autre que purement mécanique à la composante fibroélastique de la média.

Les myocytes, quant à eux, plus abondants dans les artères de moyen calibre (artères musculaires), sont responsables du tonus musculaire [Boutouyrie P. et al., 1998] qui permet la vasodilatation et la vasoconstriction de l'artère. Ceci rend possible, en faisant varier le diamètre de l'artère, la régulation de la pression sanguine artérielle, et adapte les propriétés mécaniques artérielles [Bank A.J. et al., 1999].

La couche la plus superficielle est constituée en majeure partie de fibres de collagène, et occasionnellement de cellules musculaires lisses. Dans l'adventice des gros vaisseaux viennent s'enchaîner de petits conduits vasculaires : les vasa vasorum [Williams J.K., Heistad D.D., 1996]. Ces petits vaisseaux viennent irriguer la média, car dans de telles artères, les échanges nutritifs par diffusion entre la lumière et les couches pariétales extérieures ne sont plus possibles. L'adventice contient aussi des nerfs du système nerveux autonome qui innervent le muscle lisse de la média. Enfin, l'adventice contribue aux propriétés mécaniques principalement en facilitant l'attachement au tissu conjonctif environnant.

## II.2 Mécanique artérielle

Les propriétés mécaniques des artères sont des caractéristiques essentielles quant à la compréhension et la modélisation de l'appareil circulatoire [Vito R.P., Dixon S.A., 2003]. En effet, la connaissance du fonctionnement physiologique ou pathologique de l'arbre artériel, et des moyens thérapeutiques à mettre en œuvre lors de pathologies vasculaires découlent, entre autre, des études mécaniques réalisées sur ce type de tissu.

Ces études sont comparables aux essais et mesures réalisés sur des matériaux solides déformables classiques. Cependant, le tissu artériel, comme la plupart des autres matériaux biologiques présentent de nombreuses particularités qui rendent leur étude plus complexe.

En effet, les échantillons biologiques se distinguent par des singularités mécaniques spécifiques dues à la nature même de leur composition histologique et de leur organisation architecturale. Pour tenter une approche du comportement artériel du point de vue mécanique, il est donc nécessaire d'introduire certaines spécificités propres aux tissus biologiques, et en particulier aux vaisseaux sanguins [Oddou C. et al., 1976].

### II.2.1 Eprouvettes, espace de représentation

Le terme « épreuve » désigne l'échantillon du matériau à caractériser. Afin d'effectuer des tests mécaniques (traction, compression, torsion, cisaillement...) [Fung Y.C., Liu S.Q., 1995], il est nécessaire de choisir la géométrie des épreuves, car celle-ci intervient dans les types d'essais mécaniques à réaliser (uni-axiaux, pluri-axiaux), et influe donc dans les calculs mathématiques qui en découlent, mais détermine aussi largement le type d'instrumentation à utiliser. Ainsi, pour l'étude des propriétés mécaniques de tissus vasculaires, différentes formes d'épreuves peuvent être utilisées : cylindres [Blondel W.C.P.M. et al., 2001], lames [Adham M. et al., 1996], ou encore anneaux [Cox R.H., 1983].

Il est indispensable de disposer d'un espace de représentation

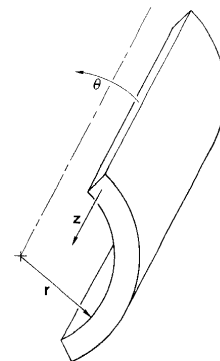


Fig. 1 : espace de représentation en coordonnées cylindriques.

volumique adapté à la géométrie du matériau à tester. Pour les matériaux vasculaires qui sont, par nature, de forme cylindrique, il est classique d'utiliser un espace en coordonnées cylindriques  $(r, \theta, z)$  (figure 1) : la première dimension est définie suivant l'axe longitudinal  $(z)$ , la deuxième dimension suivant l'axe radial  $(r)$  et la troisième dimension suivant la direction circonférentielle  $(\theta)$  [Tickner E.G., Sacks A.H., 1967].

### II.2.2 Incompressibilité, homogénéité, isotropie

Un matériau est dit incompressible si l'application d'une charge sur celui-ci n'induit pas de changement de son volume. Ainsi, si l'échantillon incompressible est déformé dans une direction de l'espace, les valeurs des déformations dans les deux autres directions vont changer de sorte que le volume reste identique.

Ce phénomène est réel pour les éprouvettes artérielles, si celles-ci sont soumises à des sollicitations de l'ordre de celles qu'elles subirait *in vivo*, en conditions physiologiques [Carew T.E., 1968]. Cette particularité est essentielle car l'hypothèse d'incompressibilité simplifie la méthode de tests mécaniques et facilite les calculs qui s'en suivent.

Lors d'essais mécaniques, même uni-axiaux, effectués sur des tissus biologiques, les trois dimensions de l'éprouvette varient en fonction de la charge appliquée. Le principe d'isotropie signifie que la constitution du matériau est telle que les efforts subis sont les mêmes dans toutes les directions de l'espace tridimensionnel. Cependant, ceci n'est pas le cas pour des tissus biologiques : en effet, la composition hétérogène et en trois couches des artères fait que celles-ci se comportent différemment selon la direction dans laquelle est appliquée la charge [Cox R.H., 1975].

Néanmoins, dans de nombreuses études mécaniques de tissus biologiques, les hypothèses d'homogénéité et d'isotropie sont posées afin de simplifier les calculs.

### II.2.3 Déformations, contraintes, module élastique

Les méthodes expérimentales [Shadwick R.E., 1992] les plus fréquemment employées pour caractériser un matériau, en régimes statique et dynamique, consistent soit à appliquer une contrainte à l'échantillon et relever la déformation correspondante, soit d'imposer une déformation à l'éprouvette et mesurer la contrainte subie.

Une déformation  $\epsilon$  est une variation relative de distance entre deux points. Il existe plusieurs expressions mathématiques selon que les déformations sont petites (quelques %) ou grandes, comme c'est le cas pour les artères (plusieurs dizaines de %). Nous utiliserons donc l'expression également choisie dans d'autres études [Demiray H., 1981] pour calculer  $\epsilon$  en grande déformation.

$$\epsilon = \ln \frac{L}{L_0} \quad \text{Eq. 1}$$

avec  $\epsilon$  la déformation (%),  $L$  et  $L_0$  les longueurs (m) initiale sans charge et mesurée en charge respectivement.

La contrainte est définie comme une force exercée perpendiculairement sur une surface, telle que :

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad \text{Eq. 2}$$

avec  $\sigma$  la contrainte (N/m<sup>2</sup>),  $F$  la force appliquée (N),  $S$  la surface de l'éprouvette sur laquelle s'exerce la force (m<sup>2</sup>).

Dans le cas de matériaux à loi de comportement élastique linéaire, on peut calculer un autre paramètre, appelé module élastique  $E$  (ou module d'Young), défini comme le rapport de la

contrainte sur la déformation ( $E = \sigma / \epsilon$ ). Le module élastique est une propriété du matériau, indépendante de sa quantité ou de sa forme géométrique.

D'autres expressions de module d'élasticité existent, notamment lorsque le comportement du matériau n'est pas linéaire, comme c'est le cas pour les artères. On utilise alors le module élastique incrémental ( $E_{inc}$ ), défini comme la pente de la tangente en chaque point de la courbe contrainte-déformation correspondante [Dobrin P.B., 1978].

#### II.2.4 Viscoélasticité, fluage, relaxation, hystérésis

Les tissus biologiques constituent des matériaux solides qui se caractérisent par des comportements mécaniques spécifiques. Ainsi, dans le cas des parois vasculaires, les rhéogrammes contrainte-déformation typiques sont non-linéaires et suivent plutôt une courbe de forme exponentielle croissante. Cette particularité de leur loi de comportement correspond au caractère viscoélastique des artères, principalement induit par l'association des fibres d'élastine et de collagène [Sharma M.G., 1974]. La viscoélasticité artérielle se traduit par des spécificités de fluage (phénomène de déformation retardée ou différée pour une contrainte maintenue constante imposée au matériau), et de relaxation (adaptation du matériau consécutive à l'effet instantané d'une déformation maintenue ensuite constante). Enfin, un phénomène d'hystérésis (décalage des rhéogrammes de charge et de décharge du matériau) apparaît aussi en conséquence des composantes visqueuse et élastique des artères.

#### II.2.5 Pathologies, cryoconservation

Au cours de la vie d'un individu, le système cardio-vasculaire peut être le siège de différents phénomènes physiologiques ou pathologiques qui tendent à modifier, voire perturber, le fonctionnement normal de l'arbre vasculaire et de la circulation sanguine.

Ainsi, lors du vieillissement, de traumatismes ou de pathologies (artériopathies oblitérantes, anévrysmes), on assiste à une modification des propriétés mécaniques de la paroi artérielle [Girerd X. et al., 1992].

Afin de palier les dysfonctionnements du système circulatoire, différentes techniques chirurgicales existent. Le remodelage endovasculaire (curetage, dilatation, pose de stent), les pontages par greffes, mais aussi le recours aux biomatériaux de synthèse offrent une large palette pour suppléer un vaisseau artériel défaillant.

Les allogreffes sont communément utilisées pour des pontages artériels. Néanmoins, il faut trouver un moyen fiable de conserver ces tissus en vue de constituer une banque. De plus, afin d'éviter tout risque de contamination entre les donneurs et les futurs transplantés, une période de stockage correspondant au temps d'incubation de certains virus doit être respectée. La méthode employée consiste en la cryoconservation à  $-150^{\circ}\text{C}$ , car cette technique répond aux deux nécessités précédemment citées [Rosset E. et al., 1996].

