



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne Ardenne

Discipline : Ingénierie de la Santé

Spécialité : Biophysique

Par

Sylvain RUBIN

Soutenue le MERCREDI 20 DECEMBRE 2006

**CARACTERISATION DU TISSU AORTIQUE ET AIDE AU
DIAGNOSTIC PRECOCE DES ANEVRYSMES DE L'AORTE
ASCENDANTE PAR SPECTRO-IMAGERIE**

Directeur de Thèse

Professeur Michel MANFAIT

JURY

Pr Alain PRAT - Rapporteur

Pr Patrice PROGNON - Rapporteur

Pr Bernard BAEHREL

Dr Marie Paule JACOB

Pr Michel MANFAIT

Dr Ganesh SOCKALINGUM

N° attribué par la bibliothèque

| 0 | 2 | R | E | I | | | | |



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne Ardenne

Discipline : Ingénierie de la Santé

Spécialité : Biophysique

Par

Sylvain RUBIN

Soutenue le **MERCREDI 20 DECEMBRE 2006**

**CARACTERISATION DU TISSU AORTIQUE ET AIDE AU
DIAGNOSTIC PRECOCE DES ANEVRYSMES DE L'AORTE
ASCENDANTE PAR SPECTRO-IMAGERIE**

Directeur de Thèse

Professeur Michel MANFAIT

JURY

Pr Alain PRAT - Rapporteur

Pr Patrice PROGNON - Rapporteur

Pr Bernard BAEHREL

Dr Marie Paule JACOB

Pr Michel MANFAIT

Dr Ganesh SOCKALINGUM

N° attribué par la bibliothèque

| 0 | 2 | R | E | I | | | | |

RESUME

Le diagnostic précoce des anévrismes de l'aorte ascendante reste, aujourd'hui, un véritable écueil. Aucun test diagnostique non destructif ne peut mettre en évidence les altérations infra-cliniques conduisant à la dilatation aortique. Nous avons utilisé différentes approches en spectro-imagerie pour étudier le tissu aortique non dilaté et anévrysmal, avec ou sans bicuspidie aortique. L'analyse en spectroscopie infrarouge a porté sur 19 échantillons, et a permis de caractériser les tissus sains et pathologiques puis de discriminer 100% de ces tissus en utilisant des bandes spectrales liées aux protéines et possiblement à la conformation de l'ADN. La structure secondaire des protéines semble à la base de ces classifications avec en particulier des variations spécifiques du rapport feuillets β sur hélice α en fonction des différents tissus. La mise en évidence d'anomalies similaires entre aortes de bicuspidie, dilatées ou non, nous fait penser que nous avons mis en évidence un facteur spécifique des bicuspidies. La spectroscopie Raman nous a permis, sur un plus faible nombre d'échantillons, de discriminer par classification hiérarchique ascendante les anévrismes des tissus non dilatés en se basant sur des gammes spectrales influencées par les acides aminés majoritaires du collagène et de l'élastine. Pourtant, le traitement fastidieux des données nécessitera le développement de méthodes suffisamment souples et puissantes pour analyser les millions de données qui seront générées par l'extension de ces travaux.

En conclusion, nous avons pu caractériser et discriminer différents tissus en utilisant plusieurs approches dont certaines peuvent avoir un débouché en pratique clinique.

Mots clés :

Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier, Spectroscopie Raman, Aorte, Anévrisme, Classification

ABSTRACT

AORTIC TISSUE CHARACTERISATION AND PRECOCIOUS DIAGNOSIS OF AORTIC ASCENDING ANEURISMS USING SPECTRAL IMAGING

To date, the precocious diagnosis of ascending aortic aneurysms remains impossible. No non-destructive diagnostic test, showing infraclinical modifications before the aneurysm, exists. We have used different spectral and imaging approaches to study non-dilated and aneurysmal tissues, with or without bicuspid aortic valve. The infrared analysis, based on 19 samples, have characterised and correctly discriminated 100% of our tissues, using some specific spectral ranges related to the protein secondary structure and, probably, the structure of the DNA. The secondary structure of proteins seems to be the most important point of this discrimination with major modifications in the β -sheet / α -helix ratio. Same modifications have been shown for dilated and non-dilated bicuspid aortas. We believe that it could be a specific descriptor and perhaps a predictive factor of aortas from patients with bicuspid aortic valve. With few samples, the Raman spectroscopy has allowed to discriminate aneurysmal aortas from the others using spectral ranges presenting information from collagen and elastin. However, the spectral analysis will require powerful tools to treat the enormous quantity of generated data by the extension of this project. To conclude, we have characterized and discriminated different aortic tissues using some spectral approaches with, for someones, the hope of exportation to the hospital.

KEYWORDS : Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Raman Spectroscopy, Aorta, aneurysm, classification

Remerciements

Epreuve finale toujours difficile, les remerciements sont souvent l'occasion d'interrogations ? Qui remercier en premier, le cinquième a-t-il moins de mérite ? Que dira le dernier remercié ?

A ces questions je répondrai : l'important, c'est ce que l'on dit et pas où on le dit.

A Ganesh Sockalingum, collaborateur de la première heure et ami,

je souhaite ici te remercier de tes conseils, de ton encadrement et de m'avoir accompagné dans tout ce que j'ai entrepris au sein de l'unité MÉDIAN.

Aux membres du Jury,

je souhaite vous remercier tout d'abord collectivement pour le précieux concours que vous m'avez apporté et pour votre disponibilité. Vous tous avez, pour des raisons différentes, contribué à l'aboutissement de cette thèse, soyez assurés de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Michel Manfait,

vous m'avez accueilli au sein de votre unité et vous avez dirigé cette thèse, je souhaite vous remercier de m'avoir accordé confiance et de m'avoir laissé suffisamment de liberté pour effectuer ces travaux en parallèle de ma carrière chirurgicale.

A Monsieur le Professeur Alain Prat,

vous me faites l'honneur d'être rapporteur de ce travail, je souhaite vous renouveler mes sincères remerciements pour votre implication tout au long de ma *courte* carrière hospitalo-universitaire.

A Monsieur le Professeur Bernard Baehrel,

vous m'avez fait découvrir la chirurgie cardiaque et aortique, je souhaite ici vous témoigner ma reconnaissance pour ce que vous avez fait afin que ce projet puisse aller de l'avant au sein de votre service de chirurgie.

A Monsieur le Professeur Patrice Prognon,

vous avez accepté d'être rapporteur de cette thèse, je souhaite vous remercier pour votre implication dans l'évaluation de mes travaux ainsi que pour votre compréhension de la situation un peu particulière ayant entouré sa rédaction.

A Madame le Docteur Marie-Paule Jacob,

vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, je vous remercie également pour l'ensemble de vos travaux sur l'aorte qui ont été pour moi une remarquable source d'information.

A Franck Bonnier,

je souhaite te remercier de ton importante contribution à ce travail assurant une partie des acquisitions spectrales. J'espère que notre amicale collaboration perdurera au-delà de ton propre travail de thèse.

A Christophe Sandt,

Sois remercié de ta patience lors de mon initiation à la spectroscopie infrarouge, je souhaite te remercier de tes judicieux conseils et de m'avoir appris le sens de l'expression « critique constructive », sois assuré de mon amitié.

A Gregory Kegelaer,

qui m'a initié à la spectroscopie Raman, il y a six ans déjà, je tiens ici à te remercier de m'avoir fait découvrir le potentiel de ces techniques ; sache que ces travaux n'auraient pas vu le jour sans ce stage à tes côtés.

A Monsieur le Professeur Pluot et aux membres du laboratoire d'Anatomo-pathologie

de l'Hôpital Robert Debré qui m'ont accueilli et m'ont permis la constitution de la banque de tissu aortique, je souhaite vous remercier de votre gentillesse et de votre disponibilité.

A Linda, Nicolas, Olivier, Ali, Mohamed, Didier, Sylvain, et tous les membres de l'unité MéDIAN toujours disponibles pour m'aider dans ce travail de thèse.

Soyez tous assurés de mon amitié.

A Hervé Kaplan,

qui m'a fait récemment découvrir la microscopie confocale et l'imagerie RMN, je souhaite te remercier de ta disponibilité et de ta gentillesse et je compte sur ton aide pour poursuivre ces travaux.

A l'ensemble des membres du bloc opératoire et des chirurgiens du service de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire du CHU de Reims qui ont permis la constitution de la banque de tissu, je souhaite ici sincèrement vous remercier pour votre contribution avant de le faire de vive voix dès mon retour en France.

A Muriel , mon épouse qui a toujours été mon plus fidèle soutien, je souhaite te remercier pour ta participation très active à toutes les étapes de ces travaux, de l'obtention de mon premier stage à l'unité MÉDIAN à la diffusion de ce document. Je souhaite aussi te remercier pour ta patience et ta compréhension des inconvénients inhérents à mes choix professionnels.

A Clarisse et Quentin, mes enfants

A mes Parents et Beaux Parents

A toute ma famille

;~)

... A mes ordinateurs qui, malgré quelques signes de révolte, ont toujours supporté des horaires de travail peu compatibles avec les « 35 heures », ont créé, ouvert, modifié, traité, converti et enregistré pas moins de 128 248 fichiers informatiques dans mon dossier « *Recherche* » ...

;~)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
1. PREAMBULE	18
2. L'AOORTE NORMALE	20
2.1. Anatomie descriptive et fonctionnelle de l'aorte	20
2.2. Description des différents segments de l'aorte	21
2.2.1. L'aorte ascendante	21
2.2.1.1. Aspect global de l'aorte ascendante	21
2.2.1.2. Les différentes structures composant l'aorte ascendante	23
2.2.2. L'aorte horizontale ou arche aortique	26
2.2.3. L'aorte thoracique descendante	28
2.2.4. L'aorte abdominale	28
2.3. Dimensions des différents segments de l'aorte ascendante normale	29
2.3.1. Le diamètre de l'anneau aortique	30
2.3.2. Le diamètre maximum de la racine aortique au niveau des sinus de Valsalva	32
2.3.3. Le diamètre au niveau de la jonction sino-tubulaire (JST)	35
2.3.4. Le diamètre au niveau de l'aorte ascendante dans sa partie « tubulaire »	35
2.3.5. Conclusion concernant les mensurations de l'aorte	36
2.4. Anatomopathologie des artères élastiques	37
2.5. Architecture fonctionnelle des artères élastiques	39
2.6. Constituants de la paroi aortique	40
2.6.1. Introduction	40
2.6.2. La matrice extracellulaire du tissu aortique	41
2.6.2.1. L'élastine	42
a- La synthèse de l'élastine	42
b. Structure primaire de la tropoélastine	44
c. Structure du polymère d'élastine	45
d. Structure secondaire de l'élastine	46
2.6.2.2. Le collagène	47
a- La molécule de collagène (Exemple de collagène I)	47
b. la fibrille et la fibre de collagène	50
a. Les Glycoprotéines matricielles	52
b. Les Protéoglycanes	54
2.6.3. Les cellules musculaires lisses des artères élastiques	55
2.6.3.1. Les cellules musculaires lisses vasculaires matures	55
2.6.3.2. Les cellules musculaires lisses au cours de l'angiogénèse	56
2.6.3.3. Les cellules musculaires lisses dans l'athérome	57
2.6.4. Les métalloprotéases matricielles ou MMPs	58
2.7. Concept d'unité élastique et structuration globale de la paroi aortique	61
2.7.1. L'unité élastique	61
2.7.2. Structuration globale de la paroi aortique	62
2.8. Facteurs et pathologies influençant la composition de la paroi aortique	62
2.8.1. Effet du vieillissement	62
2.8.2. Effet de l'hypertension artérielle	67
2.8.3. Effet du diabète	67
3. L'AOORTE PATHOLOGIQUE	68
3.1. Introduction : Athérome, Athérosclérose et Calcifications	68
3.1.1. L'athérome	68
3.1.2. L'athérosclérose	68
3.2. L'anévrisme de l'aorte ascendante	69
3.2.1. Définition	69
3.2.2. Présentation	69
3.2.2.1. Anévrisme Fusiforme	69
3.2.2.2. Anévrisme sacciforme	70
3.2.3. Les complications	71
3.2.3.1. La rupture	71
3.2.3.2. La dissection aortique	71
3.2.3.3. L'insuffisance aortique	72
3.2.3.4. La compression des structures adjacentes	73
3.2.4. Physiopathologie des anévrysmes	73
3.2.4.1. La maladie annulo-ectasiante	74
3.2.4.2. La valve et « l'aorte de bicuspidie »	75

4. LA CHIRURGIE DE L'AOORTE ANEVRYSMALE.....	77
4.1. Introduction.....	77
4.2. Le remplacement de l'aorte ascendante (ou mise à plat-greffe).....	77
4.3. Le remplacement de l'aorte ascendante et des sinus de Valsalva.....	78
4.4. Remplacement de la racine aortique avec conservation de la valve aortique et réimplantation des coronaires.....	78
4.4.1. L'intervention de YACOUB (1983).....	79
4.4.2. L'intervention de Tirone DAVID (1992).....	80
4.4.3. L'intervention de RAMA (2006).....	81
4.5. Remplacement de la valve aortique, de l'aorte ascendante avec réimplantation des coronaires ou intervention de BENTALL (1968).....	81
5. LES SPECTROSCOPIES OPTIQUES.....	83
5.1. Introduction.....	83
5.2. La spectroscopie infrarouge.....	83
5.2.1. Aspects théoriques.....	84
5.2.1.1. Interaction onde-matière.....	84
5.2.1.2. Loi de Beer-Lambert.....	85
5.2.2. Principes de la spectroscopie infrarouge.....	86
5.2.2.1. Modèle du vibreur harmonique.....	87
a. Pour les molécules simples.....	87
b. Pour les molécules polyatomiques.....	87
5.2.2.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	89
a. l'interféromètre de Michelson.....	90
b. la transformée de Fourier.....	91
c. traitements nécessaires avant l'application de la transformée de Fourier.....	93
d. Génération du spectre.....	95
e. Avantages de la spectroscopie à transformation de Fourier.....	96
5.2.3. Méthodes de mesure et appareillages.....	97
5.2.3.1. Principe du spectromètre IRTF.....	97
5.2.3.2. Mode de mesure et supports utilisés.....	98
5.2.3.3. Principe de la microspectroscopie IRTF.....	98
5.2.4. Attributions spectrales en spectroscopie infrarouge.....	100
5.2.4.1. Les Protéines.....	100
5.2.4.2. Les acides nucléiques.....	102
5.2.4.3. Les polysaccharides.....	103
5.2.4.4. Les lipides.....	104
5.2.5. Applications médicales de la spectroscopie infrarouge.....	105
6. LA SPECTROSCOPIE RAMAN.....	108
6.1. Introduction.....	108
6.2. Principes.....	108
6.2.1. Bases de la spectroscopie Raman.....	109
6.2.2. Modèle ondulatoire de l'émission Rayleigh et Raman.....	111
6.2.3. Exemple de changement de polarisabilité pour 2 molécules simples H ₂ O et CO ₂	112
6.2.4. Les principaux avantages de la spectroscopie Raman.....	114
6.3. Spectre Raman et modes vibrationnels.....	115
6.4. Pics et attributions en spectroscopie Raman.....	116
MATERIEL ET METHODES.....	117
1. COLLECTION DES ECHANTILLONS.....	118
2. REALISATION DES COUPES AU MICROTOME.....	119
3. LES SPECTROMETRES INFRAROUGES.....	120
3.1. L'analyse en mode « point par point » à l'aide du spectromètre Equinox 55.....	120
3.1.1. Le spectromètre de recherche Equinox 55, Bruker (Wissembourg, France).....	120
3.1.2. Le microscope IRscope II (Bruker).....	120
3.1.3. Acquisition des spectres infrarouges à l'aide du Microspectromètre Equinox 55 associé au microscope IRscope II (Bruker).....	123
3.2. L'analyse en mode « image » à l'aide de l'imageur infrarouge Spectrum Spotlight 300 (PerkinElmer).....	124
3.2.1. Le spectromètre.....	124
3.2.2. Le microscope infrarouge (données constructeur).....	124
3.2.3. Acquisition des spectres infrarouges à l'aide de l'imageur Spotlight 300 (Perkin Elmer).....	127

3.3	<i>Pré-traitement des données spectrales</i>	127
3.3.1.	Correction de ligne de base	127
3.3.2.	Le lissage	128
3.3.3.	La normalisation	128
3.3.4.	Les dérivées de premier et second ordre	129
3.4.	<i>Traitement des données spectrales</i>	129
3.4.1.	L'analyse en composantes principales	130
3.4.1.1.	Principe de l'ACP	130
3.4.1.2.	Réalisation de l'ACP	132
3.4.2.	Classification hiérarchique ascendante	133
3.4.2.1.	Particularités du traitement des images spectrales dans le logiciel Spotlight (PerkinElmer)	134
3.4.2.2.	Utilisation du test de Student pour évaluer la significativité des longueurs d'onde testées	135
4.	LE SPECTROMETRE RAMAN	136
5.	LA FIBRE RAMAN	138
6-	PRE-TRAITEMENTS ET TRAITEMENTS DES SPECTRES OBTENUS EN SPECTROSCOPIE RAMAN	140
	RÉSULTATS ET DISCUSSION	141
1.	REALISATION DES PRELEVEMENTS AORTIQUES ET CONDITIONS D'ANALYSE	142
1.1	<i>Concernant les biopsies provenant d'aortes anévrysmales</i>	142
1.2.	<i>Concernant les biopsies provenant d'aortes « témoins »</i>	143
1.3.	<i>Observation des coupes aortiques en microscopie optique</i>	144
2.	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN MODE TRANS-MISSION/ABSORPTION	146
2.1.	<i>Etude infrarouge à l'aide du spectromètre Brucker Equinox 55</i>	146
2.1.1	Description spectrale du tissu aortique normal	146
2.1.1.1	Introduction à l'étude infrarouge du tissu aortique normal	146
2.1.1.2	Etude infrarouge d'un échantillon selon la zone d'acquisition	150
a.	Conditions d'acquisition	150
b.	Variabilité des spectres en fonction de la profondeur dans l'échantillon	152
c.	Variabilité des spectres en fonction de la position longitudinale sur l'échantillon	155
2.1.2	Description spectrale du tissu aortique anévrysmal	157
2.1.3.	Introduction des notions de moyenne spectrale et de déviation standard	160
2.1.4.	Analyses des résultats des échantillons normaux en spectroscopie « point par point »	161
2.1.5.	Analyses des résultats des échantillons anévrysmaux en spectroscopie « point par point »	161
2.1.6.	Etablissement des moyennes spectrales de l'ensemble des aortes normales et anévrysmales	162
2.1.7.	Analyse des moyennes spectrales des aortes normales et anévrysmales par classification hiérarchique ascendante et analyse en composante principale	166
2.1.7.1.	Analyse des résultats des classifications hiérarchiques des spectres moyens	166
a.	Analyses non guidées par le test de Student	166
b.	Analyses guidées par le Student test	169
2.1.7.2.	Analyse des résultats des classifications hiérarchiques des dérivées secondes	172
2.2.	<i>Etude infrarouge à l'aide de l'imageur SPOTLIGHT 300 (PerkinElmer®)</i>	180
2.2.1.	Avantages de l'imageur spectral	180
2.2.2.	Résultats de l'analyse des images spectrale des tissus aortiques	182
2.2.2.1.	Analyse des résultats en absorbance totale	182
a.	Analyse des échantillons selon des zones spectrales définies	184
b.	Analyse selon les bandes amides I, II et III	184
c.	Analyse selon la bande spectrale 1100-1050 cm ⁻¹	187
2.2.2.2.	Analyse selon un rapport de bande	187
2.2.2.3.	Analyse de band ratio de bandes spécifiques des protéines	190
2.2.3.	Résultats après extraction de spectres provenant de l'image spectrale	196
2.2.3.1	Hétérogénéité des données spectrales dans l'épaisseur de l'échantillon	196
2.2.3.2.	Analyses et classifications des différents types de tissus à partir des Images Spotlight	201
a.	Analyses basées sur la classification hiérarchique ascendante	201
b.	Analyses en composantes principales	204
2.	LA SPECTROSCOPIE RAMAN APPLIQUEE AU TISSU AORTIQUE	207
2.1.	<i>Analyse des tissus aortiques à l'aide du spectromètre Labram</i>	208
2.1.1.	Le spectre Raman du tissu aortique	208
2.1.2.	Etude préliminaire des tissus aortiques non dilatés et anévrysmaux en spectroscopie Raman	209
2.2.	<i>Etude préliminaire ex vivo d'une crosse aortique à l'aide de la « fibre Raman »</i>	214
2.3.	<i>Conclusion concernant les méthodes spectroscopiques Raman</i>	216
3.	APPROCHE EN MICROSCOPIE CONFOCALE	217
4.	APPROCHE EN IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	221

CONCLUSION.....	225
BIBLIOGRAPHIE.....	228
ANNEXES.....	241
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	242
1.1. <i>Publications de niveau internationales</i>	242
1.2. <i>Articles soumis à publication</i>	243
1.3. <i>Présentations internationales</i>	243
Communications écrites (affiches).....	243
Communications orales.....	244
1.4. <i>Présentations nationales</i>	244
Communications écrites (affiches).....	244
Communications orales.....	244
1.5. <i>Participation à présentation</i>	244

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : aspect général de l'anatomie aortique.....	20
Figure 2 : aorte ascendante avec le détail de la racine aortique	21
Figure 3 : aspects de l'anneau aortique, des commissures et de la jonction sino-tubulaire	25
selon le mécanisme d'insuffisance aortique.....	25
Figure 4 : aorte horizontale ou arche aortique.....	26
Figure 5 : aspect de l'aorte thoracique	28
Figure 6 : structure de la paroi aortique	37
Figure 7 : implication des cellules musculaires lisses (SMC) dans la dynamique.....	40
de la paroi aortique par la mise en jeu des fibres élastiques (FE)	40
figure 8 : structures secondaires des protéines	46
Figure 9 : organisation spatiale des résidus de 3 chaînes α	48
figure 10 : auto-agrégation de 3 chaînes α du collagène	49
figure 11 : aspect final du collagène mature	49
figure 12 : l'unité élastique de la paroi artique.....	62
SMC : cellule musculaire lisse. AD : adhérence à la matrice extracellulaire.	62
Figure 13 : anévrisme fusiforme de l'aorte ascendante.....	70
Figure 14 : anévrisme sacciforme de l'aorte ascendante.....	70
Figure 15 : aspect d'une dissection aortique de l'aorte ascendante associée à une insuffisance aortique par désinsertion des commissures de la valve aortique.....	72
figure 16 : intervention de Yacoub laissant l'anneau valvulaire libre.....	79
Figure 17 : intervention de David par inclusion de la valve aortique dans un tube prothétique avant la réimplantation des artères coronaires	80
Figure 18 : intervention de RAMA créant des néosinus	81
et stabilisant l'anneau aortique	81
Figure 19 : intervention de Bentall remplaçant la totalité de l'aorte ascendante	82
et la valve aortique (ici : prothèse valvulaire mécanique).....	82
Figure 20 : Diagramme de Jablonski représentant les niveaux d'excitation électronique	83
pour les différentes spectroscopies vibrationnelles.....	83
Figure 21 : Le spectre électromagnétique	85
Figure 22 : Quelques modes de vibration de molécules polyatomiques	88
Figure 23 : Schéma de l'interféromètre de Michelson.....	91
Figure 24 : visualisation des interférogrammes et des spectres correspondants en cas de déplacement infini du miroir mobile (a), de déplacement limité (b)	93
et après application de la fonction d'apodisation	93
Figure 25 : Exemple de quelques fonctions d'apodisation	94
et leur effet sur la résolution des bandes d'absorption.....	94
Figure 26 : Génération du spectre IRTF.....	95
Figure 27 : Schéma de principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.....	98
Figure 28 : Spectre IRTF du collagène (tendon de rat).....	101
Figure 29: Spectres infrarouges normalisés de tissu thyroïdien, aortique et cérébral.....	106
Figure 30 : diagramme de Jablonski appliqué à la diffusion Raman	110
Figure 31 : Spectromètre IRTF Equinox 55 (A) associé à l' IRscope II (B), l'ordinateur (C), la caméra CCD (D), et la purge (E).....	121
Figure 32 : aspect du détecteur 16 éléments de l'imageur Spotlight	126
et principe d'acquisition par translation	126
Figure 33 : Changement de repère dans un espace multidimensionnel	131

ou le principe de l'ACP	131
Figure 34 : aspect général du microspectromètre Raman Labram.....	136
Figure 35 : schéma du microspectromètre Labram.....	137
Figure 36 : Composants et détails du spectromètre axial Raman et de sa fibre optique.....	138
Figure 37 : photographies du prototype de spectromètre axial	139
et de sa fibre (configuration originelle).....	139
Figure 38 : représentation tridimensionnelle d'un rapport de bande spectrale d'une acquisition infrarouge (Imageur Spotlight 300) Les pics représentent les déchirures du tissu	145
Figure 40 : bloc de données produit par l'acquisition des spectres.....	147
aux positions définies par l'opérateur	147
Figure 41 : Spectre infrarouge brut du tissu aortique (4000-650 cm^{-1}).....	147
Figure 42 : dérivées seconde du collagène (bleu) et de l'élastine (rouge)	150
Figure 43 : repérage et éliminations des spectres altérés lors du prétraitement.....	151
Figure 44 : représentation en couleur arbitraire des deux bras de la classification hiérarchique des 200 spectres d'un échantillon normal	153
Figure 45: visualisation des différents spectres au sein de l'épaisseur du tissu aortique.....	154
Figure 46 : Dérivées secondes de l'ensemble des spectres d'un échantillon.....	155
dans la région spectrale 1250-900 cm^{-1}	155
Figure 47 : visualisation des zones d'acquisition utilisées dans la profondeur du tissu aortique. L'intima est par convention en haut et l'adventice en bas	155
Figure 48 : classification hiérarchique de moyennes réalisées près de l'intima (<i>haut</i>), en pleine média (<i>milieu</i>) et proche de l'adventice (<i>bas</i>) sur un même échantillon - sur 1500-1000 cm^{-1}	156
Figure 49 : visualisation du pic correspondant au cholestérol estérifié (1740 cm^{-1}).....	158
Figure 50 : Classification hiérarchique de deux échantillons (normal en bleu, anévrysmal en rouge)	159
Figure 51 : ACP représentant les première et troisième composantes principales d'un tissu sain (bleu) et d'un tissu anévrysmal (rouge)	159
Figure 52 : Comparaison des spectres moyens d'échantillons d'aorte normale (bleu) et anévrysmale (rouge) associés à leur déviation standard respective (en bas de l'illustration).....	160
Figure 53 : visualisation des spectres moyens des échantillons sains en bleu et anévrysmaux en rouge. Les flèches marquent les différences visibles.	162
Figure 54 : Moyennes spectrales et déviation standard (en bas) des aortes normales (bleu) et des aortes anévrysmales (rouge)	163
Figure 55 : dérivées seconde des spectres moyens	163
Figure 56 : Détails de la décomposition par la dérivée seconde de la bande amide I des moyennes normales en bleu et anévrysmales en rouge.....	164
Figure 57 : Classification hiérarchique des moyennes spectrales des anévrysmes(A) et des aortes normales (N) utilisant la bande Amide I.....	167
Figure 58 : classification hiérarchique des spectres moyens des anévrysmes et des aortes normales utilisant la gamme spectrale 1000-1500 cm^{-1}	168
Figure 59 : Classification hiérarchique des moyennes spectrales utilisant la gamme 1636- 1618 cm^{-1}	171
figure 60 : Classification hiérarchique des spectres moyens selon la gamme 1696-1647 cm^{-1}	171
Figure 61 : bandes significatives des dérivées moyennes des aortes normales et anévrysmales	173
Figure 62 : classification hiérarchique sur la zone 1700-1480 cm^{-1}	176
des dérivés secondes des spectres moyens.....	176

Figure 63 : classification hiérarchique sur la zone 1700-1580 cm^{-1}	176
des dérivés secondes des spectres moyens	176
Figure 64 : classification hiérarchique établie sur les zones 1055-1095 et 1616-1633 cm^{-1}	179
Figure 65 : comparaison des dérivées secondes de l'élastine en vert, de la moyenne normale en bleu et de la moyenne des anévrismes en rouge	179
Figure 66 : image spectrale brute provenant de l'imageur spotlight associé (à droite) à l'image visible correspondante	182
figure 67 : aspect de la normalisation sur la bande Amide I (maximum spectral).....	183
Figure 68 : images spectrales 2D en absorbance totale d'échantillons sains, anévrismaux ou provenant d'aorte de bicuspidie	185
Figure 69 : aspect 3D de la bande Amide I après prétraitement et normalisation de l'échelle	186
Figure 70 : cross-sections du rapport de bande 1700-1600 / 1100-1050 cm^{-1}	188
pour un échantillon sain (bleu) et anévrysmal (rouge).....	188
Figure 71 : cross-sections du rapport de bande 1700-1600 / 1100-1050 cm^{-1}	188
Figure 72: cross-sections établies sur le rapport de bande 1700-1485 / 1445-1335 cm^{-1} des dérivés secondes de chaque image spectrale.....	190
Figure 73 : images spectrales représentant le rapport de bande 1700-1485 / 1345-1335 cm^{-1} entre les échantillons normaux, anévrysmaux avec ou sans bicuspidie.....	191
Figure 74 : aspect des dérivées secondes des spectres moyens des différents groupes	192
d'échantillons sains et pathologiques	192
figure 76 : Classification hiérarchique des spectres moyens dans l'épaisseur	197
d'une aorte anévrysmale (bandes Amides I+II)	197
Figure 77 : variations des dérivées secondes des spectres moyens réalisés dans l'épaisseur	198
d'un tissu aortique anévrysmal.....	198
Figure 77 : Dérivées secondes des spectres moyens recueillis dans l'épaisseur.....	199
d'une aorte de bicuspidie.....	199
figure 79 : Classification hiérarchique des spectres moyens dans l'épaisseur	199
d'une aorte anévrysmale sur bicuspidie (bande Amide II)	199
Figure 80 : classification hiérarchique des spectres moyennes extraits	200
d'un échantillon d'aorte non dilatée.....	200
Figure 80 : variations des dérivées secondes des spectres moyens issus de l'épaisseur.....	201
d'une paroi aortique normale	201
Figure 82 : classification obtenue en utilisant les bandes 1652 - 1610 / 1568 - 1504 / 1126- 1112 cm^{-1}	203
des dérivées secondes des spectres moyens	203
Figure 83 : Analyse en composante principale des échantillons sains,.....	205
anévrismaux et de bicuspidie non dilatées	205
figure 84 : aspect des spectres du tissu aortique non dilaté et du spectre du collagène (bleu)	208
Figure 85 : exemple de variations de spectres moyens Raman pour un tissu sain (bleu), anévrismal (rouge) et provenant d'un anévrysme sur bicuspidie (vert).....	210
Figure 86 : dendrogramme réalisé sur les dérivées secondes de la région spectrale 800-950 cm^{-1} d'aortes non dilatées (1 et 2) et anévrysmales (3 et 4).....	211
Figure 87 : classification hiérarchique sur la gamme spectrale 970-800 cm^{-1} (dérivées secondes) de patients d'âge et de sexe différents sans anévrysme.....	212
Figure 88 : photographies de la crosse aortique et d'une prise de mesure.....	214
Figure 89 : schématisation des positions de mesure avec la fibre.....	214
Figure 90 : classification hiérarchique des spectres de la crosse aortique (fibre Raman-Axial)	215

figure 91 : principe du microscope confocal.....	218
Figure 92 : aspect d'une paroi aortique normale en microscopie confocale.....	219
Figure 93 : aspect d'une paroi aortique anévrysmale en microscopie confocale.....	219
Figure 94 : A : spectromètre RMN, B : module de contrôle.....	221
Figure 95 : Image RMN d'une aorte non dilatée	223
Figure 96 : Image RMN d'une aorte anévrysmale.....	223

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU I : MMPS DE LA PAROI ARTERIELLE, SUBSTRATS ET INHIBITEURS	60
TABLEAU II : LONGUEUR D'ONDE DES GROUPES CARACTERISTIQUES.....	89
TABLEAU III : VIBRATIONS IRTF DES LIAISONS PEPTIDIQUES.....	100
TABLEAU IV : DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEINES	101
A L'ETAT SOLIDE EN IRTF.....	101
TABLEAU V : VIBRATIONS DES CHAINES LATERALES DES PEPTIDES ET AA EN INFRAROUGE	102
TABLEAU VI : QUELQUES PICS D'ABSORPTION INFRAROUGE ATTRIBUES A L'ADN.....	103
SELON SA CONFORMATION.....	103
TABLEAU VII : QUELQUES PICS D'ABSORPTION DES POLYSACCHARIDES COMPLEXES EN INFRAROUGE.....	103
TABLEAU VIII : PRINCIPAUX PICS IRTF D'ABSORPTION DES PHOSPHOLIPIDES.....	104
TABLEAU IX : DIFFERENTES REGIONS DU SPECTRE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES	104
TABLEAU X : ATTRIBUTION DES BANDES DES ECHANTILLONS CELLULAIRES ET TISSULAIRES	105
TABLEAU XI : ZONE D'ACQUISITION EN FONCTION DE L'OUVERTURE DU MICROSCOPE IRSCOPE II (X 15).....	122
TABLEAU XII : PICS DE SPECTRES INFRAROUGES DU TISSU AORTIQUE NORMAL, DU COLLAGENE ET DE L'ELASTINE BASES SUR L'ANALYSE DES DERIVES SECONDES DE LEUR SPECTRE RESPECTIFS.....	149
TABLEAU XIII : PICS DES DERIVEES SECONDES DES MOYENNES DES ANEVRYSMES ET AORTES NORMALES (L'ANALYSE MANUELLE).....	165
TABLEAU XIV : ZONES SPECTRALES DISCRIMINANTES ISSUES DU TEST DE STUDENT APPLIQUE AUX COORDONNEES DES SPECTRES MOYENS AORTIQUES	170
TABLEAU XV : RESULTAT DU STUDENT TEST DES DERIVEES SECONDES	174
DES MOYENNES NORMALES ET ANEVRYSMALES	174
TABLEAU XVI : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DU TEST VIS-A-VIS DES ANEVRYSMES SELON LES ZONES.....	175
DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS.....	175
TABLEAU XVII : RESULTATS DU TEST DE STUDENT SUR LE RAPPORT DE BANDE D'ABSORBANCE 1667-1643 / 1642-1628 CM^{-1} DES DIFFERENTS GROUPES D'ECHANTILLONS	193
TABLEAU XVIII : RESULTATS DU TEST DE STUDENT SUR LE RAPPORT DE BANDE DES DERIVEES SECONDES.....	195
DES ZONES 1667-1643 / 1642-1628 CM^{-1}	195
TABLEAU XIX : BANDES SPECTRALES SIGNIFICATIVES ENTRE LES ANEVRYSMES ET LES AORTES SAINES.....	202
TABLEAU XX : MODE DE VIBRATION EN SPECTROSCOPIE RAMAN ET INFRAROUGE DU CO_2 .	209

INTRODUCTION

1. PREAMBULE

L'anévrisme de l'aorte est à l'origine de nombreux décès dans nos sociétés occidentales. Devant la prévalence, toujours plus forte, de nombreux facteurs de risque cardiovasculaires associés au vieillissement des populations [1], il est probable que la fréquence de cette pathologie augmente encore dans les décennies à venir, alors qu'elle est déjà, toute cause confondue, à l'origine de 1 à 5 % des décès de la population européenne et nord-américaine [2].

Malgré ces chiffres, il est surprenant de voir qu'aucun test prédictif ni aucune politique de prévention et de dépistage à large échelle ne soient instaurés. La seule volonté d'une telle politique ne suffit pas, il faudrait pouvoir disposer d'un test capable de dépister des anomalies infracliniques précurseurs des anévrismes. Or à ce jour, aucun test fiable n'est disponible et le médecin reste bien souvent celui qui diagnostique l'anévrisme sans jamais avoir pu le prédire. Comme souvent, ce diagnostic n'est posé qu'à l'occasion d'une complication cardiovasculaire [3]. Alors, dans le meilleur des cas, le patient ne garde de sa rencontre avec le chirurgien que le sentiment d'être « passé par une toute petite porte ».

Le chirurgien, peut être plus terre à terre, est bien conscient que l'anévrisme est comme un fléau endormi qu'il vaut mieux combattre pendant son sommeil... Les difficultés rencontrées lors d'un geste chirurgical en urgence n'ont aucune commune mesure avec la « très » relative simplicité du geste en dehors de ce contexte dramatique [4]. Le cas particulier des dissections aortiques étendues, sur anévrisme de l'aorte ascendante, est encore plus édifiant : l'intervention ne propose que d'éviter la rupture fatale sans « guérir » les 4/5ème de l'aorte qui resteront comme une épée de Damoclès au dessus de la tête du patient pour le reste de sa vie.

C'est dans ce contexte que nous avons imaginé nos travaux. Pourquoi la spectroscopie vibrationnelle ? Simplement, grâce à une courte initiation à la spectroscopie, dans le cadre d'un stage de maîtrise de science biologique, me faisant percevoir une infime partie de son potentiel. Alors que nous poursuivions la discrimination de cellules néoplasiques, l'idée m'est venue d'appliquer ces protocoles au tissu aortique, auquel j'étais, en ma qualité de chirurgien, confronté tous les jours, mais qui restait si « méconnu ».

Le challenge était de taille : appréhender et comprendre les différentes spectroscopies afin de « parler » comme un spectroscopiste, de penser comme un spectroscopiste....et par-dessus tout de pérenniser ces travaux dans le temps.

Il est alors apparu nécessaire de créer une banque de tissus avec l'assistance du Professeur Pluot, chef du service d'anatomopathologie du CHU de Reims et de l'entretenir. De nombreuses erreurs « de jeunesse » ont compromis certains échantillons et certaines manipulations, mais ces erreurs nous ont également permis d'améliorer nos procédures.

Aujourd'hui, cinq ans après l'initiation de ce projet, cette thèse de science est l'occasion de réaliser un premier bilan, le plus exhaustif et objectif possible, sur l'ensemble des travaux effectués. C'est aussi l'occasion de voir le travail qu'il reste à accomplir et les collaborations restant à établir pour aboutir à la validation de nos résultats et au développement de techniques exportables au cœur de l'hôpital.

C'est dans cet optique de collaboration, que j'ai voulu faire de cette thèse un recueil d'informations médicales et scientifiques centrées sur l'aorte et la spectroscopie. Il est effectivement difficile d'avoir une vision globale de ces divers domaines tant ils sont différents. J'ai donc tenu à inclure et à détailler dans ce travail aussi bien des notions médicales, chirurgicales, biochimiques et spectroscopiques nécessaires à la compréhension des multiples facettes de ces recherches.

Pour ce faire, cette thèse débute par un large rappel concernant l'anatomie, la physiologie et la pathologie de l'aorte suivi par une mise au point des techniques chirurgicales de remplacement de l'aorte ascendante. Le reste de ce travail expose essentiellement nos travaux en spectroscopie infrarouge et Raman.

J'espère que ce document deviendra une sorte de « référence » pour qui souhaitera travailler avec nous sur ce passionnant mais complexe sujet , qu'il soit médecin, chercheur ou étudiant.

2. L'AORTE NORMALE

2.1. Anatomie descriptive et fonctionnelle de l'aorte

L'aorte est l'artère principale de l'organisme. Elle naît de la chambre de chasse du ventricule gauche, au niveau de la valve aortique. Après un court trajet ascendant, elle transite du thorax vers l'abdomen en donnant naissance à l'ensemble des collatérales artérielles du corps humain. Elle se termine, dans l'espace retro-péritonéal, en donnant naissance à deux collatérales terminales principales au niveau de la bifurcation aorto-iliaque. On peut donc lui reconnaître plusieurs segments différents, tant du point de vue anatomique que pathologique .

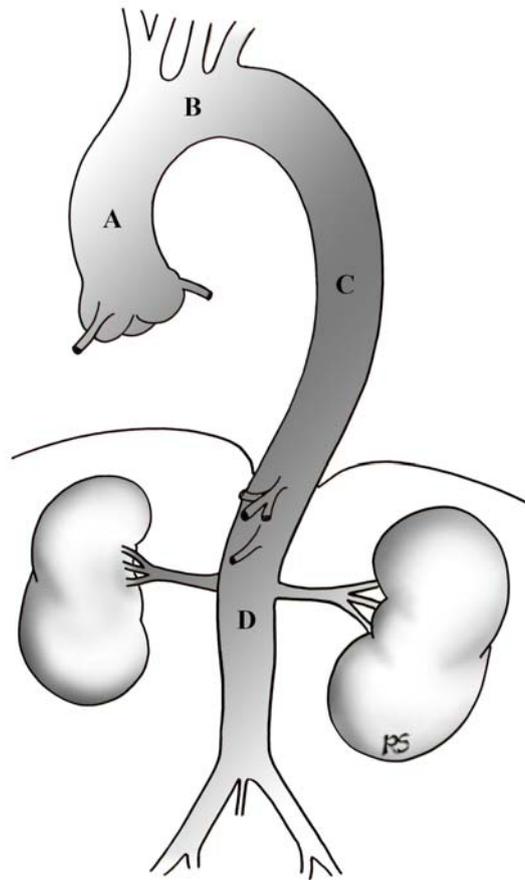


FIGURE 1 : ASPECT GENERAL DE L'ANATOMIE AORTIQUE

Quatre segments aortiques sont habituellement décrits (figure 1) : l'aorte thoracique ascendante (A), l'aorte thoracique horizontale (B), l'aorte thoracique descendante (C) et l'aorte abdominale (D).

2.2 Description des différents segments de l'aorte

2.2.1 L'aorte ascendante

2.2.1.1. Aspect global de l'aorte ascendante

Elle chemine dans un trajet ascendant entre la valve aortique cardiaque et le pied du Tronc Artériel Brachio-Céphalique (TABC) sur 7 à 10 cm en moyenne. Les deux artères coronaires droite et gauche sont les seules collatérales naissant de l'aorte ascendante au niveau de sa portion initiale sus-valvulaire, appelée racine aortique. Pour être tout à fait exact, elles naissent respectivement au niveau des sinus de Valsalva droit et gauche, qui avec le sinus de Valsalva non coronaire, composent la racine aortique chapeautant la valve aortique. (Figure 2)

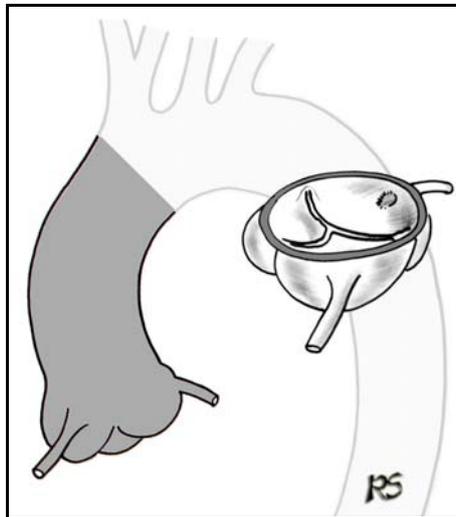


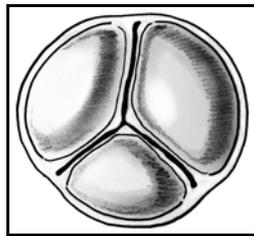
FIGURE 2 : AORTE ASCENDANTE AVEC LE DETAIL DE LA RACINE AORTIQUE

L'étude anatomique et physiologique poussée permet d'individualiser plusieurs structures composant l'aorte ascendante. Outre un intérêt purement descriptif, ces structures sont diversement impliquées dans les pathologies de l'aorte ascendante et conditionnent donc le choix du traitement chirurgical adapté.

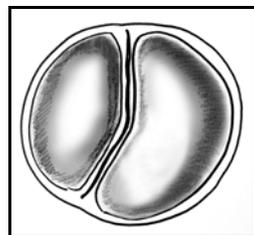
La valve aortique ne fait pas partie, d'un point de vue purement anatomique de l'aorte ascendante ; toutefois, sa continuité avec l'aorte et son implication dans les différentes pathologies aortiques nous imposent sa description détaillée.

Elle se compose de valvules implantées dans un anneau :

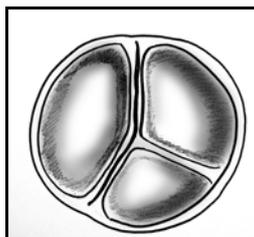
- la valve aortique normale, le plus souvent composée de trois feuillets souples, ou valvules sigmoïdes semi-lunaires, est qualifiée de valve « tricuspide » Ces feuillets sont implantés circonférentiellement sur l'anneau aortique, faisant la jonction entre la chambre de chasse du ventricule gauche et l'aorte ascendante. La valve aortique empêche, à l'état normal, un flux sanguin rétrograde entre l'aorte et le ventricule gauche en diastole et permet donc d'assurer une perfusion optimale de l'ensemble des collatérales aortiques (Schéma ci-dessous).



Dans environ 1 % à 2 % des cas [5], la valve aortique n'est seulement composée que de 2 valvules sigmoïdes et est donc qualifiée de « bicuspidie » (Schéma ci-dessous).



Dans certains cas intermédiaires, on distingue plus ou moins nettement trois feuillets, dont deux sont fusionnés réalisant ainsi une « fausse bicuspidie » par fusion commissurale (Schéma ci dessous).



Même si aujourd'hui le débat fait rage autour de ces valves bicuspidés, de nombreux auteurs, anatomistes et chirurgiens, les considèrent toujours plus comme des variations anatomiques que comme des valves pathologiques [6].

Pourtant, une récente mais importante littérature, principalement basée sur des études cliniques et de suivi de cohorte, tend à démontrer le contraire [7], [8].

L'anneau aortique est une structure fibreuse complexe, tant du point de vue anatomique que fonctionnel. Cette structure tridimensionnelle répond à la forme des sigmoïdes et présente trois indentations correspondant aux commissures de la valve aortique (deux en cas de vraie bicuspidie et trois en cas de fausse bicuspidie). Ce squelette fibreux assure le maintien de la forme et donc la coaptation des feuillets valvulaires aortiques dans des conditions physiologiques.

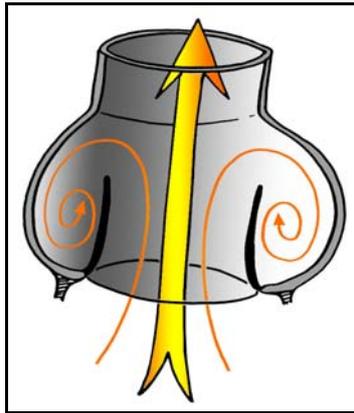
Pour bien comprendre la physiologie de la racine aortique, il est impératif de ne pas dissocier l'anneau aortique de son implantation ventriculaire et de la jonction sino-tubulaire de l'aorte. Nous y reviendrons dans l'analyse fonctionnelle de la racine aortique.

2.2.1.2. Les différentes structures composant l'aorte ascendante

Les sinus de Valsalva : trois pour les valves aortiques tricuspides, leur nombre varie pour les différentes valves bicuspidés. Ils résultent en fait d'une légère dilatation de la racine aortique, entre chaque commissure et en regard de chaque sigmoïde valvulaire.

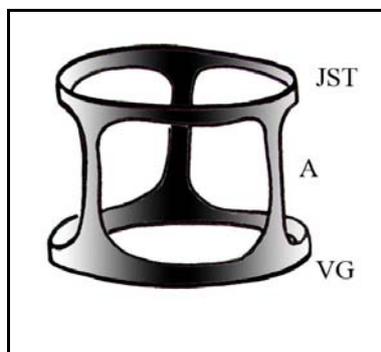
Leur rôle principal est d'éviter le contact des valvules avec la paroi aortique permettant un effacement total de la valve en systole, une diminution du stress pariétal qui lui est imposé évitant ainsi une détérioration précoce.

De plus, d'un point de vue hémodynamique, ils permettent un « lavage », à chaque cycle cardiaque, des deux faces des sigmoïdes évitant ainsi la formation de thrombus (Schéma ci dessous).



- **La jonction sino-tubulaire** : représente la jonction entre la racine aortique, légèrement dilatée par les sinus de Valsalva, et la partie « haute » ou sus-coronaire de l'aorte ascendante. Même si d'un point de vue descriptif, cette jonction ne présente pas de point particulièrement remarquable, elle est pourtant un élément majeur de l'anatomie fonctionnelle de la racine aortique et est impliquée dans la quasi-totalité des pathologies touchant l'aorte ascendante. Il est intéressant de comprendre l'architecture fonctionnelle de la racine aortique.

- **La racine aortique** vue en tant qu'*unité fonctionnelle* est globalement circulaire et comporte une charpente avec une base (l'implantation ventriculaire : VG) légèrement plus large que son sommet (la jonction sino-tubulaire : JST) et une structure intermédiaire les unissant (l'anneau aortique : A). Une vue du concept d'architecture fonctionnelle de la racine aortique est présentée sur le schéma ci-dessous.



Outre une description plus fidèle à la réalité valvulaire, ce concept permet de comprendre les mécanismes des insuffisances aortiques rencontrés dans les pathologies de l'aorte ascendante et de prévoir le type de geste chirurgical à entreprendre. La figure 3 illustre les différents mécanismes d'insuffisance aortique dans les anévrysmes aortiques.

La figure 3.1 représente deux cuspidés normales (C) naissant de l'anneau (A) et suspendues par les commissures (CO), elles mêmes fixées à la jonction sino-tubulaire (JST).

La figure 3.2 illustre l'insuffisance aortique par dilatation de la jonction sino-tubulaire ; la flèche rouge schématise la dilatation.

La figure 3.3 illustre la dilatation de l'anneau responsable de la fuite aortique.

La figure 3.4 présente l'insuffisance aortique causée par un mécanisme mixte, comportant à la fois une dilatation de la jonction sino-tubulaire et de l'anneau aortique, retrouvée dans les maladies annulo-ectasiantes.

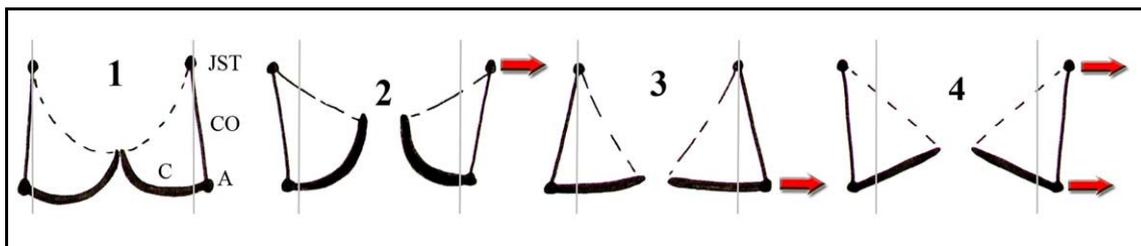


FIGURE 3 : ASPECTS DE L'ANNEAU AORTIQUE, DES COMMISSURES ET DE LA JONCTION SINO-TUBULAIRE SELON LE MECANISME D'INSUFFISANCE AORTIQUE

- Vient enfin la **partie sus-coronaire de l'aorte ascendante**, comprise entre la jonction sino-tubulaire et l'ostium du TABC. La partie proximale de ce segment est intra-péricardique alors que la partie distale se situe en dehors du sac péricardique. Ceci ne semble pas avoir d'incidence sur l'aorte elle-même mais revêt une importance toute particulière lors des gestes de chirurgie aortique en urgence. Une rupture intra-péricardique est le plus souvent synonyme de décès rapide par tamponnade (compression des cavités cardiaques droites par le sang artériel) ou par troubles du rythme cardiaque, ce qui n'est pas systématiquement le cas pour les autres segments de l'aorte.

L'aorte ascendante sus-coronaire est approximativement circulaire et incurvée en avant et vers la droite. Ses dimensions sont variables mais sa partie postérieure gauche ne représente souvent que 3 à 4 cm de long alors que sa partie antérieure droite peut mesurer plus de 6 à 8 cm de long.

Outre ces différences de dimension, les contraintes auxquelles sont soumises les différentes parties de l'aorte ascendante ne sont pas uniformes [9]. C'est principalement le fait de l'orientation de l'aorte par rapport à la valve aortique et de sa courbure. Il existe habituellement un angle de 12 degrés, en moyenne, entre le flux passant au travers de la valve aortique et l'orientation initiale de l'aorte ascendante. Ceci a pour effet d'augmenter encore les contraintes appliquées sur la partie convexe de l'aorte ascendante et explique en partie pourquoi les dilatations anévrysmales débutent plus souvent à ce niveau.

2.2.2. L'aorte horizontale ou arche aortique

Ce court segment horizontal de l'aorte a une importance particulière pour le chirurgien cardiovasculaire : même s'il ne mesure pas plus de 6 à 8 cm de long, il est à l'origine de trois artères collatérales à destinée cérébrale et des membres supérieurs. Dans l'ordre de naissance des ostia sur l'aorte horizontale on trouve habituellement : le Tronc Artériel Brachio-Céphalique ou TABC, l'artère Carotide Primitive Gauche puis l'artère Sous Clavière Gauche (Figure 4). Il est à noter que dans plus de 2 % de la population, on retrouve des variations anatomiques le plus souvent asymptomatiques.

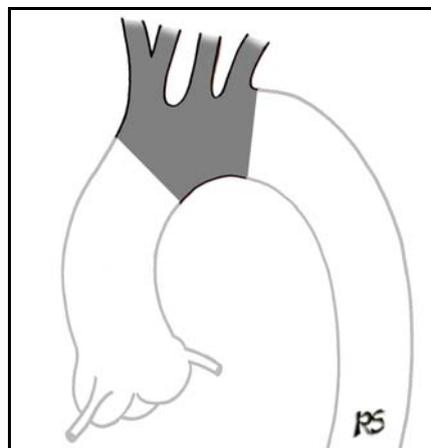


FIGURE 4 : AORTE HORIZONTALE OU ARCHE AORTIQUE

Le Tronc Artériel Brachio-Céphalique ou TABC, première collatérale, naît de la convexité de l'aorte horizontale et donne très rapidement deux collatérales importantes : vers le haut, la carotide primitive droite à destinée essentiellement cérébrale et vers l'extérieur, l'artère Sous Clavière Droite irrigant principalement le moignon de l'épaule et le membre supérieur.

L'artère Carotide Primitive Gauche naît de la partie centrale de l'arche aortique. Son ostium est en général très proche de celui du TABC, voire commun avec ce dernier dans de nombreux cas. Après un trajet globalement vertical au travers du défilé cervico-thoracique, elle donne naissance au niveau du cou à l'artère Carotide Interne Gauche à destinée cérébrale et à l'artère Carotide Externe Gauche à destinée de la face et du cou comme pour la Carotide Primitive Droite).

L'artère Sous Clavière Gauche est la troisième et dernière artère naissant de l'arche aortique. Essentiellement à destinée du membre supérieur gauche, elle donne naissance à des collatérales remarquables :

- L'artère vertébrale gauche naît dès la sortie du thorax de l'artère sous Clavière Gauche par le défilé cervico-thoracique et chemine, vers le haut, le long du rachis pour assurer une partie de la vascularisation cérébrale par l'intermédiaire du tronc basilaire et du polygone de Willis.
- L'artère mammaire interne ou thoracique interne, chère aux chirurgiens cardiaques qui l'utilisent comme greffon pour la réalisation des pontages coronaires.
- L'artère cervicale ascendante (via le tronc thyro-cervical) qui participe, chez certaines personnes, à la vascularisation médullaire dans sa partie haute.

Même si l'anatomie de ces vaisseaux est très variable et les suppléances difficiles à affirmer pour un patient donné, le chirurgien doit en tenir compte lors de gestes portant sur l'arche aortique.

2.2.3. L'aorte thoracique descendante

Elle prolonge l'aorte horizontale après la naissance de l'artère Sous Clavière Gauche (SCG) et chemine dans le médiastin postérieur, à gauche et en avant du rachis dorsal, jusqu'au hiatus aortique où elle entre dans la cavité abdominale (figure 5).

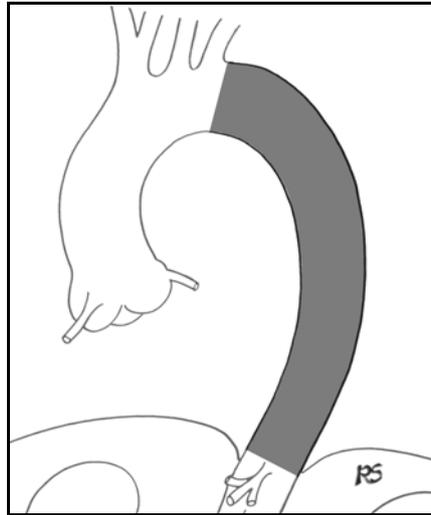


FIGURE 5 : ASPECT DE L'AORTE THORACIQUE

Elle permet la vascularisation des bronches, via les artères bronchiques, de l'œsophage, via les artères œsophagiennes et de la paroi thoracique par les artères intercostales qui naissent, par paire, à chaque étage métamérique. Enfin, elle donne fréquemment naissance à l'artère d'Adamkiewicz dans sa partie basse, juxta-diaphragmatique, qui est considérée comme la vascularisation principale de la moelle épinière.

2.2.4. L'aorte abdominale

Après son passage trans-diaphragmatique par le hiatus aortique, l'aorte devient abdominale et donne rapidement de multiples artères collatérales à destinée viscérale. Par ordre, on retrouve le tronc coeliaque (vascularisation hépatique, gastrique et splanchnique), l'artère mésentérique supérieure, les artères rénales et l'artère mésentérique inférieure. Associées à ces artères viscérales, on retrouve les artères lombaires qui vascularisent, elles aussi de façon métamérique, la paroi abdominale. Enfin, l'aorte se termine en se trifurquant, donnant les deux artères iliaques primitives droite et gauche (collatérales terminales) ainsi qu'une petite artère centrale à destinée du petit bassin : l'artère sacrée moyenne.

2.3. Dimensions des différents segments de l'aorte ascendante normale

Parler de dilatation ou d'anévrisme de l'aorte ascendante sous-entend que l'on connaît les dimensions normales de cette artère dans ses différents segments et pour chaque patient, qu'il soit un homme de grande taille ou une femme d'1m50 hypertendue.

Ce n'est environ que depuis les années 70 - 80 que de nombreuses études ont défini les dimensions de la racine aortique. Elles ont été d'abord réalisées sur des cœurs provenant d'autopsies, puis « in vivo » à l'aide de techniques d'imagerie (tomodensitométrie, échographie, images par résonance magnétique ou *IRM*) [10] [11], [12].

Plusieurs publications récentes ont refait le point sur ces mensurations en raison d'un fort développement de la chirurgie conservatrice de la valve aortique en cas d'anévrisme de l'aorte ascendante. En effet, pour conserver une valve aortique fonctionnelle, il est impératif de recréer une anatomie la plus proche possible de la normale, tant dans ses dimensions que dans ses proportions relatives.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la racine aortique est comprise entre la base de l'anneau aortique et la jonction sino-tubulaire. On définit donc trois diamètres :

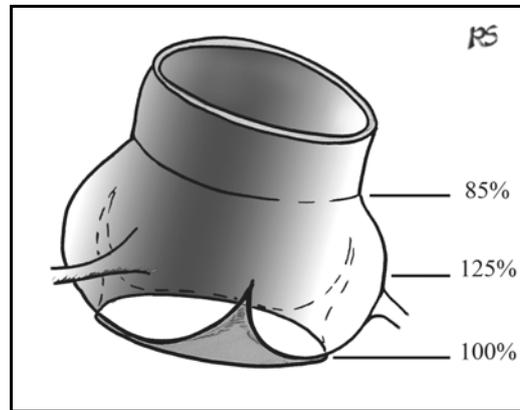
- le diamètre de l'anneau aortique (mesuré en fin de diastole par convention)
- le diamètre au niveau des sinus de Valsalva
- le diamètre de la jonction sino-tubulaire

Avant de détailler ces différents diamètres, il est nécessaire de préciser les relations mathématiques les liant les uns aux autres. De nombreux travaux ont déterminé ces équations par régression logistique.

Après quelques approximations, chez un adulte âgé de 17 à 65 ans, on considère :

- que le diamètre de la jonction sino-tubulaire est environ 30 % plus petit que le diamètre au niveau des sinus de Valsalva,
- que le diamètre de la jonction sino-tubulaire est environ 15 à 20 % plus petit que celui de l'anneau aortique.

Le diamètre de la jonction sino-tubulaire représente donc environ 85 % de celui de l'anneau aortique et le diamètre maximum au niveau des sinus de Valsalva représente environ 125 % du diamètre de l'anneau aortique



2.3.1. Le diamètre de l'anneau aortique

Capps et al. [13] ont rapporté dans une étude totalisant 4636 cas (cœurs explantés) les variations du diamètre de l'anneau aortique chez des patients distribués entre 0 et 59 ans (âge moyen de la cohorte : 31 ans +/- 17 ans). Le diamètre moyen de l'anneau aortique était de 23,1mm +/- 2mm et la surface de l'anneau aortique indexée à la surface corporelle* des patients était de 2,02 +/- 0,52 cm/m².

* *Surface corporelle* : évaluation de la surface cutanée d'un patient en fonction de son poids et de sa taille. Cette donnée caractérise mieux le morphotype du sujet qu'une étude prenant simplement en compte sa taille ou son poids. Elle permet par exemple de comparer des personnes de sexe opposé ou de morphotype très différent. Plusieurs méthodes d'estimation de la surface corporelle ont été publiées mais la plus fréquemment utilisée est celle de Dubois [14] :

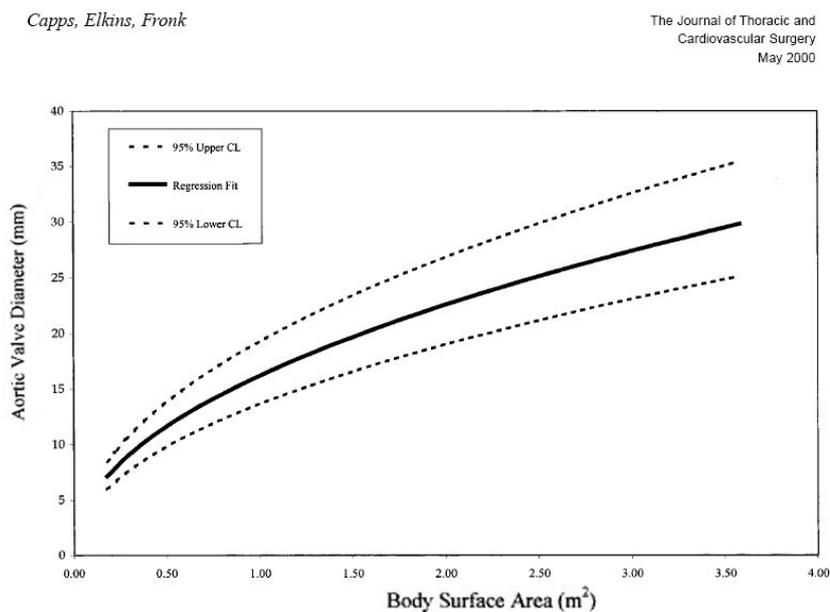
$$\text{Surface Corporelle (m}^2\text{)} = 0.20247 \times \text{Taille (m)}^{0.725} \times \text{Poids (kg)}^{0.425}$$

Cette publication démontre que le diamètre de l'anneau aortique augmente progressivement au cours de la vie et que plus de 85 % de cette variation sont uniquement liés à l'âge des patients. Quand on considère la surface de l'anneau aortique indexée à la surface corporelle, le sexe des patients n'intervient plus que pour 1% de cette variation.

L'analyse de ces données par régression logistique [13] a permis d'établir l'équation prédisant le diamètre de l'anneau aortique (Dp) en mm en fonction de la surface corporelle (SC) en m². Elle s'établit de la façon suivante pour tout patient :

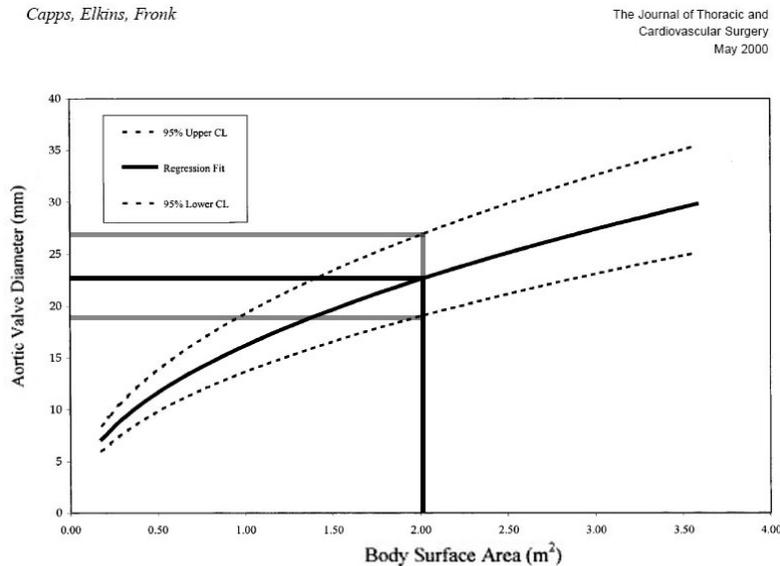
$$Dp = \exp(2,778 + 0,4727 \times \ln [SC])$$

La représentation graphique de cette fonction est illustrée ci-dessous :



Ainsi en reportant des données habituelles dans la population européenne, soit une surface corporelle d'environ 2 m², on obtient un diamètre de l'anneau aortique compris entre 19 et 27 mm avec une moyenne à 23 mm.

Ces données estimées sont proches des valeurs mesurées en pratique clinique même si l'intervalle de confiance est relativement important.



2.3.2. Le diamètre maximum de la racine aortique au niveau des sinus de Valsalva

Même si nous avons souligné l'importance des sinus de Valsalva dans l'hémodynamique et l'anatomie fonctionnelle de la racine aortique, leurs diamètres ont été relativement peu étudiés si l'on compare avec le diamètre de l'anneau. La chirurgie conservatrice de la valve aortique a pourtant permis un regain d'intérêt pour cette dimension qui définit en partie la « racine aortique fonctionnelle ».

Roman publiait en 1989 une étude échographique portant sur 187 patients pour lesquels elle mesurait le diamètre des sinus de Valsalva [15]. Elle rapportait une forte corrélation entre le diamètre et l'âge des patients. En utilisant, le diamètre indexé à la surface corporelle, elle ne trouvait pas de corrélation significative avec le sexe, la tension artérielle ou le volume éjecté par le ventricule gauche à chaque systole cardiaque. Elle a déterminé un diamètre seuil au niveau des sinus de Valsalva à 2,1 cm/m² de surface corporelle au-delà duquel la racine aortique est considérée comme pathologique.

En 1995, Ramachandran, dans un article paru dans *Circulation* [16], reprenant la célèbre « Framingham Heart Study » (comportant 4001 patients et décrivant la quasi-totalité des facteurs de risque cardiovasculaires) retrouvait que l'âge, le poids, la taille et le sexe influent sur les dimensions de la racine aortique. Là aussi, l'hypertension artérielle était décrite comme un élément jouant un rôle assez modeste, comparée aux autres facteurs énumérés ci-dessus.

Cette étude a pourtant montré le rôle de l'hypertension artérielle diastolique dans les dilatations de l'aorte ascendante alors qu'elle retrouvait une surprenante corrélation négative entre le diamètre de l'aorte et la pression artérielle systolique.

La prédiction du diamètre de l'aorte au niveau des sinus de Valsalva était donnée par les équations suivantes selon le sexe, l'âge et la MAP (régression logistique linéaire) :

Pour un homme :

$$DpV = 27,83 + 0,0612 \times AGE + 0,0234 \times MAP$$

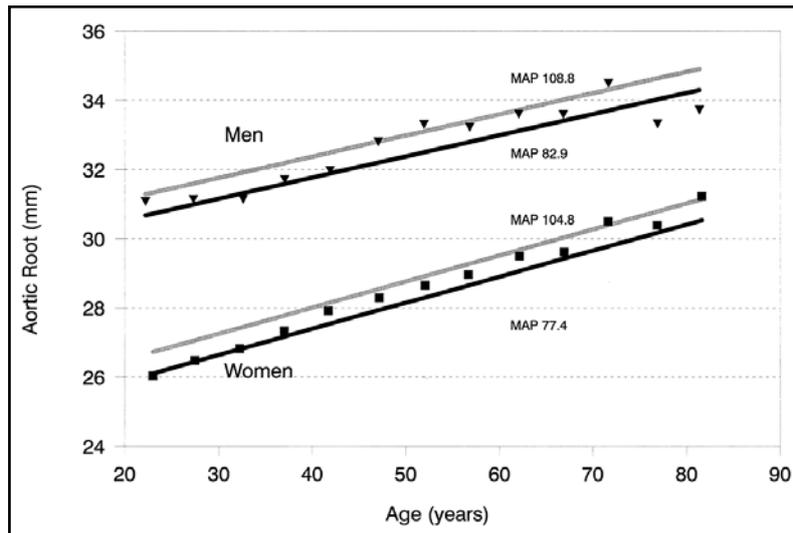
Pour une femme:

$$DpV = 22,65 + 0,0755 \times AGE + 0,0224 \times MAP$$

Où DpV est le diamètre prédit au niveau du sinus de Valsalva en millimètres et MAP, la pression artérielle moyenne calculée selon la formule :

$$MAP = [(2 \times Pression Diastolique) + Pression systolique] / 3$$

Les pentes respectives des représentations graphiques confirment que l'âge est donc un facteur plus important pour la femme alors que c'est l'inverse pour la tension artérielle moyenne. Pourtant, la tension artérielle est un facteur qui intervient peu puisque, quelque soit le sexe, des écarts importants de MAP et donc des contraintes pariétales se traduisent par une dilatation de la racine aortique inférieure au millimètre.



Cette étude a par ailleurs défini certains paramètres importants. Les résultats de l'analyse univariée permettaient de définir la contribution de chaque paramètre dans le diamètre de la racine aortique.

Ainsi on obtient :

pour l'homme (toute chose égale par ailleurs) :

Incrément d' 1 an	: + 0,0080 mm +/- 0,0049
Incrément d' 1 Kg	: + 0,0087 mm +/- 0,0065
Incrément d' 1 m	: + 2,403 mm +/- 1,0514

Et pour la femme :

Incrément d' 1 an	: + 0,0089 mm +/- 0,0043
Incrément d' 1 Kg	: + 0,0068 mm +/- 0,0062
Incrément d' 1 m	: + 3,807 mm +/- 0,9861

Globalement, différents auteurs ont évalué la croissance des différentes dimensions de l'aorte ascendante entre 0,8 à 1,2 mm par décade.

2.3.3. Le diamètre au niveau de la jonction sino-tubulaire (JST)

Malgré le rôle important joué par la jonction sino-tubulaire dans la dynamique de la racine aortique et dans la continence de la valve aortique, nous avons été surpris du peu d'articles traitant de cette structure. En fait en entrant les mots clés : « sinotubular » « junction » et « dimension » dans le moteur de recherche « Pubmed » on obtient seulement 5 réponses dont la plus pertinente ne porte que sur un nombre restreint de patients, suivis pendant 3 ans avec des variations de diamètre aux limites des possibilités de détection de l'échocardiographie.

En 2005, Ben-Dor et al. mesuraient l'ensemble des dimensions de l'aorte ascendante, y compris la jonction sino-tubulaire, chez 76 volontaires sains (groupe contrôle de l'étude) et retrouvait des diamètres très différents de ceux retrouvés dans des études portant sur de grandes cohortes [17]. En effet, il retrouvait une jonction sino-tubulaire systématiquement plus large que l'anneau aortique de 15 à 20 % et un diamètre au niveau des sinus de Valsalva environ 150 % supérieur à celui de l'anneau aortique.

Devant ces différences morphologiques importantes, nous avons préféré conserver la vision classique d'une jonction sino-tubulaire estimée à 85 % du diamètre de l'anneau aortique [18].

2.3.4. Le diamètre au niveau de l'aorte ascendante dans sa partie « tubulaire »

Cette valeur reflète le diamètre de la plus grande partie de l'aorte ascendante, située entre la jonction sino-tubulaire et le pied du Tronc Artériel Brachio-Cephalique. Même si les représentations classiques de l'aorte ascendante en font un segment de diamètre constant, certaines variations existent.

En effet, la forme de l'aorte ascendante est relativement complexe et associe :

- une courbure concave vers l'extérieur, la droite et l'avant,
- un diamètre augmentant progressivement de la jonction sino-tubulaire jusqu'au milieu de l'aorte ascendante pour décroître légèrement mais régulièrement dans sa partie supérieure.

Ces variations de diamètre sont asymétriques et portent essentiellement sur la partie concave de l'aorte, là où les contraintes sont les plus fortes. Les diamètres, à différents niveaux de l'aorte ascendante, retrouvés dans des études IRM ou tomodensitométrie (Scanner), sont assez similaires avec des valeurs normales maximales respectives évaluées à 30,7 +/- 0,62 mm à 45 ans et à 30,9 +/- 0.42 cm à 50 ans avec une progression annuelle de 0,10 à 0.15 mm par an [12], [19].

2.3.5. Conclusion concernant les mensurations de l'aorte

L'aorte ascendante, vue initialement uniquement que comme un simple « tube » véhiculant le sang à travers l'organisme, est aujourd'hui au centre de multiples attentions. Comme nous venons de le voir, l'aorte est une structure complexe dont nous avons ici simplement rappelé l'anatomie statique...

Pourtant, des travaux récents ont démontré que ses dimensions sont variables dans le temps, principalement en fonction des battements cardiaques et des contraintes pariétales, définissant alors une anatomie en quatre dimensions. Les études utilisées pour estimer les dimensions de l'aorte et leurs variations sont basées sur des données déjà anciennes. [20] [21]

Depuis, de nombreuses choses ont changé, comme la taille moyenne de la population, le poids et les habitudes hygiéno-diététiques engendrant une plus forte prévalence de l'hypertension artérielle...

Même si nous utilisons habituellement ces données « historiques », de nouvelles études comportant de larges cohortes et utilisant des moyens diagnostiques plus récents, seront nécessaires pour connaître avec précision l'évolution des dimensions de l'aorte.

Des travaux récents, portant sur de petites séries, ont démontré le potentiel de l'IRM et du scanner multi-barrettes dans la description anatomique de l'aorte.

2.4. Anatomopathologie des artères élastiques

Les artères élastiques présentent une paroi dont la composition diffère de celle des autres artères et artérioles. Cette différenciation est le fait des conditions hémodynamiques auxquelles elles sont soumises. C'est particulièrement vrai pour l'aorte et le tronc de l'artère pulmonaire.

La paroi aortique est composée de trois couches concentriques, successives, allant de la lumière vasculaire vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice, délimitées par deux lames élastiques internes et externes.

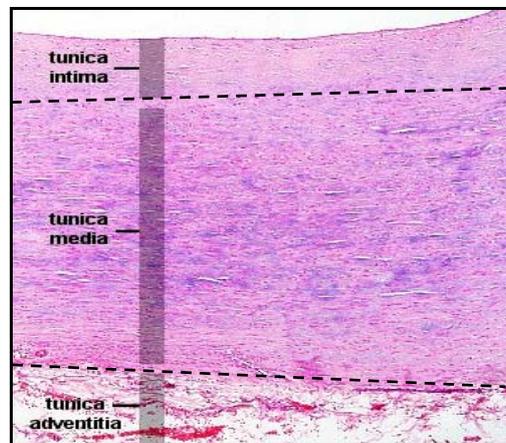


FIGURE 6 : STRUCTURE DE LA PAROI AORTIQUE

L'intima est composée d'une couche unicellulaire et jointive de cellules endothéliales (épaisseur : 15 μm) et d'un tissu conjonctif sous endothélial. Ce dernier est particulièrement important pour les artères élastiques puisqu'il permet de « dissocier » l'endothélium des mouvements du reste de la paroi artérielle et donc d'en assurer l'intégrité. De récentes recherches ont aussi démontré son rôle dans la régulation de l'activité cellulaire des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

L'endothélium est, pour sa part, impliqué dans de très nombreux processus physiologiques ou pathologiques comme la vasomotricité, l'activité anticoagulante, la thrombose, l'inflammation, la protection contre certaines agressions ou encore l'athérosclérose.

La média est composée d'un nombre variable de couches concentriques de cellules musculaires lisses soutenues par une matrice extracellulaire largement fenêtrée, riche en élastine, collagène et mucopolysaccharides. A l'âge adulte, elle comporte environ 50 couches de cellules musculaires lisses séparées par des lames élastiques. Le collagène et l'élastine, contenus dans le tissu conjonctif de soutien, sont organisés en réseau tridimensionnel complexe à l'origine d'une grande partie des caractéristiques physiques de l'aorte. Comme pour l'intima, il existe de nombreuses interconnexions entre les cellules musculaires lisses et le tissu conjonctif. Les cellules musculaires lisses peuvent synthétiser de nombreuses macromolécules de la matrice extracellulaire après transformation de leur phénotype de « contractile » à « sécrétoire ». Cette transformation est retrouvée dans des phénomènes physiologiques comme la croissance et le vieillissement des artères ainsi que dans des processus pathologiques tels que les anévrysmes et les dissections artérielles [22].

L'adventice est constituée d'un tissu conjonctif lâche comportant des fibres de collagène, des fibres élastiques, des mucopolysaccharides, des capillaires (vasa-vasorum), des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons du système nerveux autonome. Fibroblastes et cellules adipeuses y sont également présentes en grand nombre. Malgré une structure moins organisée par rapport à celle de la média et une épaisseur plus faible, l'adventice joue un rôle important dans la compliance et la résistance de l'aorte en plus de son rôle nutritif du vaisseau. Dans un certain nombre de pathologies de l'aorte, comme par exemple les ruptures aiguës, l'intima et la média sont fortement endommagées et seule l'adventice peut permettre d'éviter un syndrome hémorragique massif et souvent rapidement fatal.

Enfin, ces trois couches sont séparées par des limitantes élastiques internes et externes, d'environ 50 µm d'épaisseur composées presque exclusivement de fibres élastiques (élastine).

2.5. Architecture fonctionnelle des artères élastiques

La structure de la paroi des artères élastiques est donc un ensemble complexe de cellules et de fibres formant un réseau tridimensionnel stratifié assurant la compliance et l'élastance du vaisseau. Trois constituants fonctionnels fondamentaux composent l'architecture de la paroi aortique :

- Les *fibres d'élastine* forment des lames élastiques fenêtrées, et concentriques au sein de la média des artères. Formées par l'assemblage de polymères insolubles d'élastine entourés par des microfibrilles de fibrilline, elles peuvent supporter une élongation maximale d'environ 140 %. Ces fibres élastiques sont interconnectées avec l'ensemble des constituants de la matrice extracellulaire. Elles présentent par ailleurs des extensions connectées, via différentes protéines, à la surface des cellules musculaires lisses. Cette architecture permet de transmettre les forces s'exerçant sur la paroi aortique jusqu'à l'élastine capable d'emmagasiner l'énergie puis de la restituer dans un retour élastique passif jusqu'à son état basal [23].
- Les *fibres de collagène* de la paroi de l'aorte sont relativement inélastiques et très résistantes. Ces fibres sont principalement composées de collagène I et III dans l'aorte. En dehors du tissu artériel, ces fibres sont, par exemple, aussi très abondantes dans les tendons. Ces derniers doivent transmettre l'énergie, parfois considérable, développée par le muscle au squelette, sans se distendre ni se rompre. En cas d'étirement, les limites structurales du collagène sont atteintes pour des élongations modérées correspondant à 110 % de leur longueur initiale. Malgré cela, les forces nécessaires pour dépasser ces 110 % sont considérables [24]. L'architecture de la molécule de collagène en triple hélice et son organisation au sein de fibres compactes lui confèrent cette résistance. Au niveau de l'aorte, la diastole cardiaque correspond à l'état de « repos ». Les fibres de collagène forment alors des boucles lâches intimement liées aux fibres élastiques. Lors de la systole, la pression intravasculaire augmentant, ces boucles s'étirent rapidement jusqu'à leur maximum les unes après les autres formant un véritable "manchon" limitant la dilatation des fibres élastiques et donc du vaisseau.

Ce rôle fondamental des fibres de collagène a été mis en évidence par l'étude de mutation [25] ainsi que par l'utilisation de collagénases spécifiques chez l'animal qui, infusées au contact de l'aorte, provoquent des ruptures aortiques sans dilatation. A l'inverse, l'infusion d'élastase entraîne des dilatations du vaisseau sans rupture du fait de la persistance d'une partie des fibres de collagène [26].

- les *fibres musculaires lisses* sont composées de nombreuses cellules musculaires lisses connectées entre elles ainsi qu'aux fibres élastiques et de collagène. En se contractant, elles augmentent la tension du tissu élastique et modifient ainsi le module élastique de la paroi artérielle (Figure 7).

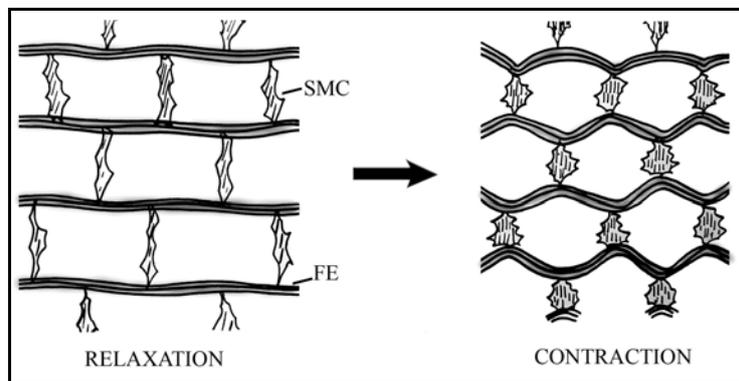


FIGURE 7 : IMPLICATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES (SMC) DANS LA DYNAMIQUE DE LA PAROI AORTIQUE PAR LA MISE EN JEU DES FIBRES ELASTIQUES (FE)

2.6. Constituants de la paroi aortique

2.6.1. Introduction

Comme nous l'avons déjà cité précédemment, la paroi aortique est composée, en quantité variable, de plusieurs composants fondamentaux. On retrouve les cellules endothéliales et musculaires lisses, les réseaux d'élastine et de collagène ainsi que les autres molécules de la matrice extracellulaire.

Pour comprendre les modifications de la paroi aortique rencontrées lors du vieillissement ou de processus pathologiques, il est important d'en connaître les différents constituants. Malgré de nombreux travaux portant sur les constituants de la matrice extracellulaire, certaines voies de synthèse, de régulation ou de dégradation restent obscures.

Des travaux plus récents, voire juste publiés, nous permettent aujourd'hui d'appréhender cette matrice extracellulaire et les différents constituants de la paroi aortique de façon plus précise mais aussi plus complexe. Alors que des travaux datant des années 70-80 décrivaient une matrice extracellulaire faite, tout au plus, d'une dizaine de constituants, les méthodes actuelles en dénombrent plus de cinquante, apportant ainsi certaines réponses mais engendrant de nouvelles questions...

Bien entendu, nous ne présenterons pas l'ensemble de ces constituants et nous nous limiterons à l'étude des constituants structurants les plus abondants et/ou ayant une grande implication dans la synthèse, la stabilisation ou la dégradation de la paroi aortique.

Nous décrirons les éléments constituant la *matrice extracellulaire* : les molécules formant les *fibres* (*l'élastine, le collagène, les microfibrilles et les protéines* qui y sont associées), les *glycoprotéines* et les *protéoglycanes*. Par ailleurs, nous étudierons les *cellules musculaires lisses* et leur rapport à la matrice extracellulaire. Enfin, nous rapporterons les connaissances récentes sur les *Métallo-protéinases (MMP)* et leurs inhibiteurs (*TIMP*), très impliqués dans les phénomènes de « *turn over* » physiologiques comme dans la plupart des pathologies de l'aorte.

2.6.2. La matrice extracellulaire du tissu aortique

La paroi aortique est en grande partie composée par une matrice extracellulaire complexe et dense, lui conférant ses propriétés visco-élastiques et sa résistance. Malgré le grand nombre de molécules entrant dans la composition de cette matrice, l'élastine et « le collagène » sont le cœur de cette architecture fibrillaire.

2.6.2.1. L'élastine

Macromolécule aux propriétés peu communes, l'élastine est le constituant principal de la paroi de l'aorte ascendante. Elle donne à l'aorte son élasticité et permet d'absorber l'énergie de l'onde systolique et de la restituer pendant la diastole. Les variations de contraintes tout au long de l'aorte s'accompagnent de modifications dans sa composition pariétale. Les travaux de Halloran [27] ont montré que la quantité d'élastine par unité de surface diminue tout au long de l'aorte pour ne plus être que le cinquième de sa concentration initiale au niveau de l'aorte abdominale terminale.

a- La synthèse de l'élastine

L'élastine est produite par les cellules de la paroi aortique et en particulier par les cellules musculaires lisses lors du développement embryonnaire et chez l'enfant. Chez l'adulte et dans des conditions normales, la quantité d'élastine totale est fixée et n'est donc pas soumise à renouvellement. Cette caractéristique, peu commune dans l'organisme, sous-tend une résistance aux contraintes particulièrement développée. Des travaux expérimentaux, portant sur le comportement visco-élastique de l'élastine, ont montré que cette macromolécule était capable de supporter jusqu'à 10^9 cycles d'élongation - retour élastique passif avant de présenter les premières fractures de fatigue ! Ceci correspond approximativement au nombre de battements cardiaques enregistré en 40 ans [28].

La synthèse de l'élastine est un processus complexe, débutant dans la cellule musculaire lisse et se terminant, après de nombreuses étapes, dans la matrice extracellulaire sous forme d'un polymère insoluble : l'élastine

Comme pour toute protéine, la synthèse débute par une transcription - traduction au sein de la cellule musculaire lisse, du gène unique codant pour « l'élastine » situé sur le chromosome 7. Le produit de cette première étape est une protéine soluble : la *tropoélastine*.

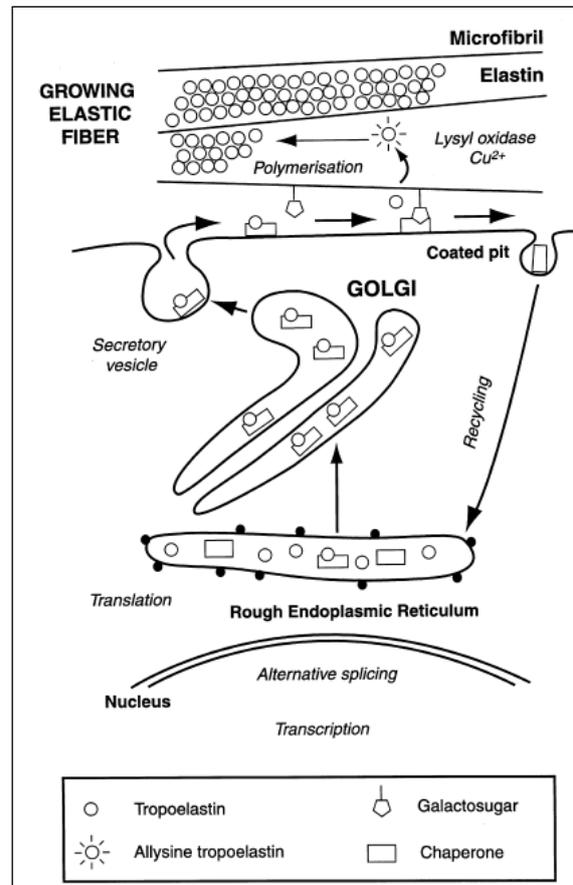
Elle subira encore quelques modifications post-transcriptionnelles comme le clivage de sa séquence signal hydrophile avant d'être prise en charge par une protéine « chaperonne » : L'EBP (Elastine Binding Protein).

Cette protéine protège la tropoélastine d'une agrégation prématurée et d'éventuelles dégradations enzymatiques précoces dans le cytoplasme de la cellule. L'EBP est aussi une sous unité du récepteur membranaire de l'élastine.

Après avoir été excrétée hors de la cellule, la tropoélastine est « présentée » par l'EBP, au niveau de la face extracellulaire de la membrane cytoplasmique, aux fibres élastiques matures. La protéine chaperonne libère alors le monomère soluble de tropoélastine dans la matrice péri-cellulaire. L'EBP est alors endocytée et recyclée par la cellule.

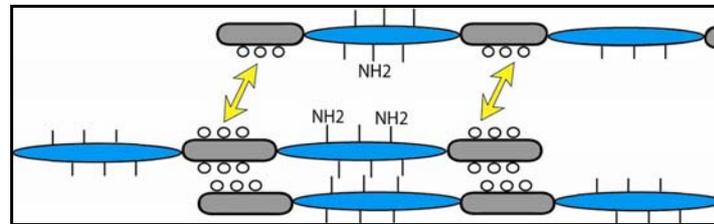
Dès lors, La modification de résidus lysyle de la tropoélastine par la lysyle oxydase permet le cross-linking entre cette dernière et le polymère d'élastine insoluble.