Des études des propriétés mécaniques *in vitro* ont été réalisées dans le but de comparer les segments artériels frais et issus de cryoconservation. Dans certains cas, les auteurs [Gournier J.P. et al., 1993] n'observent pas de différences mécaniques significatives entre des échantillons en lames, cependant les fonctions des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales sont fortement diminuées après cryoconservation [Langerak S.E. et al., 2001]. D'autres études sur des segments complets montrent que les artères issues de cryoconservation présentent des caractéristiques mécaniques significativement différentes [Blondel W.C.P.M. et al., 2000], voire même des ruptures précoces de leur paroi après réimplantation. [Lehalle B. et al., 1997].

**Il n'existe, pour le moment, aucun test d'intégrité mécanique de ces greffons avant leur transplantation.**

## II.3 Optique des matériaux du vivant

L'originalité du sujet présenté est de coupler des tests mécaniques avec des mesures de paramètres optiques, afin d'observer une éventuelle corrélation entre les comportements rhéologiques de tissus vasculaires sous contraintes et des modifications d'intensité spectrales et/ou de forme des signaux, en réponse à une excitation lumineuse.

Les deux techniques d'investigation choisies pour cette étude, compte tenu notamment de leur applicabilité *ex vivo* à l'aide de fibres optiques, sont les spectroscopies d'autofluorescence et de diffusion élastique des photons en régime statique.

Ce chapitre est consacré à une brève description des mécanismes et principes physiques mis en jeu lors d'interactions lumière/tissus biologiques en fluorescence et en diffusion élastique et qui justifient leur choix pour notre application [Cheong W.F. et al., 1990].

### II.3.1 Fluorescence : origine, principe et applications

Une molécule ne peut exister que dans un certain nombre d'états d'énergie discrets correspondant à des configurations électroniques données. La molécule est dite à son état fondamental ( $S_0$ ) lorsque l'énergie du cortège électronique est la plus basse. Cette molécule peut passer d'un état d'énergie  $S_0$  à un niveau d'énergie supérieur  $S_1$  par absorption d'un photon de longueur d'onde appropriée ( $E_p = h.c/\lambda$ )<sup>1</sup>. Ceci pourra être le cas si l'énergie photonique correspond à la différence entre les deux niveaux d'énergie ( $E_p \geq S_1 - S_0$ ) de la molécule qui se trouvera alors dans un état excité (niveau d'énergie  $S_1$  ou  $S_2$ ). Pour retrouver son état initial, la molécule devra se débarrasser de son surplus énergétique par relaxation non-radiative ou encore par émission d'un photon de fluorescence [Bourg-Heckly G., 2002] (figure 2).

La longueur d'onde  $\lambda_{em}$  du photon de fluorescence émis sera plus grande par rapport à la longueur d'onde  $\lambda_{ex}$  du photon incident qui aura excité la molécule : ce phénomène est appelé déplacement de Stokes.

Il faut savoir que les spectres de fluorescence sont très spécifiques des molécules excitées, mais sont aussi très sensibles à l'environnement proche de ces molécules et des variations des conditions physico-chimiques du milieu étudié [Ramanujam N., 2000].

Les applications de la spectroscopie de fluorescence sont nombreuses, en particulier dans le domaine biomédical. En effet, de nombreux travaux traitent de l'intérêt d'utiliser les spectres d'autofluorescence, émise par les fluorophores endogènes des tissus biologiques, pour essayer d'extraire une information spécifique du type et de l'état du tissu analysé. Ainsi, il existe des méthodes de spectrofluorimétrie destinées à discerner des tissus sains de tissus cancéreux [Panjehpour M. et al., 2002], dans le but de diagnostiquer le plus tôt possible un site tumoral. De même, dans le domaine cardio-vasculaire, la spectrométrie d'autofluorescence permet de différencier efficacement des artères saines d'artères athéromateuses [Filippidis G. et al., 2000].

Dans notre présente étude, nous nous intéressons à l'autofluorescence émise par des échantillons d'artères fraîches et cryoconservées. Les constituants de la paroi artérielle, connus pour leurs propriétés mécaniques (collagène et élastine), sont aussi capables d'émettre

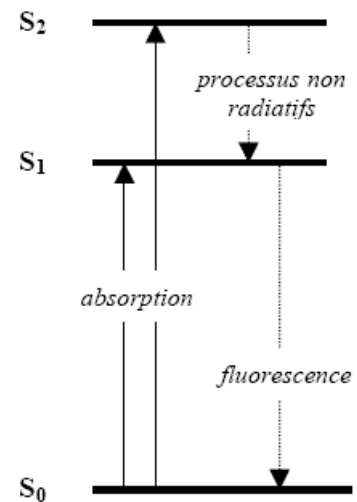


Fig. 2 : diagramme de Jablonsky.

<sup>1</sup>  $E_p$  : énergie du photon,  $h$  : constante de Planck,  $c$  : célérité de la lumière dans le vide,  $\lambda$  : longueur d'onde.

un signal d'autofluorescence lors d'une excitation lumineuse appropriée [Richards-Kortum R. et al., 1991].

La détection par autofluorescence présente l'avantage d'être non-invasive et atraumatique, ne nécessitant pas l'adjonction d'un marqueur. De plus, elle est d'une grande sensibilité et fournit une grande quantité d'informations sur la constitution des échantillons étudiés. Cette approche nécessite ensuite de mettre en œuvre des moyens mathématiques et statistiques efficaces pour traiter les spectres et en faire ressortir les données informatives [Eker C. et al., 2001].

### II.3.2 Diffusion élastique de la lumière : principe physique, applications

Lors de l'irradiation d'un tissu biologique par une source lumineuse de relative basse puissance, un phénomène physique complémentaire peut être étudié (en dehors de l'absorption totale) : il s'agit de la diffusion élastique [Groenhuis R.A.J. et al., 1983].

Si un milieu inhomogène constitué de particules aléatoirement réparties est éclairé par un rayon lumineux, les photons peuvent soit se déplacer dans le milieu suivant leur direction initiale, soit être déviés de cette direction. Si les photons ne sont déviés qu'une seule fois, on parle de diffusion simple, si les changements de direction sont plus nombreux, on utilise alors le terme de diffusion multiple (figure 3).

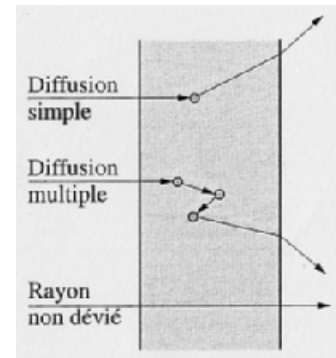


Fig. 3 : phénomènes de diffusion lumineuse.

Ces changements de direction des photons s'opèrent sans perte

d'énergie, c'est-à-dire que les photons gardent leur même

longueur d'onde tout au long de leur trajet au sein du tissu biologique [Farrell T.J., Patterson M.S., 1992]. Le spectre recueilli après diffusion multiple contient ainsi des informations liées à la structure morphologique et à la composition biochimique de la zone de tissu parcourue.

Il existe différents types de diffusion de la lumière, selon les dimensions des éléments diffuseurs du milieu par rapport à la longueur d'onde ( $\lambda_{in}$ ) des photons incidents. On parle de diffusion de Rayleigh lorsque les centres diffuseurs sont très inférieurs à  $\lambda_{in}$ , et de diffusion de Mie lorsque les ordres de grandeurs sont quasiment identiques, ou que les particules du milieu sont très supérieures en taille par rapport à  $\lambda_{in}$ . Ceci a pour conséquence la nécessité d'utiliser différentes approches mathématiques lors de la modélisation du phénomène de diffusion [Saidi I.S. et al., 1995].

La spectroscopie de diffusion élastique, bien que pour le moment moins connue que la spectroscopie de fluorescence, tend à gagner de l'importance et de l'intérêt dans les domaines de la biologie et de la santé. En effet, des travaux emploient cette technique pour différencier des tissus sains de tissus dysplasiques [Wallace M.B. et al., 2000] et précancéreux [Gurjar R.S. et al., 2001], ou encore pour évaluer l'impact de la cryoconservation sur les propriétés optiques de tissus vasculaires [Çilesiz I.F., Welch A.J., 1994].

Enfin, la spectrométrie de diffusion élastique permet le recueil d'un signal fort en amplitude tout en utilisant un appareillage simple, contrairement à la diffusion inélastique (spectroscopie Raman).

Des études conjuguant différentes spectrométries existent (spectroscopies multimodales). En effectuant des relevés spectraux simultanés et en corrélant les différents types de données, on arrive alors à augmenter le degré de différenciation entre tissus biologiques de différentes natures par complémentarité des informations recueillies [Georgakoudi I. et al., 2001] [Bigio I.J., Mourant J.R., 1997].

# III Matériels et méthodes et modèle mécanique

## III.1 Banc de test mécanique

### III.1.1 Description

Nous avons conçu, développé et réalisé un banc de test mécanique permettant d'imposer des déformations uni-axiales aux échantillons artériels à analyser, et de délivrer une tension électrique en relation avec la contrainte subie en conséquence par ces tissus. L'originalité du sujet réside dans le couplage des mesures mécaniques à des relevés spectroscopiques (autofluorescence et diffusion élastique résolue dans l'espace), afin de déterminer si des informations de types variations d'intensité et changements d'allure spectrale pouvaient refléter l'état mécanique d'un tissu biologique.