La façon dont les monomères se positionnent pour réaliser le cross-linking reste débattue. Certains travaux ont mis en avant le rôle des microfibrilles qui serviraient de « treillis » alors que des études plus récentes ont prouvé que des sous unités du monomère ont le pouvoir de s'auto-aligner [29].



Cette propriété serait le fait de l'alternance identique entre des domaines hydrophobes et des domaines riches en lysine dans les monomères et les polymères matures d'élastine.

Les domaines hydrophobes (en gris) du monomère s'auto-aligneraient en regard de ceux du polymère ce qui permettrait un exact placement des résidus lysylee (en bleu) en vue du cross-linking.



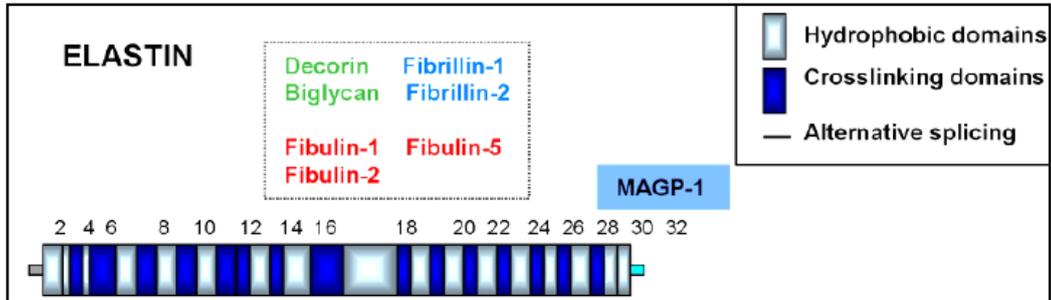
b. Structure primaire de la tropoélastine

La *tropoélastine* est une macromolécule constituée de 760 résidus et d'un poids moléculaire de 70 kDa. Elle est composée de 36 domaines alternant entre régions hydrophobes ou régions dédiées au cross-linking. Les acides aminés les plus représentés dans sa structure sont la glycine (33 %), l'alanine (24 %), la valine (15 %), la proline (11 %), la leucine et l'isoleucine. Par contre, certains acides aminés comme l'histidine, le tryptophane et la méthionine sont absents de la composition de l'élastine et la cystéine représente moins d'1 % de l'ensemble [29].

Le motif protéique « VGVPG » (Valine, Glycine, Valine, Proline, Glycine), très présent dans les régions hydrophobes semble avoir une importance particulière. Il serait impliqué dans l'auto-alignement des monomères de tropoélastine. Des études expérimentales menées avec des protéines synthétiques constituées de répétitions de cette séquence d'acides aminés confirmeraient ce concept. Dans certaines conditions d'hydratation et de température ces protéines s'auto-agrègent pour donner un réseau de fibres bien individualisé [30].

Enfin, le dernier point remarquable de la structure de la tropoélastine est la présence de nombreux résidus lysylee, par paires ou triplets, dans les zones dédiées au cross-linking, qui serviront à la stabilisation du polymère insoluble d'élastine.

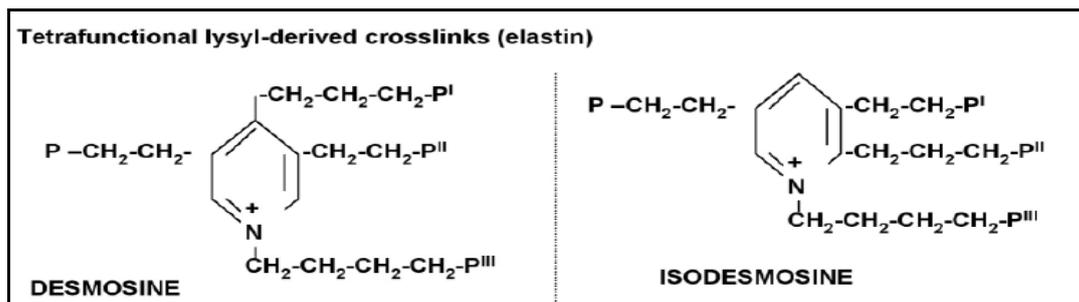
Outre des régions hydrophobes et des zones de cross-linking, la tropoélastine possède des sites de liaisons avec de nombreuses molécules comme les fibrillines 1 et 2, les fibulines 1,2 et 5, la MAGP-1, le biglycan ou encore la décorine. Ces différentes possibilités de liaison sont la clef de l'architecture complexe de la matrice extracellulaire du tissu aortique [31].



c. Structure du polymère d'élastine

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'élastine insoluble est le résultat de la polymérisation de monomères de tropoélastine par cross-linking grâce à la *lysyle oxydase*. Cette enzyme crée des liaisons covalentes en présence de Cu^{2+} après désamination et oxydation de résidus lysyle de la tropoélastine [32].

Plusieurs possibilités de liaisons ont été observées, impliquant 1, 2, ou 3 résidus Lysyle et un résidu non modifié (apportant le cycle aromatique). Le cross-linking le plus souvent rencontré est tétravalent et associe 4 résidus lysyle et est nommé Desmosine ou Isodesmosine selon la position des différents résidus sur le cycle aromatique comme illustré ci dessous.



La condensation des monomères de tropoélastine permet ainsi de constituer progressivement un réseau de fibres d'élastine mature totalement insoluble appelé le « core » d'élastine amorphe. Ce dernier, malgré sa grande insolubilité dans la quasi-totalité des solvants organiques connus, est abondamment hydraté. La présence d'eau autour du réseau d'élastine serait l'une des clefs de l'élasticité de l'élastine

d. Structure secondaire de l'élastine

La structure secondaire de l'élastine n'a été approchée que depuis quelques années du fait du caractère insoluble de l'élastine amorphe rendant un certain nombre d'analyses conventionnelles inopérantes.

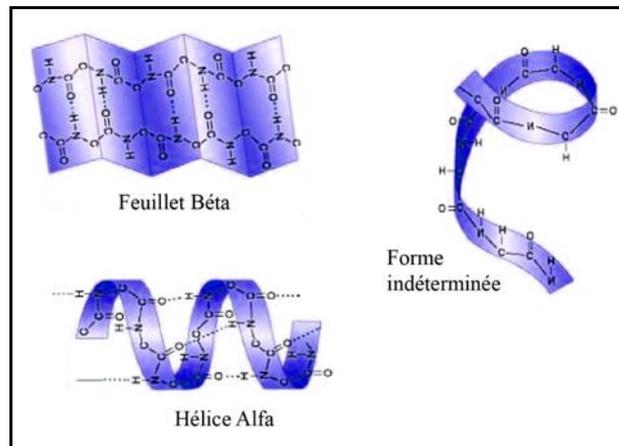


FIGURE 8 : STRUCTURES SECONDAIRES DES PROTEINES

La modélisation de la protéine décrit plusieurs types d'organisation secondaire selon les régions de la molécule. On retrouve majoritairement de nombreuses structures β (feuillets et coudes) associées à de courts segments en hélices α au niveau des sites de cross-linking [30]. Cette structure secondaire particulière serait, selon des travaux récents, à l'origine des caractéristiques élastiques de l'élastine.

2.6.2.2. Le collagène

Le collagène est le deuxième constituant de la paroi des artères, après l'élastine. Son rôle principal est d'assurer la résistance mécanique des vaisseaux grâce à une organisation particulière. Il est soumis à un renouvellement continu lent ou *turn-over* qui permet, dans des conditions physiologiques, une certaine stabilité de la résistance du tissu conjonctif. Nous verrons lors de l'étude des processus de vieillissement que ceci n'est pas tout à fait vrai aux âges extrêmes de la vie.

Environ 24 types de collagènes différents ont été décrits à ce jour et sont nommés en chiffres romains. Différentes familles ont été individualisées en fonction de l'arrangement tridimensionnel de ces collagènes matures. On décrit [33] :

- des collagènes fibrillaires (I, II, III, V),
 - des collagènes créant des fibrilles (XIV, XVI),
 - des collagènes créant des microfibrilles (VI),
 - des collagènes constitutifs des membranes basales (IV, XV, XVIII, XIX)
- etc...

On retrouve plusieurs types de collagènes au niveau de la paroi vasculaire. Par ordre d'importance quantitative, les collagènes de type III et I sont les plus représentés au sein de la matrice extracellulaire artérielle. D'autres collagènes, plus ubiquitaires, sont aussi retrouvés mais en plus faible quantité et dans des structures spécialisées ; c'est en particulier le cas des collagène VI et collagène IV [34]. Ce dernier est le constituant fondamental des membranes basales cellulaires et interagit avec de nombreuses autres protéines de la membrane basale et de la paroi cellulaire.

a- La molécule de collagène (Exemple de collagène I)

Le collagène I est un long polypeptide composé par trois sous unités ou chaînes α enroulées les unes sur les autres formant une triple hélice (rotation à droite) caractéristique des collagènes fibrillaires mesurant environ 1,5 nm de diamètre et 300 nm de long [33].

- La chaîne α : Née, après épissage alternatif, de la « transcription - traduction » de son gène, la chaîne α est la brique élémentaire formant le collagène. Du fait de l'épissage alternatif, on compte environ 38 types de chaînes α différentes composant les 24 collagènes connus à ce jour. Le collagène I est composé d'un hétéro-trimère de chaînes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$ et sa dénomination est : $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$. [Le collagène III est pour sa part composé d'un homotrimère $\alpha 1(III)$].

La chaîne α est composée d'une succession d'acides aminés dont le plus représenté est la *glycine*. Elle constitue, en effet, un tiers des acides aminés totaux de la protéine et s'intègre dans le motif répétitif « Gly - X - Y » où X est fréquemment une *proline* (30 %) ou une *Lysine* et Y fréquemment une *hydroxyproline* (30 %). Cette répétition est très importante pour la structure secondaire de la molécule de collagène. Au niveau des chaînes α , la conformation spatiale du tripeptide « Gly - X - Y » permet une rotation de 360° du squelette de la molécule pour chaque triplet d'acides aminés [35]. La répétition de cette architecture élémentaire permet la création de longues chaînes en hélices α (rotation à gauche) stabilisées par des *liaisons Hydrogène* intrachânes.

Dans le triplet d'acides aminés constituant les chaînes α , la glycine est le plus petit résidu ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$). Les deux autres acides aminés X et Y sont en général des résidus plus volumineux et plus « réactifs ». Ceci a une importance fondamentale lors de l'auto-assemblage des trois chaînes α formant le procollagène. En effet la glycine se place au centre de l'hélice formée par ces trois chaînes α et diminue ainsi l'encombrement stérique de la molécule. Cette organisation expose les résidus X et Y en périphérie de la chaîne α et permet les différentes interactions et modifications conduisant à la création des fibres de collagène matures dans la matrice extracellulaire (Figure 9).

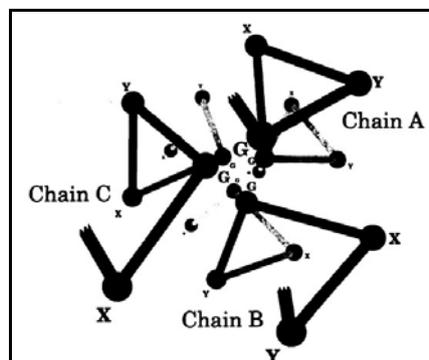


FIGURE 9 : ORGANISATION SPATIALE DES RESIDUS DE 3 CHAINES α

Pour parvenir à l'auto-assemblage des sous unités α du procollagène, plusieurs modifications post-transcriptionnelles sont nécessaires.

Elles débutent par le clivage de la séquence signal du peptide puis les résidus *Prolyl* et *Lysyle* sont environ pour moitié hydroxylés grâce aux *prolyl et lysyle oxydases*. Certains résidus *hydroxylysyle* sont ensuite glycosylés grâce aux *hydroxylysyle galactosyl et glucosyl-transférases*.

- le procollagène : il est formé de l'auto-agrégation de 3 chaînes α . (figure 10).

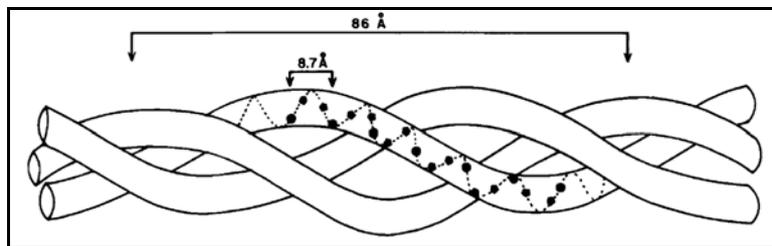


FIGURE 10 : AUTO-AGREGATION DE 3 CHAINES α DU COLLAGENE

La structure résultante est un polypeptide en hélice α dans sa partie centrale encadrée par ses 2 extrémités C et N terminales. Ces dernières empêchent l'auto-agrégation précoce des molécules de procollagène au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule.

Le procollagène est alors excrété dans la matrice extracellulaire. Les peptides C et N terminaux sont clivés par des C et N protéases donnant ainsi la molécule de collagène mature (figure 11).

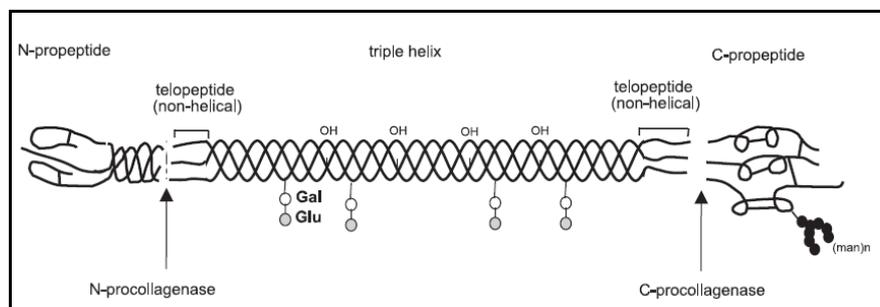
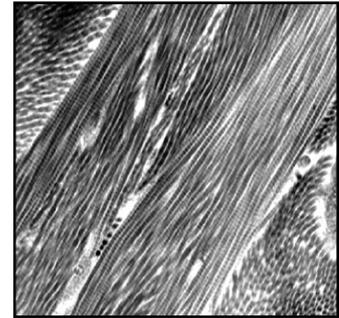


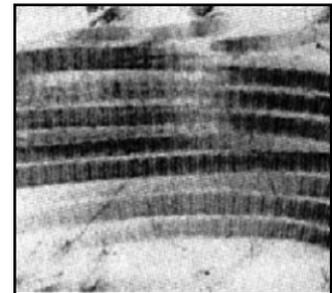
FIGURE 11 : ASPECT FINAL DU COLLAGENE MATURE

b. la fibrille et la fibre de collagène

La présence de régions hydrophobes et de charges électrostatiques négatives le long de la molécule de collagène permet son auto-assemblage aboutissant à la formation des fibrilles de collagène. L'auto-agrégation se poursuit à un niveau supramoléculaire permettant l'assemblage de très nombreuses fibrilles de collagène donnant naissance à la fibre de collagène (Figure ci contre).



L'organisation des monomères au sein de la fibre est caractéristique des collagènes. En effet, on retrouve une succession périodique de bandes sombres et claires en microscopie électronique, tous les 67 nm, correspondant à un décalage de 40 nm entre chaque molécule de collagène. (Figure ci contre).



Enfin, pour stabiliser l'ensemble, les différents monomères de collagène sont liés de façon covalente par cross-linking latéral réalisé à partir de résidus *lysyle* et *hydroxylysyle* grâce à la *Lysyle oxydase*. Cette architecture macromoléculaire confère aux fibres de collagène des propriétés remarquables quant à leur résistance malgré un modeste potentiel d'élongation (proche de 110 %). Pour assurer des élongations plus importantes, c'est l'ensemble du réseau qui doit être déformé nécessitant alors la génération de forces bien plus importantes.

Quelles cellules synthétisent les collagènes de la paroi aortique ?

De nombreuses cellules sont capables de synthétiser les molécules de collagène. Au sein des artères élastiques, cette synthèse est assumée par les *cellules musculaires lisses* et les *fibroblastes* ; toutes deux appartiennent à la lignée embryonnaire des cellules mésenchymateuses [36].

Ces deux cellules spécialisées sont en fait très proches l'une de l'autre et seule l'expression des « molécules contractiles » au sein de la cellule musculaire lisse permet de les différencier.

Les cellules musculaires lisses assurent, dès le début de la vie, la synthèse des différents collagènes de la media aortique et de la quasi totalité des constituants de sa matrice extracellulaire. Des travaux récents ont prouvé que ces cellules, baignant dans cette matrice extracellulaire, sont directement régulées par la composition de cette dernière ainsi que par ces produits de dégradation [37]. Ces régulations, approchées avec les produits de dégradation de l'élastine, semblent être un processus beaucoup plus général de rétrocontrôle du phénotype sécrétoire des cellules mésenchymateuses. De nombreux mécanismes pathologiques détournent ce rétrocontrôle pour engendrer fibroses, proliférations ou migrations cellulaires (fibrose viscérales, athérosclérose, néoplasies ou métastases, etc...).

Les collagènes fibrillaires synthétisés par ces deux cellules ont une organisation particulière au sein de la paroi aortique. Selon la topographie de la synthèse de ces fibres, on observe des orientations différentes. Les fibres de collagène au sein de la media sont principalement orientées circonférentiellement ce qui induit une grande résistance aux forces radiales et limite la compliance des vaisseaux élastiques.

Par ailleurs, les fibres de collagène de l'adventice aortique sont principalement synthétisées par les fibroblastes. Ces cellules sont très semblables aux cellules musculaires lisses (phénotype sécrétoire) et produisent du collagène en grande quantité. L'orientation longitudinale de ces fibres de collagène permet de maintenir l'architecture des vaisseaux dans le temps.

L'entrecroisement de ces différentes couches de collagène entre média et adventice ainsi que leurs connexions aux autres composants de la paroi sont la clef de la résistance des artères élastiques aux contraintes hémodynamiques.

2.6.2.3. Les autres molécules de la matrice extracellulaire des artères élastiques

L'élastine et les collagènes représentent la grande majorité des composants de la matrice extracellulaire. Pourtant, de nombreuses autres molécules sont présentes en plus faibles quantités mais jouent un rôle fondamental dans l'architecture de la paroi aortique.

Elles sont impliquées dans la synthèse, l'organisation et la stabilisation des fibres d'élastine et de collagène.

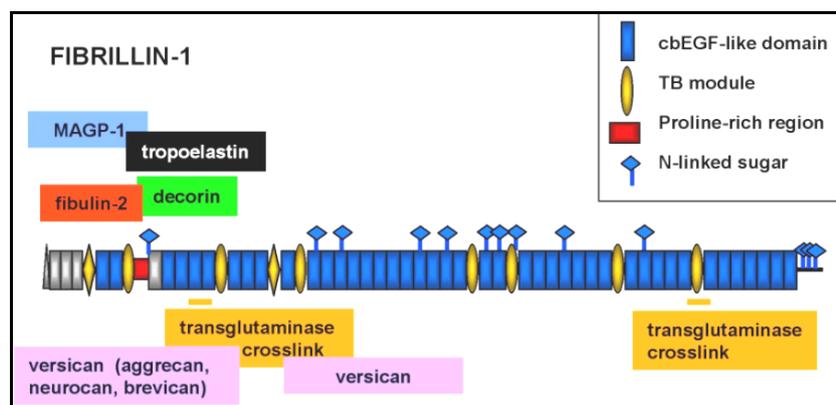
a. Les Glycoprotéines matricielles

Ces nombreuses macromolécules solubles ont un double rôle au sein de la matrice : fixer les cellules à la matrice extracellulaire et lier les différents éléments de cette dernière entre eux. Elles se comportent en fait comme une véritable « colle biologique » indispensable à la cohésion de la matrice. De plus, elles interviennent dans la transmission des signaux cellulaires nécessaires à la synthèse et à la dégradation de la matrice extracellulaire.

Ces glycoprotéines sont toutes composées de nombreux domaines répétitifs représentant autant de sites de liaison ou de régulation. Nous ne citerons que les principales.

Les fibrillines :

La famille des fibrillines comporte plusieurs glycoprotéines riches en *cystéine* et relativement proches les unes des autres. On retrouve essentiellement les fibrillines 1, 2 et 5 dans la paroi des artères élastiques.



Les fibrillines sont associées au core de l'élastine amorphe dans la paroi artérielle et sont le composant majeur des microfibrilles impliquées dans le dépôt de l'élastine et la création des fibres d'élastine. La fibrilline 2 aurait un rôle un peu particulier par rapport aux autres membres de cette famille.

De nombreuses expérimentations animales ont démontré le rôle majeur de cette fibrilline, synthétisée très précocement, dans l'élastogénèse du core mais pas dans son maintien au long cours.

Par contre, les autres fibrillines synthétisées plus tardivement, comme la fibrilline 1 en particulier, sont très impliquées dans cette fonction de préservation des fibres d'élastine en constituant le réseau de microfibrilles périphérique du core d'élastine.

Les fibrillines, par leur architecture modulaire, peuvent aussi lier de nombreuses autres molécules permettant ainsi l'ancrage des fibres d'élastine et des différentes molécules de la matrice aux cellules musculaires lisses. Quelques possibilités de liaison des fibrillines sont réunies ci-dessous :

- d'autres molécules de fibrilline (cross-linking) permettant la synthèse des microfibrilles
- la tropoélastine
- la MAGP-1
- certaines fibulines
- la décorine
- certains protéoglycanes
- Etc...

Les fibrillines ont été particulièrement étudiées ces dernières années en raison des pathologies induites par leurs mutations. On citera le syndrome de Marfan et les syndromes associés entraînant des anomalies des tissus élastiques (gigantisme, élasticité excessive de la peau, laxité articulaire, subluxation des cristallins, anévrysmes et dissections aortiques, atteintes des valves cardiaques etc ...). Les formes majeures de ces atteintes sont associées à un pronostic péjoratif dans les 40 à 50 premières années de vie.

Les MAGPs ou «Multifibrillar Associated GlycoProteines» :

Ces glycoprotéines sont présentes dans les microfibrilles et sont impliquées dans l'intégrité des microfibrilles.

MAGP-1 (riche en *proline* dans sa portion N terminale) peut se lier à la tropoélastine et MAGP-2 (riche en *sérine* et *thréonine* dans sa portion N terminale) présente des sites de liaison aux intégrines, ainsi qu'à d'autres molécules de la matrice extracellulaire permettant l'ancrage des cellules à cette dernière.

Les autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire :

- La fibronectine : molécule de liaison entre les cellules et la matrice extracellulaire et relais des informations passant de la cellule vers la matrice et inversement.
- la fibromoduline : permettant les interactions entre les cellules et les fibres de collagène et jouant un rôle dans la régulation de la synthèse du collagène.
- les autres glycoprotéines : la tensacrine, la laminine, la thrombospondine, l'ostéopontine etc...

b. Les Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont composés d'un core protéique spécifique à chacun d'eux et d'un glycosaminoglycane (GAG) fixé latéralement par une liaison covalente. Ce glycosaminoglycane est formé par la répétition de disaccharides spécifiques plus ou moins sulfatés (charges négatives). Ces charges électriques permettent une forte hydratation du protéoglycane par interaction avec les protons (H⁺) des molécules d'eau.

Nous ne détaillerons pas les différents protéoglycanes existants car ils sont présents en faible quantité dans les tissus élastiques comme l'aorte. On les retrouve par contre de façon abondante dans les tissus devant résister à des forces de compression importante (ex : cartilages, disques intervertébraux etc...).

Seul l'héparan sulfate semble jouer un rôle notable au niveau des vaisseaux. Il est présent à la surface des cellules endothéliales, au contact du sang, et serait impliqué dans différents processus de croissance et de multiplication cellulaire. Cette propriété jouerait un rôle dans la réparation et l'hyperplasie néo-intimale consécutive à un traumatisme endothélial.

2.6.3. Les cellules musculaires lisses des artères élastiques

Les Cellules Musculaires Lisses sont des cellules d'origine mésenchymateuse, extrêmement plastiques et hautement spécialisées que l'on retrouve en grande quantité dans la paroi des artères élastiques. D'une façon un peu réductrice, on considère que le rôle premier de ces cellules est d'assurer le tonus vasculaire et l'orientation des flux sanguins (vaisseaux de petit calibre). Nous reverrons que de nombreuses études ont démontré le grand rôle que joue la *cellule musculaire lisse* dans toutes les étapes de la vie de l'artère (angiogénèse, stabilisation et maintien, dégradation et vieillissement, pathologies).

Les Cellules Musculaires Lisses sont généralement fusiformes, parfois bifides, de 2 à 5 µm de diamètre pour des longueurs allant de 15 à 500 µm. Elles sont mononuclées à la différence des cellules musculaires squelettiques, qui elles sont multinuclées.

2.6.3.1. Les cellules musculaires lisses vasculaires matures

Dans leur phénotype contractile, elles expriment dans leur cytoplasme, comme toutes cellules musculaires, les molécules d'actine et de myosine nécessaires à la contraction – relaxation cellulaire. Pourtant, le type de molécules et leur organisation sous forme de filaments diffèrent de ceux retrouvés au sein des cellules musculaires striées.

In vivo et en culture, les *cellules musculaires lisses* s'organisent en feuillets parallèles, séparés par les lames élastiques contenant des fibres de collagène, d'élastines ainsi que d'autres molécules matricelles. En fait, plus que d'être séparées par la matrice, elles sont interconnectées par ce tissu conjonctif via la fibronectine qui, comme nous le verrons, à un rôle majeur dans leur survie [38].

Malgré un potentiel important de prolifération, à l'état physiologique, le « turn-over cellulaire » au sein de la paroi aortique est lent. Cette faible régénération cellulaire est liée à la haute spécialisation de la cellule qui n'exprime plus que des molécules nécessaires à son activité contractile (chaîne lourde de myosine, α actine, calmoduline, calponine, h-caldesmon, metavinculine, telokine, smootheline et quelques canaux ioniques).

Finalement et en schématisant, les *cellules musculaires lisses* « à l'âge adulte » et dans des conditions physiologiques n'ont plus qu'un rôle fonctionnel. C'est lors de l'angiogénèse et lors des processus pathologiques qu'elles redeviennent l'un des éléments clef et actif de l'architecture vasculaire.

2.6.3.2. Les cellules musculaires lisses au cours de l'angiogénèse

Après que les futures cellules endothéliales se soient réunies en formant une sorte de manchon, les cellules musculaires lisses, encore peu différenciées, se disposent de façon concentrique à leur périphérie. Entre ces différentes cellules, se forment des GAP jonctions permettant la cohésion du tissu et assurant l'échange d'informations.

Dès lors, les cellules musculaires lisses prolifèrent activement et synthétisent l'ensemble des constituants formant la paroi vasculaire (*élastine, collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines, métalloprotéases, TIMPs etc...*). A ce moment, elles expriment un « *phénotype sécrétoire* » très différent de celui rencontré chez les cellules matures. De façon schématique, elles n'expriment pas le « *phénotype contractile* » pour ne se concentrer que sur la synthèse des constituants pariétaux. Cette approximation fait fit des molécules contractiles synthétisées mais non encore fonctionnelles dans ces cellules [39].

Au fur et à mesure de la synthèse de la paroi vasculaire, les cellules s'engagent progressivement dans la voie les conduisant au « *phénotype contractile* ». Pourtant un grand nombre de ces cellules, phénotypiquement matures, gardent la possibilité de se différencier - redifférencier en cellules au « *phénotype sécrétoire* » associant un fort potentiel de prolifération.

Cette plasticité est très utile en cas de réparation physiologique du tissu artériel par exemple, après une plaie vasculaire, une intervention chirurgicale ou une angioplastie.

Pourtant, elle peut aussi être délétère dans certaines situations pathologiques comme dans l'hypertension artérielle, l'athérosclérose ou encore l'hyperplasie néo-intimale. Dans ces cas, en plus des modifications de phénotype et du fort potentiel de multiplication, les cellules musculaires lisses retrouvent la possibilité de migrer dans la paroi aortique du fait de la disparition des connections existantes entre elles et la matrice extracellulaire (cf. athérosclérose).

D'autre part, les cellules endothéliales, les fibroblastes de l'adventice ou même probablement certaines cellules souches circulantes peuvent aussi acquérir ce « *phénotype sécrétoire et migratoire* » et ainsi amplifier ces phénomènes physiologiques ou délétères.

2.6.3.3. Les cellules musculaires lisses dans l'athérome

L'athérome est le modèle idéal pour illustrer l'implication des cellules musculaires lisses dans les processus pathologiques. La lésion débute par l'accumulation de lipide (cholestérol modifié) dans le sous-endothélium vasculaire. Ce signal, transmis aux cellules musculaires lisses, engendre alors la modification de leur phénotype de « contractile » en « sécrétoire », associée à la perte des contacts avec la matrice extracellulaire. Ces modifications permettent alors à ces cellules de passer la limitante élastique interne et de rejoindre le sous endothélium vasculaire.

Après cette phase de migration, la prolifération des cellules musculaires lisses permet une synthèse intensive de matrice, essentiellement composée de collagène, encapsulant littéralement et stabilisant les dépôts lipidiques. Pourtant rapidement, ces mêmes cellules musculaires se mettent à sécréter des métalloprotéases (MMP 2, 3 et 9) qui vont déstabiliser la plaque d'athérome en lysant cette néo-matrice de collagène et conduire à sa rupture dans la lumière artérielle. L'environnement créé et en particulier les cytokines proinflammatoires libérées font alors entrer ces cellules en apoptose (mort cellulaire programmée).

Cette décellularisation progressive du tissu affaiblit peu à peu la paroi artérielle qui est dans le même temps soumise à l'activité lytique de protéases synthétisées par les cellules inflammatoires qui infiltrent le tissu (macrophages et lymphocytes T) [40]. L'ensemble de ces phénomènes explique pourquoi l'athérome est l'un des éléments constitutifs de la plupart des anévrysmes artériels.

2.6.4. Les métalloprotéases matricielles ou MMPs

Le maintien de la paroi aortique nécessite le renouvellement permanent des différents éléments de la matrice extracellulaire ainsi que des cellules à l'exception de l'élastine qui présente un *turn-over* très faible voire nul, dans des conditions physiologiques.

Cette synthèse permanente de constituants pariétaux nécessite donc l'élimination des molécules âgées ou altérées. Ce rôle est attribué à différentes protéases dont le groupe le plus important est celui des métalloprotéases matricielles ou MMPs.

Depuis environ 20 ans, l'intérêt pour les métalloprotéases n'a cessé de croître. Pour s'en convaincre, il suffit de considérer le nombre impressionnant de publications et revues de la littérature concernant ce sujet. Les interconnexions avec des sujets tels que l'inflammation, les néoplasies, les maladies cardiovasculaires, le remodelage tissulaire sont aussi à la base de cet engouement.

Plus récemment, on leur a attribué le rôle d'enzyme pouvant, en dégradant la matrice, libérer des signaux et des facteurs de croissance à destination des cellules environnantes et ainsi réguler l'ensemble des processus régissant la paroi vasculaire. Ces fragments de matrice ont été dénommés *Matrikines* du fait de leur origine matricielle et de leur rôle de cytokine .

Ces métalloprotéases sont synthétisées par un grand nombre de cellules dans le tissu vasculaire normal. Au sein de l'aorte, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages et les quelques lymphocytes présents sont capables de produire ces enzymes en quantité importante sous l'influence de divers stimuli. Le stress cellulaire, les contraintes mécaniques ainsi que nombre de cytokines peuvent activer ces cellules qui, en réponse, vont sécréter des MMPs leurs permettant par exemple de migrer au travers de la média et des limitantes élastiques ou de proliférer.

Ces métalloprotéases présentent certaines caractéristiques communes, outre le fait d'être capable de dégrader les constituants de la matrice extracellulaire.

Elles sont synthétisées sous forme de pro-MMPs inactives. Leur activation nécessite l'intervention d'autres protéases ou, pour certaines, d'autres métalloprotéases qui clivent la séquence signal masquant le site catalytique.

Elles expriment leur activité enzymatique à la température de 37°C, à pH neutre et en présence de Zinc (Zn^{2+}). La séquence d'acides aminés « HExGHxxGxxHS » est constante dans la structure primaire des MMPs et permet de lier le zinc (où x est un acide aminé indéterminé). Elles sont en fait constituées de multiples domaines analogues à certaines autres molécules (à l'hémopexine par exemple) associés au site catalytique qui leur est spécifique.

La régulation de leur activité enzymatique est le fait d'inhibiteurs spécifiques, les TIMPs. Deux inhibiteurs, TIMP-1 et TIMP-2 ont la possibilité d'inhiber l'ensemble des métalloprotéases contenues dans la paroi artérielle. De la même façon que pour les MMPs, la synthèse des TIMPs est sujette à de nombreuses régulations que nous n'aborderons pas ici.

Bien que très étudiées dans la physiopathologie de nombreuses atteintes artérielles ou tissulaires comme l'hypertension, l'athérosclérose, l'asthme ou l'emphysème, les MMPs tiennent aussi un grand rôle dans de nombreux processus physiologiques impliquant le remodelage du tissu de soutien (croissance, prolifération, diapédèse...). Ceci pose d'ailleurs le problème de la création d'inhibiteurs thérapeutiques qui pourraient être à l'origine de dysrégulations de processus physiologiques.

Plus qu'une analyse fine et détaillée des 28 métalloprotéases connues à ce jour, nous rappellerons la classification des métalloprotéases ainsi que leurs substrats au sein du tissu artériel [41], [42]. Leur implication dans les différentes pathologies aortiques sera développée au cours des chapitres qui leurs seront consacrés.

Le groupe des métalloprotéases est scindé en plusieurs sous-groupes tenant principalement compte des substrats qu'elles dégradent.

On retrouve :

Les collagénases :

Collagénase interstitielle 1 (MMP-1)
 Collagénase neutrophile 8 (MMP-8)
 Collagénase 3 (MMP-13)

Les MMP membranaires :

MT1-MMP (MMP-14)
 MT2-MMP (MMP-15)
 MT3-MMP (MMP-16)
 MT4-MMP (MMP-17)

Les Gélatinases :

Gélatinase-A (MMP-2)
 Gélatinase-B (MMP-9)

Les autres MMPs:

Stromélysine-3 (MMP-11)
 Metalloélastase des Macrophage (MMP-12)

Les Stromélysines :

Stromélysine-1 (MMP-3)
 Stromélysine-2 (MMP-10)
 Matrilysine (MMP-7)

Chaque enzyme présente des affinités différentes pour les substrats de la paroi artérielle ; ceci explique l'expression différentielle de ces enzymes en fonction des pathologies étudiées. Les substrats dégradés par ces métalloprotéases sont réunis dans le tableau ci-dessous (Tableau I).

Subgroup	Name	MMP Number	Molecular Weight (Latent Form), kD	Substrate	Regulator in Human VSMCs	Native Inhibitor
Collagenases	Interstitial collagenase	1	55	Collagen types III, I, II, VII, and X; gelatin, proteoglycans	IL-1, TNF- α , PDGF, phorbol	TIMP-1 and-2
	Neutrophil collagenase	8	75	Collagen types I, III, II, proteoglycans		TIMP-1 and-2
Gelatinases	Gelatinase A	2	72	Collagen types IV, V, VII, and X; gelatin	Constitutive	TIMP-2 and-1
	Gelatinase B	9	92	Collagen types IV, V, VII, and X		TIMP-1 and-2
Stromelysins	Stromelysin 1	3	57	Collagen types III, IV, V, and IX; laminin, fibronectin, elastin, gelatin, proteoglycans, progelatinase B, procollagenase	IL-1, TNF- α	TIMP-1 and-2
	Stromelysin 2	10	57	Same as for stromelysin 1		TIMP-1 and-2
	Stromelysin 3	11	51	Gelatin, fibronectin, proteoglycans		TIMP-1 and-2
	PUMP-1	7	28	Gelatin, fibronectin, laminin, collagen type IV, procollagenase, proteoglycan core protein		TIMP-1 and-2
	Metalloelastases	12	57	Elastin		TIMP-1 and -2
Membrane-type MMPs	MT-MMP	...	66	Collagen type IV, gelatin, progelatinase A		TIMP-1 and-2

TABLEAU I : MMPS DE LA PAROI ARTERIELLE, SUBSTRATS ET INHIBITEURS

Enfin, l'ensemble des cellules de la paroi aortique ne synthétise pas toutes les métalloprotéases ce qui implique une étroite coopération des différentes cellules de la paroi artérielle [43].

Le macrophage synthétise les MMPs suivantes : MMPs 2, 9, 14 et 16 ;

La cellule spumeuse (macrophage activé + lipides modifiés) : MMPs 1, 3, 8, 11,12, 13;

La cellule musculaire lisse vasculaire : MMPs 1, 2, 3, 8, 9 ;

Le fibroblaste : MMPs 1, 2, 3, 9 ;

Le mastocyte : MMPs 2, 9 ;

Le lymphocyte : MMPs 8, 11 associées aux MMPs 1, 2, 3, 9 lorsqu'il est activé

2.7. Concept d'unité élastique et structuration globale de la paroi aortique

2.7.1. L'unité élastique

De façon formelle, nous avons étudié un à un les différents constituants de la paroi aortique, pourtant depuis quelques années une description plus proche de la réalité s'est imposée : l'unité élastique [44].

La répétition de cette « brique élémentaire » permet d'approcher fidèlement la structure de la média aortique. Elle est centrée sur deux cellules musculaires lisses interconnectées entre elles ainsi qu'aux fibres élastiques via des extensions de la matrice extracellulaire (figure 12). Les fibres élastiques sont intimement liées aux fibres de collagène (type I et III). Les ramifications matricielles permettent un ancrage solide des cellules musculaires lisses au sein du tissu conjonctif. De plus, ces cellules sont aussi fixées à la matrice via des microfibrilles (fibrillines, fibronectines...) et le collagène de type VI. Ces ancrages sont impliqués dans les signalisations provenant de la matrice et induisant la survie, l'expression d'un phénotype ou l'apoptose des cellules musculaires lisses.

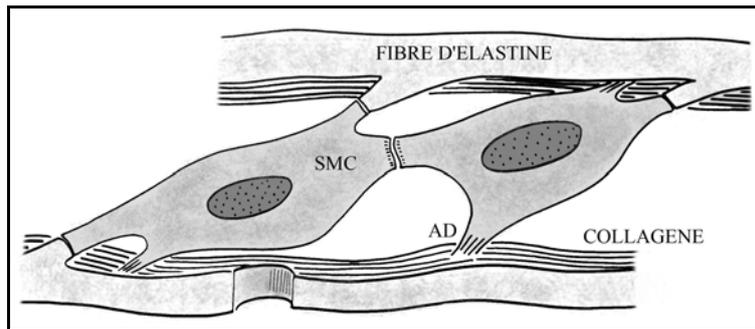


FIGURE 12 : L'UNITE ELASTIQUE DE LA PAROI ARTIQUE

SMC : CELLULE MUSCULAIRE LISSE. AD : ADHERENCE A LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.

2.7.2. Structuration globale de la paroi aortique

Ce « sandwich » se répète n fois et constitue alors en grande partie la média de la paroi aortique. Comme nous l'avons déjà mentionné, les proportions des différents éléments varient tout au long de l'aorte mais l'architecture demeure.

En fait, cette description tient compte des interconnexions entre les différents éléments de la paroi et permet d'approcher l'architecture vraie du tissu aortique. Dans certaines pathologies, cette vision globale permet de comprendre pourquoi des modifications de la matrice peuvent influencer sur les cellules et inversement.

Par ailleurs, d'un point de vue dynamique, les propriétés physiques de l'aorte sont plus justement approchées en utilisant ce type de modèle plutôt qu'en utilisant une simple sommation des différents éléments constitutifs.

2.8. Facteurs et pathologies influençant la composition de la paroi aortique

2.8.1. Effet du vieillissement

Comme nous l'avons vu lors de la description des différents constituants de la matrice extracellulaire, certaines molécules ont un taux de renouvellement faible et d'autres un taux plus élevé...

Ceci implique, pour ces dernières, un système permettant de se débarrasser des molécules anciennes, altérées, et une signalisation spécifique permettant d'assurer le « *turn-over moléculaire* ». Ce premier rôle est, en grande partie, assuré par les MMPs qui interviennent en association avec les cellules musculaires lisses, comme de véritables « *nettoyeurs* » hydrolysant l'élastine, les collagènes ou encore les glycoprotéines.

Cette vision est en partie juste, mais en partie seulement, car si ce type de mécanisme existe son efficacité tend à diminuer avec le temps. Ceci conduit progressivement à une accumulation de macromolécules âgées, fragmentées, dégradées partiellement ou encore polyglycosylées comme dans le cas des collagènes [45]. L'ensemble de ces phénomènes, à l'échelle moléculaire, modifie profondément les caractéristiques physico-chimiques du tissu aortique ainsi que le comportement propre de l'aorte, face aux variations de pression par exemple.

2.8.1.1. Les changements visibles

Le chirurgien le sait bien : une personne âgée a une aorte de plus grand diamètre, plus rigide et donc par conséquent plus fragile.

Il est habituel d'observer des signes, plus ou moins marqués, d'athérosclérose qui, dans ce cas, plus que d'être une réelle pathologie, sont probablement plus des marqueurs d'un vieillissement « *physiologique* » du tissu artériel (Rappelons que les premières stries lipidiques artérielles apparaissent lors de la vie *in utero* !).

De nombreux travaux ont rapporté ces modifications comportant une rigidification et une elongation de l'arbre artériel liées en partie à une diminution d'élastance [46]. Finalement, la paroi artérielle évolue constamment au fil de la vie rompant avec l'image vieillotte et restrictive du « conduit véhiculant le sang ».

Ces notions présentent un intérêt majeur pour qui souhaite étudier le tissu aortique « normal » et le comparer à des tissus « pathologiques ». En effet, les lésions tissulaires retrouvées chez un homme de 87 ans, apparemment bien portant, pourront paraître plus marquées que celles visualisées chez une jeune femme de 31 ans opérée d'un anévrisme de l'aorte ascendante !

De même, avec l'âge, on observe chez tous les mammifères une augmentation progressive du diamètre et de la longueur de l'aorte. Chez l'homme, ce phénomène n'est pas homogène et prédomine au niveau des zones anatomiques soumises aux plus fortes contraintes comme au niveau de l'aorte ascendante, de la crosse aortique et de la partie infrarénale de ce vaisseau.

A quantité égale de tissu, cette augmentation du diamètre aortique suppose une diminution de l'épaisseur de la paroi aortique. Pourtant certaines accumulations et infiltrations cellulaires peuvent stabiliser ou épaissir cette paroi.

Cette observation n'est qu'en partie vraie pour l'aorte ascendante où il est habituel de trouver une paroi aortique légèrement plus fine chez les personnes âgées que chez les jeunes à la différence de l'aorte abdominale.

Au niveau de l'aorte thoracique, la média représente la plus grande partie de la paroi aortique et est riche en élastine, molécule dont la quantité varie très peu avec l'âge. Malgré les accumulations de molécules tel que les collagènes, certains lipides et protéoglycanes la média aortique tend à s'amincir du fait de la dilatation. De plus, la prolifération modérée de cellules musculaires lisses au niveau sous intimal ne compense pas la forte décellularisation de la média évoluant avec l'âge.

Enfin, l'adventice est souvent le siège d'une prolifération de fibroblastes sécrétants qui s'associe à un infiltrat de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes ...)[40]. Pourtant, ces épaissements intimaux et adventiciels ne parviennent pas à compenser l'amincissement de la média.

A l'inverse, au sein de l'aorte abdominale, on retrouve un épaissement important des régions sous intima et médiale interne associées à une augmentation de l'épaisseur totale de la paroi artérielle malgré l'augmentation des diamètres. Ces constatations sont également retrouvées dans un grand nombre d'artères élastiques ou de calibre intermédiaire et s'accroissent après l'âge de 60 ans.

2.8.1.2. Les changements de composition biochimique

Le vieillissement de la paroi artérielle engendre l'altération de tous les constituants majeurs de la paroi aortique. Comme nous venons de le voir les cellules musculaires lisses diminuent en nombre, migrent et changent de phénotype pour sécréter principalement du *collagène*.