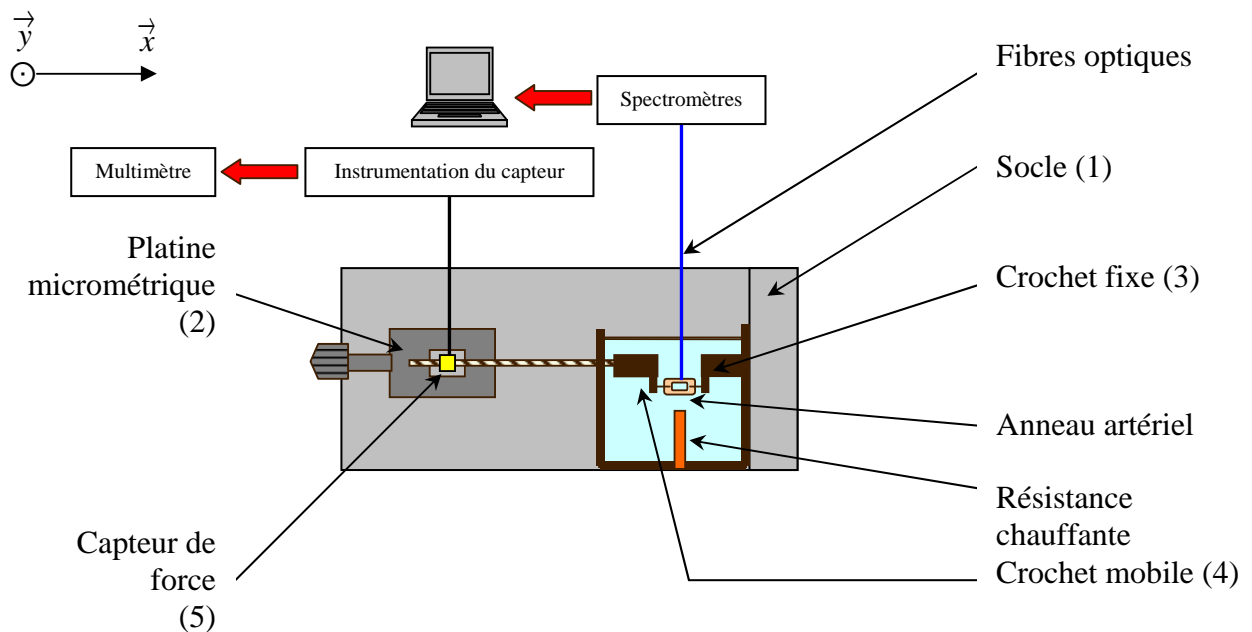


Fig. 4 : schéma de l'appareillage utilisé lors des expérimentations.

Ce banc de test est constitué des éléments suivants :

- un socle (1) en aluminium sur lequel est fixée une platine de déplacement micrométrique (2), ainsi qu'un crochet de préhension fixe (3).
- Un second crochet mobile (4), permettant « d'écarteler » l'échantillon annulaire testé, est solidaire d'un capteur de force longitudinal par l'intermédiaire d'une tige filetée assurant un prééclage en fonction de la dimension de l'échantillon.
- Une platine micrométrique qui permet d'imposer les déformations en  $\vec{x}$  avec une précision de 0,02 mm. Une vis micrométrique accessoire permet un déplacement en  $\vec{y}$ , afin que les crochets de préhension soient dans l'axe du déplacement en  $\vec{x}$ .
- Le capteur de force (5), fixé sur la platine micrométrique, est constitué d'un corps d'épreuve en aluminium sur lequel sont collées quatre jauges d'extensiométrie

montées en pont de Wheatstone (immunité aux parasites et aux variations de température, TRMC<sup>2</sup> : 80 dB). Les déformations subies par le corps d'épreuve sont traduites par un changement de la valeur de ces résistances. Un montage électronique différentiel relève et amplifie la variation de tension électrique aux bornes du pont pour fournir une tension directement exploitable.

- Une cuve remplie d'une solution d'eau physiologique (NaCl<sup>3</sup> à 0,9 %) et maintenue à 37°C qui permet d'immerger l'échantillon artériel durant les mesures.
- Un spectrofluorimètre portable ainsi qu'une maquette de spectromètre de diffusion élastique des photons, développés au Centre Alexis Vautrin, sont couplés au banc de test mécanique, et permettent de recueillir les spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique respectivement pour chaque déformation appliquée. Ces deux appareils sont dotés de sources d'excitation lumineuse et de fibres optiques excitatrices et réceptrices. Un dispositif de maintien des fibres optiques (cœur en silice, diamètre de 200 µm) permet d'amener celles-ci au contact avec le tissu artériel.

### III.1.2 Etalonnage de la jauge de contrainte

La calibration métrologique de la chaîne d'acquisition de force vise à :

- régler la pente et le décalage à l'origine de la courbe tension  $(V) = f(\text{force}(N))$
- déterminer l'erreur globale (linéarité, hystérésis).

Nous avons utilisé un ressort de traction fixé aux crochets de préhension du banc de test. En effet, la relation force =  $f(\text{élongation})$  est linéaire pour un ressort de traction. D'après les caractéristiques du ressort (acier inox, diamètre moyen : 5,5 mm, section du fil : 0,5 mm, 78,25 spires), nous pouvons déduire, pour chaque élongation du ressort, la force en newtons subie par le capteur de force. Nous pouvons alors tracer la caractéristique de transfert (figure 5) de la tension électrique délivrée par le capteur en fonction de la force exercée par le ressort de traction. Une régression linéaire (moindres carrés) nous permet de déterminer l'équation théorique approximant cette caractéristique réelle avec une erreur inférieure à 1 %.

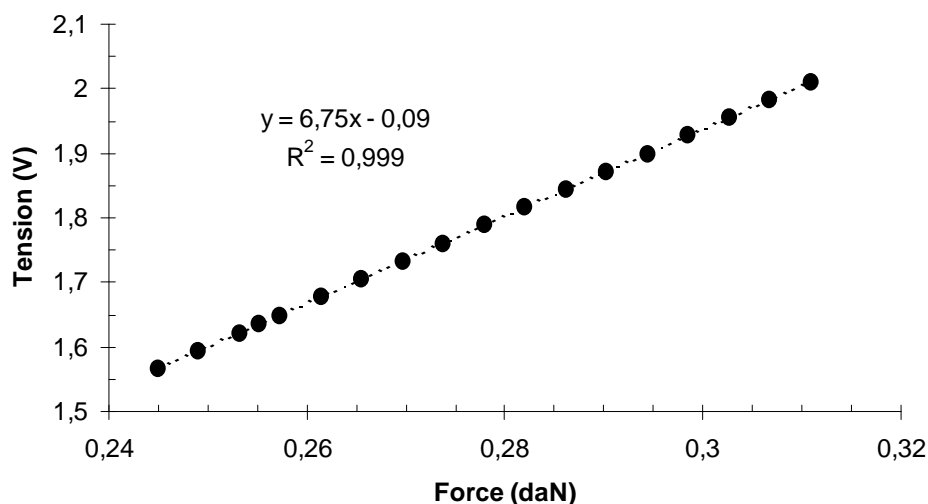


Fig. 5 : réponse du capteur de force du banc de test.

<sup>2</sup> TRMC : taux de réjection en mode commun.

<sup>3</sup> NaCl : chlorure de sodium.

### III.1.3 Eprouvettes artérielles

Pour former des éprouvettes annulaires, nous découpons des segments artériels afin d'obtenir des anneaux d'une longueur moyenne de 4 mm (procurant ainsi une surface suffisante pour le contact des fibres optiques utilisées pour les relevés spectrométriques).

Des photographies, avec référence de longueur, permettent de déduire la longueur initiale de l'éprouvette, l'épaisseur initiale de la paroi artérielle, et le diamètre extérieur initial (précision de 0,02 mm). La connaissance de ces dimensions permet de calculer le volume  $V_0$  de l'anneau artériel.

Un autre relevé photographique est effectué afin de déterminer la longueur  $x_0$ , qui correspond à la longueur initiale à régler sur le banc de test pour effectuer la première série de mesure (déformation de 0 %). On obtiendra cette longueur en pinçant légèrement l'anneau artériel de façon à ce que les deux parois opposées viennent en contact l'une avec l'autre. La longueur initiale  $x_0$  est alors la distance signifiée sur la figure 6.

Une fois ces différents paramètres connus, les échantillons sont fixés par les crochets de préhension du banc de tests mécaniques pour commencer les mesures mécano-optiques.

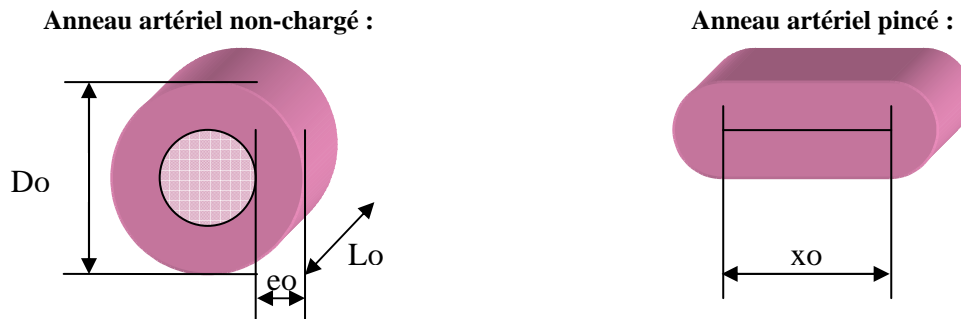


Fig. 6 : représentation des deux états initiaux (et dimensions de référence) utilisés pour les calculs mécaniques.

avec  $D_0$  le diamètre externe initiale,  $e_0$  l'épaisseur initiale de la paroi,  $L_0$  la longueur initiale et  $x_0$  l'état initial à régler sur le banc de test.

### III.1.4 Détermination des paramètres mécaniques

Le volume  $V_0$  de l'anneau artériel, supposé homogène, incompressible et isotrope, peut être calculé à partir des dimensions initiales relevées sur l'échantillon non-contraint. Ce calcul du volume est nécessaire pour déduire la contrainte circonférentielle subie par l'échantillon pendant les essais de traction.

$$V_0 = L_0 \times \pi \times \left( \left( \frac{D_0}{2} \right)^2 - \left( \left( \frac{D_0}{2} \right) - e_0 \right)^2 \right) \quad \text{Eq. 3}$$

avec  $V_0$  le volume de l'anneau artériel non chargé.

Les équations de la contrainte et de la grande déformation circonférentielles sont données par les relations suivantes :

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F}{2 \times L \times e} = \frac{F}{S} \quad \text{Eq. 4}$$

avec  $\sigma_{\theta\theta}$  la contrainte circonférentielle,  $F$  la force axiale appliquée,  $L$  la longueur de l'échantillon en charge,  $e$  l'épaisseur de la paroi artérielle en charge,  $S$  la surface d'application de la force  $F$ .



$$\mathcal{E}_{\theta\theta} = \ln \frac{x}{x_0} \quad \text{Eq. 5}$$

avec  $\mathcal{E}_{\theta\theta}$  la grande déformation circonférentielle,  $x$  l'étirement imposé en charge et  $x_0$  l'état initial.

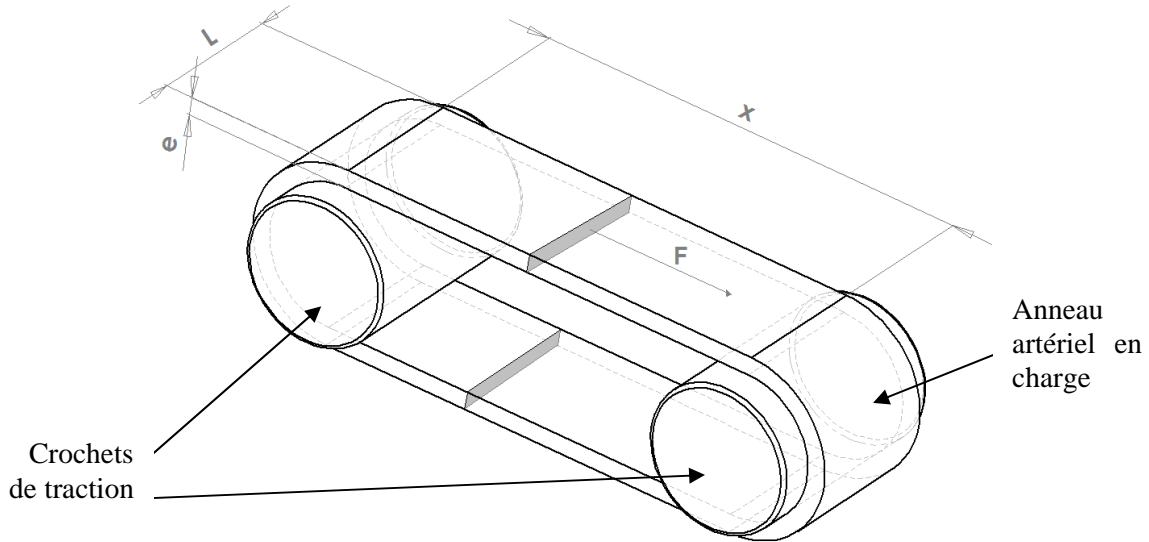


Fig. 7 : représentation schématique d'un anneau artériel en traction.

En charge, nous considérons le volume artériel  $V$  auquel on applique une déformation circonférentielle tel que :

$$V = 2 \times L \times e \times x \quad \text{Eq. 6}$$

Le volume ainsi calculé correspond au volume des deux épaisseurs de la paroi artérielle parallèles entre-elles lors des essais en traction (figure 7) [Attinger F.M.L., 1968]. Les extrémités de l'anneau artériel en contact des crochets de préhension ne sont pas prises en compte dans les calculs des contraintes, car celles-ci subissent des contraintes locales supplémentaires [Shadwick R.E., 1992].

D'après l'équation du volume artériel en charge, nous obtenons :

$$S = 2 \times L \times e = \frac{V}{x} \quad \text{Eq. 7}$$

En approximant le volume artériel initial  $V_0$  par le volume considéré en charge  $V$ , nous obtenons finalement la relation de la contrainte circonférentielle suivante :

$$\sigma_{\theta\theta} \approx \frac{F \times x}{V_0} \quad \text{Eq. 8}$$

## III.2 Spectrométries

### III.2.1 Mesures préliminaires

Des observations en microscopie multiphotonique ont été réalisées par le service d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire du laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire afin de justifier la longueur d'onde d'excitation des fluorophores (collagène, élastine) de la paroi vasculaire. Une excitation à 800 nm en mode biphotonique (correspondant à 400 nm en monophotonique) révèle l'autofluorescence de ces constituants. De plus, des images d'autofluorescence en utilisant une source laser (410 nm) ont aussi été réalisées et confirment qu'à cette longueur d'onde, les réseaux fibreux de la paroi artérielle fluorescent, avec un pic d'émission d'autofluorescence à 525 nm.

### III.2.2 Dispositif de diffusion élastique

La maquette du spectromètre de diffusion élastique résolue dans l'espace est composée d'une source d'excitation lumineuse constituée par un ensemble de trois diodes électroluminescentes, dont les pics d'émission se situent à 700 nm, 740 nm et 780 nm. Ces rayonnements lumineux sont injectés dans deux canaux constitués de trois fibres optiques chacun. Ces six fibres optiques d'excitation sont amenées en contact du tissu artériel lors des essais mécaniques de traction. Une fibre optique de réception, associée à un spectromètre, est couplée afin de recueillir les photons diffusés par les structures histologiques de l'échantillon. Les distances entre la fibre de réception et les fibres du premier et du second canal d'excitation sont respectivement de 0,5 et 1,8 mm.

Un logiciel d'acquisition et de traitement des données est utilisé pour recueillir et sauvegarder les données spectrales.

### III.2.3 Dispositif d'autofluorescence

L'obtention de spectres d'autofluorescence des échantillons artériels testés sous contraintes est rendue possible par l'utilisation d'un spectrofluorimètre fibré couplé à une source d'excitation laser (pic d'émission à 410 nm, +/- 5 nm à mi-hauteur). Le rayonnement laser est injecté au travers d'une fibre optique pour exciter les fluorophores endogènes de l'échantillon artériel. Les photons d'autofluorescence émise sont recueillis par la même fibre optique et sont envoyés vers un spectromètre couplé à un logiciel d'acquisition et de traitement des spectres.

## III.3 Protocoles

### III.3.1 Prélèvements

Les échantillons biologiques utilisés lors des expérimentations sont des artères carotides communes. Celles-ci ont été prélevées au laboratoire de Chirurgie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy, sur de jeunes porcs (20 à 30 kg, 4 à 6 mois) des deux sexes. Les cobayes étaient préalablement anesthésiés puis euthanasiés par injection létale d'une solution de chlorure de potassium (KCl).

Les artères prélevées sont immédiatement placées dans des tubes contenant un milieu de culture M199 avec antibiotiques/antifongique (pénicilline, streptomycine, fongizone). Les tubes sont ensuite entreposés en chambre froide (4°C) jusqu'à l'utilisation des échantillons pour les tests mécano-optiques qui sont effectués dans les 48 heures après les prélèvements.

### *III.3.2 Cryoconservation, décongélation*

Afin de pouvoir réaliser des tests mécano-optiques sur des échantillons issus de cryoconservation, une partie des carotides prélevées est congelée.

Pour cela, chaque segment artériel est découpé en deux parties. La première partie est directement congelée, la seconde est conservée à 4°C (M199 et antibiotiques) durant le temps des expérimentations (échantillons frais).

Pour la cryoconservation, un milieu de congélation, calqué sur les protocoles des Banques de Tissus [Rosset E. et al., 1996] et adapté à nos besoins, est préparé selon la composition suivante :

- 70 % de milieu de culture M199 et antibiotiques,
- 20 % de sérum de veau fœtal,
- 10 % de cryoprotecteur : diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Les segments artériels sont glissés dans des cryotubes placés sur lit de glace et remplis avec 1,5 mL du milieu de congélation.

On place l'ensemble en chambre froide pendant 30 minutes. Le contenu des cryotubes est homogénéisé trois fois pendant cette période afin que le cryoprotecteur pénètre les tissus.

Puis les cryotubes sont placés dans un congélateur à -80°C pendant 12 heures.

Enfin, on plonge les échantillons en azote liquide (-150°C) pendant 1 mois.

La décongélation des échantillons cryoconservés est réalisée en plaçant les cryotubes au bain marie (37°C). Dès que la glace commence à fondre les échantillons sont lavés plusieurs fois dans un milieu de culture (M199 et antibiotiques, 37°C), afin d'éliminer toute trace de DMSO délétère pour les cellules. Les échantillons issus de cryoconservation peuvent alors être utilisés pour les tests mécano-optiques.

### *III.3.3 Mesures mécano-optiques*

Après avoir mesuré les dimensions des éprouvettes, celles-ci sont disposées sur le banc de test. Sa conformation permet d'effectuer des essais uni-axiaux en imposant uniquement des déformations circonférentielles à l'anneau artériel étudié.

A partir de la valeur de l'état initial  $x_0$  précédemment obtenue, nous pouvons déduire des échelons de déformations. En effet, nous réalisons des mesures pour une gamme d'élongation allant de 0 à 60 % par pas de 10 % de l'état initial de l'échantillon vasculaire (ces échelons d'élongation correspondent à des valeurs de 0 à 0,47 selon l'expression en grandes déformations).

Au début des tests, l'anneau artériel est préconditionné à une déformation constante de 10 % pendant trois minutes afin d'atténuer les phénomènes de relaxation de l'échantillon. De même, à chaque nouvelle déformation appliquée, une période d'une minute est laissée à l'éprouvette pour se relaxer avant le début des relevés mécano-optiques, pour limiter l'effet viscoélastique.

A partir de la mesure électrique aux bornes du capteur de force et la connaissance des dimensions de l'anneau artériel, nous pouvons déduire la contrainte circonférentielle subie par l'échantillon à chaque déformation appliquée. Simultanément à la mesure mécanique, nous amenons les fibres optiques de diffusion élastique et de fluorescence en contact de la surface de l'éprouvette et nous recueillons 15 spectres d'autofluorescence et 10 spectres (5 par canal) en diffusion élastique. Ceci nous permet d'obtenir des spectres moyens, pour chaque déformation, afin d'atténuer l'influence d'éventuels parasites ou artéfacts.