La co-localisation de ces cellules musculaires lisses sécrétant des MMPs et de fibres élastiques engendre l'altération irréversible de la « charpente » élastique de l'aorte. Finalement, ces lésions soumises au stress pariétal induisent la fragmentation des fibres élastiques alors que la quantité d'*élastine* totale varie peu.

La fragmentation des fibres d'élastiques permet les dépôts de lipides et de calcium qui suractivent alors la production de MMPs (MMP2 principalement) et diminuent l'élasticité des fibres. Ce cercle vicieux s'auto amplifie pour aboutir à des lésions proches de celles retrouvées dans l'athérosclérose.

Lors du vieillissement, la production du collagène par les cellules musculaires lisses s'accroît de façon concomitante à une diminution de sa dégradation conduisant à une accumulation progressive de « vieux » *collagène*. Associée à cette fibrose de la paroi artérielle, l'augmentation du cross-linking et une glycation non enzymatique massive rendent le collagène encore plus résistant à l'action des protéases [47].

Finalement, le rapport Collagène sur Elastine augmente progressivement avec l'âge rendant l'aorte plus rigide et/ou moins élastique.

Les glycoprotéines, les protéoglycanes ou les autres molécules de la paroi intéressées par ces modifications liées à l'âge, bien que très importantes du point de vue architectural ne seront pas détaillées ici.

Enfin, pour conclure sur les effets du vieillissement de la paroi artérielle, on notera une dysfonction endothéliale liée à l'âge associant de multiples altérations dont une hyperperméabilité de la couche de cellules endothéliales et une diminution de la réactivité aux agents vasodilatateurs médiée par l'endothélium.

Ces modifications aboutissent à la rigidification de la paroi artérielle s'accompagnant de modifications du profil hémodynamique par défaut de compliance artérielle (hypertension et onde systolique réfléchie précoce).

Le tableau suivant rapporte les modifications retrouvées au sein de la paroi aortique du lapin lors du vieillissement [48].

- augmentation du diamètre aortique
- augmentation de l'épaisseur de la paroi aortique

- au sein de l'intima :
 - o épaissement lié aux cellules musculaires lisses et la synthèse de matrice
 - o augmentation du niveau et de l'activité de la MMP2
 - o augmentation de l'expression des molécules d'adhésion
 - o accumulation de molécules glycosylées

- la dysfonction endothéliale associée :
 - o diminution de la vasoréactivité
 - o diminution du NO libre,
 - o augmentation des espèces activées de l'oxygène
 - o augmentation de la perméabilité de l'endothélium
 - o diminution de l'angiogénèse

- au sein de la média :
 - o épaissement
 - o augmentation de la taille et du nombre des cellules musculaires lisses
 - o matrice :
 - augmentation du contenu en collagène
 - augmentation du cross-linking non enzymatique du collagène
 - augmentation du contenu en fibronectine
 - diminution du contenu en élastine, fragmentation et calcifications
 - augmentation du contenu en glycosaminoglycanes

Ces modifications qui pour la plupart sont aussi retrouvées chez l'homme induisent des lésions d'athérosclérose exagérées en cas de régime hyperlipidique

2.8.2. Effet de l'hypertension artérielle

L'effet de l'hypertension artérielle sur le tissu aortique est encore sujet à débat et les résultats de différentes études restent contradictoires sur certains points. L'hypertension artérielle semble avoir un impact sur la qualité de l'*élastine* mais peu sur sa quantité. De façon réactionnelle au stress pariétal plus intense, les *cellules musculaires lisses* augmentent leur synthèse de *collagène* pour tenter de pallier la « défaillance » de l'*élastine*.

Certaines glycoprotéines comme la *fibronectine* ou les *intégrines* seraient aussi synthétisées en excès, rigidifiant encore un peu plus la paroi de l'artère et aggravant alors l'hypertension. Enfin, après une phase de prolifération associée à la synthèse de *collagène* et d'autres macromolécules, il semblerait que les cellules musculaires lisses entrent progressivement en apoptose, accélérant ainsi la décellularisation de la paroi vasculaire [49], [50].

2.8.3. Effet du diabète

Les diabètes de type 1 et 2 présentent des manifestations communes au sein de la paroi artérielle et aboutissent au développement accéléré et prématuré de lésions athérosclérotiques. L'accumulation initiale de macromolécules glycosylées entraîne la cascade d'évènements déjà décrite lors du vieillissement et conduit à une fibrose pariétale ainsi qu'à l'accumulation de lipides et de calcium au sein de la paroi artérielle [51]. Ici encore, on observe une prolifération cellulaire initiale suivie, au sein de plaques plus âgées, d'une apoptose progressive des cellules musculaires lisses.

Finalement, le mécanisme sous-tendu par cette athérosclérose est commun à de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques. Certains auteurs n'hésitent d'ailleurs pas à assimiler l'athérosclérose à un vieillissement accéléré du tissu artériel .

3. L'AORTE PATHOLOGIQUE

3.1. Introduction : Athérome, Athérosclérose et Calcifications

3.1.1. L'athérome

L'athérome est défini comme une accumulation de lipides au sein de l'intima des artères élastiques et musculaires formant progressivement un core lipidique. Ce dépôt débute par de simples stries lipidiques (réversibles) qui contiennent essentiellement des macrophages ou cellules spumeuses dont le cytoplasme est rempli de lipides (essentiellement du *cholestérol*, estérifié ou non). La nécrose de ces macrophages provoque une lente accumulation de lipides dans l'espace extracellulaire de l'intima.

Dans le même temps on observe la migration et la prolifération de cellules musculaires lisses, de lymphocytes et de macrophages au sein de l'intima. Histologiquement et visuellement, on observe des zones épaissies, jaunâtres, plus ou moins confluentes et limitées à l'intima. A ce stade, ces lésions sont en général asymptomatiques du fait de la faible réduction du calibre des vaisseaux atteints et de l'absence de risque initial embolique [52] book RUBIN pathology.

3.1.2. L'athérosclérose

Dans la plaque jeune, la prolifération intense des cellules musculaires lisses au sein de l'intima et le « switch » de leur phénotype contractile en sécrétoire permet l'accumulation de collagène formant progressivement une plaque fibreuse qui stabilisera provisoirement le dépôt lipidique intimal. Les fibroblastes, les cellules endothéliales et certaines cellules circulantes sont aussi impliqués dans la constitution de la lésion d'athérosclérose. La taille de la lésion progresse alors relativement rapidement.

Dans les plaques plus âgées, la prolifération cellulaire diminue et l'expression de certaines MMPs (MMPs 3 et 9 en particulier), sous l'action de cytokines proinflammatoires, va permettre la déstabilisation de la plaque d'athérosclérose. D'autre part, les modifications de l'endothélium vasculaire vont permettre l'activation des plaquettes circulantes qui vont adhérer progressivement à la lésion. Durant cette phase l'accumulation de lipide se poursuit.

Enfin, l'activité des métalloprotéases associée à la fragilisation de la paroi intimale va permettre la rupture de la plaque et l'expulsion de son core lipidique dans le flux artériel, laissant ainsi à nu, la média du vaisseau. Outre le problème de l'embolie distal lipidique, l'agrégation rapide des plaquettes circulantes au niveau de la lésion va réduire de façon considérable la lumière du vaisseau ou l'occlure complètement comme dans le cas de la thrombose coronarienne aiguë.

Au niveau de l'aorte ascendante, les phénomènes emboliques représentent la majorité des manifestations cliniques, suivis de façon moins fréquente par les dissections ayant pour porte d'entrée la lésion intimale puis par d'éventuelles ruptures, en général en rapport avec des aortes dilatées présentant une athérosclérose ulcérée évoluée [52].

3.2. L'anévrisme de l'aorte ascendante

3.2.1. Définition

D'un point de vue chirurgical, un anévrisme correspond à une perte de parallélisme permanente des parois d'un vaisseau associée à une dilatation supérieure à 150 % des diamètres sus et sous jacents.

3.2.2. Présentation

Il peut toucher tout ou partie de l'aorte ascendante et être de plusieurs formes :

3.2.2.1. Anévrisme Fusiforme

L'anévrisme se présente sous l'aspect d'une dilatation progressive, en fuseau, qui après avoir atteint son maximum, diminue de façon tout aussi progressive pour retrouver le calibre normal du vaisseau (figure 13). C'est la description classique des anévrysmes de l'aorte (hors racine aortique).

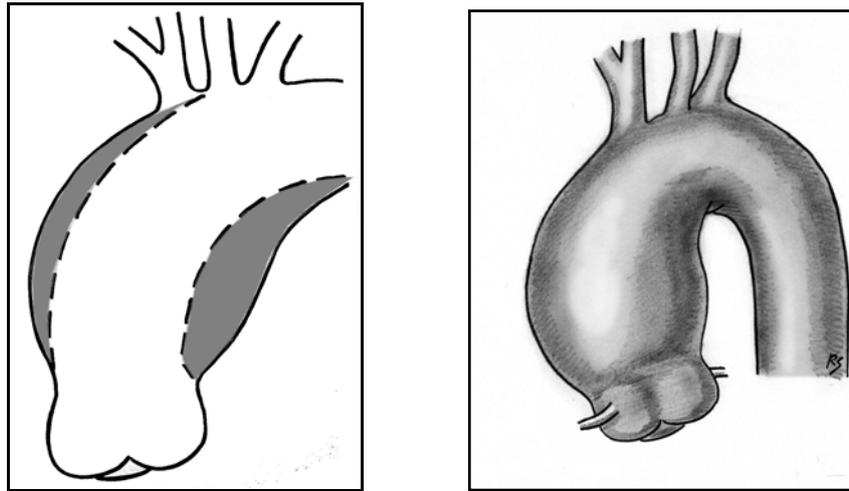


FIGURE 13 : ANEVRYSMES FUSIFORMES DE L'AORTE ASCENDANTE

3.2.2.2. Anévrysme sacciforme

Dans ce cas l'anévrysme débute brutalement et se présente sous la forme d'un « sac » appendu latéralement au vaisseau. Les diamètres de l'aorte immédiatement au contact du sac anévrysmal sont en général proches de la normale (figure 14). Cette forme anatomique est rarissime au niveau de l'aorte ascendante et ne doit pas être confondue avec un faux anévrysme (collection hématique contenue et alimentée, sans paroi individualisable, provenant d'une extravasation de sang en dehors de l'aorte).

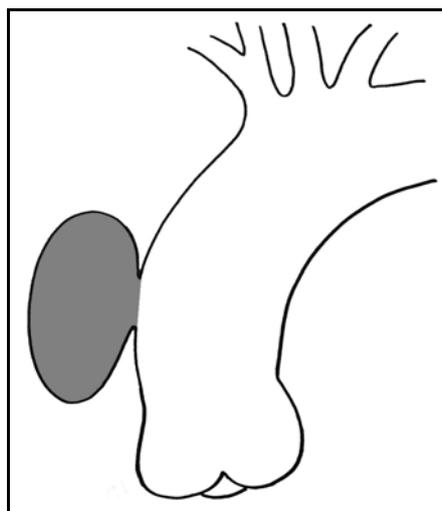


FIGURE 14 : ANEVRYSMES SACCIFORMES DE L'AORTE ASCENDANTE

3.2.3. Les complications

Les complications principales de l'anévrisme de l'aorte ascendante sont au nombre de quatre :

3.2.3.1. La rupture

Complication la plus fréquente, elle est associée à un taux de décès particulièrement élevé (50 à 95 % selon les études) et ne laisse que rarement le temps d'un geste chirurgical. Le risque est statistiquement corrélé avec le diamètre de l'anévrisme. De larges études ont défini des seuils actuellement utilisés pour retenir l'indication chirurgicale de manière élective. On considère habituellement la chirurgie à partir d'un diamètre maximum de 5 cm pour un anévrisme sans pathologie associée et de 4,5 cm chez les patients présentant une maladie annulo-ectasiente de type Marfan ou équivalents (syndrome marphanoïde).

Dans le cadre des bicuspidies aortiques, il est habituel de retenir le seuil de 5 cm [53] bien que plusieurs publications récentes tendent à prouver que dans certains cas, une chirurgie plus précoce serait bénéfique [54].

Outre ces considérations de taille, il est admis qu'un anévrisme de l'aorte évoluant de plus de 6 mm en six mois ou de 10 mm en un an doit faire retenir une indication chirurgicale quelque soit la taille de ce dernier. Des études morphologiques ont déterminé qu'un anévrisme non compliqué évoluait d'environ 2 mm par an pour un diamètre de moins de 4 cm et de 3 à 8 mm pour des diamètres supérieurs [55].

D'autres facteurs tels que l'hypertension artérielle, une pathologie inflammatoire, un antécédent de chirurgie récente ou une bronchopathie chronique obstructive (etc) peuvent influencer le risque de rupture.

3.2.3.2. La dissection aortique

Elle se définit comme le clivage longitudinal de l'aorte au niveau de la média suite à l'irruption de sang provenant de la lumière aortique via une déchirure intimale. Cette « porte d'entrée » ou brèche intimale fait communiquer le vrai et le faux chenal circulant (Figure 15).

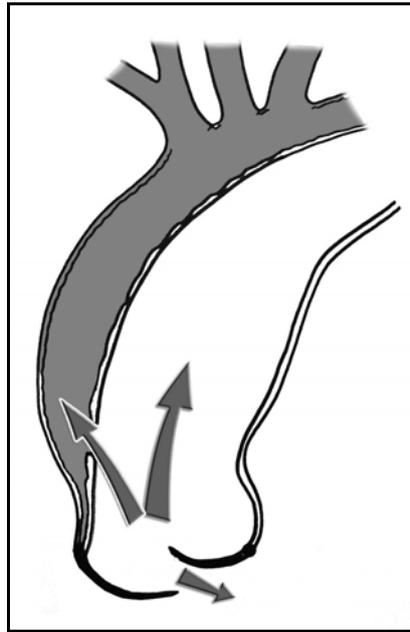


FIGURE 15 : ASPECT D'UNE DISSECTION AORTIQUE DE L'AORTE ASCENDANTE ASSOCIEE A UNE INSUFFISANCE AORTIQUE PAR DESINSERTION DES COMMISSURES DE LA VALVE AORTIQUE

La dissection est associée à une fragilisation de la média liée à l'anévrisme et à la nécrose de la partie interne de la média aortique. Cette média-nécrose kystique est généralement observée chez les patients présentant une hypertension artérielle ancienne. L'analyse de ces lésions retrouve, en plus des débris cellulaires et matriciels, une abondance de *muccopolysaccharides*. La rupture, l'évolution anévrysmale chronique et la malperfusion sont les trois complications principales des dissections.

3.2.3.3. L'insuffisance aortique

Comme vu précédemment lors de la description anatomique de la racine aortique, la continence valvulaire est le fait de l'adéquation entre la taille des cuspides, le diamètre de l'anneau aortique et le diamètre de la jonction sino-tubulaire. Dans le cadre d'un anévrisme, l'insuffisance aortique peut être liée, à une altération de la valve elle-même, à une dilatation de l'anneau aortique empêchant la coaptation des cuspides ou à une restriction du jeu des cuspides consécutive à la traction exercée sur les commissures par la dilatation de la jonction sino-tubulaire.

3.2.3.4. La compression des structures adjacentes

Plus rare, des compressions des structures adjacentes ont aussi été observées. Il s'agit, la plupart du temps, de structures veineuses tels que la veine cave supérieure ou le tronc veineux innominé. On les observe principalement dans le cadre d'anévrysmes volumineux et/ou partiellement étendus à l'arche aortique.

3.2.4. Physiopathologie des anévrysmes

Malgré un grand nombre de travaux sur ce sujet, de nombreuses zones d'ombre persistent concernant la physiopathologie exacte des anévrysmes de l'aorte. Le mécanisme est probablement complexe et trouve sa source à plusieurs niveaux.

La description classique des anévrysmes des artères élastiques admet que la lésion athéromateuse est le *primum movens* conduisant à la formation de ce dernier. Pourtant, des travaux plus récents ont retrouvé que la dégénérescence de la média artérielle est un préalable à l'athérome et à l'athérosclérose qui ne seraient alors vu que comme une circonstance aggravante de l'altération pariétale [39].

Comme nous l'avons déjà décrit, cette dégénérescence est sous tendue par des phénomènes complexes et intriqués. Ils impliquent la modification du phénotype des cellules musculaires lisses, la dysrégulation de la synthèse de MMPs et l'altération qualitative et quantitative de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle.

En fait, il semble que l'étiologie de ces anévrysmes nous échappe encore. Il est de plus en plus probable que la cause réelle de cette pathologie se trouve au niveau des gènes, de leurs régulations et des voies de signalisation organisant le dialogue entre cellules et matrice extracellulaire.

Les facteurs de risque des anévrysmes ne seraient alors plus considérés que comme des activateurs de certains mécanismes cellulaires (prolifération, migration, synthèse ou apoptose).

Par exemple, nous avons déjà vu le rôle de :

- l'hypertension artérielle qui modifie le phénotype des cellules musculaires lisses et favorise la synthèse de MMPs et de collagène,
- du diabète, engendrant une accumulation de « vieilles » macromolécules polyglycosylées et activant divers systèmes de « nettoyage » dégradant la matrice extracellulaire,
- du tabac responsable, comme dans de nombreux états inflammatoires, d'une sécrétion inappropriée de protéases dans les espaces intercellulaires...etc.

3.2.4.1. La maladie annulo-ectasiente

Sous ce terme générique, se cachent en fait de multiples pathologies à l'expression phénotypique proche. L'anévrisme de l'aorte ascendante englobe la racine aortique et est associé à une dilatation de l'anneau de la valve aortique (squelette fibreux). La forme caractéristique de ces anévrismes est dite « en bouteille de *Chianti* » : fusiforme en haut et stoppé par l'anneau de la valve aortique en bas. Le traitement de telles lésions suppose un geste combiné touchant l'aorte ascendante et l'anneau valvulaire aortique.

La cause la plus fréquente de maladie annulo-éctasiente est la maladie de Marfan. En France, on estime à environ 12500 le nombre de patients atteints par cette affection héréditaire dont environ 60 à 70 % ne sont pas diagnostiqués. La fréquence communément admise est d'environ 1 pour 5000 individus. Le décès, lié à une rupture anévrismale ou à une dissection aortique, survient généralement en l'absence de traitement médical et/ou chirurgical avant l'âge de 40 ans.

Le substratum génétique repose sur la mutation du gène de la *fibrilline 1*, porté par le chromosome 15, et transmissible à la descendance sur un mode autosomique dominant [56].

Cette pathologie, liée à une altération globale du réseau fibrillaire, se traduit par des atteintes multifocales plus ou moins marquées (cœur et vaisseaux, œil, squelette, articulations et tendons, poumon et peau) en rapport avec une hyperélasticité du tissu conjonctif de soutien.

Des modifications comparables à celles retrouvées au sein de la paroi aortique des patients porteurs de bicuspidie ont été décrites

D'autres syndromes, pour certains très rares, se rapprochent de cette description clinique et présentent un risque supérieur d'anévrisme artériel. Nous ne citerons que certains d'entre eux tels le syndrome D'Ehlers-Danlos type IV (mutation du collagène III) ou le syndrome d'ostéogénèse imparfaite (*Osteogenesis Imperfecta* = mutation du collagène I) [57].

Protéines matricielles	Maladie vasculaire	Phénotype
Fibrillin-1	Syndrome de Marfan	Dilatation artérielle, Anévrismes, Dissection aortique, autres
Collagène I	Ostéogénèse imparfaite	
Collagène III	Syndrome d'Ehler-Danlos IV	

3.2.4.2. La valve et « l'aorte de bicuspidie »

La présentation anatomique classique de la valve aortique décrit trois cuspidés ou feuillets ; la valve est dite tricuspide. Pourtant, 1 à 2 % de la population présentent une valve aortique composée de deux cuspidés aortiques, dite bicuspidie. Cette variation anatomique est probablement d'origine génétique puisqu'on retrouve des prévalences jusqu'à 15 fois supérieures au sein de certaines familles ou entre jumeaux homozygotes. Actuellement nous ne connaissons pas la ou les molécules impliquées dans la genèse de la bicuspidie aortique.

Un examen attentif de ces bicuspidies individualise donc deux cuspidés, symétriques ou non et présentant chacune une anatomie relativement normale en dehors de leurs mensurations. Il est habituel de retrouver une zone de fusion, souvent médiane, formant un raphé et siégeant généralement sur la cuspide la plus étendue.

La bicuspidie aortique est un facteur de risque d'altération précoce de la valve aortique ainsi que du tissu artériel sus-jacent [58], [59].

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que les lésions histologiques prédominaient sur l'aorte ascendante et que l'altération valvulaire serait plus en rapport avec les conditions hémodynamiques particulières générées par le caractère bicuspidé de la valve (augmentation du stress appliqué aux cuspidés en rapport avec une surface efficace plus petite à diamètre d'anneau identique).

De récentes études ont rapporté de nombreuses modifications de la paroi de l'aorte ascendante en présence d'une bicuspidie aortique. Les cellules musculaires lisses stimulées s'orientent vers un phénotype sécrétoire puis présentent une tendance à l'apoptose. L'origine de ces modifications est incertaine. Des travaux ont mis en lumière le rôle fondamental du détachement des cellules de la matrice, impliquant la *fibronectine* et les *microfibrilles*, qui pourrait à lui seul initier la sécrétion de métalloprotéases et activer la voie des *Caspases* aboutissant à une apoptose progressive (essentiellement dans la partie interne de la média) [60].

Les profils de sécrétion de métalloprotéases au sein de ce tissu aortique diffèrent de ceux retrouvés dans les tissus artériels normaux, principalement avec l'expression plus importante des MMP2 et MMP9 mais aussi de certains inhibiteurs, comme TIMP 1 et 2.

Malgré la présence d'inhibiteurs, l'action protéolytique des MMPs conduit à une fragmentation progressive des fibres élastiques, à l'altération des membranes basales et à la constitution de zones de média-nécrose même en l'absence de dilatation. L'ensemble de ces phénomènes peut aisément expliquer la nette propension de l'aorte ascendante de bicuspidie à se dilater précocement [61].

Malgré ces constatations particulièrement inquiétantes concernant l'aorte ascendante des patients porteurs de valve aortique bicuspidé, le remplacement de ce segment n'est pas communément admis ou recommandé. Des travaux, toujours plus nombreux, dans ce sens changeront probablement le regard que nous portons sur cette « variation anatomique pathologique ».

4. LA CHIRURGIE DE L'AORTE ANEVRYSMALE

4.1. Introduction

L'anévrysme de l'aorte ascendante est une pathologie sournoise, progressant à bas bruit ou de façon totalement asymptomatique jusqu'à la survenue de complications parfois fatales.

Depuis les années cinquante et Charles Dubost réussissant le premier remplacement d'un segment d'aorte par une homogreffe aortique, le concept de remplacement aortique par différents substituts persiste en s'adaptant à tous les segments de l'aorte. Par ailleurs, les améliorations constantes en matière de techniques opératoires, d'anesthésie et de circulation extracorporelle permettent aujourd'hui une chirurgie de l'aorte ascendante sûre, associée à une mortalité proche de 7 à 10 %, toutes circonstances confondues.

Dans ce chapitre, je présenterai brièvement les différentes techniques de traitement des diverses formes d'anévrysmes de l'aorte ascendante. Le but de ce « chapitre chirurgical » n'est pas de détailler chaque technique mais simplement d'apprécier le choix qui se présente au chirurgien en fonction du type de lésion.

4.2. Le remplacement de l'aorte ascendante (ou mise à plat-greffe)

Cette intervention consiste en un remplacement chirurgical du segment d'aorte situé au dessus de la jonction sino-tubulaire par un substitut prothétique. Ce dernier est en général une prothèse synthétique de Dacron* (fibres de polyester saturé) mais peut, dans des cas très exceptionnels, être une homogreffe (cas de l'infection).

L'intervention se fait sous circulation extracorporelle, après clampage de l'aorte associé à l'induction d'un « arrêt cardiaque » par la perfusion d'une solution de cardioplégie principalement riche en potassium. Cette procédure est utilisée pour l'ensemble des gestes de chirurgie touchant uniquement l'aorte ascendante. Dans les cas dépassant le « simple » siège de l'aorte ascendante, des artifices techniques permettent soit d'assurer la continuité de la perfusion cérébrale soit d'interrompre temporairement la perfusion cérébrale de façon partielle ou totale.

En cas d'atteinte simultanée de l'aorte ascendante et de la valve aortique, il alors est possible de procéder au remplacement de la valve par le substitut valvulaire adapté et d'y associer une mise à plat - greffe de l'anévrisme comme écrit précédemment. Pourtant certaines publications ont critiqué cette attitude, leurs auteurs considérant qu'en cas d'atteinte de ces deux structures, les lésions étaient « globales » et que la pérennité du résultat dépendait du remplacement complet de l'aorte ascendante comprenant la racine aortique. Des études rapportant les résultats de ce type d'intervention à long terme ont retrouvé une fréquence plus importante de chirurgie itérative (redux) pour les patients dont on avait conservé la racine aortique lors du remplacement de la valve et de l'aorte ascendante [62].

4.3. Le remplacement de l'aorte ascendante et des sinus de Valsalva

Dans le cadre d'anévrismes englobant l'ensemble de l'aorte ascendante, plusieurs techniques et variantes chirurgicales existent. Le but de ces interventions est d'assurer un remplacement effectif de l'ensemble du tissu anévrysmal en préservant la valve aortique. L'analyse morphologique de cette dernière est un point crucial, elle permet de s'assurer de la morphologie « normale » de la valve et de l'absence de lésion contre-indiquant la conservation valvulaire. D'autre part, il n'est pas rare d'observer une insuffisance aortique associée à la dilatation de la jonction sino-tubulaire induite par l'anévrisme. Le chirurgien devra donc identifier le mécanisme exact de cette insuffisance : soit l'insuffisance est liée à une restriction des mouvements de cuspides par ailleurs normales et la conservation sera préférée soit il devra se résoudre à compléter son geste devant une altération importante de la valve.

4.4. Remplacement de la racine aortique avec conservation de la valve aortique et réimplantation des coronaires

Depuis environ plus de 25 ans, les chirurgiens cardiaques cherchent la « bonne » intervention permettant un traitement efficace et pérenne de l'anévrisme de l'aorte sans altération valvulaire aortique. Historiquement, Yacoub met au point la première vraie intervention de conservation de la valve aortique en 1983 [63], Tirone David poursuivra sur cette voie en publiant sa technique d'inclusion en 1992 [64], censée éliminer le seul défaut majeur de la procédure initiée par Yacoub, près de 10 ans auparavant.

Finalement, malgré les progrès apportés par ces interventions, certains problèmes persistent permettant à de nouvelles procédures à base, par exemple, de prothèses anatomiques ou d'artifices techniques d'éclairer cette chirurgie d'un jour nouveau (en dépit de rudes réticences de certains pionniers outre-atlantique...)

4.4.1. L'intervention de YACOUB (1983)

Elle consiste en un remplacement de l'ensemble du tissu aortique par une prothèse trifoliée, épousant l'anatomie de l'anneau aortique, sur laquelle seront anastomosées les ostia coronaires selon la technique des patches de Carrel. L'avantage de cette technique est de recréer les sinus de Valsalva et donc d'amoindrir le stress subit par les cuspidés aortiques (figure 16).

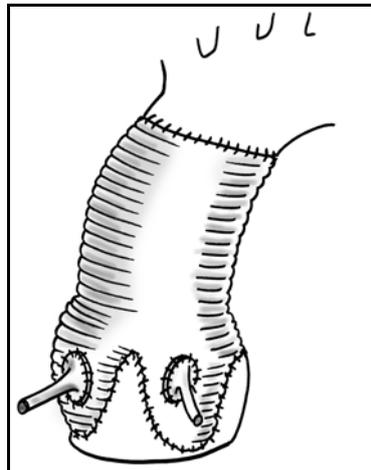


FIGURE 16 : INTERVENTION DE YACOUB LAISSANT L'ANNEAU VALVULAIRE LIBRE

Cette technique, mise au point par *Sir M. Yacoub*, a été très employée par le passé mais est actuellement « en perte de vitesse » devant un taux de réintervention important, à long terme, du fait de récurrence d'insuffisance aortique par dilatation de l'anneau valvulaire. Cette nécessité de stabiliser l'anneau aortique est d'ailleurs au centre de la problématique actuelle de cette chirurgie.

4.4.2. L'intervention de Tirone DAVID (1992)

Il convient plus exactement de parler des interventions de Tirone DAVID puisqu' il en a décliné 5 types successifs pour tenter d'associer la reconstruction la plus anatomique possible de l'aorte et une certaine stabilisation de l'anneau valvulaire aortique. Le concept initial de Tirone DAVID était d'inclure l'anneau de la valve aortique dans la prothèse remplaçant l'aorte ascendante puis de réimplanter les ostia coronaires (figure 17). Les évolutions successives de ce concept lui ont par la suite donné des néosinus de Valsalva et une jonction sino tubulaire.

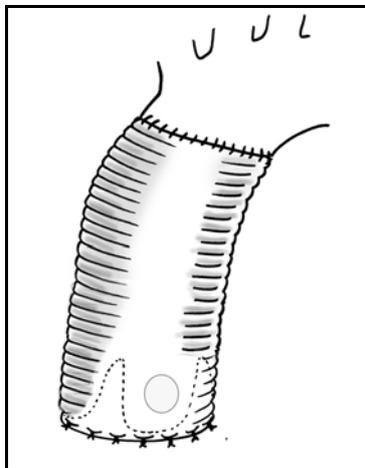


FIGURE 17 : INTERVENTION DE DAVID PAR INCLUSION DE LA VALVE AORTIQUE DANS UN TUBE PROTHETIQUE AVANT LA REIMPLANTATION DES ARTERES CORONAIRES

L'intervention de Tirone David est pour le moment l'une des interventions de la racine aortique des plus prisées par les chirurgiens bien que de nouvelles prothèses plus anatomiques (Prothèse Valsalva) semblent améliorer encore le concept et la réalisation de réparation anatomique de la racine aortique.

4.4.3. L'intervention de RAMA (2006)

Enfin, je voudrais citer cette nouvelle technique chirurgicale de remplacement de la racine aortique avec conservation de la valve aortique que j'ai eu la chance de voir lors de mon passage à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière et que nous avons récemment publié avec son « inventeur », le Docteur Akhtar RAMA dans la revue : *The Annals of Thoracic Surgery* (in press) [65] Cette technique rassemble en fait les avantages des deux précédentes et en supprime les inconvénients. L'intervention se rapproche d'une chirurgie selon Tirone David puisque le geste débute par une inclusion de l'anneau aortique dans une prothèse cylindrique. Puis pour recréer les sinus de Valsalva et la jonction sino-tubulaire on extériorise les commissures aortiques par trois incisions en « T » inversé. L'augmentation d'étoffe liée à la suture de ces patches commissuraux permet de recréer des néosinus et une racine aortique très proches de la normale tout en stabilisant l'anneau aortique.

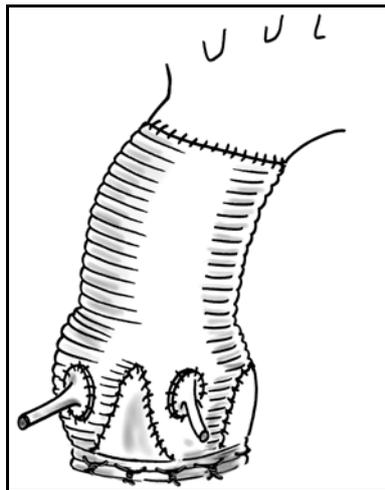


FIGURE 18 : INTERVENTION DE RAMA CREANT DES NEOSINUS
ET STABILISANT L'ANNEAU AORTIQUE

4.5. Remplacement de la valve aortique, de l'aorte ascendante avec réimplantation des coronaires ou intervention de BENTALL (1968)

Intervention historique, elle fut parmi les premières à standardiser le traitement des anévrysmes de l'aorte ascendante dès la fin des années soixante [66]. A mettre au crédit de *Bentall* et de *De Bono*, elle consiste en un remplacement complet de l'aorte ascendante, de la valve aortique avec réimplantation des coronaires (figure 19).

Malgré quelques modifications mineures, cette intervention, vieille de presque quarante ans, est encore largement utilisée de nos jours et représente encore plus de la moitié des gestes réalisés sur l'aorte ascendante. Elle consiste en un remplacement de la valve aortique par un substitut adapté à celui de l'aorte par une prothèse en dacron et par la réimplantation des ostia coronaires. Les résultats fonctionnels à long terme liés à cette intervention sont bons. Pourtant, le remplacement de la valve aortique par des substituts mécaniques impose une anticoagulation à vie grevée d'une mortalité estimée à 0,4 % par an ! La surmortalité liée à cette anticoagulation pour un homme de 40 ans vivant jusqu'à 90 ans serait donc de 20 % !!! On comprend alors l'acharnement dont certains ont fait preuve pour trouver des alternatives à ce type d'intervention radicale mais efficace...

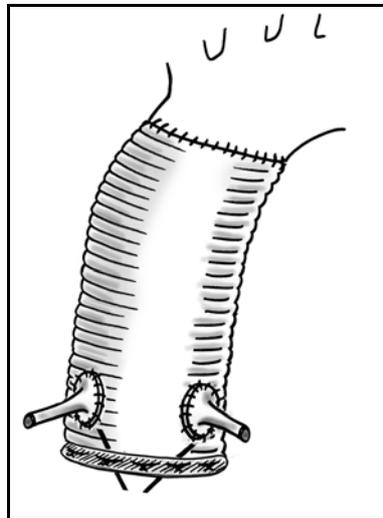


FIGURE 19 : INTERVENTION DE BENTALL REMPLAÇANT LA TOTALITE DE L'AOORTE ASCENDANTE
ET LA VALVE AORTIQUE (ICI : PROTHESE VALVULAIRE MECANIQUE)

Pour conclure sur ce chapitre chirurgical, reste le problème, une nouvelle fois des valves aortiques bicuspidés. Doit-on les considérer comme normales, anormales, l'expression d'une pathologie plus générale touchant principalement l'aorte ou l'inverse ? Aujourd'hui, nombre de ces questions reste sans réponse permettant aux uns de conserver cette valve dès que possible et aux autres de justifier une approche plus agressive. Seules des études de cohorte à long terme permettront de définir le devenir de ces gestes et ainsi d'établir leur légitimité.

5. LES SPECTROSCOPIES OPTIQUES

5.1. Introduction

Les spectroscopies optiques, infrarouge, Raman ou de fluorescence, s'appuient sur l'interaction de la lumière avec le nuage électronique des liaisons chimiques composant l'échantillon. L'interaction entre le rayonnement incident et les électrons modifie le niveau d'énergie de ces derniers. L'électron passe alors d'un état de base à un état excité modifiant alors le rayonnement incident.

5.2. La spectroscopie infrarouge

Dans le cas de la spectroscopie infrarouge, l'excitation du nuage électronique absorbe une partie du rayonnement polychromatique émis par la source. Cette absorption varie selon les différentes longueurs d'onde pour un échantillon donné et correspond à une transition entre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle. Obéissant à la loi de Beer-Lambert, cette absorption permet aussi bien d'obtenir des informations qualitatives que quantitatives sur l'échantillon étudié. Le concept des niveaux vibrationnels et des niveaux d'énergie concernant les différentes spectroscopies vibrationnelles est schématisé par le diagramme de Jablonski.

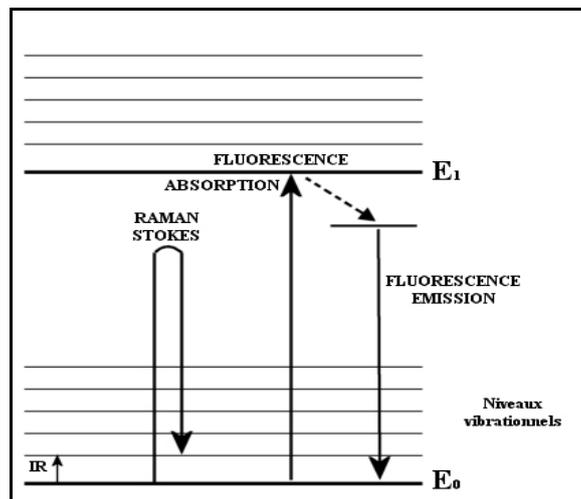


FIGURE 20 : DIAGRAMME DE JABLONSKI REPRESENTANT LES NIVEAUX D'EXCITATION ELECTRONIQUE POUR LES DIFFERENTES SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES

5.2.1. Aspects théoriques

5.2.1.1. Interaction onde-matière

La liaison atomique est formée par l'interaction stable des nuages électroniques des atomes. Lorsque le centre gravité électronique (électrons) est différent de celui des charges positives (noyau), un dipôle électrique se forme. En cas de liaison entre deux atomes, (interaction entre les deux nuages électroniques) ce dipôle est permanent et la liaison est dite polaire. Elle est dite polarisable lorsque les centres de gravité positifs et négatifs sont dissociables de façon transitoire, par exemple lors du déplacement des électrons sous l'effet d'un champ électromagnétique intense. Le moment dipolaire μ est donné par la l'équation suivante :

$$\mu = q d$$

où q est la charge absolue portée par chacun des deux atomes et d la distance entre les atomes.

Une onde électromagnétique est une variation périodique du champ électrique et du champ magnétique. Le spectre électromagnétique s'étend des ondes radio aux rayons γ (Figure 21). Le domaine infrarouge regroupe les longueurs d'onde comprises entre 0,8 μm à 1 mm et est arbitrairement divisé en 3 parties, le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm). L'énergie E d'un photon de fréquence ν est donnée par l'équation suivante

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

Où h est la constante de Planck ($h=6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), c la vitesse de la lumière ($3 \cdot 10^8$ m·s⁻¹) et λ la longueur d'onde en mètres.

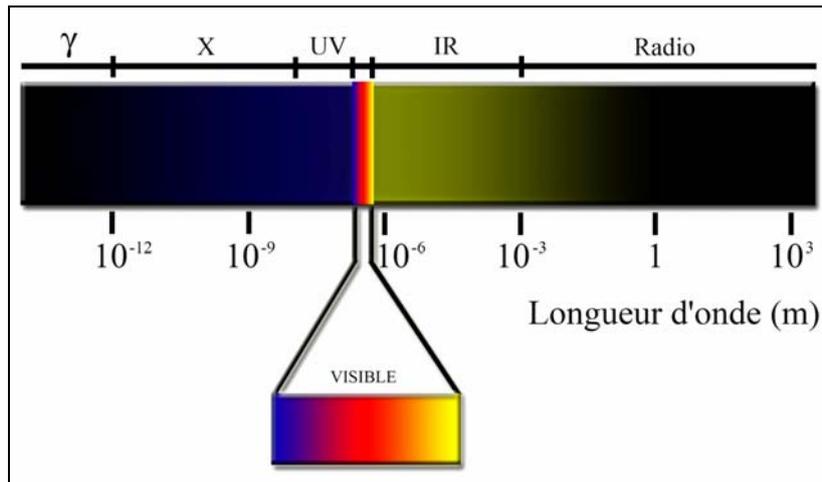


FIGURE 21 : LE SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE

L'énergie des liaisons atomiques ne peut prendre que certaines valeurs discontinues ou « discrètes ». De plus l'interaction d'une onde électromagnétique avec une liaison atomique n'est possible que si l'énergie E de l'onde électromagnétique correspond à la différence d'énergie ΔE nécessaire pour passer au niveau de d'énergie supérieur de la liaison atomique. – la liaison est polaire. – la fréquence de l'onde électromagnétique (composante électrique) est égale à la fréquence de variation du moment dipolaire.

5.2.1.2. Loi de Beer-Lambert

En traversant un milieu, une partie de l'énergie d'une radiation monochromatique peut être absorbée. La loi de Beer-Lambert permet de calculer l'intensité résultante I en fonction de l'intensité initiale I_0 , de la concentration c du milieu en substance absorbante, de la longueur l du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire ϵ dépendant de la substance traversée.

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon c l}$$

Cette relation permet de déduire la transmittance T :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

L'absorbance A étant alors simplement calculée par la formule suivante :

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l$$

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration permet d'utiliser les spectroscopies d'absorption comme méthode d'analyse quantitative, du moins dans les limites de linéarité de la loi de Beer-Lambert pour des absorbances comprises entre 0,3 et 2.

5.2.2. Principes de la spectroscopie infrarouge

Cette spectroscopie vibrationnelle est basée sur des phénomènes d'absorption. Les quanta d'énergie fournis par le rayonnement infrarouge peuvent provoquer la transition des électrons entre les niveaux de rotation et de vibration des liaisons atomiques (4-40 kJ mol⁻¹) sans atteindre les seuils nécessaires à la transition entre niveaux électroniques (400 kJ mol⁻¹).

Seuls les modes de vibration pour lesquels la variation du moment dipolaire de la molécule est en résonance avec la fréquence de la composante électrique de l'onde électromagnétique peuvent absorber les radiations infrarouges. Le coefficient d'extinction sera proportionnel à l'intensité de la variation du moment dipolaire.

Le spectre infrarouge est la représentation graphique de cette absorbance en fonction de la longueur d'onde λ exprimée sous forme de nombre d'onde $\bar{\nu}$: (où $\bar{\nu}$ en cm⁻¹ avec λ en m).

$$\bar{\nu} = \frac{1}{100 \times \lambda}$$

Le spectre en infrarouge moyen s'étend de 400 à 4000 cm⁻¹.

5.2.2.1. Modèle du vibreur harmonique

a. Pour les molécules simples

Dans le cas d'une molécule diatomique un seul type de vibration est possible. Si l'on fait l'approximation du modèle du vibreur harmonique, l'énergie des transitions entre niveaux de vibration peut prendre les valeurs E :

$$E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(v + \frac{1}{2} \right)$$

Où v est le nombre quantique de vibration, k la constante de force de la liaison et μ est la masse réduite.

Où v est le nombre quantique de vibration, k la constante de force de la liaison et μ est la masse réduite

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

avec m_1 et m_2 les masses des atomes 1 et 2 composant la liaison.

Les règles de sélection quantiques imposent $\Delta v = 0, \pm 1$; $\Delta v = 2$ étant une transition interdite.

Le nombre d'onde est alors :

$$\sigma = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

b. Pour les molécules polyatomiques

Dans le cas de molécules polyatomiques le nombre de liaisons augmente et leur géométrie devient plus complexe. Une molécule comportant n atomes possède $3n-6$ degrés de liberté pour les modes de vibration. En effet chaque atome possède 3 degrés de liberté de translation et 3 degrés de liberté de rotation. La molécule possède donc $3n$ degrés de liberté dont 6 peuvent être attribués à la translation et à la rotation de la molécule. Il reste donc $3n-6$ degrés

de liberté pour les modes de vibration des liaisons ($3n-5$ pour les molécules linéaires du fait d'un seul axe de rotation).

Ces modes de vibrations donnent naissance aux 3 principaux types de bandes d'absorption :

- les bandes de valence : caractéristiques d'un des modes de vibration fondamentale d'une liaison
 - les bandes harmoniques : leur fréquence est un multiple entier de la fréquence d'une vibration fondamentale
 - les bandes de combinaison : résultent de la combinaison (addition ou soustraction) des vibrations de plusieurs liaisons
- (- en marge, les bandes nées de la résonance de Fermi résultant de la combinaison d'un mode fondamental et d'un mode harmonique).