## III.4 Analyse des données

### III.4.1 Représentation des données et analyse statistique

Les données mécaniques sont représentées sur des rhéogrammes contrainte =  $f$ (déformation) ainsi que par des graphiques pour le module incrémental  $E_{inc} = f$ (déformation). Les informations relevées en diffusion élastique et en autofluorescence sont affichées sous forme de spectres intensité lumineuse =  $f$ (longueur d'onde).

Nous utilisons le test t de Student-Fisher ainsi que l'analyse de la variance (ANOVA) pour déterminer l'existence de différences significatives dans la comparaison de nos différents résultats, le degré de significativité étant fixé à 5 % ( $p \leq 0,05$ ).

### III.4.2 Pré-traitement des spectres d'autofluorescence

Les spectres d'autofluorescence nécessitent d'être normalisés avant de pouvoir effectuer toute comparaison. Deux types de normalisation sont effectuées :

- la « normalisation en pic » est une méthode appliquant un facteur mathématique permettant de ramener l'intensité lumineuse du pic d'autofluorescence à une valeur arbitraire unitaire. Ce même facteur est appliqué ensuite aux intensités correspondantes aux autres longueurs d'onde. Nous obtenons donc finalement la même représentation du spectre d'autofluorescence, celui-ci étant simplement représenté sur une autre échelle de valeurs d'intensité. Cette technique nous permet par la suite de comparer les intégrales d'intensité entre différents spectres de même nature.
- la « normalisation en surface » [Tsai T. et al., 2003]. Cette deuxième méthode consiste à ramener l'aire sous la courbe d'intensité spectrale (plage d'autofluorescence de 480 à 810 nm) à une valeur unitaire. Tous les spectres ainsi normalisés auront la même surface, et les comparaisons s'effectuent alors sur les changements de forme ou d'allure des tracés.

# IV Résultats et Discussions

## IV.1 Coupes histologiques

Les images de la figure 8, réalisées en microscopie de transmission, représentent les coupes histologiques transversales typiques d'artères carotides porcines fraîches (A) et issues de cryoconservation (B) utilisées lors de nos expérimentations. Ces coupes ont été réalisées par le service d'Anatomo-Pathologie du Centre Alexis Vautrin. Un marquage par coloration Weghert a été effectué pour révéler les fibres d'élastine et de collagène.

Nous pouvons observer que les fibres élastiques de la média semblent être plus pelotonnées et sinueuses pour les échantillons frais. En effet, sur l'image de l'échantillon cryoconservé, les fibres semblent plus relâchées et moins repliées. De même, la matrice extracellulaire semble être plus lâche et moins dense pour l'échantillon cryoconservé.

Ces données sont en concordance avec des résultats d'études histologiques menées sur des artères cryoconservées par d'autres équipes [Louagie Y.A., 1990].

Ces observations, sur un plan purement histologique, nous laissent effectivement déjà présager d'une possible différence de comportement mécanique entre échantillons frais et cryoconservés.

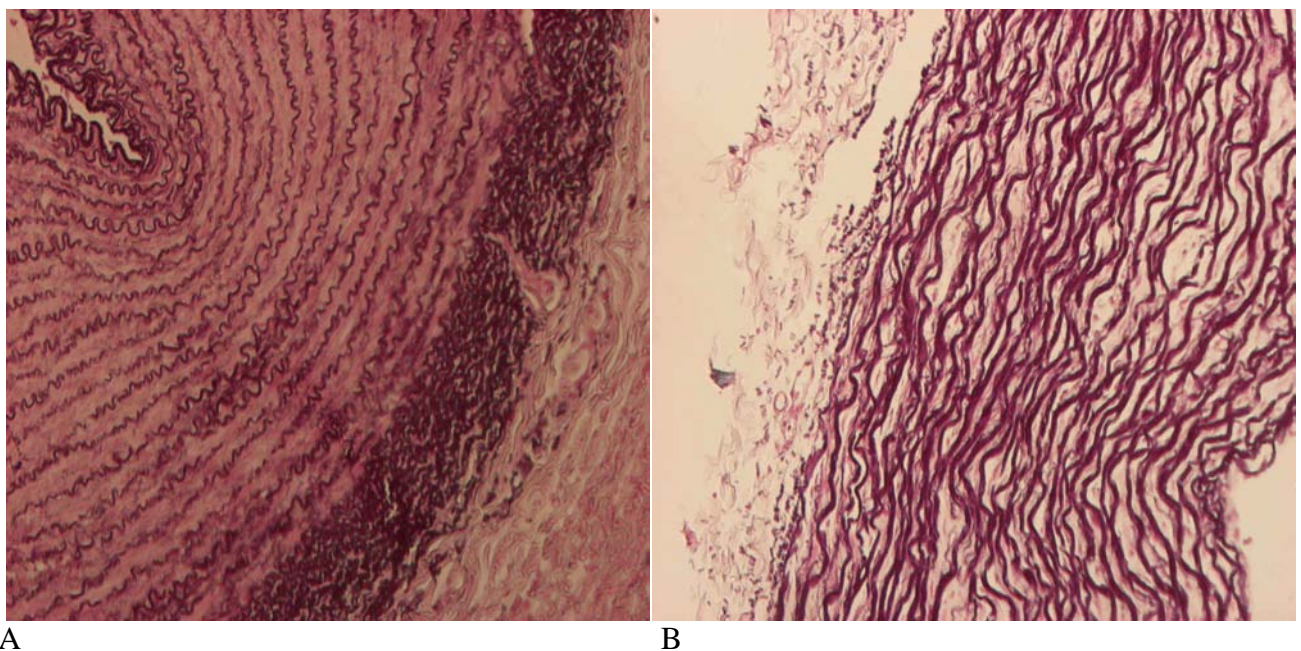


Fig. 8 : coupes histologiques d'artères fraîches (A) et cryoconservées (B), grossissement 10X.

## IV.2 Réponses biomécaniques

Les tracés des courbes de contrainte-déformation présentées figures 9 et 10 sont une moyenne inter-échantillons, pour la population (n = 16) 'échantillons frais' et la population (n = 16) 'échantillons cryoconservés'.

Sur le rhéogramme de la figure 9, nous observons un comportement non-linéaire, en grandes déformations, pour les deux populations d'échantillons. En effet, les rhéogrammes semblent suivre une loi exponentielle croissante.

L'analyse statistique (test t de Student-Fisher) révèle une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les données des échantillons frais et des échantillons cryoconservés. Pour chaque déformation imposée, la contrainte circonférentielle mesurée est toujours plus importante pour les échantillons cryoconservés, en comparaison des frais.

Dans le cas du module élastique incrémental (figure 10), nous notons que celui concernant les échantillons cryoconservés est également supérieur à celui des échantillons frais.

D'autres études [Blondel W.C.P.M. et al., 2000] montrent également des différences significatives des lois de comportement entre tissus artériels frais et cryoconservés.

Cependant, dans le cas de tests sur segments artériels entiers plutôt que sur anneaux, ce sont les artères fraîches qui présentent des valeurs de contraintes circonférentielles et de modules élastiques incrémentaux plus importants. Cette apparente contradiction s'explique par la grande différence entre ces deux types de tests, l'un uni-axial (étirement circonférent uniquement) et l'autre tridimensionnel (dilatation complète), ainsi qu'entre les modèles biomécaniques associés. D'autre part, des études [Cox R.H., 1983] montrent que les valeurs de contrainte sont plus élevées, à déformations identiques, pour des essais mécaniques sur des anneaux que sur des segments artériels, cependant, ces valeurs sont, pour les anneaux, du même ordre de grandeur ( $\sigma_{\theta\theta} \approx 15 \cdot 10^6 \text{ N/m}^2$  pour  $\epsilon_{\theta\theta} = 40 \%$ ) que nos résultats obtenus.

En rapprochant les résultats mécaniques des données histologiques, nous pouvons penser que la désorganisation architecturale des fibres pariétales fait effectivement perdre le caractère élastique de la paroi artérielle et tendrait ainsi à rendre sa structure annulaire plus rigide.

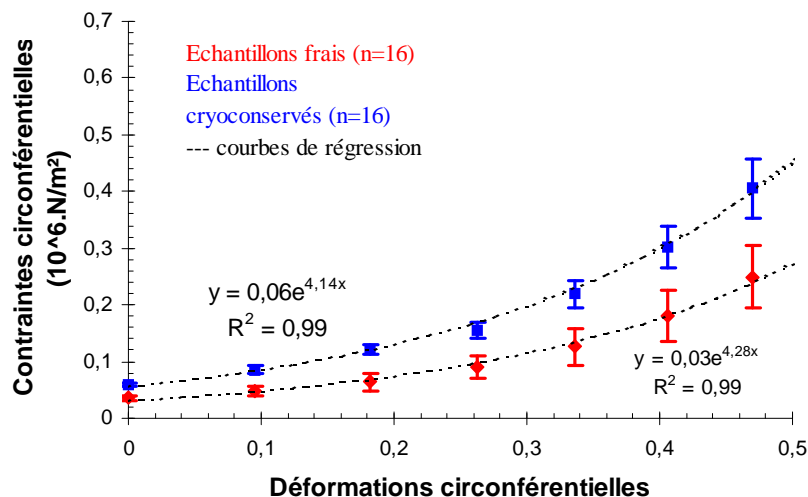


Fig. 9 : rhéogrammes moyens ( $\pm SD^4$ )  $\sigma_{\theta\theta} = f(\epsilon_{\theta\theta})$  inter-échantillons.

<sup>4</sup> SD : déviation standard.

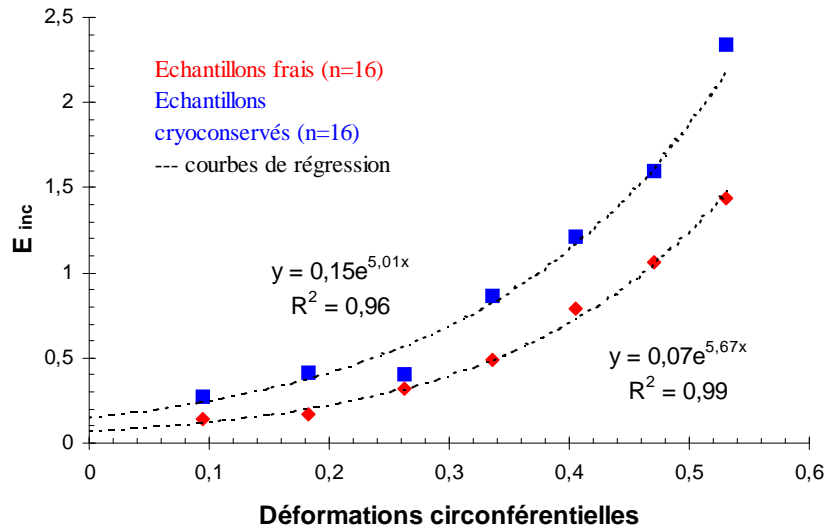


Fig. 10 : modules d'élasticité incrémentaux  $E_{inc} = \Delta\sigma_{\theta\theta} / \Delta\varepsilon_{\theta\theta}$ .

## IV.3 Réponses spectroscopiques, couplages mécano-optiques

### IV.3.1 Autofluorescence

La figure 11 représente le spectre d'autofluorescence typique d'échantillons artériels frais et cryoconservés. Les deux tracés présentés sont normalisés en surface.

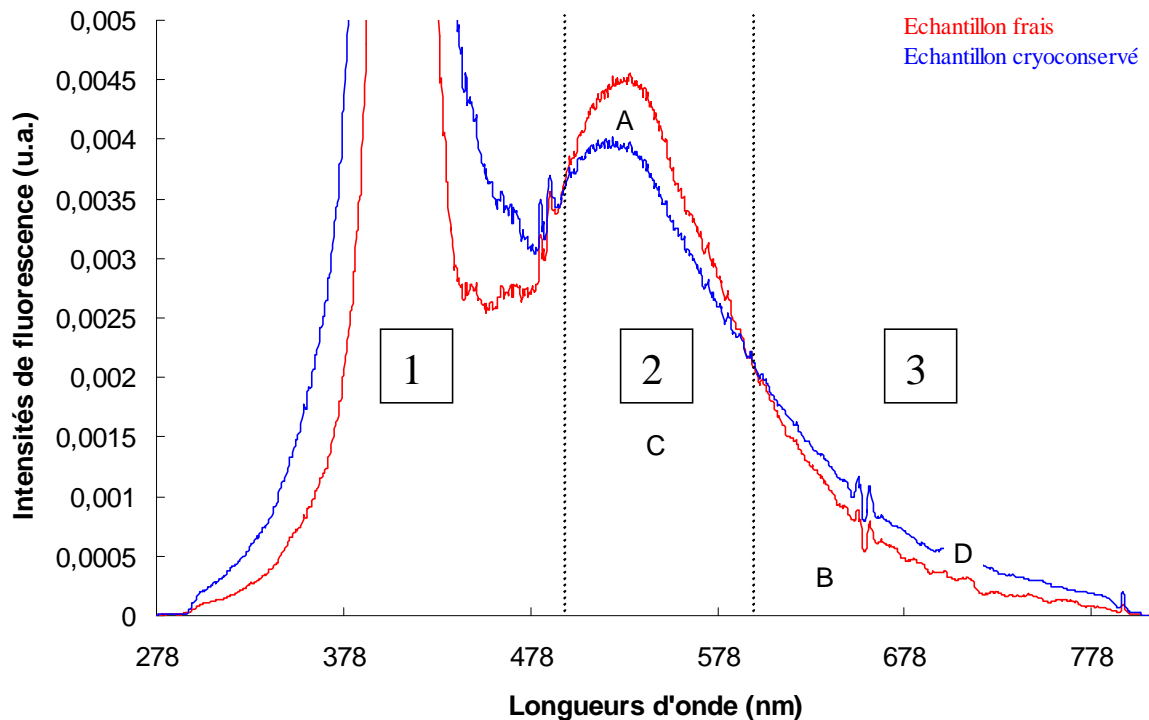


Fig. 11 : exemple de spectres normalisés d'autofluorescence (échantillons frais et cryoconservé), pour une déformation de 60 %.

A, B, C, D correspondent respectivement aux aires sous la courbe de l'échantillon frais entre 500-600 nm (A) et 600-810 nm (B) et de l'échantillon issu de cryoconservation dans les mêmes bornes (C et D).

Les spectres sont recueillis pour chaque étirement imposé à l'échantillon artériel, nous avons donc cherché à représenter de façon simple les variations spectrales en fonction de la déformation circonférentielle appliquée.

Une première approche consiste à calculer l'aire sous les spectres (dans ce cas, normalisés par rapport au pic d'autofluorescence), pour chaque type d'échantillons (frais et cryoconservés) et pour chaque déformation. Les valeurs ainsi obtenues sont reportées sur la figure 12.

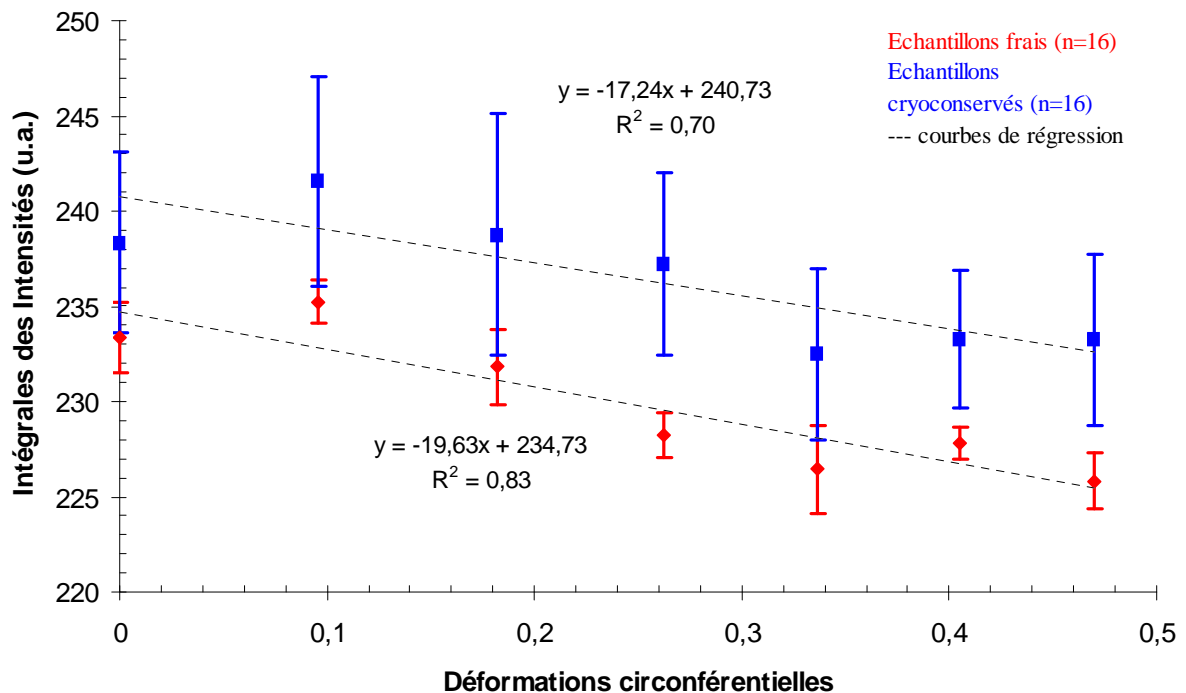


Fig. 12 : aires spectrales en fonction de la déformation appliquée.

Un décalage des spectres des échantillons frais et cryoconservés est visible sur les pages 2 et 3 de la figure 11. Ceci se traduit par une différence d'intensité globale d'autofluorescence (aire sous les spectres) entre ces deux types d'échantillons. En effet, la figure 12 met en évidence cette particularité, car le tracé des échantillons cryoconservés est significativement au-dessus de celui des anneaux artériels frais (test ANOVA,  $p < 0,05$ ). Nous observons par ailleurs que plus la déformation appliquée augmente, plus l'intensité globale d'autofluorescence a tendance à diminuer, avec des valeurs de pente très proches pour les deux types d'artères.

Nous avons été amenés à proposer une seconde approche sur la base de l'existence de trois régions distinctes sur les spectres recueillis (figure 11) :

- la région 1 correspond à la rétrodiffusion (et réflexion spéculaire) du rayonnement laser incident ( $\lambda_{ex} = 410$  nm) servant à exciter les fluorophores de la paroi vasculaire. Cette partie des spectres n'est pas utilisée dans l'interprétation des résultats, car le signal utile entre 410 et 480 nm est noyé dans l'intensité lumineuse de rétrodiffusion.
- La région 2 est une plage d'autofluorescence délimitée, entre 500 et 600 nm, par le croisement des courbes d'échantillons frais et cryoconservés, et contient le pic d'autofluorescence (525 nm) des échantillons artériels.
- La troisième région correspond à la fin de l'autofluorescence des composants pariétaux.



De cette façon, pour les spectres normalisés en surface, il est possible de calculer les aires des zones A, B, C et D (signifiées sur la figure 11), et de déterminer, pour chaque nouvelle déformation, une mesure relative A/B et C/D, afin d'observer un éventuel changement de la forme spectrale en fonction de la déformation.

Sur la figure 13, nous observons que les valeurs des rapports des aires A/B (échantillons frais) et C/D (échantillons cryopréservés) augmentent à mesure que la déformation circonférentielle augmente. Ceci traduit bien un changement d'allure des spectres d'autofluorescence en fonction de l'état mécanique subi par les anneaux artériels. Ces résultats signifient que la région 2 des spectres a tendance à « diminuer » en intensité, et la région 3 à « augmenter » avec la déformation.