Par exemple pour une molécule à 3 atomes, on a 3 degrés de liberté de vibration :

- vibration de valence : élongation symétrique ν_s
- vibration de valence : élongation antisymétrique ν_{as}
- vibration de valence : déformation dans le plan δ

Pour une molécule à 4 atomes, il y a 6 degrés de liberté (Figure 22) :

- vibration de valence : élongation
- vibration de valence : déformation dans le plan δ
- Balancement. (rocking)
- Cisaillement (scissoring)
- Hochement (wagging)
- Torsion (twisting)

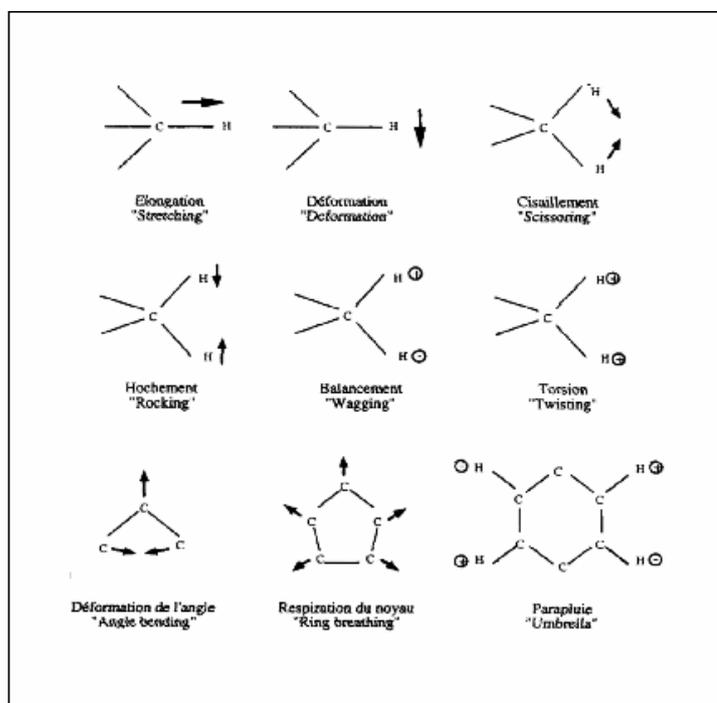


FIGURE 22 : QUELQUES MODES DE VIBRATION DE MOLECULES POLYATOMIQUES

Le spectre moyen infrarouge peut être divisé en 3 régions : de 4000 cm^{-1} à 1500 cm^{-1} on trouve les bandes d'absorption des vibrations d'élongation ν de liaisons principales (O-H, N-H, C-H, C=O, C=C), de 1500 à 1000 cm^{-1} les bandes de déformations δ (C-H) ainsi que quelques vibrations d'élongation (C-O, P=O) alors que les nombres d'onde inférieurs représentent essentiellement des vibrations complexes comme la « respiration » des structures cycliques, des systèmes éthyléniques ou aromatiques.

TABLEAU II : LONGUEUR D'ONDE DES GROUPES CARACTERISTIQUES

Nombre d'ondes (cm^{-1})	Intensité	Liaison	Type de composé
3600	Fine	O-H en phase vapeur	Alcools, phénols
3400-3200	Forte, large	O-H lié	Alcools, phénols
3550-3000	Moyenne	N-H	Amines I et II
3200-2900	Forte, large	O-H lié	Acides carboxyliques
3300	Forte, fine	C-H de C \equiv H	Alcynes
3100-3000	Moyenne, fine	C-H de C=C-H	Alcènes, arènes
2800-2700	Moyenne, fine	C-H de COH	Aldéhydes
3000-2850	2 bandes	C-H	Alcyles CH ₃ , CH ₂ , CH
1720-1700	Très forte	C=O	Acides carboxyliques
1745-1725	Très forte	C=O	Esters
1735-1715	Très forte	C=O	Aldéhydes
1720-1710	Très forte	C=O	Cétones
1670-1615	Variable	C=C	Alcènes
1600-1450	Variable	C=C	Arènes

5.2.2.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge a longtemps été limitée par la lenteur d'acquisition des spectres, les mesures étant réalisées successivement pour chaque longueur d'onde par un monochromateur dispersif (prisme ou réseau). Le multiplexage de ces acquisitions rendu possible grâce à l'interférométrie permet de mesurer toutes les longueurs d'onde

simultanément accélérant alors considérablement le temps d'acquisition nécessaire à l'établissement de l'interférogramme.

Cette avancée a été rendue possible par l'application de la transformée de Fourier rapide permettant la résolution en temps réel de l'interférogramme, par le perfectionnement des lasers améliorant la précision de la mesure et par le couplage à des micro-ordinateurs rapides et performants. L'interférométrie, basée sur la génération d'interférences constructives et destructives, via un interféromètre, dans le rayonnement polychromatique permet de calculer précisément l'intensité de chacune des longueurs d'onde du rayonnement total par l'application de la transformée de Fourier.

a. l'interféromètre de Michelson

L'interféromètre est un instrument formé d'une lame séparatrice semi-transparente O qui divise le faisceau issu de la source en deux faisceaux, l'un réfléchi vers un miroir fixe F, l'autre transmis vers un miroir mobile M (Figure 23). Le miroir mobile, perpendiculaire au miroir fixe, se déplace à une vitesse constante le long de son axe. Le mouvement du miroir mobile introduit une différence de trajet optique entre les 2 faisceaux. Cette différence de trajet, dite différence de marche optique, provoque un déphasage entre les 2 faisceaux. Les interférences sont créées lorsque les faisceaux réfléchis par les miroirs se recombinent au niveau de la lame séparatrice. En raison de ces interférences, l'intensité du faisceau renvoyé par la séparatrice au détecteur est fonction de la différence de marche entre les deux miroirs de l'interféromètre. L'information recueillie forme l'interférogramme qui représente l'intensité globale du faisceau en fonction de la différence de marche optique. Le spectre est calculé à partir de l'interférogramme grâce à l'algorithme de transformation de Fourier.

Soit δ la différence de marche optique entre les 2 faisceaux :

$$\delta = 2(OM-OF)$$

Pour $\delta = k\lambda$ avec $k = 0, 1, 2 \dots$ les 2 faisceaux sont en phase : des interférences constructives se produisent pour la longueur d'onde λ dont l'intensité double.

Pour $\delta = (2k+1)\lambda/2$ avec $k = 0, 1, 2 \dots$ les 2 faisceaux sont en opposition de phase pour la longueur d'onde λ , dont l'intensité résultante est nulle.

Pour chaque autre position du miroir mobile des interférences constructives ou destructives sont générées.

Le détecteur reçoit alors un signal composé par la somme de toutes les interférences à toutes les longueurs d'onde du faisceau pour une position donnée du miroir mobile.

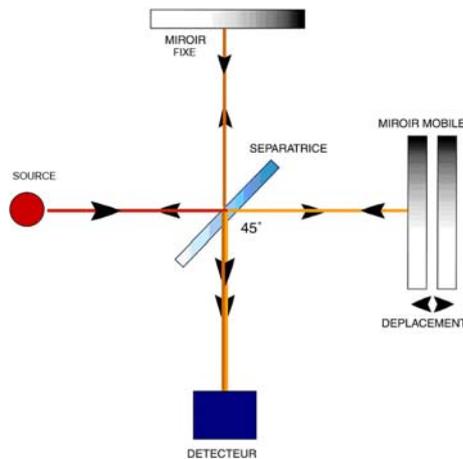


FIGURE 23 : SCHEMA DE L'INTERFEROMETRE DE MICHELSON

b. la transformée de Fourier

Pour une source monochromatique l'intensité du faisceau arrivant au détecteur $I'(\delta)$ est donnée par :

$$I'(\delta) = 0.5 I(\sigma) \cdot (1 + \cos 2\pi\sigma\delta)$$

où $I(\sigma)$ est l'intensité de la source. Le signal $I'(\delta)$ sera donc vu comme une sinusoïde et pour chaque position du miroir M telle que $\delta = \lambda, 2\lambda \dots$, sera égal à l'intensité de la source. Le signal se compose donc d'une partie constante $0,5I(\sigma)$ et d'une partie modulée. Cette dernière correspond à l'interférogramme d'une source monochromatique obtenue avec un interféromètre idéal (lame séparatrice non absorbante).

$$I(\delta) = 0.5 I(\sigma) \cdot \cos 2\pi\sigma\delta$$

Pourtant la lame séparatrice idéale n'existe pas et les réponses non linéaires sur tous les nombres d'onde des détecteurs, amplificateurs et convertisseurs analogique-digital nécessitent d'introduire un terme correctif dépendant de la fréquence. L'équation devient alors :

$$I(\delta) = B(\sigma) \cdot \cos 2\pi\sigma\delta$$

où $B(\sigma)$ donne l'intensité de la source selon les caractéristiques instrumentales.

Le spectre est alors calculé à partir de l'interférogramme par l'opération de transformée de Fourier qui établit une relation entre l'interférogramme $I(\delta)$, le déplacement du miroir et l'intensité $I(\sigma)$, fonction de la fréquence de la lumière.

Pour une source polychromatique, le signal est la somme des interférogrammes de toutes les radiations émises par la source. L'interférogramme résultant est donné par la relation :

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\sigma) \cdot \cos 2\pi\sigma\delta \cdot d\sigma$$

Le spectre correspondant est donné par la transformation de Fourier de l'interférogramme :

$$B(\sigma) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cdot \cos 2\pi\sigma\delta \cdot d\delta$$

L'interférogramme n'étant mesuré que pour des nombres d'ondes positifs, la relation précédente devient :

$$B(\sigma) = 2 \int_0^{+\infty} I(\delta) \cdot \cos 2\pi\sigma\delta \cdot d\delta$$

Cette relation montre que l'obtention du spectre requiert la mesure de l'interférogramme pour des valeurs de δ comprises entre 0 et $+\infty$, ce qui nécessiterait un déplacement infini du miroir mobile. Or, le déplacement du miroir est nécessairement limité ce qui revient mathématiquement à multiplier l'interférogramme par une fonction de troncation. Ceci induit

alors une résolution maximale finie (et non infinie), un élargissement des pics principaux et l'apparition de lobes secondaires nécessitant des étapes supplémentaires de traitement.

c. traitements nécessaires avant l'application de la transformée de Fourier

- l'apodisation

La convolution de l'interférogramme par une fonction d'apodisation permet de réduire la taille des pics secondaires aux dépens d'un certain élargissement des pics principaux. En effet, du fait du déplacement limité du miroir mobile de l'interféromètre de Michelson, les pics s'élargissent et présentent des pics secondaires de part et d'autre comme illustré sur la figure 24 :

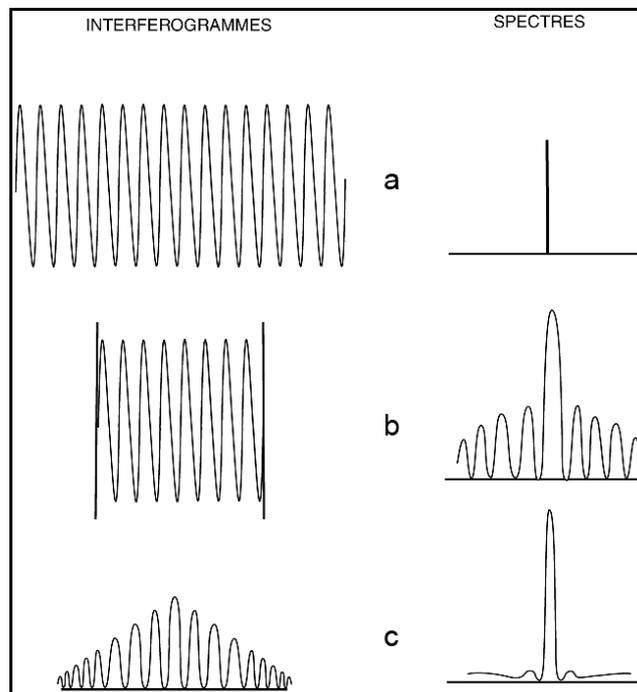


FIGURE 24 : VISUALISATION DES INTERFEROGRAMMES ET DES SPECTRES CORRESPONDANTS EN CAS DE DEPLACEMENT INFINI DU MIROIR MOBILE (A), DE DEPLACEMENT LIMITE (B) ET APRES APPLICATION DE LA FONCTION D'APODISATION

Lors du choix de la méthode d'apodisation, on réalise un compromis entre l'atténuation des lobes secondaires et l'élargissement des pics principaux. Il existe plusieurs fonctions d'apodisation : rectangulaires, triangulaires, trapézoïdales ou des fonctions plus perfectionnées : Bessel, Gaussienne, Lorenzienne, Norton-Beer, Blackman-Harris (Figure 25).

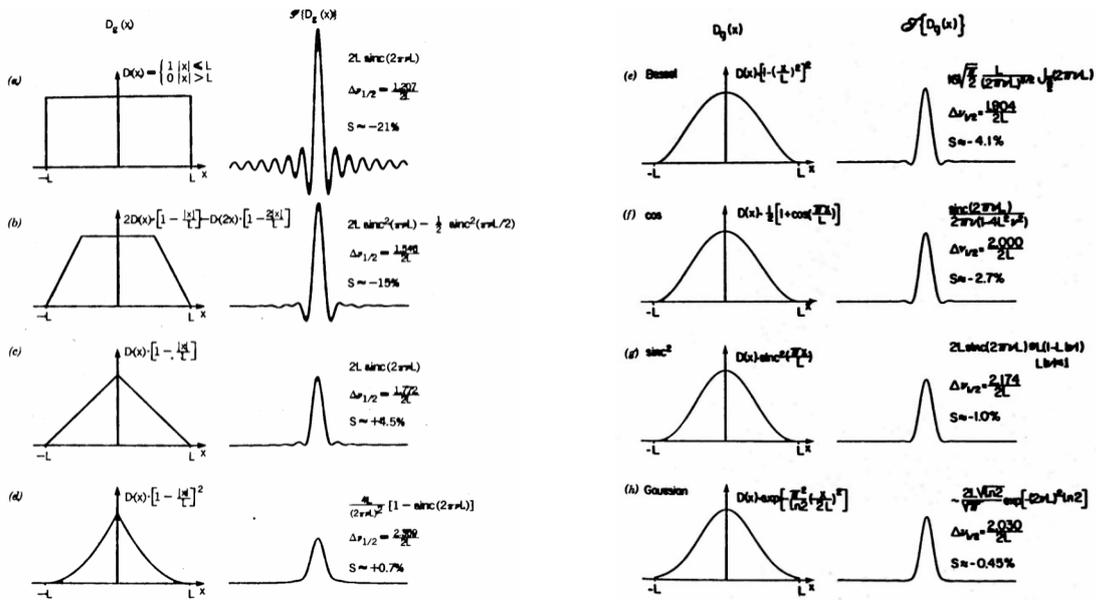


FIGURE 25 : EXEMPLE DE QUELQUES FONCTIONS D'APODISATION ET LEUR EFFET SUR LA RESOLUTION DES BANDES D'ABSORPTION.

Fonction (a) rectangulaire, (b) trapézoïdale, (c) triangulaire, (d) triangulaire carrée, (e) Bessel, (f) cosinus (g) sinc² (h) Gaussienne

- la correction de phase

Des corrections supplémentaires doivent être apportées pour tenir compte des déphasages introduits par l'appareillage. Ils sont liés au déplacement rapide du miroir mobile entraînant une imprécision dans la mesure de la position $\delta=0$, se traduisant par une asymétrie de l'interférogramme ne permettant pas l'application de la transformation de Fourier et aux filtres électroniques utilisés pour diminuer le bruit de haute fréquence. Ces décalages induisent la déformation de l'interférogramme entraînant une imprécision des fréquences et une déformation des pics.

La convolution de l'interférogramme par les fonctions de correction 'Mertz' ou 'Power spectrum' est d'usage courant pour corriger la phase du signal (Bruker manual). Cette modélisation du décalage sous-tend que le spectre est composé d'une part réelle, mesurée additionnée à une part interprétée.

- le zero filling

L'opération de "zero filling" consiste en l'opération inverse de la troncation de l'interférogramme. L'ajout de points artificiels de valeur nulle aux deux extrémités de l'interférogramme produit un allongement artificiel de ses branches et simule un accroissement de la différence de marche optique δ . Cela se traduit après transformation de Fourier par interpolation de points supplémentaires entre les points d'absorbance réelle. Cette procédure résulte en une augmentation artificielle de la résolution spectrale. Le facteur de "zero filling" indique le degré de démultiplication de l'interférogramme (un facteur de 2 signifie que le nombre de points de l'interférogramme est doublé).

d. Génération du spectre

La lecture d'un interférogramme est une mission difficile, même pour un spectroscopiste chevronné. Pour cette raison la présentation des résultats se fait sous forme de spectres, représentation graphique des valeurs d'absorbance ou de transmittance en fonction des fréquences ou nombres d'onde.

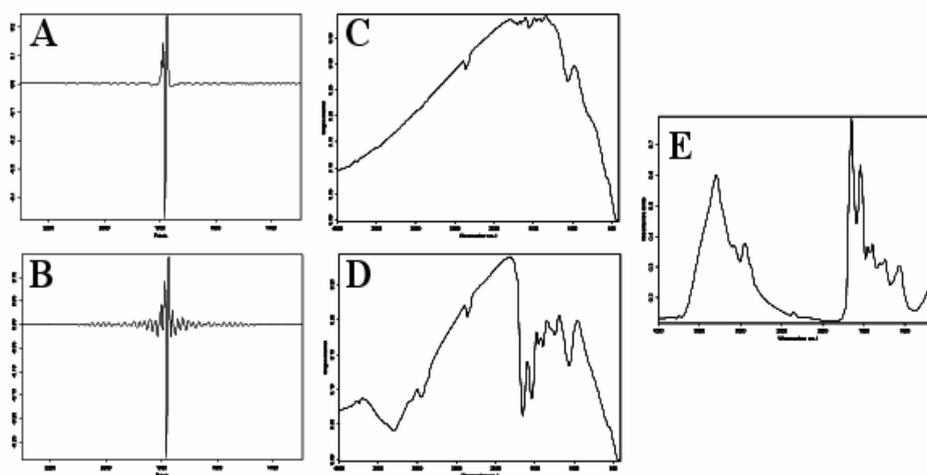


FIGURE 26 : GENERATION DU SPECTRE IRTF

Interférogramme de référence (A) et interférogramme échantillon (B) ; spectre simple faisceau de référence (C) et spectre simple faisceau échantillon (D). Spectre résultant exprimé en absorbance (E) .

Le processus de génération du spectre comporte 4 étapes : l'enregistrement d'un interférogramme de référence sur le support sans l'échantillon, l'enregistrement de l'interférogramme simple-faisceau de l'échantillon (Figure 26) puis l'application de la transformation de Fourier inverse et des opérations post-Fourier sur les interférogrammes. Enfin le spectre est calculé à partir de l'ensemble des spectres simple faisceau.

e. Avantages de la spectroscopie à transformation de Fourier

Les instruments IRTF possèdent plusieurs avantages comparés aux spectromètres dispersifs.

- Avantage de Fellgett

Cet avantage, également appelé l'avantage du multiplexe tient au fait que tous les éléments du spectre sont acquis simultanément alors que, dans un système dispersif, les fréquences sont mesurées de façon séquentielle. Le gain de temps ainsi obtenu permet d'augmenter le nombre d'accumulation et donc d'améliorer la qualité du signal en augmentant le rapport signal sur bruit. En effet, le rapport *Signal sur Bruit* est multiplié par \sqrt{n} pour n accumulations utilisées pour générer le spectre. D'autre part, le temps de mesure est diminué par n à rapport *Signal sur Bruit* et résolution constants ou encore une amélioration de la résolution peut-être obtenue à rapport S/B et durée de mesure donnés.

- Avantage de Jacquinot

Aussi nommé l'avantage du trou circulaire : pour filtrer les longueurs d'onde qui doivent parvenir au détecteur et déterminer la résolution spectrale, le spectromètre IRTF utilise non pas une fente comme sur les systèmes dispersifs mais un trou circulaire de plus fort diamètre laissant passer plus d'énergie et améliorant le rapport *Signal sur Bruit*.

- Avantage de Connes

L'utilisation d'un laser He-Ne pour mesurer la position du miroir mobile permet l'exacte calibration des fréquences du spectromètre. La précision atteinte est de l'ordre de $0,0002 \text{ cm}^{-1}$ pour une résolution de 2 cm^{-1} .

- Avantage de la vitesse du miroir mobile

La résolution spectrale dépend du déplacement maximum du miroir et est donc indépendante de la vitesse de déplacement du miroir et de la fréquence. Plus la vitesse de déplacement du miroir est élevée, plus le nombre d'interférogrammes accumulés est élevé et meilleur est le rapport *Signal sur Bruit*, sans perte de résolution spectrale.

- Avantage de la lumière parasite

Puisque le spectromètre mesure toutes les fréquences en même temps, la proportion de lumière parasite par rapport à l'énergie du signal est bien moindre que pour un système dispersif. Cela contribue à améliorer encore le rapport *Signal sur Bruit*.

5.2.3. Méthodes de mesure et appareillages

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la caractérisation d'échantillons de types différents par spectroscopie infrarouge avec l'emploi d'accessoires spécifiques.

5.2.3.1. Principe du spectromètre IRTF

Le spectromètre IRTF se compose généralement d'une source infrarouge, d'un interféromètre, d'un compartiment échantillon, d'un détecteur, d'un convertisseur analogique-digital et d'un ordinateur (Figure 27).

La source employée pour le domaine moyen-infrarouge est généralement un Global constitué d'un filament de carbure de silicium chauffé de 1200 à 1500°C.

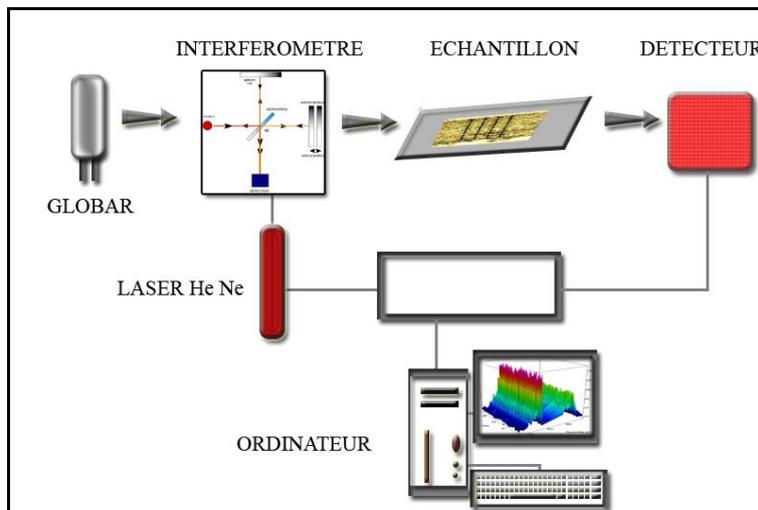


FIGURE 27 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UN SPECTROMETRE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER

5.2.3.2. Mode de mesure et supports utilisés

L'acquisition des spectres en transmission/absorption consiste à quantifier l'énergie transmise au travers de l'échantillon puis par simple soustraction de l'énergie incidente, à en déduire la partie absorbée par l'échantillon pour chaque nombre d'onde. On peut alors construire le spectre qui correspond à l'énergie absorbée en fonction du nombre d'onde.

Pour cette analyse, différents matériaux transparents aux radiations infrarouges peuvent être utilisés comme support. Le sélénure de zinc (ZnSe), le fluorure de calcium (CaF₂) et le Fluorure de Baryum (BaF₂) ou encore le KBr (cristal transparent) sont habituellement utilisés. Ces supports sont relativement bien adaptés à l'étude de matériels biologiques.

L'ensemble des mesures de ce travail ont été faites sur des fenêtres de ZnSe dont les caractéristiques physiques et optiques permettent l'acquisition de spectres dans les zones d'intérêt concernant le tissu aortique (750-4000 cm⁻¹).

5.2.3.3. Principe de la microspectroscopie IRTF

Cette technique nécessite le couplage d'un microscope infrarouge et d'un spectromètre IRTF et permet l'étude de micro-échantillons de taille parfois inférieure à 10 μm . Les avantages de l'interférométrie et l'usage de détecteurs MCT ultrasensibles refroidit à l'azote liquide permettent l'application de cette technique à des échantillons biologiques.

Dans ce cas le microscope conduit simplement le rayon infrarouge de l'interféromètre à l'échantillon de manière colinéaire au chemin optique visible. L'échantillon mesuré correspond alors à l'échantillon observé. Le specimen à analyser est amené au centre du champ de vision du microscope et la zone à étudier est circonscrite par une ouverture placée dans le plan image de l'échantillon. Le diamètre de cette ouverture peut être sélectionné de façon à restreindre le faisceau aux contours exacts de l'objet étudié. La résolution spatiale peut être définie comme la capacité à mesurer le spectre d'un objet sans contamination par des radiations provenant d'objets placés hors du champ délimité par l'ouverture.

La spectroscopie infrarouge a déjà prouvé son efficacité dans l'analyse de la composition d'échantillons biologiques. La gamme 400-4000 cm^{-1} , correspondant au moyen-infrarouge, est principalement utilisée car de nombreux constituants biologiques y présentent de fortes bandes d'absorption. C'est principalement le cas des acides nucléiques, des protéines et acides aminés, des oses et des lipides. Le grand nombre de modes de vibration possible pour ces macromolécules et l'étroitesse de la zone spectrale intéressée expliquent les difficultés d'analyse. La superposition des informations spectrales liées à ces molécules biologiques demande alors des méthodes d'investigation spécifiques, à même de réindividualiser les différentes bandes spectrales. Le spectre infrarouge forme une véritable « empreinte moléculaire » caractéristique de l'échantillon biologique étudié. Pourtant une grande partie de ces informations sont redondantes et seule une faible partie est spécifique. Le challenge est donc d'extraire de l'ensemble des données celles qui seront réellement discriminantes.

Le caractère non destructif de la spectrométrie infrarouge et sa relative simplicité d'utilisation en font un outil intéressant pour l'étude des systèmes biologiques.

5.2.4. Attributions spectrales en spectroscopie infrarouge

L'étude des macromolécules biologiques initiée par Blout et Fields en 1949 pour les acides nucléiques, par Elliott et Ambrose en 1950 pour les protéines a montré que de nombreuses informations pouvaient être apportées par cette méthode. La spectroscopie infrarouge s'est révélée particulièrement sensible aux conformations de ces molécules complexes et est considérée comme l'une des méthodes les plus adaptées à l'étude des biopolymères. L'un des avantages majeurs de la technique est de pouvoir étudier les changements de conformation des molécules biologiques en interaction avec leur environnement.

5.2.4.1. Les Protéines

Ces macromolécules ont fait l'objet de toute l'attention des spectroscopistes depuis de nombreuses années. Une grande partie de la pathologie humaine y est d'ailleurs associée. La liaison peptidique possède de nombreux modes de vibration et donne 9 bandes (notées amide I à amide VII et amide A et B). Les bandes amide I, II et III sont particulièrement actives en infrarouge et ont été particulièrement étudiées. (Tableau III)

TABLEAU III : VIBRATIONS IRTF DES LIAISONS PEPTIDIQUES

Vibrations des liaisons peptidiques	
Fréquences (cm ⁻¹)	Attributions
3250-3300	Amide A (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)
3090-3100	Amide B (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)
1600-1700	Amide I ν (C=O) couplé avec ν (C-N) et δ (N-H)
1550-1580	Amide II δ (N-H) couple avec ν (C-N)
1230-1330	Amide III δ (N-H) et ν (C-N)
625-767	Amide IV δ (O=C-N) et autres modes
640-800	Amide V δ (O=C-N-H) et autres modes
537-606	Amide VI δ (N-H) hors du plan
200	Amide VII (torsion du squelette)

v vibration d'élongation, δ vibration de déformation

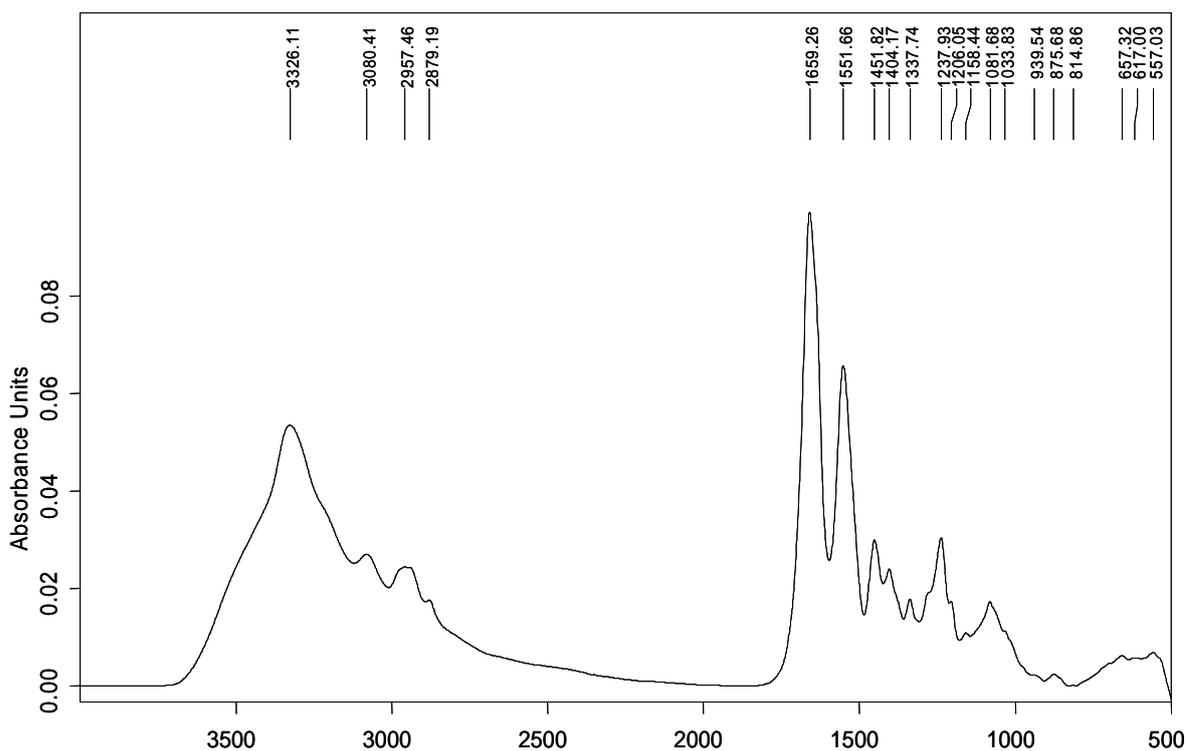


FIGURE 28 : SPECTRE IRTF DU COLLAGENE (TENDON DE RAT)

L'analyse fine de la position et de la structure de ces bandes donne des informations sur la structure primaire et secondaire de la protéine étudiée. Ainsi les différentes conformations secondaires de type hélice α , feuillet β , coude β ou pelote statistique peuvent être estimées (Tableau IV)

**TABLEAU IV : DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEINES
A L'ETAT SOLIDE EN IRTF**

Structure secondaire	Fréquence (cm ⁻¹)		
	Amide I	Amide II	Amide III
Hélice α	1650-1652	1516-1540	1260-1315
Feuillet β			1230-1242
Chaînes antiparallèles	1630-1645	1530-1550	
Chaînes parallèles	1632-1685	1530	
Pelote statistique	1656	1535	1245-1255

Outre cet aspect d'analyse structurale, la spectrométrie infrarouge peut aussi renseigner sur certains acides aminés (AA) impliqués dans la structure primaire d'une protéine (tableau V).

Bien qu'il soit difficile d'effectuer ce type d'analyse sur une cellule ou un tissu où le recouvrement des bandes spectrales ne permet pas de discriminer les différents acides aminés. A l'inverse la spectroscopie Raman permet, plus facilement, ce type d'analyse et devient donc complémentaire de la spectroscopie infrarouge. Le tableau ci-dessous illustre quelques uns des pics d'absorption infrarouge attribués à certains acides aminés :

TABLEAU V : VIBRATIONS DES CHAINES LATERALES DES PEPTIDES ET AA EN INFRAROUGE

Vibrations des chaînes latérales des peptides et AA	
Fréquence (cm⁻¹)	Attribution
3486-3491	Tryptophane ν (N-H du noyau indole)
2400-2700	Cystéine ν (S-H)
1716	ν_{as} (C=O) de COO ⁻ de l'aspartate
1712	ν_{as} (C=O) de COO ⁻ du glutamate
1622	δ (CH ₂) de l'asparagine
1596	Histidine (mouvement du cycle)
1516	tyrosine (mouvement du cycle)

5.2.4.2. Les acides nucléiques

L'ADN et l'ARN sont à la base de la synthèse des protéines et sont donc très impliqués dans la pathologie humaine. Il n'est donc pas étonnant qu'ils aient suscité un nombre important de travaux en spectroscopie. Leurs groupes phosphates et les riboses qui les composent sont à l'origine de vibrations parmi les plus actives en infrarouge. La spectroscopie infrarouge est à même d'évaluer les changements de conformation que peuvent présenter les acides nucléiques, la nature et la force des liaisons impliquées dans l'interaction avec un ligand. Des bandes caractéristiques des conformations A, B et Z de l'ADN ont par ailleurs été décrites.

**TABLEAU VI : QUELQUES PICS D'ABSORPTION INFRAROUGE ATTRIBUES A L'ADN
SELON SA CONFORMATION**

Fréquence (cm ⁻¹)			Attributions
ADN A	ADN B	ADN Z	
1710	1717	1692	v (C=O) carbonyle
1240	1220	1265	v _{as} (P=O)
1090	1085	1090	v (P=O)
810-820	820-825		O=P=O diester
665 - 675	680 – 690	600 - 625	Guanine, respiration du noyau

5.2.4.3. Les polysaccharides

L'étude des sucres en spectrométrie infrarouge a également débuté dans les années 50 mais il a fallu attendre les années 90 pour que l'étude des polysaccharides complexes soit réellement envisagée [67]. La spectroscopie infrarouge permet une analyse qualitative et quantitative des sucres renseignant sur la nature des sucres impliqués et leur état (solution, cristallisation etc). L'industrie alimentaire est la première activité concernée par ce type d'analyse et a largement participé à l'amélioration des techniques spectroscopiques.

TABLEAU VII : QUELQUES PICS D'ABSORPTION DES POLYSACCHARIDES COMPLEXES EN INFRAROUGE

Fréquence (cm ⁻¹)	Vibration	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
1700-1730	v (C=O) de COOH	1050-1070	
1600-1650	Amide I v (C=O) + v (C-N)	1030	
1540-1560	Amide II δ (N-H) + v (C-N)	1016-1024	α-glucose
1420	v _s (COO ⁻)	966	C-C désoxyribose
1160-1170	v (C-O-C), v (C-C) β-glucose	930	Vibration du cycle
1120-1150	v (C-O-C), v (C-C) α-glucose	830	δ (C-H)
1105		805-812	α et β-mannanes
1080	v (C-O-C) β-glucose		

5.2.4.4. Les lipides

L'étude de l'organisation des membranes biologiques est pour beaucoup dans les connaissances sur les lipides en spectroscopie infrarouge.

L'attribution des bandes spectrales des systèmes cellulaires a été réalisée grâce à ces études des lipides isolés. Les tableaux présentés ici rassemblent les attributions des bandes obtenues à partir des macromolécules isolées. En raison de leurs larges pics entraînant des chevauchements importants l'attribution des bandes, dans un tissu par exemple, reste complexe.

TABLEAU VIII : PRINCIPAUX PICS IRTF D'ABSORPTION DES PHOSPHOLIPIDES

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
2950-2960	ν_{as} (C-H) de CH ₃	1470-480	δ (C-H) de CH ₂
2920-2930	ν_{as} (C-H) de CH ₂	1460	δ (C-H) de CH ₃
2865-2880	ν (C-H) de CH ₃	1230	ν_{as} (P=O) de PO ₂
2840-2860	ν (C-H) de CH ₂	1170-1200	ν (C-O-C) des esters
1730-1760	ν (C=O) des esters	1080	ν (P=O) de PO ₂

TABLEAU IX : DIFFERENTES REGIONS DU SPECTRE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES

Fréquence (cm ⁻¹)	Région	Fréquence (cm ⁻¹)	Région
2800-3000	Lipides	1350-1500	Région mixte
1700-1800	Esters des lipides	1250-1350	Amide III
1500-1700	Protéines (amide I, II)	1200-1250	Acides nucléiques
1500-900	Empreinte digitale	900-1200	Sucres

L'attribution des bandes a été définie grâce aux données obtenues à partir de macromolécules isolées.

TABEAU X : ATTRIBUTION DES BANDES DES ECHANTILLONS CELLULAIRES ET TISSULAIRES

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution	Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
3250-3800	v (O-H)	1380-1430	v (C-H) de CH des protéines
2950-2960	vas (C-H) de CH ₃	1400	vas (C=O) de COO ⁻
2920-2930	vas (C-H) de CH ₂	1230-1330	Amide III
2865-2880	v (C-H) de CH ₃	1240	vas (P=O) de PO ₂
2840-2860	v (C-H) de CH ₂	1150-1170	v (C-O-C) des esters
1700-1750	v (C=O) esters des lipides	1120	v (C-O) des riboses
1625-1695	Amide I	1080-1085	v (C-O-C), v (P=O)
1525-1560	Amide II	1050-1070	v (C-O) glycogène
1515	Tyrosine (en dérivée 2nde)	1024	v (C-O) glycogène
1460-1470	δ (C-H) de CH ₃ épaulement	968	v (C-C/C-O) des phosphates
1440-1460	δ (C-H) de CH ₂		

5.2.5. Applications médicales de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie IRTF permet d'acquérir des spectres pouvant détecter les subtiles changements au sein d'un système biologique à l'échelle d'une cellule ou d'un tissu. Différents domaines sont intéressés par cette technique. La biochimie clinique IRTF permet par exemple l'analyse des certains constituants de liquides biologiques (sang, serum, urine etc). La cytologie pathologique, en particulier liée aux néoplasies, est aussi l'objet d'investigations poussées en spectroscopie infrarouge. Le nombre important de publications relatif à ces applications prouve l'intérêt de cette approche dans le diagnostic cellulaire et tissulaire [68], [69], [70]. Pourtant la faible variabilité spectrale en fonction des différents tissus ou cellules impose des analyses sophistiquées afin d'identifier des variations parfois minimales (figure 29). Cette faible variabilité est finalement logique puisque toutes les cellules sont composées d'un noyau, de membranes et d'organites intracellulaires dont la composition varie peu ou pas ; seules les structures spécifiques ou des lésions permettent alors de discriminer ces cellules.

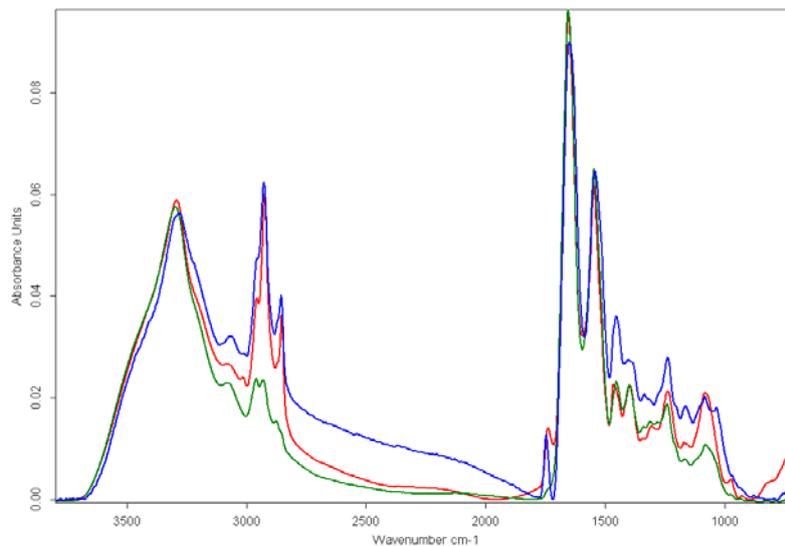


FIGURE 29: SPECTRES INFRAROUGES NORMALISES DE TISSU THYROÏDIEN, AORTIQUE ET CEREBRAL

Devant la difficulté de séparer et d'attribuer les bandes d'absorption du spectre, différentes techniques d'analyse et de traitement des données ont été mises au point et seront détaillées ultérieurement.

Pourtant on considère certaines régions du spectre comme assez spécifiques de certains composés chimiques. Entre 1000 et 1800 cm^{-1} , le spectre IRTF des échantillons biologiques est dominé par les bandes Amide I et II des protéines ayant leur pic respectif à 1650 et 1550 cm^{-1} , par la bande d'élongation antisymétrique des phosphates à 1240 cm^{-1} et par un massif peu résolu dit région des sucres entre 900 et 1200 cm^{-1} . Malgré cette relative segmentation, cette même région contient aussi des pics du collagène et de l'élastine. Pour sa part, la région des lipides s'étend de 2800 à 3000 cm^{-1} et est dominée par les vibrations d'élongation des liaisons C-H. Enfin, la région comprise entre 1500 et 900 cm^{-1} est nommée l'empreinte digitale de l'échantillon car cette région contient un grand nombre d'information provenant de nombreux composés organiques.

A ce jour la spectrométrie infrarouge est essentiellement appliquée aux systèmes biologiques relevant de l'étude des cellules néoplasiques, de leurs comportements en fonction de l'environnement ou encore de l'action de certaines chimiothérapies [71].

Depuis quelques années, certains auteurs ont rapporté l'emploi de telles méthodes d'analyse dans des pathologies sortant complètement du cadre des néoplasies. Les travaux conduits au sein de notre unité de recherche sur les bactéries [72], les champignons [73], l'étude de la peau [74] ou du tissu aortique [75] en sont d'ailleurs quelques exemples parmi beaucoup d'autres.

6. LA SPECTROSCOPIE RAMAN

6.1. Introduction

La seconde spectroscopie vibrationnelle que nous avons utilisée lors de ce travail repose sur la découverte de l'effet Raman en 1928, simultanément par Raman et Krishnan alors qu'ils étudiaient la diffusion de la lumière par les liquides. Le premier recevra le Prix Nobel en 1930 pour ces travaux. Malgré une expansion rapide de la spectroscopie Raman, l'utilisation intensive de la spectroscopie infrarouge dans l'industrie éclipsa cette méthode d'analyse, pourtant complémentaire, dès les années 50. La mise au point de lasers monochromatiques dans les années 60 donna les sources lumineuses indispensables à l'expansion de la spectroscopie Raman [76].

L'effet Raman repose sur l'existence d'un spectre décalé en fréquence dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique. Ce spectre, de faible intensité, est littéralement « noyé » dans la lumière diffusée de longueur d'onde identique à l'onde incidente. Pourtant, ce spectre est spécifique de l'échantillon étudié et renseigne sur la composition atomique de ce dernier. Les concentrations des constituants de l'échantillon influencent aussi ce spectre, permettant alors des analyses qualitatives et quantitatives en spectroscopie Raman, même si les calibrations nécessaires rendent la procédure complexe.

L'un des avantages de cette spectroscopie par rapport à l'étude infrarouge est la faible diffusion Raman de l'eau qui permet l'étude des molécules en solution.

6.2. Principes

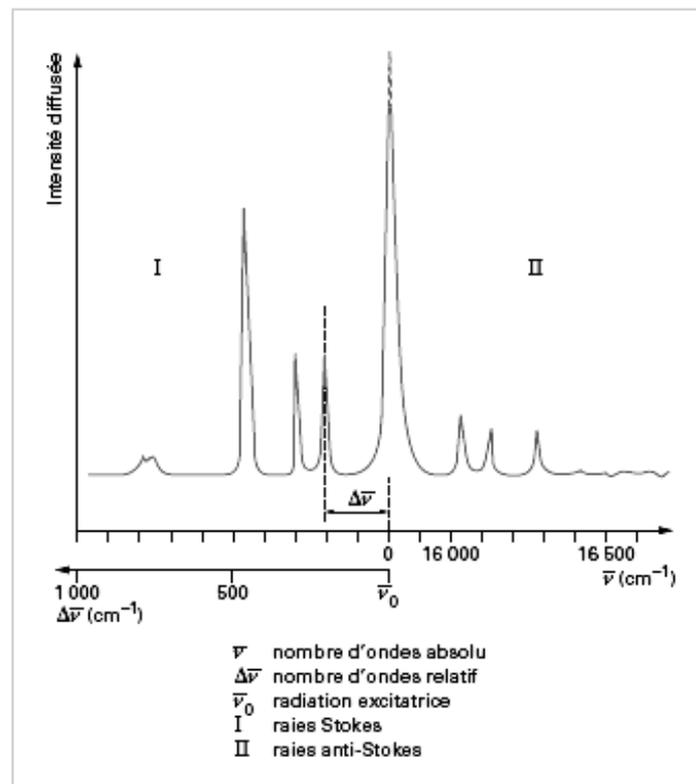
Comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman repose sur l'observation des états vibrationnels des molécules constituant l'échantillon. Dans le cas de l'étude Raman, la recherche repose sur la diffusion inélastique de la lumière qui survient avec une fréquence estimée à 1 photon sur 100 millions lors de l'interaction entre une molécule et la radiation lumineuse. Ce phénomène nécessite que la molécule puisse produire une polarisabilité.

6.2.1. Bases de la spectroscopie Raman

Lorsque l'on illumine une substance gazeuse, liquide ou solide par une source monochromatique intense (ou excitatrice), l'analyse spectrométrique de la lumière diffusée renseigne sur la composition de cette substance.

Plusieurs raies correspondant aux diffusions élastiques et inélastiques sont alors visualisables :

- une raie intense de même fréquence σ_0 que la radiation incidente ou raie de Rayleigh (même énergie). Seule la direction de cette radiation lumineuse correspondant à la diffusion Rayleigh est modifiée
- des raies de fréquence σ_i , d'intensité beaucoup plus faible et disposées symétriquement autour du pic principal. On y distingue les raies Anti-Stokes, dont les fréquences sont inférieures à σ_0 et les raies Stokes dont les fréquences et intensités sont plus intenses.