Cette représentation est meilleure que celle de la figure 12, car tout en faisant apparaître les variations spectrales en fonction de la déformation imposée, elle permet d'augmenter la discrimination des deux types d'échantillons (déviations standards plus faibles).

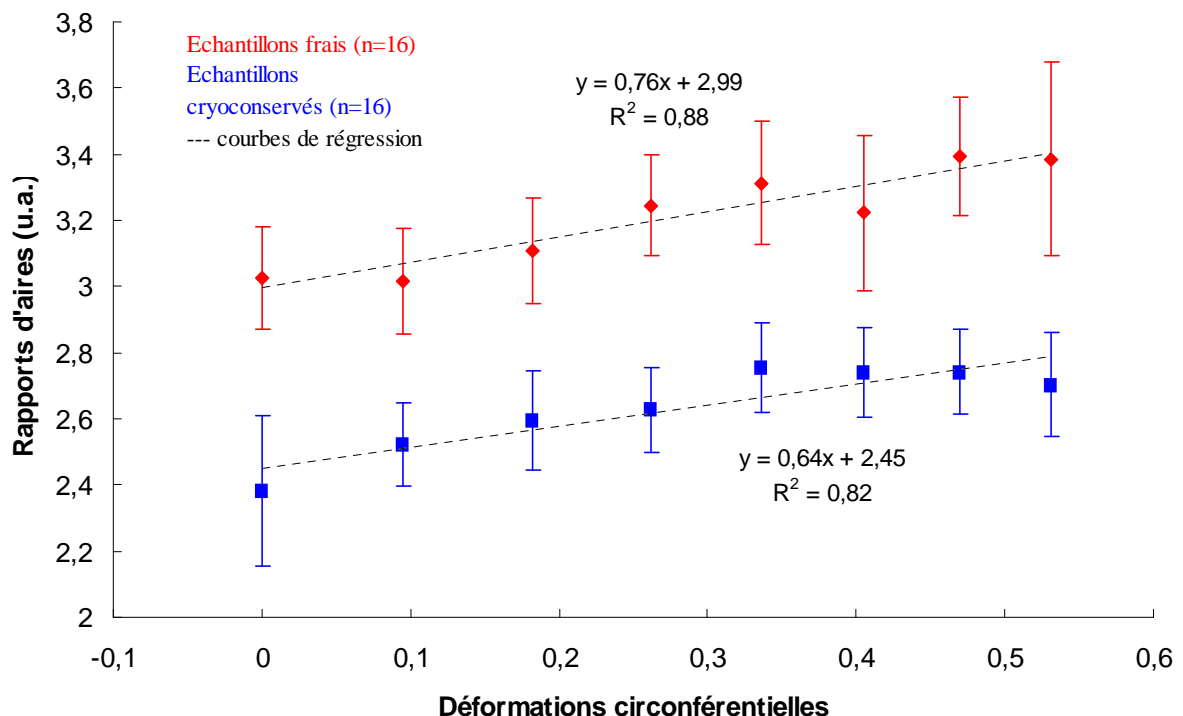


Fig. 13 : rapports des aires en fonction de la déformation appliquée.

Une analyse de la variance (ANOVA) est effectuée sur les données des graphiques 12 et 13. Ces tests statistiques révèlent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les échantillons frais et cryoconservés. Ceci indique qu'il est possible, pour une déformation donnée, de différencier un anneau artériel frais d'un autre cryoconservé par l'analyse des spectres d'autofluorescence.

#### IV.3.2 Diffusion élastique

La figure 14 montre les spectres de diffusion élastique recueillis sur chaque canal, à 0,5 mm (courbes de fortes amplitudes) et à 1,8 mm (courbes de moindres amplitudes), et pour trois déformations différentes imposées à l'échantillon testé.

Le parcours plus long que doivent effectuer les photons, entre les fibres excitatrices du canal 2 et la fibre de réception, génère une plus forte absorption par le tissu artériel, ce qui se traduit par une intensité globale plus faible du deuxième groupe de spectres.

En mettant en relation les niveaux d'intensité lumineuse des deux canaux avec la valeur de déformation appliquée, nous observons que les spectres diminuent en intensité à mesure que la déformation s'accroît. Nous pouvons aussi remarquer que ces variations sont moins marquées pour le canal 2 que pour le canal 1.

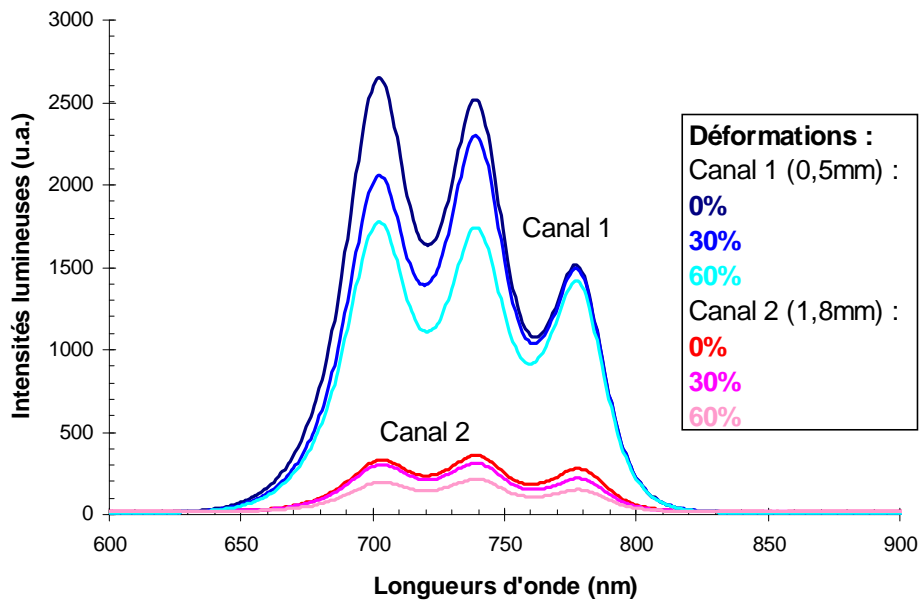


Fig. 14 : exemple de spectres de diffusion élastique pour 0, 30 et 60% de déformation.

Afin de pouvoir corréler les variations spectrales avec les valeurs de déformation, nous calculons l'aire sous la courbe pour chaque spectre, pour chaque déformation imposée. Nous obtenons alors les résultats représentés sur la figure 15.

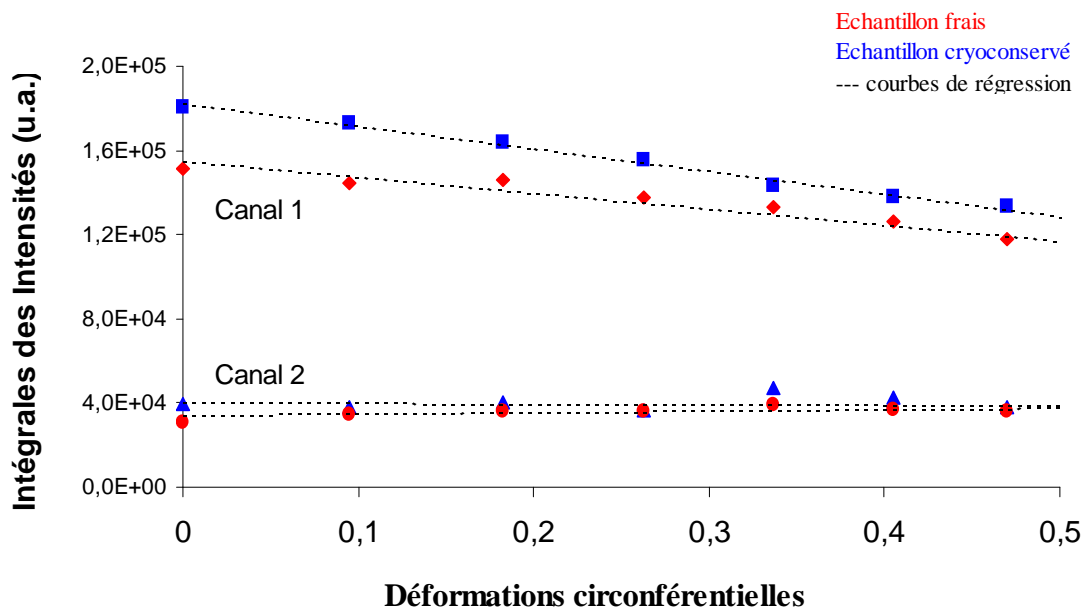


Fig. 15 : variations des intensités spectrales en fonction de la déformation appliquée.

Sur ce graphique, nous constatons que l'intensité lumineuse correspondant aux photons diffusés issus du canal 2 ne varie que très peu (test ANOVA, non significatif). De plus, pour ce canal, les points bleus (échantillons cryoconservés) et les points rouges (échantillons frais) sont quasiment confondus. Une hypothèse pouvant expliquer ces deux phénomènes est que le rayonnement diffusé doit parcourir une trop grande distance entre les fibres excitatrices et la fibre réceptrice. Ceci induirait donc un signal à détecter trop faible pour observer de véritables variations d'intensité entre échantillons frais et cryoconservés d'une part, et pour différentes déformations d'autre part.

Au contraire, pour les intégrales d'intensité correspondant à l'excitation par les fibres du premier canal (0,5 mm de distance), nous observons une diminution significative (test ANOVA,  $p < 0,05$ ), ce qui confirme l'existence d'une corrélation entre les variations d'intensité spectrales et de déformations. De plus, un décalage entre les points d'échantillons frais et cryoconservés est ici notable (test ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Les spectres de diffusion élastique des photons issus du premier canal d'excitation semblent donc être de bons indicateurs des différences de comportement optique, et de l'état de déformation mécanique des échantillons testés.