En effet, si l'on considère un photon d'énergie $h\nu_0$ rencontrant une molécule ayant deux niveaux d'énergie E_0 et E_1 , et que l'énergie du photon est suffisante pour atteindre l'état excité virtuel E_1 ($\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu_c$). Trois possibilités se présentent alors :

- le photon est diffusé avec la même énergie et donc la même fréquence, c'est un choc élastique donnant le pic de Rayleigh.
- soit il cède de l'énergie aux molécules pour les porter au niveau énergétique supérieure E_1 et il est diffusé avec la fréquence $\nu_0 - \nu_c$ et produit les raies Stokes.
- soit il prélève de l'énergie aux molécules pour les porter à un niveau vibrationnel plus faible, ici de E_1 à E_0 , et est diffusé avec une fréquence correspondant à $\nu_0 + \nu_c$ et produit les raies Anti-Stokes.

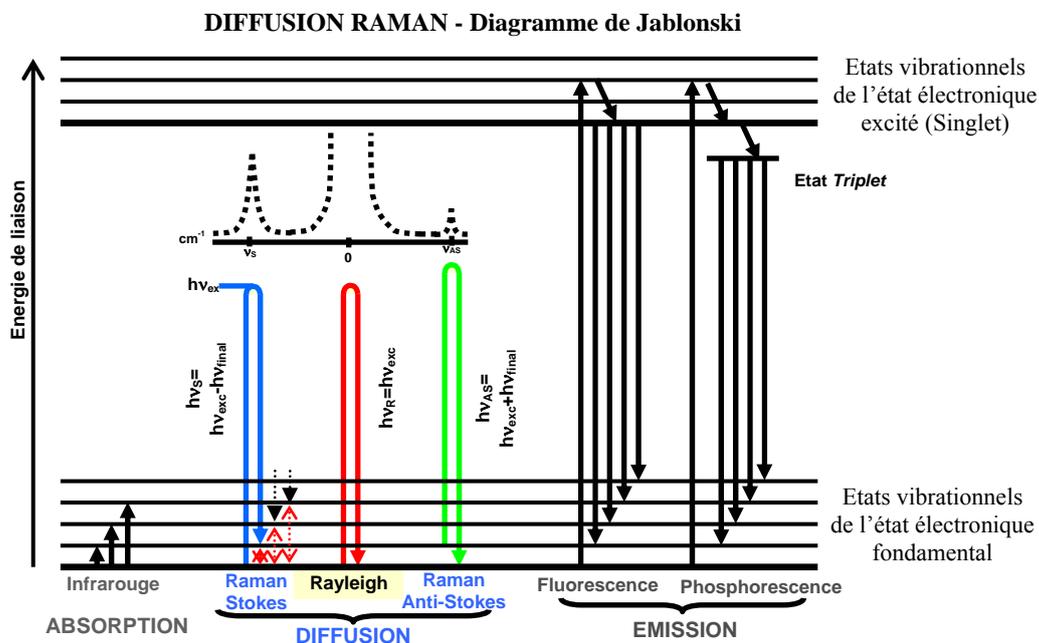


FIGURE 30 : DIAGRAMME DE JABLONSKI APPLIQUE A LA DIFFUSION RAMAN

Pour un système en équilibre thermique, la répartition des populations issues de chocs inélastique est définie par la loi de Boltzmann qui nous donne, si N_{E1} et N_{E0} sont les populations des niveaux E_0 et E_1

$$\frac{N_{E1}}{N_{E0}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

D'après cette équation et à température ambiante, le niveau d'énergie inférieur est donc le plus peuplé (300 K), expliquant la plus grande probabilité d'observer les transitions Stokes par rapport à la transition Anti-Stokes. De même cette relation explique les variations d'intensité des pics correspondants.

6.2.2. Modèle ondulatoire de l'émission Rayleigh et Raman

Pour une onde monochromatique de fréquence ν_0 frappant un échantillon. Le champ électrique de cette onde est donné par la relation suivante:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

où E_0 est l'amplitude de l'onde.

L'interaction entre ce champ électrique et le nuage électronique de l'échantillon va créer un moment dipolaire induit m défini par :

$$m = \alpha E$$

où α est la polarisabilité de l'échantillon.

Pour que l'échantillon donne lieu à un effet Raman, la polarisabilité de l'échantillon doit être de la forme :

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right)$$

où α_0 est la polarisabilité de l'échantillon à la distance internucléaire d'équilibre r_{eq} , et r la distance internucléaire à tout instant.

En substituant les deux dernières relations dans la première en appliquant la formule de trigonométrie $\cos x \cos y = \frac{1}{2} (\cos(x+y) + \cos(x-y))$: on obtient :

$$m = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_0 - \nu)t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_0 + \nu)t]$$

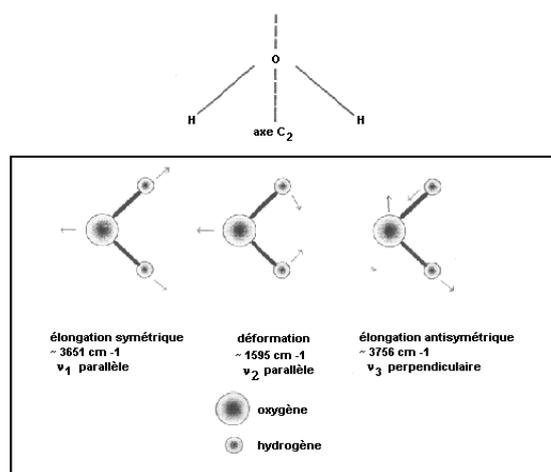
Le premier terme de cette équation représente la raie Rayleigh, alors que les deux derniers représentent respectivement les raies Stokes et Anti-Stokes.

6.2.3. Exemple de changement de polarisabilité pour 2 molécules simples H₂O et CO₂

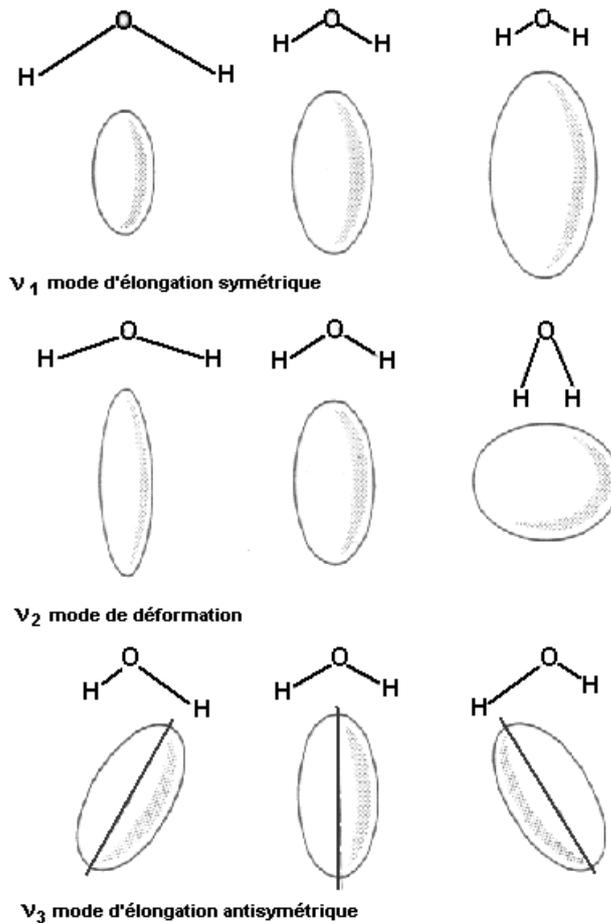
H₂O :

cette molécule linéaire et triatomique présente 3 modes normaux de vibrations permis dont 2 modes d'élongation et 1 mode de déformation [76].

Les schémas suivants montrent ces différents modes de vibration :



La colonne centrale de l'illustration suivante montre la position d'équilibre de l'ellipsoïde de polarisabilité de la molécule d'eau, tandis que les colonnes de droite et gauche représentent les extrêmes dans chaque mode de vibration



Pour ces trois modes de vibration de la molécule d'eau, on constate donc :

- Pour l'élongation symétrique **V₁**: lors de l'étirement de la liaison, les électrons sont moins fermement tenus par le noyau rendant les liaisons plus polarisables ce qui implique que l'ellipsoïde de polarisabilité devienne de plus en plus petite sans changer de forme et vice-versa.
- Pour la déformation **V₂**, c'est la forme de l'ellipsoïde qui change durant la vibration. Lorsque les liaisons sont étirées et les hydrogènes éloignés, les liaisons deviennent plus polarisables. L'ellipsoïde de polarisabilité est écrasée en longueur et s'aplatit au fur et à mesure que les hydrogènes se rapprochent.
- Pour l'élongation antisymétrique **V₃**, la forme et taille de l'ellipsoïde restent constantes mais la direction de l'axe majeur change.

6.2.4. Les principaux avantages de la spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman présente de nombreux avantages par rapport aux analyses conventionnelles.

Elle ne nécessite aucune préparation de l'échantillon avant de réaliser l'acquisition des spectres et ne requiert que de faible quantité d'échantillon qui peuvent être de l'ordre du μg .

L'analyse est non destructive et permet donc la répétition des acquisitions ou la confrontation des résultats avec d'autres techniques d'investigation.

L'étude de molécules en solution aqueuse est possible puisque l'eau interfère peu en Raman. Pourtant l'analyse de certains résultats pour les molécules biologiques peut être rendue plus difficile en raison des faibles perturbations liées à l'eau.

Les lasers modernes permettent d'obtenir une résolution spatiale proche du micron. Elle est essentiellement fonction de la source laser utilisée.

L'évolution des dispositifs optiques et des fibres optiques permet d'envisager des applications *ex vivo* ou *in vivo*.

Ces avantages sont toutefois contrebalancés par la gêne provoquée par quelques phénomènes tels que :

- l'émission de fluorescence, beaucoup plus intense que l'effet Raman lorsqu'elle se produit mais qui peut être évitée en utilisant une excitatrice (laser) moins puissante.
- une sensibilité moins bonne qu'en infrarouge et un bruit plus présent.
- l'émission du corps noir par échauffement de l'échantillon qui peut être corrigé en partie lors du traitement des spectres.
- la possibilité, dans certains cas particuliers de réactions photochimiques décomposant certaines substances colorées par exemple.

Certains de ces inconvénients trouvent une réponse dans l'utilisation de spectromètres Raman à Transformée de Fourier :

- le problème de fluorescence ne se pose plus en raison de l'utilisation d'une raie excitatrice peu énergétique (radiation à 1064 nm du laser Nd:YAG dans le proche infrarouge)
- les substances colorées ne sont plus alors décomposées pour la même raison.
- l'analyse est plus rapide car tous les éléments spectraux sont mesurés simultanément
- la sensibilité est meilleure car une plus grande quantité de photons est détectée dans le même temps
- les fréquences sont déterminées avec précision grâce à un laser qui mesure la position du miroir mobile de l'interféromètre.

6.3. Spectre Raman et modes vibrationnels

Certaines macromolécules peuvent présenter un poids moléculaire considérable représentant des centaines de milliers d'atomes. Par exemple une macromolécule de 600 000 atomes présentera 1 800 000 modes fondamentaux vibrationnels ($3N-6$) !

Heureusement, un grand nombre de ces modes ont presque les mêmes fréquences puisque les liaisons impliquées sont souvent très redondantes dans ce type de molécule. Le spectre résultant sera donc constitué d'un nombre de pics restreints puisque toutes les groupements C=C donneront une seule bande à environ 1650 cm^{-1} .

Pourtant les groupements environnants de cette liaison C=C, portés par les carbones, seront à l'origine de perturbations de la vibration C=C et donc de légers décalages de la position du pic correspondant.

6.4. Pics et attributions en spectroscopie Raman

Nombre d'onde en cm^{-1}	Attributions Raman
619	Cycle de la Phénylalanine
642	Cycle de la Tyrosine et ν C-S
671	ν C-S Cysteine
699	ν C-S Cysteine
722	Phospholipides et ν C-S Cystine
746	Cycle aromatique "puckering"
758	Tryptophane et ν sym O-P-O Lipides
803	ADN
829	Doublet de Fermi de la Tyrosine (cycle)
851	Doublet de Fermi de la Tyrosine (cycle)
883	Tryptophane
909	ν CH_3 , γ_w CH_2 ; ρ CH_2 Polypeptides
935	ρ CH_3 terminal, ν CC hélice α Phospholipides
957	ν P-O ADN et ν C-C (hélice α et aléatoire) Cholestérol, δ CCH oléfinique
987	ν P-O-C phospholipides
1003	Respiration sym. du cycle de Phénylalanine et Tryptophane
1032	C-H de Phénylalanine
1045	ν C-C, ν C-O, ν S-O
1062	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> et ν C-O ADN
1086	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche
1102	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche
1127	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i>
1157	ν C-C, ρ CH_3 , C-C vibration du squelette
1175	CH Tyrosine, Phénylalanine et ν sym C-O-C Lipides
1207	ν C-C ₆ -H ₅ , Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine
1250	Amide III random coil
1284	Amide III hélice α
1296	Amide III, CH_2 phospholipides
1319	C=C, Guanine, δ CH protéines
1339	ν C-C, CH bend et Phe, Tryptophane, Adénine, Guanine
1382	CH_3 bend, δ CH_3
1443	δ CH protéines et lipides
1555	Tryptophane
1651	Amide I

ν : élongation ; γ_w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking)

MATERIEL ET METHODES

1. COLLECTION DES ECHANTILLONS

La première étape de ce travail a été la constitution d'une banque de tissus spécifiques regroupant les différents échantillons de tissu aortique. Cette étape s'est avérée possible grâce à la collaboration amicale et efficace du Professeur Pluot au sein du laboratoire d'anatomopathologie et de cytologie du CHU Robert Debré de Reims.

Les prélèvements ont été réalisés lors d'intervention de chirurgie pour anévrisme de l'aorte ascendante pour l'ensemble des tissus pathologiques étudiés. Les prélèvements des échantillons témoins dits « normaux » proviennent d'aortes ascendantes prélevées chez des patients en état de mort cérébrale dont le cœur était explanté à des fins de prélèvements des valves cardiaques (allogreffes). Ce prélèvement se faisait dans le même temps chirurgical et emportait un anneau d'environ 1 cm de haut de l'aorte ascendante.

Les échantillons ont été ensuite découpés en petites bandes de 5 mm de large sur 20 mm de long et disposés dans des tubes permettant leur cryocongélation. Pour des raisons pratiques, liées à des difficultés de coupe au microtome, l'adventice des aortes prélevées a été en partie éliminée de façon systématique.

La cryocongélation à -80° Celsius permet de conserver les échantillons durant de longues périodes sans altération des composants du tissu. Ce procédé de conservation s'affranchit aussi des artéfacts liés à l'altération des cellules par les cristaux de glace se formant dans le leur cytoplasme lors d'une congélation lente à des températures comprises entre -5 et -20° Celsius. Bien qu'utiles pour les cellules musculaires lisses, ces précautions n'affectent en rien le collagène et l'élastine qui sont particulièrement résistants et peuvent être conservés des décennies en congélation.

Nous avons convenu de réaliser une double conservation des échantillons en associant une conservation dans du formol à 4 %. La fixation dans le formol n'était réalisée que dans le seul but d'études anatomopathologiques ultérieures. La durée de conservation est, dans ce cas, plus courte du fait de phénomènes de surfixation liés au formol lui même.

2. REALISATION DES COUPES AU MICROTOME

Pour permettre l'étude en microspectrométrie infrarouge, des coupes ont été réalisées sur les échantillons cryocongelés. Les coupes ont été faites à l'aide d'un microtome réfrigéré conservant une température de -25° Celsius pendant toute la procédure. Les échantillons étaient fixés sur un support à l'aide d'OCT (mélange figeant à basse température).

Une expérience préalable a été nécessaire pour déterminer l'épaisseur optimale des coupes pour l'étude en spectrométrie infrarouge. La spectroscopie Raman s'affranchit de cette contrainte puisque les acquisitions ne nécessitent pas de traverser le tissu. Les premières coupes à 5 microns d'épaisseur nous ont montré les limites de résistance de ces tissus, en particulier pour les tissus pathologiques. En effet, pour cette faible épaisseur, on peut observer de nombreuses déchirures du tissu ne permettant pas une étude correcte. Les coupes à 7 et 10 microns se sont révélées de bien meilleures candidates alors que les coupes à 20 microns ont été écartées du fait d'un rapport signal sur bruit peu favorable pour l'analyse infrarouge à l'aide du microspectromètre IRscope (+ Equinox 55). Par contre, les études en Raman et en microscopie confocale des aortes ont bénéficié de coupes à 20 microns. En effet, cette méthode permet de focaliser la mesure à une profondeur donnée du fait de sa confocalité et nécessite donc une certaine épaisseur de tissu pour générer les vues tridimensionnelles du tissu.

Dès la coupe réalisée, le transfert de l'échantillon, de la lame du microtome à la pastille de ZnSe préalablement nettoyée à l'alcool à 90 %, se faisait par un simple contact entre la coupe congelée et la pastille de ZnSe.

3. LES SPECTROMETRES INFRAROUGES

Deux spectromètres IRFT ont été utilisés pour l'acquisition des spectres en transmission-absorption. Le premier, chronologiquement le plus ancien, conçu par la société Bruker à permis la réalisation d'acquisitions en mode « point par point ». Le second, acquis plus récemment, est en fait un imageur permettant des acquisitions rapides sur des zones plus étendues grâce à son détecteur muni de seize capteurs travaillant de concert.

3.1. L'analyse en mode « point par point » à l'aide du spectromètre Equinox 55

Ce spectromètre de laboratoire est couplé avec un microscope lui permettant des acquisitions sur des structures microscopiques.

3.1.1. Le spectromètre de recherche Equinox 55, Bruker (Wissembourg, France)

Ce spectromètre a été utilisé pour l'enregistrement des spectres de transmission en mode «point par point ». Cet équipement est muni d'une source infrarouge de type Globar, d'un interféromètre de type Rocksolid™ à miroirs cubiques, d'une séparatrice en KBr isolée de l'atmosphère et d'un laser Hélium-Néon permettant une grande précision dans les mesures.

Ce spectromètre est par ailleurs équipé d'un détecteur DLATGS (Deuterated L-Alanine Tri-Glycine Sulfate) réservé aux mesure réalisées sur le compartiment échantillon et n'est donc pas utilisé lors des acquisitions en microspectrométrie. En fait, le microscope IRscope II possède son propre détecteur dédié à cette application.

Enfin, le spectromètre est continuellement purgé par de l'air sec évitant ainsi au maximum les interférences liées à la vapeur d'eau et au CO₂ lors des acquisitions (figure 31) .

3.1.2. Le microscope IRscope II (Bruker)

Ce microscope IRTF, couplé au spectromètre Equinox 55, permet d'obtenir des acquisitions sur des zones de tissu sélectionnées visuellement. L'IRscope II utilise uniquement la source et l'interféromètre du spectromètre Equinox 55 puisqu'il dispose de son propre détecteur.

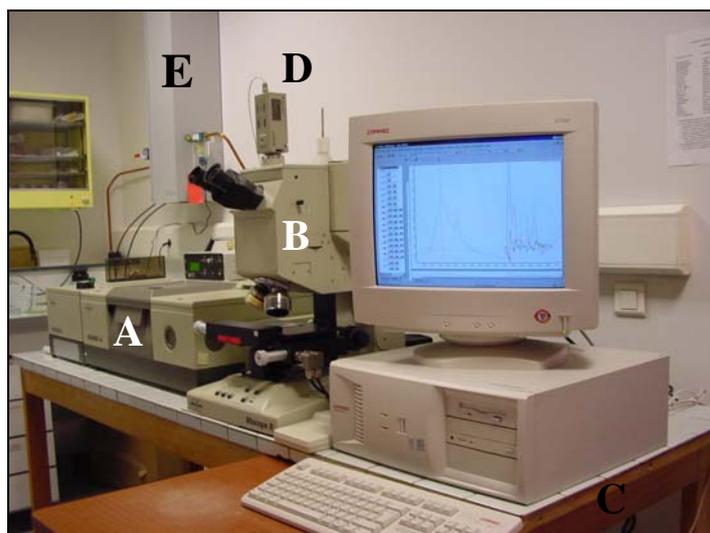


FIGURE 31 : SPECTROMETRE IRTF EQUINOX 55 (A) ASSOCIE A L' IRSCOPE II (B), L'ORDINATEUR (C), LA CAMERA CCD (D), ET LA PURGE (E)

Ce dernier est un détecteur de type MCT beaucoup plus sensible que le détecteur DLATGS du spectromètre mais qui nécessite un refroidissement par de l'azote liquide (77°K). En l'absence de refroidissement aucun signal ne peut être détecté. Malgré un réservoir partiellement fermé, l'azote liquide s'évapore progressivement permettant des acquisitions ne pouvant pas dépasser les 5 à 6 heures.

Une caméra CCD, placée en haut du microscope, permet de visualiser l'image sur le moniteur de l'ordinateur et d'enregistrer cette image. Pour des raisons de commodité, le repérage optique de la zone d'acquisition sur l'échantillon se fait classiquement à l'aide des deux oculaires.

L'échantillon est placé comme sur tout microscope sur la platine « porte lame ». Cette dernière motorisée est contrôlée en XY par l'ordinateur permettant un positionnement précis et identifiable par ses coordonnées. Il est alors possible de cartographier un échantillon en programmant l'enregistrement automatique de spectres à des coordonnées prédéterminées. De façon concomitante, une caméra numérique autorise l'enregistrement des images dans la gamme visible, permettant a posteriori la comparaison d'informations visibles et infrarouges.

Le microscope IRscope2 est équipé de 3 objectifs : un objectif visible x4 et deux objectifs infrarouges de type Cassegrain de grandissement x15 et x36.

La taille de la zone analysée par le microscope dépend de l'objectif employé et du diamètre d'un trou circulaire placé dans le trajet optique pour limiter le diamètre du faisceau infrarouge parvenant au détecteur.

Le diamètre de la zone analysée en fonction de l'objectif et de l'ouverture (trou circulaire) figure dans le tableau XI.

TABLEAU XI : ZONE D'ACQUISITION EN FONCTION DE L'OUVERTURE DU MICROSCOPE IRSCOPE II (x 15)

Ouverture (mm)	Zone étudiée avec	Zone étudiée avec
3,75	104 μm	250 μm
3,00	83 μm	200 μm
2,50	69 μm	166 μm
2,10	58 μm	140 μm
1,80	50 μm	120 μm
1,50	42 μm	100 μm
1,20	33 μm	80 μm
0,90	25 μm	60 μm
0,75	21 μm	50 μm
0,60	16,7 μm	40 μm
0,45	12,5 μm	30 μm
0,30	8,3 μm	20 μm

Du fait de l'absorbance non nulle du ZnSe utilisé comme support des échantillons, le diamètre minimum possible de la zone étudiée est de l'ordre de 30 μm . En dessous, le rapport signal sur bruit diminue ne permettant pas des acquisitions de qualité en un temps raisonnable. A l'inverse, la saturation du détecteur est observée pour des diamètres supérieurs à 150 μm ne permettant alors pas l'enregistrement d'une quelconque variation de signal. Nous avons utilisé l'objectif x15 pour l'ensemble de ce travail de microspectroscopie infrarouge avec une ouverture à 0,45 correspondant à une zone de travail de 30 μm .

3.1.3. Acquisition des spectres infrarouges à l'aide du Microspectromètre Equinox 55 associé au microscope IRscope II (Brucker)

Les paramètres d'acquisition des spectres ont été standardisés après une expérience préalable sur différentes coupes. Ces paramètres sont contrôlés par l'ordinateur qui par ailleurs commande la table motorisée porte-échantillon du microspectromètre.

Les paramètres retenus sont :

- l'aire géographique des mesures : toute l'épaisseur du tissu de l'intima aux limites de l'adventice correspondant à environ 1200 à 1500 μm de haut pour 150 μm de large
- le domaine spectral analysé : 600-4000 cm^{-1}
- la résolution spectrale : 4 cm^{-1}
- le nombre d'accumulations par spectre : 128
- le spectre de référence : 1 tous les 10 spectres (256 accumulations par référence)
- l'ouverture 0,45 correspondant à une zone d'analyse de 30 μm de diamètre
- Les spectres ont été traités par les logiciels LabSpec version 2 et 4 (Dilor, France), ainsi que par le logiciel OPUS 3 (Brucker*, Allemagne).

Pour chaque acquisition, limitée à 5 heures du fait du refroidissement du détecteur, il a été possible d'accumuler entre 120 et 200 spectres disposés en colonnes successives sur la zone de mesure définie préalablement.

3.2. L'analyse en mode « image » à l'aide de l'imageur infrarouge Spectrum Spotlight 300 (PerkinElmer)



Ce dispositif composé de deux sous unités, comporte le spectromètre positionné à côté du module de microscopie infrarouge.

3.2.1. Le spectromètre

Ce dispositif est composé d'une source infrarouge (1300 kelvin) dessinée spécifiquement pour les applications spectrométriques. Cette source est stabilisée par un système propriétaire PerkinElmer appelé « hot spot stabilization » assurant la constance du rayonnement émis.

Par ailleurs, un interféromètre de Michelson, compensant automatiquement les pertes d'alignement, par exemple dues à des secousses lors des acquisitions, complète le système.

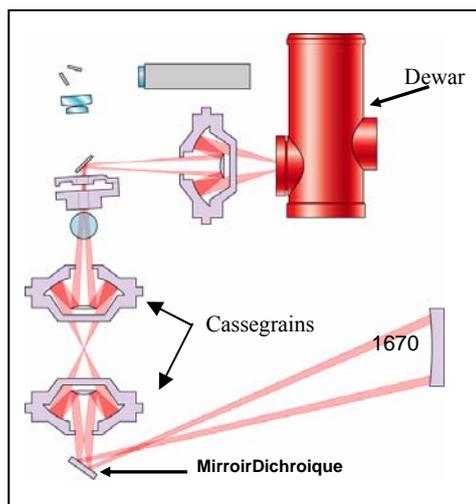
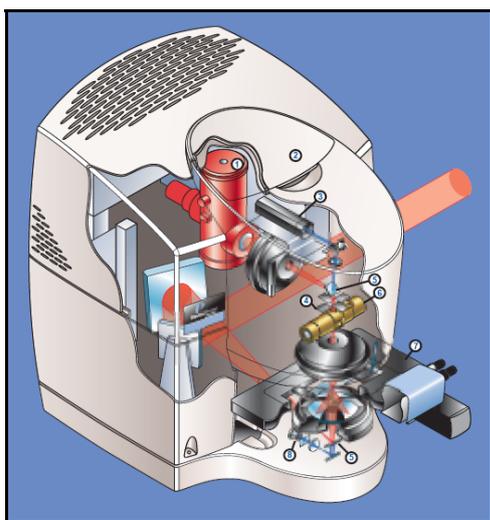
3.2.2. Le microscope infrarouge (données constructeur)

Cet élément comprend outre le microscope équipé de deux objectifs, une platine pilotée, un système autofocus et d'auto-alignement du faisceau infrarouge ainsi que deux détecteurs différents et leur système de refroidissement. Un capteur vidéo classique complète le système et permet la production d'images visibles de bonne qualité.

Les deux objectifs disponibles sur cet imageur permettent, pour le premier des acquisitions en transmission/absorbance et présente une ouverture numérique de 0,6 alors que le second en Germanium est dévolu aux acquisitions en réflexion totale atténuée.

La platine motorisée portant l'échantillon est contrôlée par l'ordinateur. Cet imageur permet de réaliser des acquisitions sur une surface maximum 25 mm x 25 mm (sauf limitation en mémoire vive de l'ordinateur) quand de nombreux spectromètres se limitent à quelques millimètres voire moins.

Un système autofocus et d'auto-alignement agissant sur le cassegrain inférieur permet d'optimiser de façon automatique l'intensité du faisceau infrarouge dans le plan de l'échantillon. Cette simplicité d'utilisation est aussi présente dans le logiciel associé qui gère une grande partie des paramètres.



Enfin ce système dispose de deux détecteurs dans le même Dewar (système de refroidissement) :

- le premier est un détecteur medium-band MCT $100\mu\text{m}^2$ permettant des acquisitions ponctuelles avec un rapport signal sur bruit supérieur à 7000/1 sur une gamme spectrale comprise entre $7800 - 600\text{ cm}^{-1}$ (un jeu de masque permet des acquisitions sur une surface de $25\mu\text{m}^2$).

- le second est un détecteur composé de 16 éléments NBMCT disposés en quinconce sur deux colonnes, se déplaçant latéralement de $6,25 \mu\text{m}$ à chaque cycle d'acquisition (Figure 32). Cette disposition permet à chaque détecteur d'assurer l'acquisition d'une ligne de $6,25 \mu\text{m}$ de hauteur dans la largeur de l'échantillon. Ce système permet donc de couvrir toute la largeur de l'échantillon sur la hauteur du détecteur et de ses 16 détecteurs. Les données sont simplement réarrangées en fonction des coordonnées X et Y de chaque spectre pour constituer l'image spectrale de la bande d'acquisition. Pour les zones plus hautes que le détecteur, les acquisitions sont réalisées sous forme de bandes successives qui sont ensuite combinées les unes aux autres pour couvrir l'ensemble de l'échantillon.

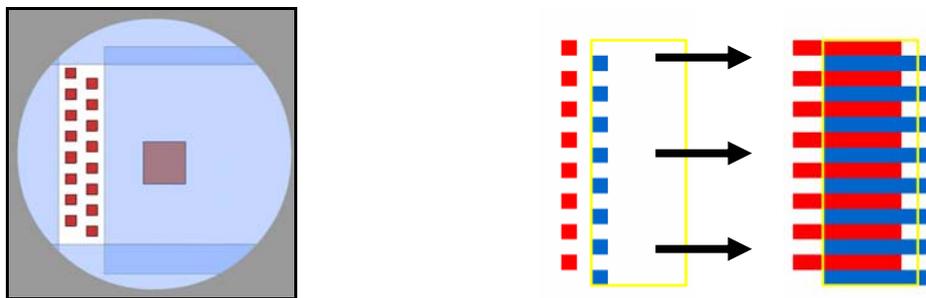


FIGURE 32 : ASPECT DU DETECTEUR 16 ELEMENTS DE L'IMAGEUR SPOTLIGHT
ET PRINCIPE D'ACQUISITION PAR TRANSLATION

Ce nouveau type de détecteur permet des acquisitions très rapides puisqu'un échantillon de $2000 \mu\text{m}^2$ analysé avec des résolutions spectrales de 16 cm^{-1} et spatiales de $6,25 \mu\text{m}$ ne demande qu'environ 22 minutes (données constructeur) alors que l'image spectrale contient alors $(2000/6,25)^2$ spectres soit 102400 !

Ce progrès important par rapport au mode point par point nous a permis d'augmenter très nettement le nombre de spectres pour chaque échantillon tout en restant dans des limites raisonnables. En effet, si la génération des spectres a été considérablement simplifiée et accélérée, le traitement des données reste en partie manuel et ne permet pas le traitement d'une telle masse de données. En fait le gain de rapidité a permis essentiellement d'augmenter la résolution spatiale à son maximum (haute résolution : $6,25 \mu\text{m}^2$) et la résolution spectrale à 4 cm^{-1} tout en conservant des durées d'acquisitions inférieures aux 5 heures allouées par le refroidissement du détecteur (azote liquide).

3.2.3. Acquisition des spectres infrarouges à l'aide de l'imageur Spotlight 300 (Perkin Elmer)

Habituellement, trois à quatre heures étaient nécessaires à l'acquisition de zone de 1500 μm par 200 μm représentant environ 8000 spectres en utilisant la barrette de détecteurs à 6,25 μm .

Les paramètres retenus sont :

- l'aire géographique des mesures : toute l'épaisseur du tissu de l'intima aux limites de l'adventice correspondant à environ 1500 μm de haut pour 200 μm de large
- le domaine spectral analysé : 700 - 4000 cm^{-1}
- la résolution spectrale : 4 cm^{-1}
- le nombre d'accumulations par spectre : 32 à 64
- les spectres ont été extraits et pré-traités par les logiciels Spotlight 1.0.B.30 et Spectrum 3.3 de la société PerkinElmer
- les spectres ont été traités par les logiciels LabSpec version 2 et 4 (Dilor, France), ainsi que par le logiciel OPUS 3 (Brucker*, Allemagne).

3.3 Pré-traitement des données spectrales

Les données issues de notre expérimentation initiale avec le microspectromètre Equinox 55 nécessitaient une extraction de l'ensemble des spectres du bloc de données spectrales pour subir le pré-traitement décrit ci-dessous. Pour les données provenant des images spectrales de l'imageur Spotlight une partie du traitement peut être réalisé sur l'image et directement visualisé par des échelles en fausses couleurs. Ceci permet une évaluation visuelle et intuitive de l'ensemble de l'échantillon pour le paramètre étudié.

3.3.1. Correction de ligne de base

Lors de l'interaction entre la lumière et le tissu étudié, des phénomènes s'associent à l'absorption des radiations infrarouges : diffusion, aberrations chromatiques et diffraction sont observées, déviant alors la lumière transmise de son trajet « normal » vers le détecteur MCT.

Ces phénomènes sont variables en fonction de la longueur d'onde et de l'épaisseur de l'échantillon. Ces interactions se manifestent par une déformation du spectre qui s'incline de façon plus prononcée pour les grands nombres d'onde.

Cette correction permet d'éliminer l'influence néfaste de ces phénomènes sur le spectre. Elle peut être automatique ou manuelle. La détermination du nombre de points utilisés pour ce traitement définit le nombre de minima du spectre. Enfin, la ligne de base ainsi définie est soustraite point par point au spectre acquis. Toutefois, même s'il n'a pas été possible de s'en passer lors de nos travaux, cette procédure est connue pour générer des artefacts.

3.3.2. Le lissage

Cette fonction vise à diminuer le bruit surajouté aux données spectrales bien qu'elle présente deux aspects contradictoires. En effet, d'un côté le lissage tend à éliminer les signaux parasites (ou le bruit) enregistrés par le détecteur et qui ne sont pas des informations, d'autre part ce prétraitement affecte toujours les informations du spectre IRTF, essentiellement quand leur amplitude est faible. Ce lissage est réalisé par l'intermédiaire d'un filtre de Savitsky-Golay dont l'intensité était fixé à 9.

3.3.3. La normalisation

De nombreux facteurs affectent l'intensité de l'absorption infrarouge par un tissu et nécessitent d'être compensés pour permettre une comparaison de spectres provenant de régions tissulaires d'épaisseur ou d'inclinaison différentes modifiant alors la quantité de matière interagissant avec le rayonnement et donc le signal résultant. Pourtant, si cette opération mathématique permet de rendre comparable les spectres entre eux, elle les ramène tous à une échelle arbitraire éliminant la composante quantitative absolue contenue dans le spectre. Par contre, les intensités relatives dans et entre les spectres (rapports de bandes, de pic...) peuvent toujours être comparées après normalisation des spectres. La normalisation peut être réalisée sur l'intensité d'un pic (normalisation min-max) ou sur la surface du spectre (normalisation vectorielle). Dans ce cas, l'aire de chaque spectre est calculée dans l'intervalle défini par l'utilisateur et tous les spectres sont ramenés à la même aire.

3.3.4. Les dérivées de premier et second ordre

La dérivation du spectre permet d'accroître le nombre d'éléments discriminants de ce dernier. La dérivée première détermine la pente en chaque point du spectre et renseigne donc sur la façon dont varie l'absorbance en fonction du nombre d'onde. Elle permet donc de s'affranchir des problèmes liés aux conditions d'acquisition. La dérivée seconde, quant à elle, renseigne sur la variabilité de la pente du spectre et correspond en fait à son rayon de courbure. L'information en terme d'absorbance pure est alors perdue mais les pics composant les différentes bandes peu résolues du spectre sont alors dévoilés. La dérivation, réalisée par un algorithme de Savitsky-Golay comprenant un filtre de 9 points, permet également de s'affranchir de la correction de ligne de base et des artefacts qu'elle génère.

3.4. Traitement des données spectrales

Du fait de la complexité du spectre IFTR, de la subtilité des différences recherchées ainsi que du chevauchement des différents massifs, leur analyse par une simple inspection visuelle n'est pas possible. D'autre part les méthodes spectroscopiques modernes génèrent tant de données qu'une analyse humaine n'est pas possible. Une image spectrale « normale » peut en effet contenir plus de 10.000 spectres individuels ! L'analyse de 10 images se révèle alors être un véritable « casse-tête ».

Le traitement de ces masses de données nécessite le recours à des méthodes adaptées ce d'autant plus que la variabilité intrinsèque des échantillons peut en partie cacher l'information recherchée.

Les méthodes d'analyse spectrale doivent donc assurer la réduction du nombre des données, l'extraction d'informations utiles, la classification des spectres, l'établissement et l'exploration de bases de données. Cette science, nommée chimiométrie est en passe de devenir l'une des clefs de la spectroscopie moderne. Les méthodes chimiométriques utilisent l'outil statistique et en particulier les statistiques multivariées du fait de l'important nombre de paramètres à traiter. L'analyse en composantes principales (ACP), la classification hiérarchique ascendante (HCA), l'analyse discriminante et les tests de significativité font partie des outils que nous avons utilisés.

3.4.1. L'analyse en composantes principales

Les objectifs de l'analyse en composantes principales (ACP) sont de réduire le nombre de variables et de détecter les relations les régissant ce qui revient en fait à les classifier. En d'autres termes, l'ACP transforme un ensemble complexe de données en une somme de données simplifiées mais exprimant la plus grande partie de la variance de l'échantillon initial. Ceci simplifie la représentation et l'interprétation des données spectrales par l'extraction des informations principales.

3.4.1.1. Principe de l'ACP

Une analogie graphique permet d'expliquer le processus de l'ACP de manière relativement simple et intuitive (Figure 22). Il suffit de considérer que le spectre n'est plus constitué de plusieurs points en fonction du nombre d'onde mais comme un point unique dans un espace hyperdimensionnel comprenant autant de dimensions qu'il y a de fréquences dans le spectre.

Lorsque l'on considère un ensemble de spectres, l'association des « points » caractérisant chaque spectre donne naissance à un nuage de points dans cet espace hyperdimensionnel. L'algorithme utilisé recherche alors un nouveau jeu de coordonnées plus adapté à la forme du nuage de points, correspondant en fait en un changement de repère spatial. L'origine du nouveau repère sera alors le centre du nuage de points, son premier axe correspondra à l'axe présentant la plus grande variabilité au sein du nuage de points. L'algorithme cherche également à minimiser la variabilité autour de ce premier axe de façon à ce qu'il soit vraiment placé au centre du nuage. Les coordonnées de cet axe dans l'espace hyperdimensionnel sont un vecteur dit « vecteur propre » qui peut être représenté par un nouveau spectre dans l'espace à deux dimensions fréquence-absorbance : c'est la première composante principale. La deuxième composante principale est en fait le deuxième axe du nuage de point, perpendiculaire au premier et capturant la deuxième plus grande variabilité du nuage et ainsi de suite (figure 33).

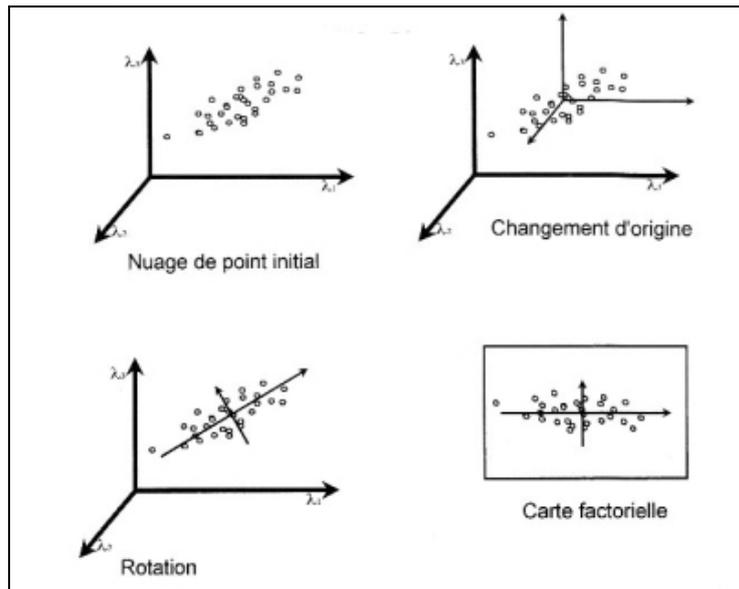


FIGURE 33 : CHANGEMENT DE REPERE DANS UN ESPACE MULTIDIMENSIONNEL
OU LE PRINCIPE DE L'ACP

Finalement, il est possible d'extraire autant de composantes principales qu'il y a de dimensions et donc de fréquences dans le spectre moins une, chaque nouvelle composante principale exprimant la plus grande variabilité résiduelle après l'extraction des composantes précédentes. En raison de l'agencement perpendiculaire des vecteurs propres, les composantes principales sont dites orthogonales ce qui signifie qu'elles sont indépendantes ou non corrélées. Finalement, l'ACP permet d'éliminer certaines données redondantes au profit d'une synthèse des informations caractérisant le mieux les données spectrales initiales.

Enfin, lors de l'application de l'ACP à nos spectres, 99 % de la variance se trouvent réunis dans les 6 premières composantes principales alors que les suivantes ne sont composées que de bruit.

Les vecteurs propres peuvent être indifféremment orientés dans l'espace et permettent alors l'obtention de possibles contributions négatives pour certaines composantes principales (CP).

Chacun des spectres mesuré peut alors être exprimé par ses coordonnées dans ce nouveau repère calculé à partir du nuage de points et matérialisé par les vecteurs propres de l'ensemble des spectres. Ces coordonnées sont appelées scores et peuvent être considérées comme exprimant la corrélation de chacun des spectres avec chacune des CP.

Enfin la matrice de ces scores est utilisée pour réaliser la classification des spectres et produire la représentation graphique correspondante. Par exemple, en utilisant deux composantes principales, les points des spectres les plus semblables seront les plus proches dans l'espace ainsi défini ce qui permettra d'établir différents groupes. Les résultats, outre ces groupes, seront exprimés en fonction du caractère discriminant de telle ou telle CP (projection des différents groupes sur la CP considérée).

Pourtant, l'analyse en composantes principales ne peut être réalisée de la sorte que si les données initiales ne contiennent pas d'information totalement redondante. Or les points d'un spectre ne sont pas indépendants les uns des autres. Pour s'affranchir de cette contrainte un artifice mathématique est utilisé et consiste en une diminution artificielle de la corrélation induisant alors une part d'inexactitude qu'il est difficile d'appréhender.

3.4.1.2. Réalisation de l'ACP

Nous avons utilisé l'algorithme NIPALS (Non Iterative PARTial Partial Least Square) intégré au logiciel LabSpec 2 (Dilor, Lille, France) qui utilise la régression aux moindres carrés pour réaliser l'ACP. Cette procédure, basée sur les restes, ne permet de calculer que 8 CP mais utilise l'ensemble des points du spectre. Le logiciel permet de visualiser facilement les CP et de déterminer lesquelles sont discriminantes grâce à la représentation graphique des valeurs des scores. La construction graphique des ACP est ensuite réalisée dans Excel sous forme de nuage de points.

Excel ne dispose pas de module permettant de calculer une zone de confiance à 95 %. Nous avons donc utilisé des courbes de tendance qui représentent en fait la courbe qui minimise le plus les distances entre chaque point. Le coefficient de corrélation de cette courbe renseigne sur la dispersion des échantillons appartenant à un groupe.

3.4.2. Classification hiérarchique ascendante

La classification hiérarchique ascendante (HCA) est une méthode statistique qui permet de grouper des observations dans des classes de plus en plus larges par une procédure cyclique se basant sur la similarité ou les distances respectives entre chaque observation en fonction des variables étudiées. Le résultat est un arbre hiérarchique ou dendrogramme représentant l'hétérogénéité entre les différentes observations.

Mesure des distances utilisées pour former les classes :

Le logiciel Opus propose plusieurs modes de calcul de ces distances. En mode « standard », le calcul se base sur la distance euclidienne. En mode « normalisation à la première gamme », la différence entre les spectres est donnée par la valeur d'hétérogénéité D. L'hétérogénéité est calculée à partir du coefficient de corrélation de Pearson r donné par la relation :

$$r = \frac{\sum (a(k) - a_m) \times (b(k) - b_m)}{\sqrt{\sum (a(k) - a_m)^2} \times \sqrt{\sum (b(k) - b_m)^2}}$$

où $a(k)$ et $b(k)$ sont les absorbances des spectres a et b pour le nombre d'onde k et a_m, b_m sont les moyennes de l'absorbance pour le nombre d'onde k.

L'hétérogénéité D est égale à :

$$D = (1 - r) \times 1000$$

Cette hétérogénéité peut être comprise entre 0, pour des spectres identiques sur chacune des zones et 2000 pour des spectres inversement corrélés.

Dans ce mode, l'utilisateur doit définir une ou plusieurs régions spectrales sur lesquelles l'hétérogénéité sera mesurée. Pour chaque zone, l'hétérogénéité est normalisée de façon à ce qu'elle soit comprise entre les mêmes valeurs pour chacune des zones. Il est pourtant possible d'affecter un coefficient différent à chaque zone de façon à ce qu'elles aient un poids différent dans la classification finale.

Les règles d'agrégation :

Au premier cycle, le programme calcule les distances entre les observations et groupe ensemble les deux plus proches pour chaque groupe. Les règles d'agrégation interviennent dès le deuxième cycle pour déterminer le mode de calcul des distances entre groupes. Il en existe plusieurs types. Nous avons généralement utilisé la méthode de Ward basée sur la minimisation de la variance des groupes formés. Cet algorithme permet en fait de minimiser les distances entre couples tout en maximisant les distances entre classes.

3.4.2.1. Particularités du traitement des images spectrales dans le logiciel Spotlight (PerkinElmer)

Comme nous l'avons précédemment précisé, l'imageur Spotlight permet de générer des images spectrales manipulables. Les corrections apportées aux spectres étant directement visualisables sur l'image. Plusieurs modules, contenus dans le logiciel Spotlight 1.0 permettent une analyse globale de la zone étudiée en fonction de diverses corrections ou méthodes de visualisation du résultat spectral.

Les images peuvent être visualisées en fonction :

- de l'absorbance totale intégrée,
- d'une seule longueur d'onde (Single Wavenumber)
- d'une gamme spectrale donnée correspondant à certaines fonctions chimiques (ChemiMap),
- du ratio entre deux bandes spectrales sélectionnées (BandRatio),
- d'une corrélation avec un spectre connu ou une partie de ce dernier (Compare Correlation)

Le pré-traitement permet les corrections habituelles comme le lissage, la normalisation, les dérivées... à l'exception de la correction de la ligne de base. En plus de ces pré-traitements classiques, une fonction de correction atmosphérique compensant les interférences liées aux conditions de la mesure a été intégrée au logiciel Spotlight.

Outre un affichage 2D conventionnel, ce logiciel peut produire des représentations 3D permettant d'appréhender plus facilement certaines variations au sein d'un tissu même si cette analyse n'est que subjective.

3.4.2.2. Utilisation du test de Student pour évaluer la significativité des longueurs d'onde testées

La définition des nombres d'onde permettant d'accomplir les meilleures classifications est essentielle. L'analyse visuelle, même si elle peut orienter certains choix, ne peut définir la significativité des différences observées au sein de différents groupes de spectres. Afin de sélectionner de façon objective des nombres d'onde ayant une significativité, nous avons utilisé une analyse statistique basée sur un test de significativité univarié : le test de Student.

Ce test compare l'écart existant entre deux groupes et la variabilité au sein des deux groupes (dispersion interne). Une certaine homogénéité des variances des deux groupes est nécessaire pour l'application des tests unilatéraux tel le test de Student (unilatéral). Ainsi ce dernier permet d'estimer la probabilité de faire une erreur de classement. Pour augmenter encore la significativité de ce test nous avons considéré les nombres d'onde présentant un $p < 0,01$. En fait, les régions spectrales les plus discriminantes présentent des « p » de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} . Plus que le nombre d'onde, c'est l'étendue et la significativité des zones spectrales significatives qui importent. Compte tenu de la résolution spatiale utilisée lors des mesures, seules les bandes supérieures à 7 cm^{-1} de large ont été considérées. Pour les zones inférieures à 7 cm^{-1} , dont certaines hautement significatives, nous les avons systématiquement testées seules ou en association avec d'autres zones de la gamme spectrale.

En cas de variances très différentes, ou de non appariement des groupes comme dans de nombreux cas, l'option bilatérale du test de student a été systématiquement utilisée.

4. LE SPECTROMETRE RAMAN

Plus récemment, nous avons débuté une expérimentation en spectroscopie Raman. Ces travaux ont été conduits à l'aide du microspectromètre Labram commercialisé par la société Jobin Yvon, Horiba, (Lille, France) (figure 34).

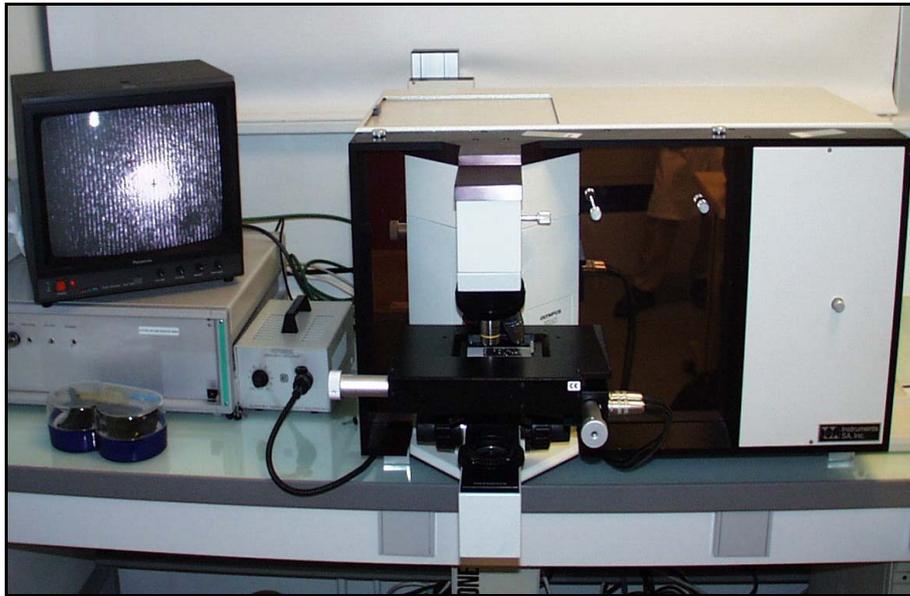


FIGURE 34 : ASPECT GENERAL DU MICROSPECTROMETRE RAMAN LABRAM

Il est composé d'un système optique complexe, d'un microscope et d'un système de détection. Une source excitatrice proche infrarouge composée d'un laser Titane – Saphir (Spectra Physics, USA) à 785 nm est couplée au microspectromètre Labram, le barreau Titane-Saphir étant lui-même pompé par un laser Argon (Spectra Physics).

Le faisceau incident est filtré et focalisé sur l'échantillon au moyen d'un microscope optique. Initialement, cette focalisation est faite manuellement, sous contrôle de l'image diffusée par l'écran vidéo, puis un dispositif piezo d'autofocalisation assure cette dernière avec une résolution en Z de 1 à 2 μm .

L'échantillon est disposé sur une platine motorisée assurant des déplacements d'un pas minimum de 0,1 μm en X et en Y.

Cette caractéristique remarquable permet de réaliser des mesures très proches les unes des autres comme cela est par exemple nécessaire pour l'étude des différents compartiments d'une cellule.

La partie détection de ce microspectromètre est constituée :

- d'un filtre Notch qui atténue la diffusion Rayleigh d'un facteur de 10^6 en laissant passer la totalité de la diffusion Raman Stokes,
- d'un trou confocal permettant de ne transmettre au détecteur que le signal diffusé provenant d'un volume restreint de l'échantillon,
- d'un réseau dispersif holographique de 950 traits/mm chargé de séparer les différentes longueurs d'onde,
- d'un détecteur multicanal CCD (Coupled Charge Device) de 1024 x 256 pixels, permettant une mesure simultanée de l'intensité des différentes longueurs d'onde qui composeront le spectre.

Le schéma 35 illustre les différents composants du microspectromètre Labram et le principe du trou confocal qui permet de ne prendre en compte que le rayonnement diffusé provenant du plan focal en excluant les plans supérieurs et inférieurs.

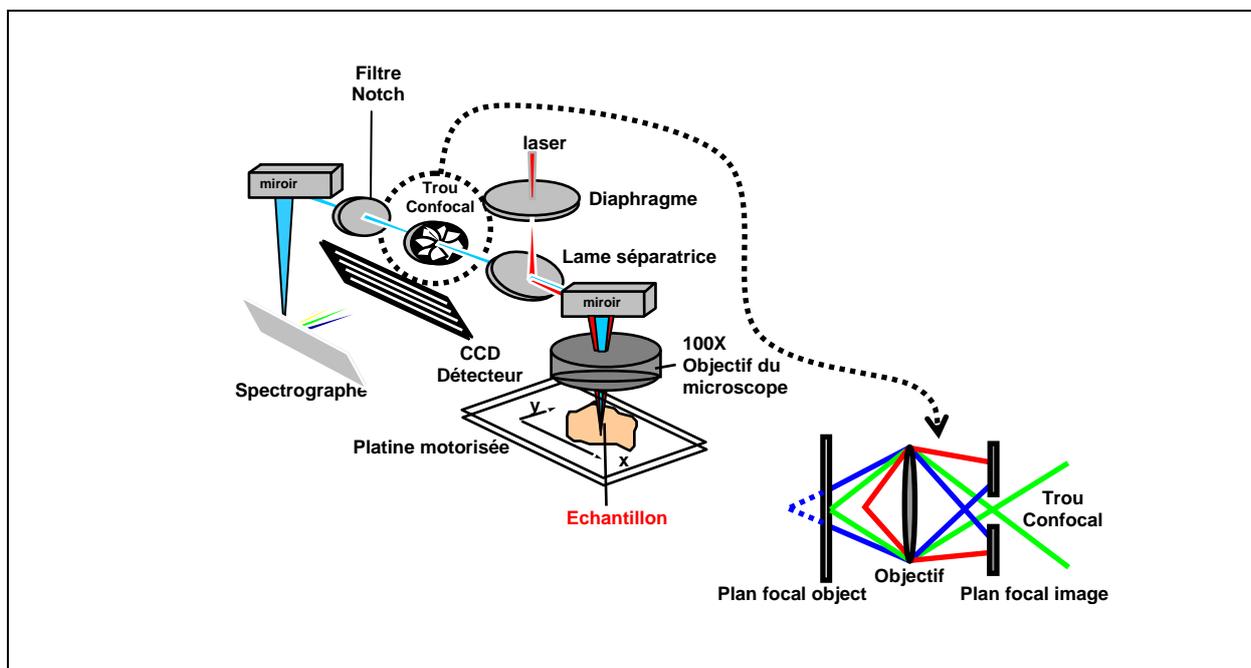


FIGURE 35 : SCHEMA DU MICROSPECTROMETRE LABRAM

L'ensemble de ce système est interfacé à un ordinateur. Le logiciel Labspec 4 (Jobin Yvon Horiba, Lille France) permet de paramétrer le microspectromètre, d'effectuer sa calibration et d'acquérir les données spectrales. Deux modes d'acquisition sont disponibles : soit la mesure est effectuée en un point donné soit sur une région sélectionnée de l'échantillon. Le fichier alors généré comporte l'ensemble des spectres ainsi que leur position au sein de l'image. Les logiciels dont nous disposons ne permettent pas actuellement de travailler directement sur ces images et il est donc nécessaire de procéder à l'extraction préalable des spectres avant d'entreprendre leurs traitements.

5. LA FIBRE RAMAN

L'évolution des appareillages et leur miniaturisation a permis la construction d'un spectromètre Raman de dimension réduite. La société Horiba Jobin Yvon (France) développe ce spectromètre dans le but d'applications déportées hors des laboratoires (marqué CE). Le schéma ci-dessous illustre le principe et les différents composants de cet appareillage (figure 36).

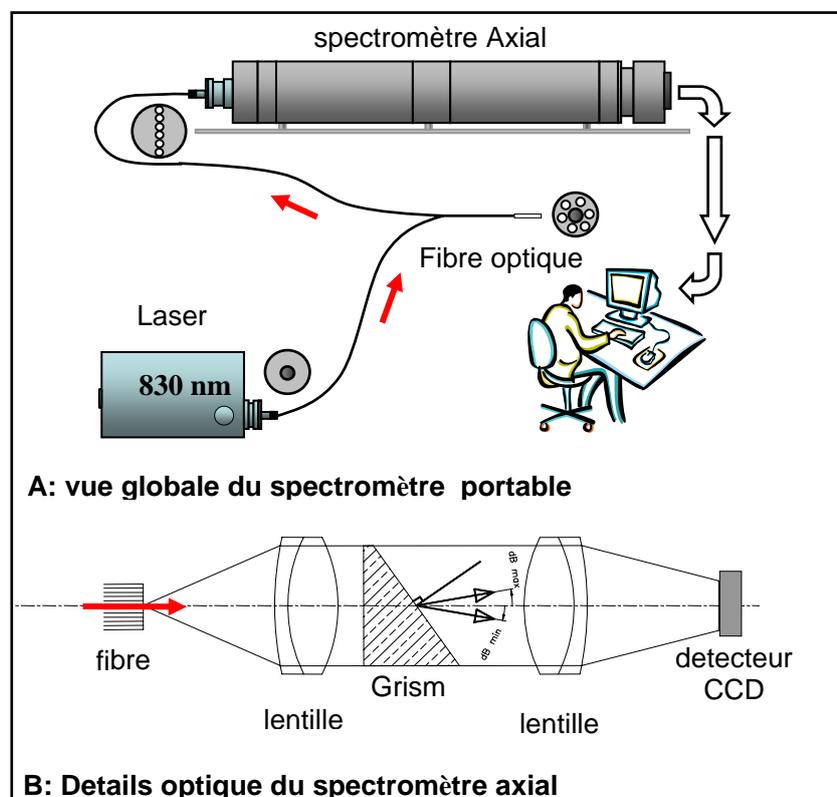


FIGURE 36 : COMPOSANTS ET DETAILS DU SPECTROMETRE AXIAL RAMAN ET DE SA FIBRE OPTIQUE

Le spectromètre ne fait que 60 cm de long pour 15 de diamètre, en conséquence il affiche un poids raisonnable quand les spectromètres Raman de laboratoire mesurent plus d'un mètre et pèsent plus de dix fois son poids ! Ces caractéristiques en font un candidat idéal (?) pour envisager des analyses déportées à l'hôpital (Figure 37).

La dispersion du signal est assurée par un « GRISM » qui associe un prisme et un réseau disposé sur sa face de sortie. Une lentille oriente ensuite les différentes longueurs d'ondes vers un détecteur CCD, refroidi par effet Peltier à -65°C . Malgré sa miniaturisation et sa relative simplicité, la résolution spectrale minimale obtenue est seulement de 2 cm^{-1} .

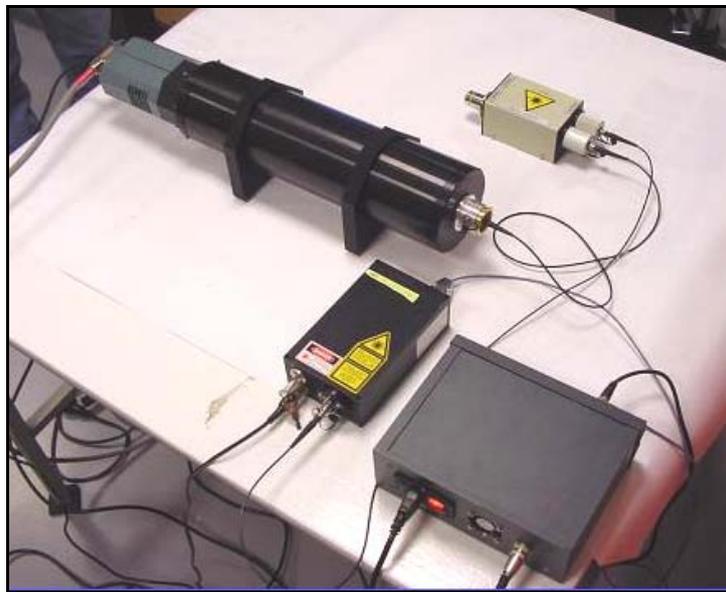


FIGURE 37 : PHOTOGRAPHIES DU PROTOTYPE DE SPECTROMETRE AXIAL
ET DE SA FIBRE (CONFIGURATION ORIGINELLE)

La fibre optique bifurquée est produite par la société SEDI Fibres Optiques (France). Elle est composée d'une fibre reliant le laser au site de mesure et d'un ensemble de 6 fibres périphériques apportant les longueurs d'onde diffusées au spectromètre axial après interaction avec l'échantillon.

Le Laser à 830 nm délivre une puissance de 110 mW. L'excitation est produite par une diode Laser produite par la société Renishaw (Grande Bretagne).

Ce choix a été fait pour minimiser le plus possible les phénomènes de fluorescence liés à des rayonnements plus puissants (l'énergie dispensée est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de l'excitatrice).

Pour le moment, les spectres obtenus avec ce type d'appareillage n'ont pourtant rien à voir avec ceux provenant de spectromètres de laboratoire mais les développements successifs de ce type d'instrument devraient améliorer ces résultats.

6- PRE-TRAITEMENTS ET TRAITEMENTS DES SPECTRES OBTENUS EN SPECTROSCOPIE RAMAN

L'ensemble des spectres a été pré-traité à l'aide des logiciels OPUS 3, Labspec 2 et 4.04 comme précédemment cité pour les spectres issus des acquisitions infrarouges. Du fait d'un bruit beaucoup plus présent lors de ces expérimentations que lors des acquisitions infrarouges, le lissage des spectres a été un point important pouvant expliquer certaines difficultés de classification rencontrées.

Les méthodes d'ACP et d'HCA ont été appliquées pour traiter ces informations spectrales après sélection des zones discriminantes par réalisation de tests de Student uni ou bilatéraux sur les coordonnées des moyennes spectrales ou de leurs dérivées secondes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et Raman pour analyser les différents échantillons aortiques dont nous disposions. Pourtant avant de rapporter nos résultats et d'en discuter la validité, il est nécessaire de revenir sur les conditions préalables à l'obtention de ces échantillons et sur la qualité de ces derniers.

1. REALISATION DES PRELEVEMENTS AORTIQUES ET CONDITIONS D'ANALYSE

1.1 Concernant les biopsies provenant d'aortes anévrysmales

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre matériel et méthodes, nous avons collecté 10 biopsies provenant d'aortes ascendantes anévrysmales. Dans un souci de standardisation, les différentes biopsies ont été réalisées au dépend de la paroi antérieure de l'aorte ascendante. En effet, des travaux récents [9] ont montré certaines variations entre les profils de synthèse des macromolécules ou encore dans l'expression de certaines métalloprotéases selon que les prélèvements intéressent la concavité ou la convexité de l'aorte ascendante. Malgré ces constatations, il ne nous est pas possible de savoir avec précision d'où proviennent les différentes biopsies. Cette limitation est aussi à relativiser au regard des faibles dimensions de l'aorte ascendante, la distance maximum concernant les sites de prélèvement ne pouvant être que de deux à trois centimètres tout au plus. D'autre part, de nombreuses expériences préliminaires et l'analyse histopathologique des biopsies nous laissent à penser que l'altération de la paroi aortique est très diffuse au sein de l'aorte et qu'elle influe à elle seule de façon prépondérante sur les résultats de notre travail.

La conservation des échantillons, avant leur cryocongélation a fait l'objet de quelques discussions avec le service d'anatomocytologie du Pr Pluot. Nous avons essayé dans un premier temps de conserver les échantillons transitoirement dans du sérum physiologique à 4°C durant les quelques heures à quelques jours (week-end) les séparant de leur congélation à - 80°C. Les coupes histologiques réalisées montraient alors une forte altération des structures cellulaires alors que la charpente fibreuse ne semblait pas altérée, du moins optiquement. Nous avons opté pour une conservation dans une compresse humidifiée par du serum physiologique sans que la biopsie ne baigne dans le liquide.

Les coupes histologiques ont alors montré une architecture normale des fibres associées à une conservation des structures cellulaires, même si une certaine décellularisation était observée du fait de l'anévrisme lui-même.

1.2. Concernant les biopsies provenant d'aortes « témoins »

Par convention, ces biopsies ont été considérées comme « normales » du fait d'un diamètre aortique normal pour l'âge et le sexe du patient. Pourtant, il est possible que sur cette série, certains patients, s'ils avaient survécus, auraient pu présenter une dilatation anévrysmale de l'aorte. Ce paramètre nous semble important dans l'interprétation des résultats des différentes expérimentations que nous avons réalisées. Par conséquent, nous avons pris en compte les antécédents et les facteurs de risque d'anévrisme que présentaient ces patients dans les différentes interprétations.

A la différence des aortes anévrysmales, le site de prélèvement des biopsies aortiques était ici très standardisé. Dans l'ensemble des cas, la biopsie était réalisée lors du prélèvement d'allogreffe aortique comprenant la valve aortique et l'aorte ascendante. La biopsie emportait alors un anneau d'aorte ascendante dans sa partie terminale, juste avant le *tronc artériel brachio-cephalique*. Par contre après réalisation des bandelettes de tissu nécessaire à la congélation, la localisation exacte de la coupe est impossible.

Malgré ces quelques limitations préalables, nous restons persuadés que quelque soit le site de prélèvement au niveau de l'aorte ascendante, les altérations que nous cherchons à caractériser sont diffuses et touchent probablement aussi d'autres tissus comme cela a déjà été démontré cliniquement [77] et biologiquement [78] dans certaines pathologies des réseaux fibrillaires aortiques (collagène, élastine ou glycoprotéines).

Par ailleurs, les techniques de conservation et de préparation des échantillons étaient identiques en tout point avec celles utilisées pour les biopsies provenant d'anévrismes.

1.3. Observation des coupes aortiques en microscopie optique

Comme nous l'avons précédemment décrit, l'aorte est un tissu dense présentant une architecture lamellaire. Pour déterminer l'épaisseur optimale des coupes que nous allons utiliser, nous avons associé à l'observation visuelle en microscopie conventionnelle, des acquisitions en spectrométrie infrarouge. En effet, cette dernière reposant sur la possibilité du rayonnement infrarouge à traverser le tissu, l'épaisseur des coupes constitue un facteur important de l'expérimentation. Au début de notre expérimentation, ces tests, réalisés sur le spectromètre Equinox 55 associé à l'IRscope II, ont permis de définir un juste compromis pour cet appareillage. Nous avons réalisé des coupes à 5, 7, 10, 15, 20 et 25 μm d'épaisseur pour déterminer laquelle présentait la meilleure association entre conservation de l'architecture du tissu aortique et intensité du signal transmis.

Pour les coupes de 5 μm , l'étape des coupes fines a été suffisante pour se rendre compte que le tissu aortique, en particulier pour les aortes anévrysmales, ne présentait pas une épaisseur suffisante pour conserver sa cohésion. De très nombreuses déchirures associées à des difficultés à déposer l'échantillon sur les fenêtres de ZnSe, nous ont fait rapidement abandonner cette épaisseur de coupe.

Si les coupes à 15, 20 et 25 μm conservaient parfaitement l'architecture de la paroi aortique, elles ne permettaient pas l'obtention d'un bon signal infrarouge du fait d'un faisceau transmis au détecteur trop faible.

Restaient alors les coupes de 7 et 10 μm d'épaisseur. Les premières ont finalement été utilisées pour l'expérimentation avec le spectromètre Equinox car elles permettaient d'avoir un bon signal et une cohésion de l'échantillon jugée correcte lors des premières séries d'analyse. En effet, pour les anévrysmes quelques « trous » étaient visualisables lors des observations optiques. Deux raisons peuvent expliquer ces « trous » : la première est l'épaisseur des coupes comparée à la taille des cellules musculaires lisses. En effet, les cellules musculaires lisses, dans leur phénotype sécrétoire ou lors de leur transformation en cellules spumeuses peuvent atteindre plus de 50 à 75 μm dans leur plus grande dimension. On comprend donc que les cellules sont littéralement coupées en deux lors de la réalisation de ces coupes fines, fragilisant alors le tissu.

La deuxième raison est liée au fait que, comme nous l'avons exposé, l'anévrisme est défini par une altération de ces constituants fibrillaires, par une décellularisation et par la perte des liaisons entre les cellules restantes et la matrice extracellulaire. Ces constatations rendent plausible le fait que ces déchirures localisées ne soient que le reflet de ces altérations et non un artéfact lié à la technique de coupe. Devant ces « trous » ou régions optiquement vides pouvant gêner l'interprétation des résultats, la réalisation de mesures de référence lors des acquisitions a permis d'éliminer le signal du support pour ne conserver que celui appartenant au tissu. Ceci permet à la simple visualisation des spectres de savoir si la zone comporte un signal suffisant avec un rapport signal sur bruit acceptable. Lors de notre expérimentation initiale en mode point par point, les spectres manifestement altérés ou ne présentant que du bruit ont été exclus des analyses et du spectre moyen. Ceci était possible en raison du nombre de spectres ne dépassant pas 200 à 250 par échantillon.

Pour les expériences menées avec l'imageur Spotlight, le nombre de spectres générés étant beaucoup plus important, il était impossible de réaliser cette analyse visuelle. La visualisation tridimensionnelle des images pré-traitées permet une appréciation des zones altérées. En effet, l'étude directe des images ou de certains rapports de bandes permet de localiser ces zones tissulaires altérées représentées comme autant de pics de forte intensité, positif ou négatif, très aisément visualisables sur les représentations 3D (figure 38).

Finalement plus qu'un facteur gênant, nous avons considéré ce critère comme un paramètre à part entière lors de l'analyse des résultats. Pour autant, les acquisitions présentant une trop grande densité de déchirures ont été exclues de l'analyse et de nouvelles ont été réalisées sur des régions moins altérées ou sur de nouvelles coupes.

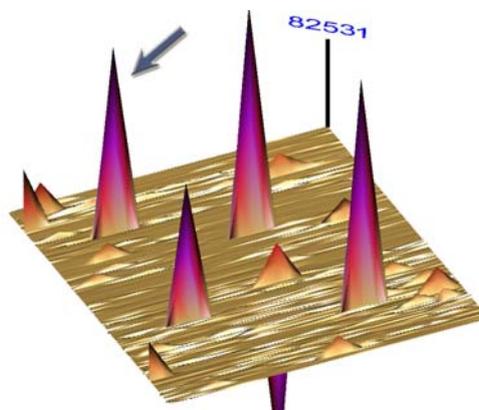


FIGURE 38 : REPRESENTATION TRIDIMENSIONNELLE D'UN RAPPORT DE BANDE SPECTRALE D'UNE ACQUISITION INFRAROUGE (IMAGEUR SPOTLIGHT 300) LES PICS REPRESENTENT LES DECHIRURES DU TISSU

2. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN MODE TRANSMISSION/ABSORPTION

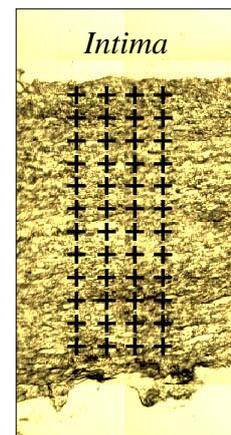
2.1. Etude infrarouge à l'aide du spectromètre Brucker Equinox 55

2.1.1 Description spectrale du tissu aortique normal

2.1.1.1 Introduction à l'étude infrarouge du tissu aortique normal

Au début de notre expérience et en raison de l'absence totale d'étude utilisant la spectroscopie comme méthode d'analyse du tissu aortique, il nous a été nécessaire de « décrire » le tissu aortique normal via cette technique. Seules quelques publications préalables avaient rapporté des descriptions spectroscopiques de la plaque athéromateuse sans jamais décrire le tissu aortique environnant.

Pour ce faire nous avons réalisé des acquisitions prenant l'ensemble de l'épaisseur de la paroi aortique, depuis l'intima jusqu'à l'approche de l'adventice. Les acquisitions réalisées avec le spectromètre Equinox 55 et le microscope IRscope II sont réalisées selon des positions préalablement définies par l'opérateur (repérage des positions par des marques sur l'image visible). Ce repérage visuel permet de ne réaliser ces acquisitions spectroscopiques que sur des zones ne présentant aucune altération, poussière ou tout autre facteur pouvant gêner les mesures. (FIGURE 39 : REPERAGE VISUEL DES ZONES D'ACQUISITION) ci contre.



Les premières acquisitions réalisées ont permis d'obtenir les premiers blocs de données spectrales du tissu aortique. La figure ci-dessous illustre comment sont présentées les données à l'état brut. Les spectres sont assemblés dans l'ordre d'acquisition sous forme d'un bloc qui ne peut être traité tel quel (figure 39).

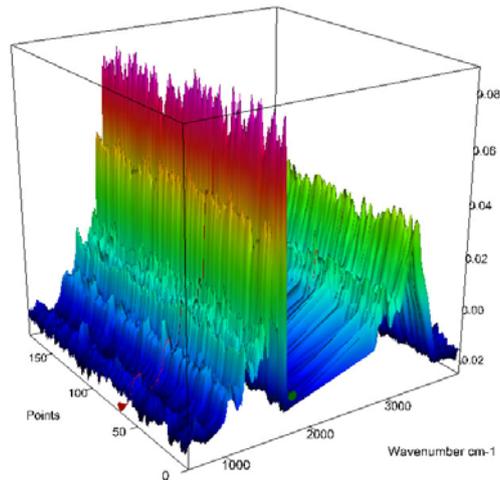


FIGURE 40 : BLOC DE DONNEES PRODUIT PAR L'ACQUISITION DES SPECTRES
AUX POSITIONS DEFINIES PAR L'OPERATEUR

En observant cette représentation graphique on remarque des variations, parfois marquées, de l'intensité de certains pics. Pourtant, cette analyse visuelle des spectres sur le bloc de données ne doit pas aller plus loin que cette simple appréciation du fait de l'absence totale de prétraitement rendant l'interprétation impossible. Il est donc nécessaire d'extraire les spectres individuels qui seront alors enregistrés de façon incrémentielle en conservant l'ordre des acquisitions. De plus un fichier d'information est associé à chaque spectre permettant de connaître les paramètres d'acquisition et les coordonnées relatives. Le spectre brut ainsi obtenu est représenté ci-dessous.

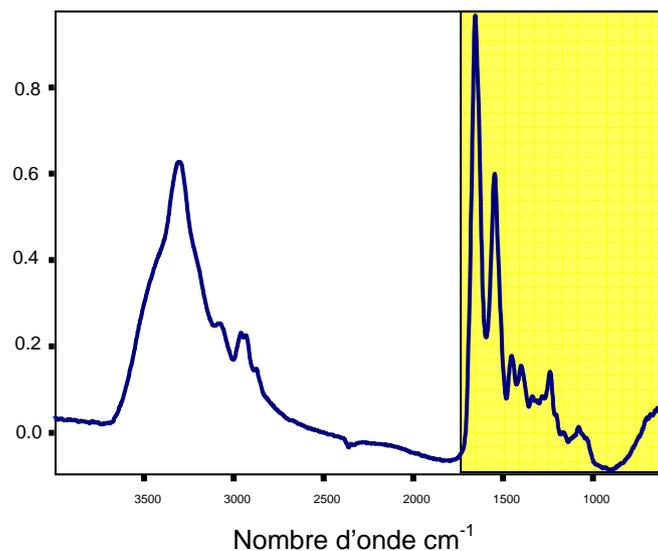


FIGURE 41 : SPECTRE INFRAROUGE BRUT DU TISSU AORTIQUE (4000-650 cm^{-1})

En jaune, la zone d'intérêt de nos travaux

On retrouve un spectre brut familier aux spectroscopistes travaillant sur des échantillons biologiques avec le massif des lipides au delà de 2800 cm^{-1} , les bandes amides I, II, III des protéines entre 1700 et 1230 cm^{-1} et la région plus spécifique des oses entre 1230 et 900 cm^{-1} .

La région comprise entre le pied de la bande Amide I et le massif lipidique ne comporte pas d'information spectrale en dehors du signal à 1940 cm^{-1} en rapport avec les conditions atmosphériques (vapeur d'eau).

Recherchant des modifications principalement en rapport avec les protéines présentes dans le tissu aortique, nous avons décidé d'utiliser la zone spectrale comprise entre 1720 et 650 cm^{-1} . Pourtant, certaines études, entre autre initiées par Puppels, ont montré que la région spectrale du massif lipidique comportait de nombreuses informations utiles au diagnostic biologique. En dépit de ces démonstrations, les recouvrements multiples des bandes spectrales et l'implication forte des lipides dans certaines pathologies vasculaires autres que les anévrysmes nous ont fait préférer la région des protéines et des oses, même si certaines parties de cette gamme spectrale restent en partie influencées par certains lipides.

Comme on peut le visualiser dans le tableau ci-dessous (XII), les pics d'absorption du collagène et de l'élastine se trouvent principalement dans la gamme spectrale que nous avons décidé d'utiliser. On remarque aussi que les nombres d'onde des pics de l'*élastine*, du *collagène* et du tissu aortique sont très proches confirmant, s'il en était encore besoin, la prépondérance de ces deux macromolécules au sein de la paroi aortique. Les similitudes entre *collagène* et *élastine* reflètent simplement le fait que ces deux macromolécules sont composées d'acides aminés présentant pour la plupart les mêmes liaisons (Figure 42). On remarque certaines variations expliquées par des compositions différentes en acides aminés (cf. descriptions) et par les structures secondaires différentes entre ces deux macromolécules. Enfin, certains pics du collagène et/ou de l'élastine ne sont pas retrouvés dans le spectre du tissu aortique. Ceci s'explique simplement par la superposition des différentes contributions provenant d'autres molécules masquant les pics les moins marqués ou ne créant simplement qu'un épaulement sur un pic existant.

TABEAU XII : PICS DE SPECTRES INFRAROUGES DU TISSU AORTIQUE NORMAL, DU COLLAGENE ET DE L'ELASTINE BASES SUR L'ANALYSE DES DERIVES SECONDES DE LEUR SPECTRE RESPECTIFS

Principales bandes spectrales	Pics du tissu aortique (cm ⁻¹)	Pics du collagène (cm ⁻¹)	Pics de l'elastine (cm ⁻¹)
	1694	1695	1693
<i>Amide I</i>	1681	1678 faible	1680
	1658	1662	1657
	1637	1635	1638
	1629	-	1630
	1609	-	1609
	1594	1594	1593
<i>Amide II</i>	1584	1584	1584
	1566	1564	1566
	1553	1555	-
	1546	1542	1547
	1535	1531	1535
	1511	1515	1513
	1499	1498	1499
	1481	1481	1481
	1468	1467	1467
	1452	1452	1451
	1440	1441	1441
	1404	1404	1404
	1385	-	1384
	1368	1376	1369
1335	1336	1334	
1306	1315	1305	
<i>Amide III</i>	1281	1284	1280
	1234	1234	1234
	1202	1203	1202
	1167	1168	1162
	1104	1103	1104
	1081	1082	1080
	1061	1062	1061
	1048	1048	1047
1028	1031	1029	

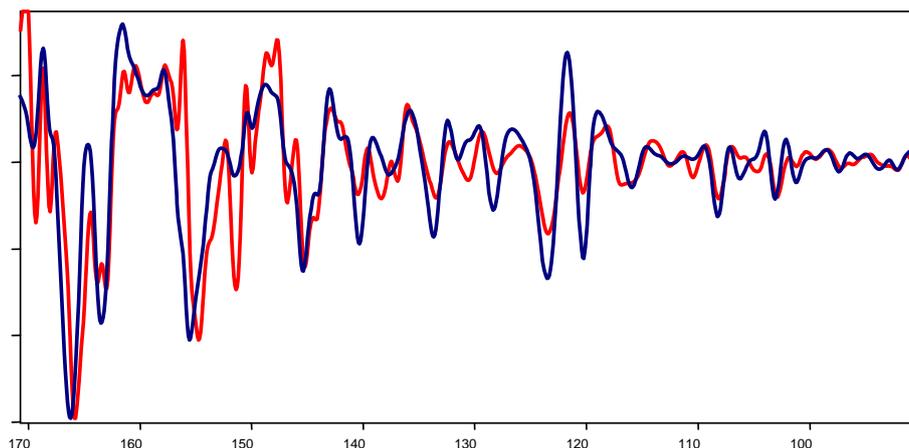


FIGURE 42 : DERIVEES SECONDE DU COLLAGENE (BLEU) ET DE L'ELASTINE (ROUGE)

Il est à noter que ces spectres proviennent d'extractions d'élastine et de collagène de Rat dont les structures sont relativement similaires à celles retrouvées chez l'homme. Malheureusement, ces données concernant des tissus humains n'ont jamais fait, à ce jour, l'objet de publication permettant de connaître avec précision les différents pics de ces macromolécules chez l'Homme. Nous avons donc utilisé les données spectrales provenant d'expérimentations animales dans l'attente de réaliser des extractions / purifications dans un proche avenir. D'autre part, les acquisitions spectrales infrarouges de ces composés ont été réalisées sur des composés à l'état solide, sous forme de poudre emprisonnée dans des pastilles de KBr. Ce dernier est un sel en poudre, transparent aux rayonnements infrarouges, qui a la propriété de former un cristal solide et manipulable quand il est pressé à la pression de 1000 Newtons. Les conditions d'analyse ne sont donc pas similaires et ces pics doivent alors être considérés comme des indicateurs plus que comme des valeurs de référence immuables.

2.1.1.2 Etude infrarouge d'un échantillon selon la zone d'acquisition

a. Conditions d'acquisition

Avant de débiter cette expérimentation, nous nous sommes demandé où réaliser les mesures. Une question simple en apparence mais qui en sous-tendait une autre : est-ce que l'information spectrale est uniforme dans un échantillon ? A la réflexion, il était fort probable que les changements de composition dans l'épaisseur du tissu aortique devaient induire des variations d'absorption qu'il nous fallait donc quantifier.

Nous avons donc opté pour des acquisitions sur toute l'épaisseur de la paroi aortique représentant pour les tissus sains environ 1500 à 2000 μm . La zone d'acquisition en mode point par point était de 30 μm ce qui représente donc de 50 à 65 spectres par « colonne ». Généralement, la largeur de la zone d'acquisition permettait 3 à 5 « colonnes » représentant donc de 90 à 150 μm de large.

Une fois les spectres acquis, prétraités nous avons supprimé manuellement les spectres manifestement anormaux ce qui représente environ 1 à 2 % de ceux initialement mesurés. La figure 43 illustre cette étape fondamentale du prétraitement sans laquelle les résultats des classifications hiérarchiques ou des ACP sont particulièrement décevants. Les deux spectres rouges, très éloignés de l'ensemble des autres spectres ne seront pas utilisés lors des traitements ultérieurs.

Dans ces deux cas il est probable que des anomalies optiques soient à l'origine de ces déformations. Après vérification, les deux spectres sont consécutifs et représentent une zone d'acquisition altérée où, de plus, le tissu n'est pas parfaitement horizontal (plan de focalisation).

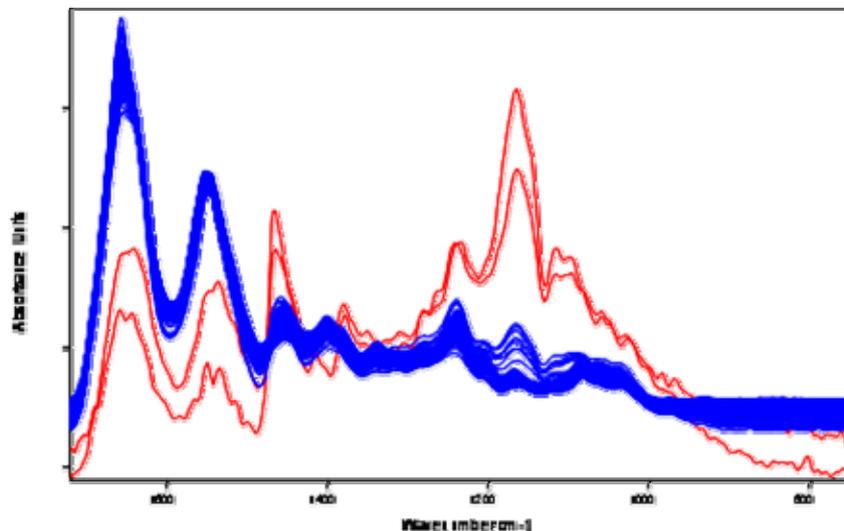


FIGURE 43 : REPERAGE ET ELIMINATIONS DES SPECTRES ALTERES LORS DU PRETRAITEMENT

Bien que la sélection des spectres à éliminer soit non automatisée et donc en partie subjective, il ne nous est pas apparu que ceci pouvait particulièrement influencer sur les résultats alors que leur conservation pouvait induire des erreurs dans le traitement des données.

En effet, le poids représenté par ces quelques spectres sur des acquisitions en comportant plus de 200 ne semble pas important.

Nous nous sommes fixés un seuil maximum de 5 % au-delà duquel l'acquisition ne pouvait pas être considérée comme utilisable. De ce fait, deux échantillons, où plus de la moitié des spectres étaient altérés, n'ont pas été pris en compte et de nouvelles acquisitions ont alors été réalisées.

b. Variabilité des spectres en fonction de la profondeur dans l'échantillon

Dès l'observation visuelle des spectres extraits à la suite d'acquisition sur l'épaisseur du tissu, on remarque une certaine hétérogénéité sur l'ensemble de la gamme spectrale. Pour essayer de quantifier cette hétérogénéité nous avons réalisé la classification hiérarchique ascendante et des analyses en composantes principales basées sur l'ensemble des spectres d'une acquisition.

Pour l'ensemble des échantillons considérés comme normaux nous avons observé une hétérogénéité certes importante mais sous tendue par une segmentation plus ou moins marquée en trois régions au sein de la paroi aortique. Même si ces dernières suivent globalement la description histologique du tissu aortique on remarque pourtant quelques variations.

La représentation graphique suivante (Figure 44) a été réalisée en attribuant des couleurs arbitraires aux différentes branches d'une classification hiérarchique réalisée sur l'ensemble des spectres d'un échantillon.

Les positions respectives des acquisitions spectrales ont été respectées sur cette représentation.

40	80	120	160	200
39	79	119	159	199
38	78	118	158	198
37	77	117	157	197
36	76	116	156	196
35	75	115	155	195
34	74	114	154	194
33	73	113	153	193
32	72	112	152	192
31	71	111	151	191
30	70	110	150	190
29	69	109	149	189
28	68	108	148	188
27	67	107	147	187
26	66	106	146	186
25	65	105	145	185
24	64	104	144	184
23	63	103	143	183
22	62	102	142	182
21	61	101	141	181
20	60	100	140	180
19	59	99	139	179
18	58	98	138	178
17	57	97	137	177
16	56	96	136	176
15	55	95	135	175
14	54	94	134	174
13	53	93	133	173
12	52	92	132	172
11	51	91	131	171
10	50	90	130	170
9	49	89	129	169
8	48	88	128	168
7	47	87	127	167
6	46	86	126	166
5	45	85	125	165
4	44	84	124	164
3	43	83	123	163
2	42	82	122	162
1	41	81	121	161

FIGURE 44 : REPRESENTATION EN COULEUR ARBITRAIRE DES DEUX BRAS DE LA CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES 200 SPECTRES D'UN ECHANTILLON NORMAL (dérivée seconde des bandes amides I à III)

On distingue clairement que le tissu est traversé par une zone centrale distincte. Elle correspond à la zone centrale de la média aortique contenant collagène et élastine en quantité. Les zones périphériques, sont topographiquement distinctes sur cette représentation alors qu'elles sont associées dans un bras de la classification hiérarchique. On peut donc en conclure que leur composition respective sont plus proches l'une de l'autre que de celle de la zone centrale. Si l'on se réfère à la composition biochimique de la paroi aortique, il semble que ces deux zones périphériques correspondent à des régions plus riches en collagène qu'en élastine (sous endothélium et jonction média-adventice).

Lorsque l'on marque les spectres appartenant aux différents bras de la classification hierarchique basée sur les dérivées secondes, on observe des classes bien individualisées pouvant correspondre à des compositions protéiques différentes (Figure 45).