Dans les deux techniques de spectrométrie utilisées (autofluorescence et diffusion élastique) nous avons pu montrer que l'intensité des spectres recueillis était toujours plus importante pour les échantillons cryoconservés, en comparaison des échantillons frais. Le fait que la cryoconservation affecte l'organisation histologique de la paroi artérielle (figure 8.B), en la rendant plus lâche, pourrait expliquer l'atténuation du phénomène d'absorption lumineuse d'une part, et, d'autre part, l'excitation plus efficace des éléments fluorescents et des centres diffuseurs de lumière. Les spectres d'intensité lumineuse permettent donc de discriminer efficacement les anneaux artériels frais de ceux cryoconservés.

Les variations spectrales observées entre différents niveaux de déformation peuvent trouver une explication dans le fait que les échantillons en traction deviennent de plus en plus minces à mesure que la déformation augmente. La transmission de la lumière au travers du tissu sondé s'en trouverait donc augmentée, au détriment du signal (spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique) recueilli.

De plus, l'allongement des éprouvettes tendrait à diminuer le nombre de fluorophores et de centres diffuseurs recrutés dans le « champ de vision » des fibres optiques, ce qui renforcerait la diminution de l'intensité des données spectrales.

# V Conclusions et Perspectives

En guise de conclusion à ce mémoire, nous allons nous pencher sur différents points reprenant les objectifs et buts fixés au début de ce sujet.

En premier lieu, sur le plan instrumental, nous avons pu réaliser un banc de test mécanique permettant d'imposer différentes déformations uni-axiales à des anneaux artériels. Cet appareillage simple mais fiable délivre des informations sur l'état de contrainte en grandes déformations des échantillons testés, et l'ajout de deux méthodes de spectrométrie (fluorescence et diffusion élastique) permet, en parallèle, l'analyse des interactions de la lumière avec les tissus sous contrainte.

Il serait intéressant de pouvoir intégrer les appareils de spectrométrie sur un banc de test tridimensionnel plus complexe mais permettant l'étude de segments artériels entiers, afin de se rapprocher d'avantage des conditions naturelles *in vivo*.

De même, un couplage des appareillages spectroscopiques avec diverses méthodes d'investigation des propriétés mécaniques permettrait, par comparaison, de mieux définir la précision et la sensibilité des méthodes spectroscopiques.

Une validation de notre technique d'analyse « mécano-optique » par des essais effectués sur des artères humaines serait, elle aussi, souhaitable.

Sur le plan de la corrélation des données mécaniques et optiques, les opérations mathématiques simples réalisées sur les spectres d'autofluorescence et de diffusion élastique recueillis mettent en lumière des différences significatives entre artères fraîches et cryoconservées. De plus, les variations de la déformation appliquée se traduisent, elles aussi, par des modifications d'intensité et d'allure de tracés spectraux.

Cependant, afin d'accroître les possibilités de discrimination entre différents types d'échantillons et d'états de déformation, des méthodes de représentation graphique où figurent à la fois les déformations appliquées, les données de fluorescence et de diffusion élastique sont à l'étude. De plus, des méthodes mathématiques et statistiques plus puissantes, telle l'analyse en composantes principales ou des algorithmes de classification, doivent permettre de préciser la corrélation des propriétés mécaniques et optiques de tissus biologiques testés sous contraintes.

L'innovation apportée par l'adjonction de deux techniques de spectrométrie à un banc de test mécanique ouvre la voie de la détermination des propriétés rhéologiques de tissus biologiques sans avoir recours nécessairement à des installations lourdes. Cette nouvelle approche est intéressante dans le sens où elle pourrait permettre, à terme, le développement d'un appareil souple et facilement utilisable pour des tests pré- et per-implantatoires, sans contact et atraumatiques, pour l'évaluation de la compatibilité mécanique d'un greffon artériel à réimplanter avec le site anatomique receveur.

# VI Références bibliographiques

Adham M. et al., 1996. Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta, *J. Surgical Research*, 64 : 32-34.

Attinger F.M.L., 1968. Two-dimensional in-vitro studies of femoral arterial walls of the dog, *Circulation Research*, 22 : 829-840.

Bank A.J. et al., 1999. In vivo human brachial artery elastic mechanics. Effects of smooth muscle relaxation, *Circulation*, 100 : 41-47.

Bigio I.J., Mourant J.R., 1997. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics : fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy, *Phys. Med. Biol.*, 42 : 803-814.

Blondel W.C.P.M. et al., 2000. Rheological properties of fresh and cryopreserved human arteries tested in vitro, *Rheol. Acta*, 39 : 461-468.

Blondel W.C.P.M. et al., 2001. Investigation of 3-D mechanical properties of blood vessels using a new in vitro tests system : results on sheep common carotid arteries, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 48 (4) : 442-451.

Bourg-Heckly G., 2002. Dans *Applications de l'optoélectronique*, p. 103-168, ed. Hermes Lavoisier, Paris.

Boutouyrie P. et al., 1998. Smooth muscle tone and arterial wall viscosity. An in vivo/in vitro study, *Hypertension*, 32 : 360-364.

Carew T.E. et al., 1968. Compressibility of the arterial wall, *Circulation Research*, 23 : 61-68.

Cheong W.F et al., 1990. A review of the optical properties of biological tissues, *IEEE J. Quantum Electronics*, 26 (12) : 2166-2185.

Cox R.H., 1975. Anisotropic properties of the canine carotid artery in vitro, *J. Biomechanics*, 8 : 293-300.

Cox R.H., 1983. Comparison of arterial wall mechanics using ring and cylindrical segments, *Am. J. Physiol.*, 244 : H298-H303.

Çilesiz I.F., Welch A.J., 1994. Optical properties of human aorta : are they affected by cryopreservation ? , *Lasers Surg. Med.*, 14 : 396-402.

Demiray H., 1981. Large deformation analysis of some soft biological tissues, *J. Biomechanical Engineering*, 103 : 73-78.

Dobrin P.B., 1978. Mechanical properties of arteries, *Physiological Reviews*, 58 (2) : 397-460.

Eker C. et al, 2001. Multivariate analysis of laryngeal fluorescence spectra recorded in vivo, *Lasers Surg. Med.*, 28 : 259-266.

Farrell T.J., Patterson M.S., 1992. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for noninvasive determination of tissue optical properties in vivo, *Med. Phys.*, 19 (4) : 879-888.

Filippidis G. et al., 2000. Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue, *J. Photochem. Photobiol. B Biology*, 56 : 163-171.

Fung Y.C., Liu S.Q., 1993. Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels, *J. Biomedical Engineering*, 115 : 1-12.

Fung Y.C., Liu S.Q., 1995. Determination of the mechanical properties of the different layers of blood vessels in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 2169-2173.

Georgakoudi I. et al., 2001. Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's Esophagus, *Gastroenterology*, 120 : 1620-1629.

Girerd X. et al., 1992. Conséquences du vieillissement sur la fonction artérielle chez l'homme, *Presse Médicale*, 21 : 1204-1209.

Gournier J.P. et al, 1993. Allogreffes artérielles cryopréservées : étude préliminaire, *Ann. Chir. Vasc.*, 7 (6) : 503-511.

Groenhuis R.A.J. et al., 1983. Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements, *Applied Optics*, 22 (16) : 2456-2462.

Gurjar R.S. et al., 2001. Imaging human epithelial properties with polarized light scattering spectroscopy, *Nature Medicine*, 7 (11) : 1245-1248.

Langerak S.E. et al., 2001. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts, *Transpl. Int*, 14 : 248-255.

Lehalle B. et al., 1997. Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts, *J. Vasc. Surg.*, 25 : 751-752.

Li D.Y. et al., 1998. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis, *Nature*, 393 : 276-280.

Louagie Y.A., 1990. Viability of long-term cryopreserved human saphenous veins, *J. Cardiovasc. Surg.*, 31 : 92-100.

Oddou C. et al., 1976. Rhéologie des parois et hydrodynamique artérielle. Modèles théoriques et hydromécaniques, *J. Physiol.*, 72 : 663-681.

Panjehpour M. et al., 2002. Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers, *Lasers Surg. Med.*, 31 : 367-373.

Ramanujam N., 2000. Dans *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, p. 20-56, ed. R.A. Meyers, Chichester.

- Richards-Kortum R. et al., 1991. 476 nm excited laser-induced fluorescence spectroscopy of human coronary arteries : applications in cardiology, *Am. Heart Journal*, 122 (4) : 1141-1150.
- Roach M.R., Burton A.C., 1957. The reason for the shape of distensibility curves of arteries, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 : 681-690.
- Rosset E. et al., 1996. Effets de la cryopréservation sur les propriétés visco-élastiques des artères humaines, *Ann. Chir. Vasc.*, 10 : 262-272.
- Saidi I.S. et al., 1995. Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin, *Applied Optics*, 34 (31) : 7410-7418.
- Shadwick R.E., 1992. Dans *Biomechanics, structures and systems, a practical approach*, p. 233-261, ed. A.A. Biewener, Chicago.
- Sharma M.G., 1974. Viscoelastic behavior of conduit arteries, *Biorheology*, 11 : 279-291.
- Stevens A., Lowe J., 1997. Dans *Histologie humaine, traduction de la deuxième édition anglaise*, p. 137-147, ed. DeBoeck Université, Paris, Bruxelles.
- Stoltz J.F. et al., 2000. Influence of mechanical forces on cells and tissues, *Biorheology*, 37 : 3-14.
- Tsai T. et al., 2003. In vivo autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions : distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis, *Lasers Surg. Med.*, 33 : 40-47.
- Tickner E.G., Sacks A.H., 1967. A theory for the static elastic behavior of blood vessels, *Biorheology*, 4 : 151-168.
- Vito R.P., Dixon S.A., 2003. Blood vessel constitutive models—1995-2002, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5 : 413-439.
- Wallace M.B. et al., 2000. Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy, *Gastroenterology*, 119 : 677-682.
- Williams J.K., Heistad D.D., 1996. Les vasa vasorum des artères, *J. Maladies Vasculaires*, 21 (suppl. C) : 266-269.