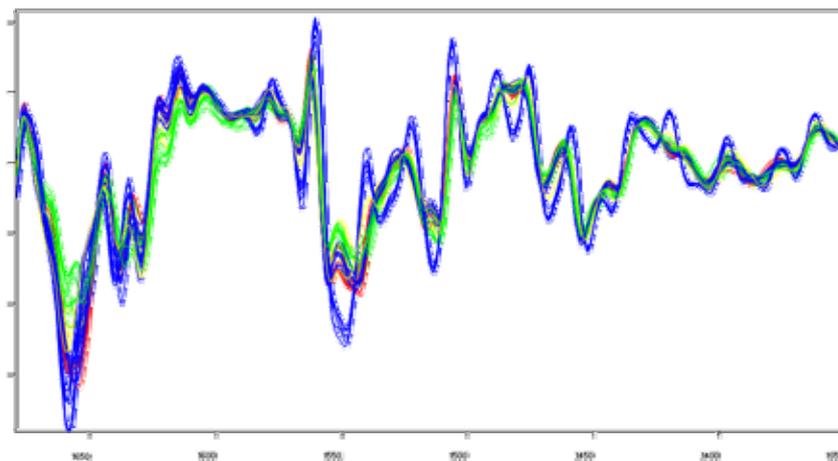


FIGURE 45: VISUALISATION DES DIFFERENTS SPECTRES AU SEIN DE L'ÉPAISSEUR DU TISSU AORTIQUE

Remarquez un groupe (en bleu) se détachant nettement des autres spectres

D'autre part, lorsque l'on teste spécifiquement la région des oses ($1250-900\text{ cm}^{-1}$) on ne remarque pas de tendance particulière au sein du tissu. La distribution se fait par petits groupes de 5 à 10 spectres colocalisés ayant la même hétérogénéité avec les groupes contigus qu'avec des groupes plus éloignés. La visualisation des dérivées secondes confirme ces observations (Figure 45). En réalisant les mêmes analyses sur l'ensemble des échantillons normaux nous avons retrouvé des résultats similaires même si dans un cas on obtenait systématiquement une quatrième bande proche de l'intima. L'analyse de ces spectres a retrouvé un pic à 1715 cm^{-1} qui correspond aux formes estérifiées du cholestérol. D'autre part, on retrouvait des variations plus marquées concernant les oses dans cette région. Lors du prélèvement, il avait été signalé que l'aorte présentait un athérome léger expliquant les perturbations spectrales visualisées tant au niveau des lipides que des glucides.

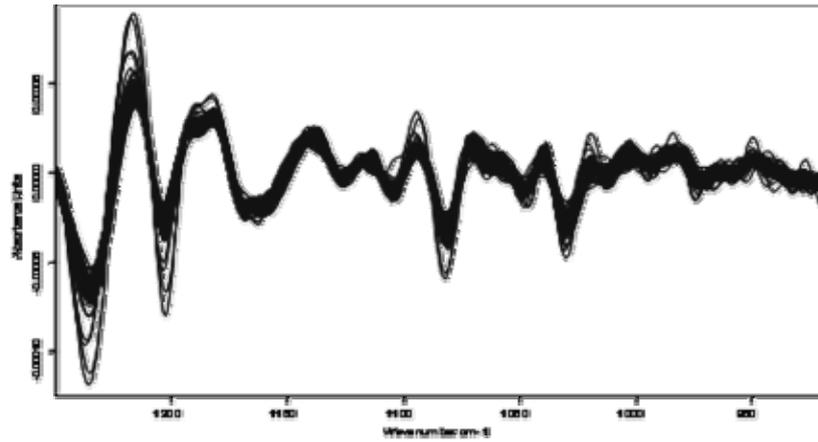


FIGURE 46 : DERIVEES SECONDES DE L'ENSEMBLE DES SPECTRES D'UN ECHANTILLON DANS LA REGION SPECTRALE 1250-900 cm^{-1}

c. Variabilité des spectres en fonction de la position longitudinale sur l'échantillon

A l'inverse de ce que l'on retrouve en analysant l'échantillon dans sa profondeur, les spectres acquis sur une bande longitudinale de tissu aortique présentent une homogénéité certaine. Pour s'en convaincre nous avons « moyenné » 5 spectres consécutifs pour limiter les différences interspectres à des profondeurs différentes et sur différentes colonnes d'une même acquisition (Figure 47). Puis nous avons réalisé une classification hiérarchique (Figure 48) s'appuyant sur trois moyennes de zone par profondeur (quatre pour la région sous intimale).

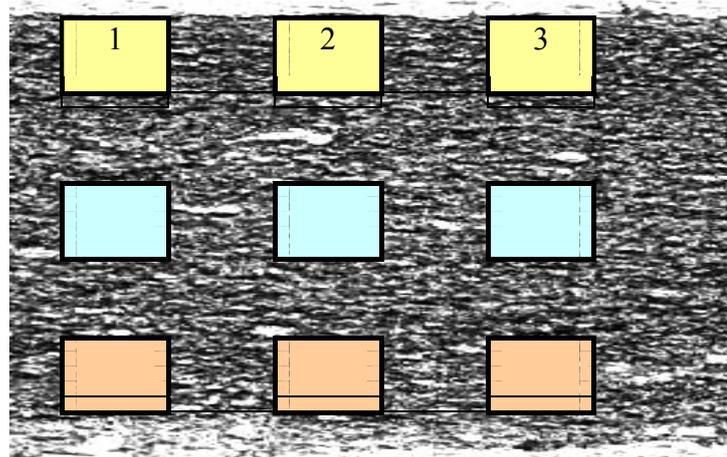


FIGURE 47 : VISUALISATION DES ZONES D'ACQUISITION UTILISEES DANS LA PROFONDEUR DU-TISSU AORTIQUE. L'INTIMA EST PAR CONVENTION EN HAUT ET L'ADVENTICE EN BAS

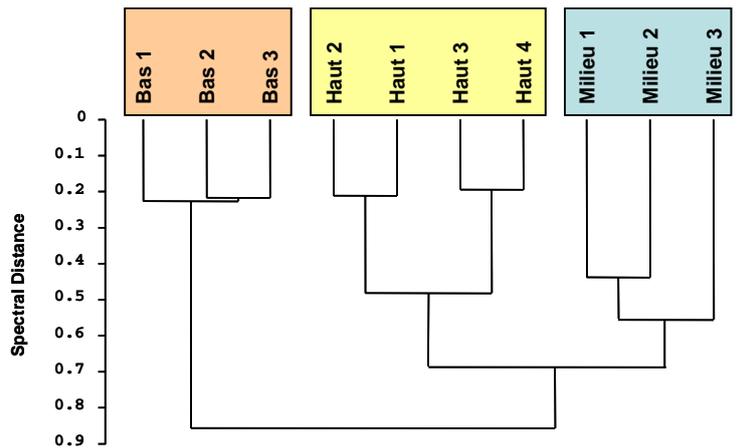


FIGURE 48 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DE MOYENNES REALISEES PRES DE L'INTIMA (*HAUT*), EN PLEINE MEDIA (*MILIEU*) ET PROCHE DE L'ADVENTICE (*BAS*) SUR UN MÊME ECHANTILLON - SUR 1500-1000 CM⁻¹

Pour conclure sur cette description de l'architecture spectrale du tissu aortique normal, on observe une hétérogénéité dans la profondeur du tissu liée à la présence de couches successives au sein du tissu aortique. Ces dernières sont liées aux variations de composition dans la paroi aortique tant au niveau de la matrice extracellulaire que des cellules. Par contre et conformément à la description anatomopathologique, on observe une faible hétérogénéité longitudinale. Ces observations, finalement banales, expliquent pourquoi les analyses que nous réalisons au début de notre expérience n'arrivaient à aucune conclusion satisfaisante. En effet, nous comparions des acquisitions faites sur de petites zones et à des profondeurs différentes ce qui, dans certains cas, amplifiait les différences et dans d'autres provoquait la confusion la plus totale. Depuis nous utilisons des acquisitions sur l'ensemble de l'épaisseur du tissu permettant des comparaisons entre différents échantillons sur la base de l'ensemble des spectres ou de zones de profondeur équivalente.

Les résultats concernant l'ensemble des échantillons normaux seront relatés dans le chapitre traitant de l'analyse des images produites par l'imageur Spotlight 300. En effet, la totalité des acquisitions réalisées avec le spectromètre Equinox 55 ont été refaites avec l'imageur qui permet un plus grand nombre d'acquisitions pour un échantillon et un traitement spécifique des images.

2.1.2 Description spectrale du tissu aortique anévrysmal

Comme nous venons de le décrire pour les tissus normaux, on retrouve aussi une hétérogénéité au sein des tissus anévrysmaux liée aux changements de composition des différentes couches présentes dans le tissu aortique.

De la même façon, cette hétérogénéité spectrale est plus marquée dans la profondeur du tissu que dans le sens longitudinal. Pourtant, l'analogie s'arrête là, car le tissu aortique présente d'autres caractéristiques plus spécifiques liées aux modifications de structure et de composition de la paroi aortique anévrysmale. De plus de nombreux facteurs associés aux anévrysmes influent sur l'information spectrale contenue dans la paroi artérielle pathologique.

On citera bien sûr les hyperlipidémies et l'athérome, fréquemment associés aux anévrysmes aortiques, qui modifient la composition chimique de la paroi aortique. De multiples travaux ont décrit les lésions d'athérome qui se caractérisent en particulier par des dépôts plus ou moins confluents de lipides (en particulier de cholestérol estérifié) associés à des remaniements cellulaires (prolifération, nécrose et apoptose). Même si pour nos travaux, nous avons sélectionné des zones tissulaires ne présentant pas de lésions visibles d'athérome, il est certain que les modifications liées à cette lésion étaient présentes dans l'épaisseur de la plupart des tissus pathologiques.

L'observation des spectres provenant de telles biopsies renseigne rapidement sur la présence ou non de cholestérol estérifié. En effet, cette molécule présente de nombreux modes vibratoires en spectroscopie infrarouge mais donne en particulier naissance à un pic à 1740 cm^{-1} correspondant au mode ν de la liaison ester ($\text{C}=\text{O}$). Ce pic, localisé entre la fin de bande amide I (1720 cm^{-1}) et la zone « muette » en infrarouge comprise entre 2800 et 1760 cm^{-1} , est facilement visualisée sous la forme d'un pic individualisé plus ou moins imbriqué dans la bande Amide I. Certaines études portant sur la quantification du cholestérol estérifié ont d'ailleurs utilisé l'intégration de ce pic comparée à l'intégration d'une échelle d'étalonnage [79]. La figure qui suit illustre l'aspect et la position de ce spectre caractéristique des esters de cholestérol (Figure 49)

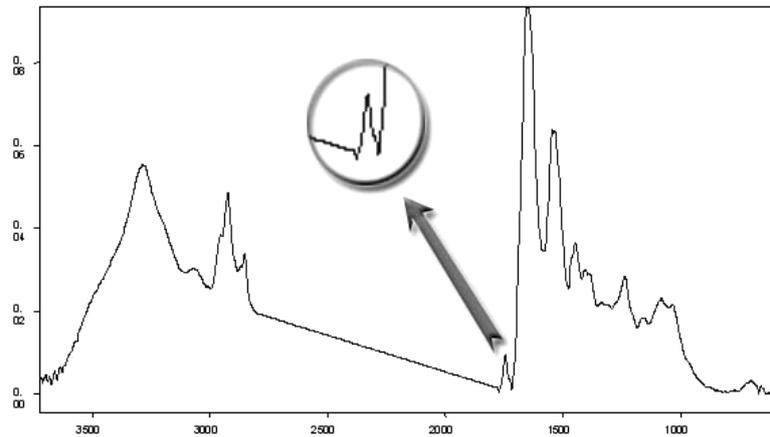


FIGURE 49 : VISUALISATION DU PIC CORRESPONDANT AU CHOLESTEROL ESTERIFIE (1740 cm^{-1})

Avant de faire ces constatations, nous utilisons une gamme spectrale comprise entre 1750 et 750 cm^{-1} , mais de nombreux essais de classification hiérarchique et d'analyse en composantes principales nous ont laissé penser qu'il fallait exclure ce pic pour ne pas introduire un critère supplémentaire susceptible d'orienter la classification entre aortes normales et anévrysmales. Suite à ces constatations, nous avons défini notre zone d'intérêt spectrale comme étant comprise entre 1720 et 750 cm^{-1} . Même si cette précaution est probablement utile, les traitements et classifications ont rarement été réalisés sur l'intégralité de ce spectre mais plutôt sur des zones sélectionnées.

Enfin, comme nous l'avons déjà signalé, d'autres facteurs influent sur la composition du tissu aortique. L'hypertension artérielle intervient au niveau de la média et engendre une médianécrose progressive accumulant des cellules nécrosées et l'accumulation de certains glucides. Pour cette raison, nous avons aussi restreint le spectre utilisé à la gamme spectrale $1720 - 900\text{ cm}^{-1}$ pour minimiser l'impact de ce paramètre sur nos résultats. Pourtant, il est impossible de totalement éliminer l'effet de l'hypertension puisque comme nous l'avons aussi relaté, les cellules musculaires lisses stimulées par l'hypertension peuvent changer de phénotype et produire du collagène et/ou certaines métalloprotéases. A terme, pour s'affranchir totalement de ce paramètre, il faudra un appariement des échantillons dans les différents groupes ce qui impliquera alors un plus grand nombre d'échantillons.

Enfin, l'hétérogénéité des tissus anévrysmaux est multifactorielle et comme le montre la classification hiérarchique (Figure 50) et l'ACP suivante (Figure 51), celle-ci est en général plus marquée pour les tissus anévrysmaux.

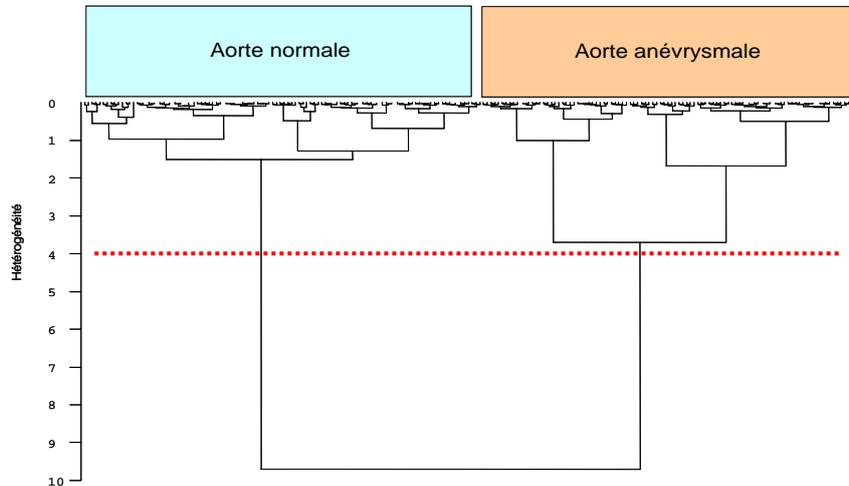


FIGURE 50 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DE DEUX ECHANTILLONS (NORMAL EN BLEU, ANEVRYSMAL EN ROUGE)

On remarque une hétérogénéité nettement supérieure pour l'anévrysmal (x2)

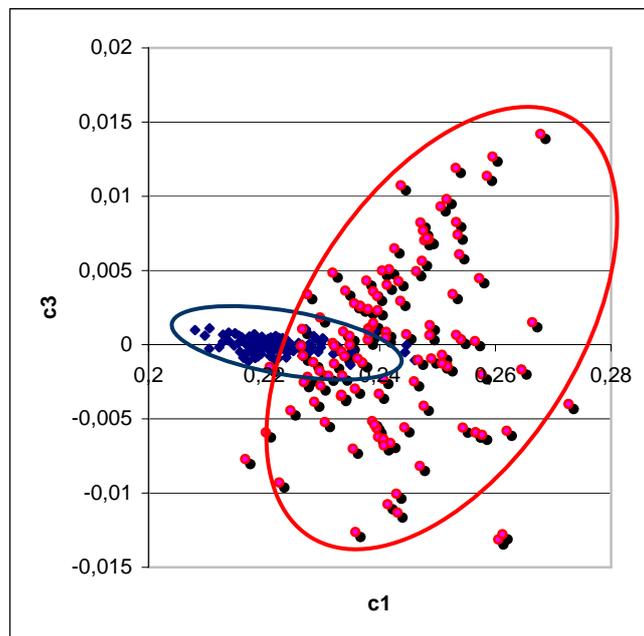


FIGURE 51 : ACP REPRESENTANT LES PREMIERE ET TROISIEME COMPOSANTES PRINCIPALES D'UN TISSU SAIN (BLEU) ET D'UN TISSU ANEVRYSMAL (ROUGE)

La dispersion des données illustre l'hétérogénéité tissulaire en fonction de ces composantes

2.1.3. Introduction des notions de moyenne spectrale et de déviation standard

Devant cette hétérogénéité spectrale relativement importante, en particulier pour ceux issus de l'analyse des aortes anévrysmales, il était important de trouver un moyen simple de décrire l'ensemble d'un tissu avec un seul spectre. Ce dernier devait synthétiser l'information spectrale tout en préservant les informations spécifiques de chaque tissu.

Pour ce faire, nous avons donc utilisé la moyenne de l'ensemble des spectres provenant d'une acquisition après avoir éliminé les spectres présentant une trop grande variance et avoir réalisé le prétraitement spectral habituel. Ce spectre moyen, produit dans le logiciel OPUS 3, est associé à un second spectre représentant la déviation standard des spectres par rapport à la moyenne calculée. De la même façon que précédemment la déviation standard qui représente la variabilité était toujours plus importante pour les tissus anévrysmaux (Figure 52).

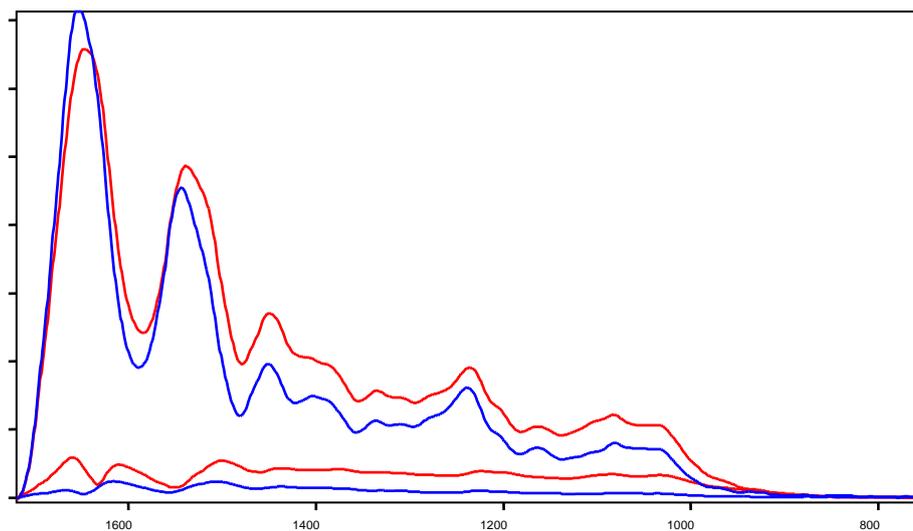


FIGURE 52 : COMPARAISON DES SPECTRES MOYENS D'ÉCHANTILLONS D'AORTE NORMALE (BLEU) ET ANEVRYSMALÉ (ROUGE) ASSOCIÉS À LEUR DÉVIATION STANDARD RESPECTIVE (EN BAS DE L'ILLUSTRATION)

L'utilisation des moyennes spectrales apporte indéniablement un confort important dans le traitement des données, pourtant il est fort probable que l'emploi de telles moyennes lisse certaines variations spectrales intéressantes. L'utilisation de moyennes provenant des différentes couches du tissu aortique limite cette perte d'information mais rend le traitement des données plus complexe et les résultats plus aléatoires. En effet dans un nombre significatif de cas, les moyennes de deux média aortiques provenant d'échantillons différents étaient plus semblables que la média et la région sous-intimale d'un même échantillon.

2.1.4. Analyses des résultats des échantillons normaux en spectroscopie « point par point »

Les 9 échantillons normaux que nous avons utilisés lors de cette étude nous ont permis de réaliser un total de 32 acquisitions. Trois acquisitions se sont révélées inutilisables du fait d'un rapport signal/bruit trop faible dans deux cas (lié à une mauvaise optimisation de l'énergie ou un défaut d'alignement) et d'un fichier informatique d'acquisition inutilisable.

Les 29 autres blocs d'acquisition ont permis d'établir le spectre moyen des échantillons normaux et sa variabilité. D'autre part, nous avons confronté ces spectres aux données dont nous avons connaissance pour ces différents échantillons. Malheureusement, la loi française ne permet pas au centre de prélèvement d'homogreffe de connaître l'identité des donneurs et donc d'accéder aux données médicales des patients. Pour chaque patient nous ne disposons que de leur âge et de leur sexe. Une démarche auprès de la coordination des prélèvements d'organes de notre hôpital est en cours pour avoir accès à certaines données sous couvert d'anonymat.

2.1.5. Analyses des résultats des échantillons anévrysmaux en spectroscopie « point par point »

Pour cette étude, nous avons utilisé 10 biopsies provenant d'anévrysmes de l'aorte ascendante sur lesquels nous avons réalisé vingt huit acquisitions selon le protocole et les paramètres déjà exposés. L'analyse des données brutes nous a permis d'éliminer 4 acquisitions ne présentant pas, dans un cas, un rapport signal sur bruit satisfaisant, et dans les trois autres, des mesures de référence correctes.

Pour ces derniers cas, la répétition des acquisitions n'a pas permis d'améliorer la qualité des références. Après quelques essais nous nous sommes rendu compte que les références, réalisées sur une zone optiquement vide à proximité de l'échantillon étaient en fait réalisées sur une coupe fine d'OCT entourant la biopsie. Cette sorte de colle est utilisée pour fixer les biopsies avant de réaliser les coupes au microtome. Dans ce cas, du fait de la petite taille de l'échantillon, la coupe a emporté le tissu et ce qui permettait de le fixer au support.

2.1.6. Etablissement des moyennes spectrales de l'ensemble des aortes normales et anévrysmales

Avant de produire la moyenne des deux catégories d'échantillons, il est intéressant de visualiser les différentes moyennes des deux groupes. On remarque visuellement quelques modifications de la forme ou de la position de certains pics entre ces deux catégories. La visualisation superposée des différentes moyennes (non illustrée) bien que d'interprétation difficile objective un « shift » ou décalage des bandes Amide I et II vers des nombres d'ondes plus petits associé à des variations d'amplitudes des pics sur l'ensemble de la gamme spectrale. D'autre part, subjectivement, il semble que les moyennes anévrysmales soient un peu plus hétérogènes que les spectres moyens normaux. (Figure 53) Cette impression sera d'ailleurs confirmée par l'analyse des spectres de déviation standard des moyennes pour les deux catégories (Figure 54).

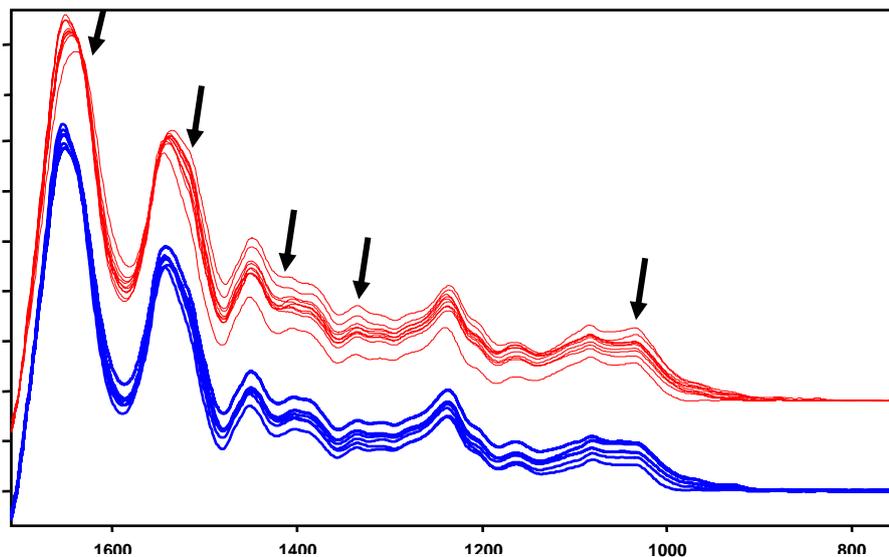


FIGURE 53 : VISUALISATION DES SPECTRES MOYENS DES ECHANTILLONS SAINS EN BLEU ET ANEVRYSMAL EN ROUGE. LES FLECHES MARQUENT LES DIFFERENCES VISIBLES.

Les spectres moyens normal et anévrysmal sont représentés sur l'illustration suivante associés à leur déviation standard respective. On remarque que ces moyennes confirment que les différences sont faibles. Pourtant, on observe des différences significatives au niveau des pics Amide I et II tant en position du pic qu'en intensité. Par ailleurs on remarque, après normalisation, des différences d'intensité sur la gamme spectrale 1500-950 cm^{-1} .

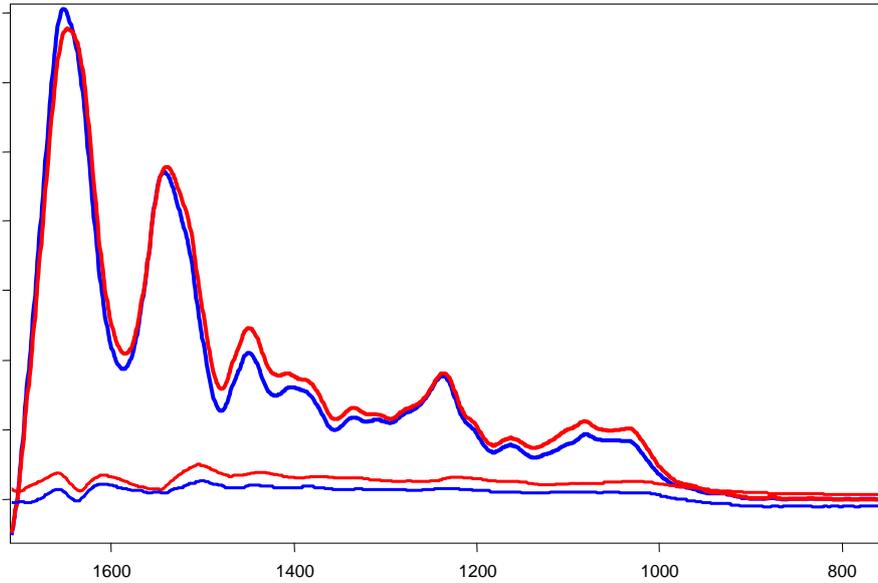


FIGURE 54 : MOYENNES SPECTRALES ET DEVIATION STANDARD (EN BAS) DES AORTES NORMALES (BLEU) ET DES AORTES ANEVRYSMALES (ROUGE)

L'analyse des spectres ne retrouve que de faibles différences qui semblent reproductibles sur l'ensemble des moyennes étudiées. Les dérivées secondes des deux moyennes permettent de décomposer les pics des spectres (figure 55).

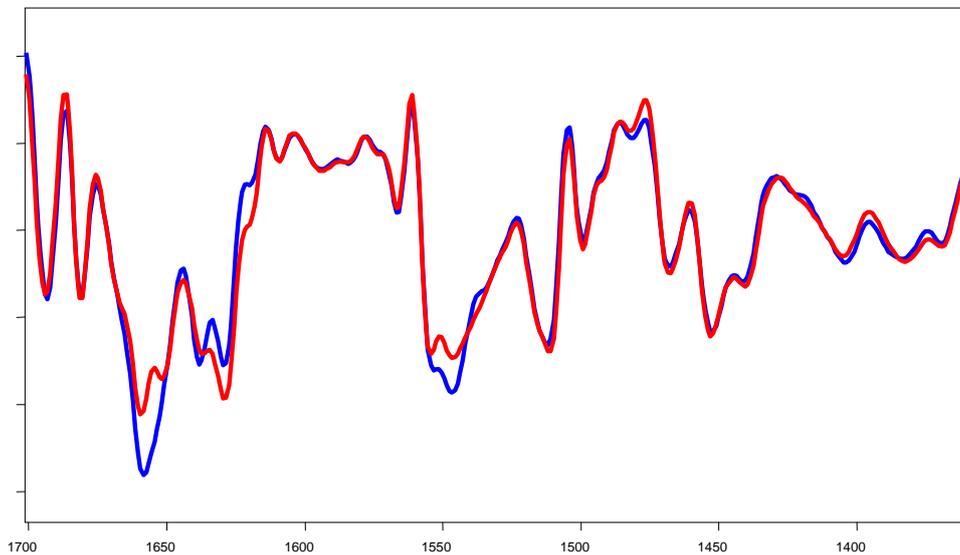


FIGURE 55 : DERIVEES SECONDE DES SPECTRES MOYENS (anévrismes : rouge, aortes normales : bleu)

Nous avons calculé plusieurs moyennes pour les groupes sains et anévrysmaux en considérant les différentes moyennes individuelles provenant de la répétition d'acquisitions pour chaque individu. On remarque une bonne reproductibilité de ces spectres. La bande Amide I présente les différences les plus significatives avec une décomposition en deux pics principaux eux même subdivisés. On note aussi que le pic présent à 1651 cm^{-1} pour les anévrysmes, en rouge, n'est pas visualisé sur les dérivées secondes d'aortes normales. En fait l'épaulement indiqué par la flèche sur la figure 56 représente ce pic qui est masqué par l'importance du pic voisin à 1659 cm^{-1} . La technique du curve fitting permettant d'attribuer les participations de chaque pic dans la forme du spectre pourrait ici être utile pour pousser plus avant l'analyse spectrale.

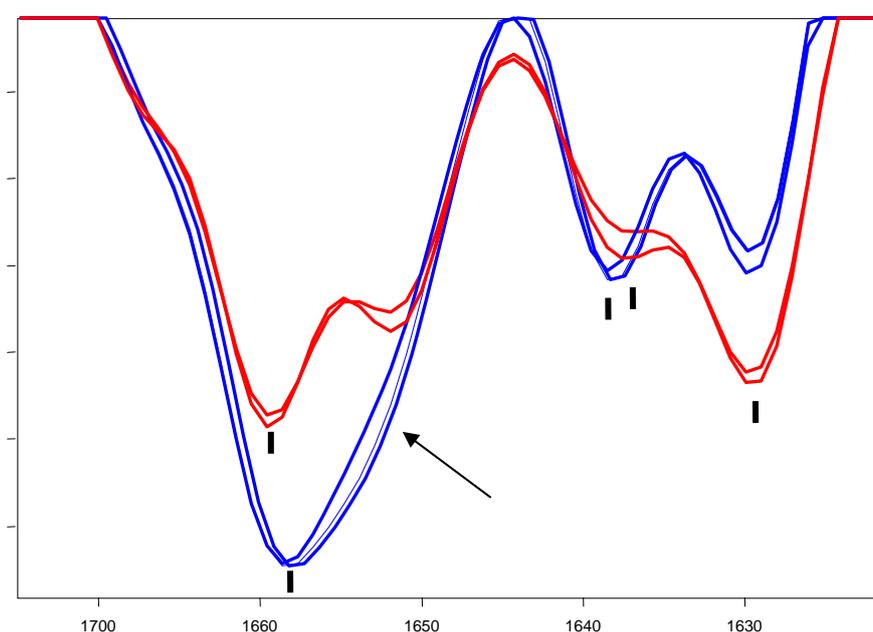


FIGURE 56 : DETAILS DE LA DECOMPOSITION PAR LA DERIVEE SECONDE DE LA BANDE AMIDE I DES MOYENNES NORMALES EN BLEU ET ANEVRYSMALES EN ROUGE

L'ensemble des pics s'établit comme décrit dans le tableau XIII pour les moyennes des aortes normales et anévrysmales. Les bandes grisées représentent les zones spectrales présentant des différences, même si ces dernières sont parfois faibles et probablement non significatives pour certaines.

TABLEAU XIII : PICS DES DERIVEES SECONDES DES MOYENNES DES ANEVRYSMES ET AORTES NORMALES
(L'ANALYSE MANUELLE)

Pics (dérivées secondes)	Normaux (cm ⁻¹)	Anévrysmes (cm ⁻¹)
	1694	1694
	1681	1681
Amide I	1659	1657
	-	1651
	1638	1636
	1629	1628
	1609	1609
	1566	1566
Amide II	1553	1553
	1546	1546
	1535	-
	1511	1511
	1499	1499
	1481	1482
	1467	1468
	1452	1452
	1440	1440
	1404	1404
	1385	1381
	1369	1369
	1334	1334
Amide III	1308	1305
	1282	1280
	1234	1232
	1202	1202
	1168	1168
	1159	1159
	1126	1126
	1103	1103
	1081	1081
	1049	1045
	1030	1030
	984	980

2.1.7. Analyse des moyennes spectrales des aortes normales et anévrysmales par classification hiérarchique ascendante et analyse en composante principale

Ces analyses ont été guidées dans un premier temps par notre étude des dérivées secondes des spectres moyens normaux et anévrysmaux. Dans un second temps nous avons utilisé le test de Student sur l'ensemble des spectres moyens de façon à identifier les zones spectrales les plus significatives et les utiliser pour réaliser le traitement de nos données.

2.1.7.1. Analyse des résultats des classifications hiérarchiques des spectres moyens

Les 19 moyennes spectrales représentant les 9 échantillons aortiques normaux et les 10 anévrysmes ont été utilisés pour réaliser ces traitements et classifications. Pour éliminer les différences liées aux conditions d'analyse, nous avons à nouveau corrigé la ligne de base, normalisé et dérivé les moyennes représentatives de chaque échantillon.

a. Analyses non guidées par le test de Student

L'analyse visuelle des spectres moyens des anévrysmes et des aortes normales

En comparant visuellement les spectres moyens de chaque catégorie, on peut faire plusieurs remarques :

- le pic de la bande Amide I est moins intense et légèrement shiftée vers la droite.
- le pic de la bande Amide II est légèrement plus important pour les anévrysmes
- l'absorbance globale entre 1500 et 1000 cm^{-1} semble plus importante pour les anévrysmes

Suite à ces constatations nous avons réalisé les classifications hiérarchiques prenant en compte ces régions ainsi que les spectres moyens complets entre 750 et 1710 cm^{-1} .

- La classification hiérarchique utilisant l'ensemble des spectres moyens, sans aucune sélection de gamme spectrale ou pondération permet de séparer les 10 anévrysmes dans un bras du dendrogramme comportant aussi 2 échantillons normaux. Le second bras ne comprend que les échantillons normaux.

Cette classification, même si elle admet 22 % d'erreur dans la classification des échantillons normaux, permet de classer correctement l'ensemble des anévrysmes. On peut alors définir la sensibilité du test vis-à-vis des anévrysmes qui est définie comme le nombre d'anévrysmes bien classé sur le nombre total d'anévrysmes et sa spécificité qui correspond au pourcentage d'anévrysmes dans le bras « anévrysmes ». La sensibilité de ce test vis-à-vis du diagnostic d'anévrysmes est donc de 100 % (10 sur 10) alors que sa spécificité est de 83 % (10 sur 12).

Compte tenu des remarques précédentes nous avons utilisé les zones précédemment citées pour construire de nouvelles classifications.

- Si l'on considère la bande Amide I entre 1700 et 1580 cm^{-1} , la classification hiérarchique dessine deux bras bien individualisés avec une hétérogénéité importante entre chaque bras. Par contre, celle observée au sein de chaque bras est comparativement assez faible. Le bras gauche de la classification porte l'ensemble des anévrysmes ainsi que deux aortes normales. La sensibilité de ce test appliquée à la détection des anévrysmes est donc maximum (100 %) et sa spécificité est de 83 %. Par contre, le bras des aortes normales emporte l'ensemble des échantillons normaux (Figure 57).

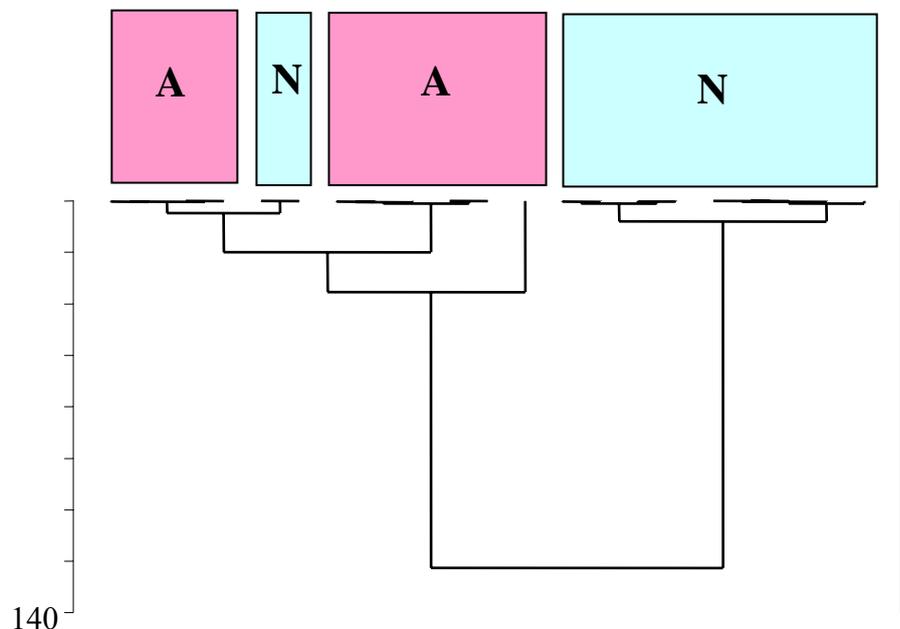


FIGURE 57 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES MOYENNES SPECTRALES DES ANEVRYSMES(A) ET DES AORTES NORMALES (N) UTILISANT LA BANDE AMIDE I

- Pour sa part et ce malgré des différences visibles, la zone Amide II comprise entre 1580 et 1480 cm^{-1} n'a permis la classification correcte que de 6 anévrysmes sur 10, soit une sensibilité de 60 %; par contre ces anévrysmes sont tous isolés dans le même bras ce qui porte la spécificité à 100 %.

- Enfin, en utilisant la large gamme spectrale 1500-1000 cm^{-1} , les résultats sont nettement améliorés avec une classification parfaite des anévrysmes et des tissus non dilatés, portant sensibilité et spécificité à 100 % (Figure 58). On remarquera une hétérogénéité importante entre les deux bras du dendrogramme confirmant le pouvoir discriminant de cette zone spectrale.

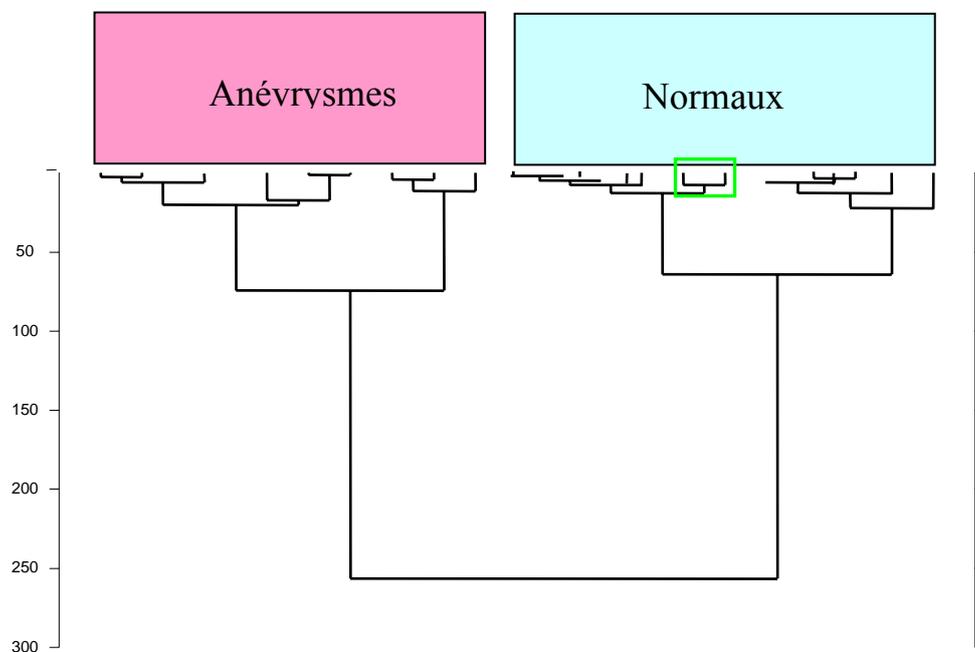


FIGURE 58 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES MOYENS DES ANEVRYSMES ET DES AORTES NORMALES UTILISANT LA GAMME SPECTRALE 1000-1500 CM^{-1}

Certes, cette classification semble principalement reposer sur l'intensité de l'absorbance qui peut être influencée par les conditions d'examen. Pourtant, plusieurs précautions ont été prises lors du pré-traitement pour ne pas fausser la classification.

La normalisation qui ramène l'intégralité du spectre (aire sous la courbe) à la même valeur pour tous les spectres, associée à une vérification manuelle de la correction de la ligne de base permettent de minimiser l'influence des conditions d'examen.

D'autre part, on peut remarquer que l'ensemble du spectre moyen n'est pas intéressé de la même façon par ces variations d'intensité d'absorption. Les bandes amides I et II varient en effet de façon antagoniste par rapport à la zone spectrale 1500-1000 cm^{-1} . On peut donc considérer ce paramètre comme n'étant pas lié aux conditions d'acquisition des spectres mais comme l'une des données caractérisant les spectres.

En marge de cette étude, nous avons incorporé deux autres spectres moyens, marqués par un carré vert (10 et 11^{ème} spectres « normaux »), issus d'un même patient qui a présenté une dissection aortique peropératoire au cours d'un remplacement valvulaire aortique alors que le diamètre de son aorte était normal. On constate simplement que les lésions qui ont été à l'origine de la dissection aortique (médianécrose ?) n'influencent pas la classification. Pourtant, le caractère très particulier et unique de ce cas ne permet d'établir aucune certitude.

b. Analyses guidées par le Student test

- Analyse des spectres

Le test de Student appliqué à l'ensemble des spectres moyens normaux et pathologiques a permis de dégager les zones les plus discriminantes entre aorte saines et anévrysmales.

Nous avons utilisé un test de Student bilatéral en raison de l'inégalité du nombre d'échantillons et des disparités de variance entre les deux groupes testés.

Les gammes spectrales discriminantes sont réunies dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV : ZONES SPECTRALES DISCRIMINANTES ISSUES DU TEST DE STUDENT APPLIQUE AUX COORDONNEES DES SPECTRES MOYENS AORTIQUES

Zones discriminantes du spectres avec $p > 0,01$ (cm^{-1})	Zones discriminantes du spectre avec $p > 0,05$ (cm^{-1})
	880-864
	1471-1449
1636-1618	1637-1570
1696-1647	1697-1645
	1709-1705

Les zones 880-864 et 1709-1705 n'ont pas été étudiées en raison de la position de la première sur le spectre et de l'étroitesse de la bande pour la seconde.

Suite à ces résultats, nous avons donc refait nos classifications hiérarchiques selon les régions spectrales précisées par le test de Student.

- en utilisant la région $1636-1618 \text{ cm}^{-1}$, on obtient une classification où le bras des anévrismes emporte 9 anévrismes sur 10. La sensibilité est donc de 90% et la spécificité de 100 % vis-à-vis des anévrismes. Pour sa part, le bras des échantillons normaux comporte les 9 aortes normales associées à l'un des anévrismes. Cette bande permet donc une discrimination correcte malgré l'erreur de classement de l'un des anévrismes (Figure 59). L'hétérogénéité entre les deux bras est moins importante qu'en utilisant la zone $1500-1000 \text{ cm}^{-1}$ mais l'homogénéité des groupes semble meilleure.

- Lorsque l'on sélectionne la gamme spectrale $1696-1647 \text{ cm}^{-1}$, on obtient alors la classification suivante (figure 60). On objective une discrimination parfaite des échantillons normaux et anévrysmaux associée à une hétérogénéité importante intergroupe alors que ces derniers sont relativement homogènes. Cette remarque sur l'hétérogénéité est importante car si la distance entre les groupes est grande cela signifie que le classement de futurs échantillons aura toutes les chances d'être correct.

En effet pour qu'un échantillon anévrysmal soit mal classé à l'avenir, son hétérogénéité devra être 4 à 5 fois supérieure à celle présentée par le groupe des anévrysmes ici présentée. Pour les échantillons normaux, la même remarque est possible avec cette fois un coefficient d'environ 10 entre les hétérogénéités liées au groupe et intergroupe.

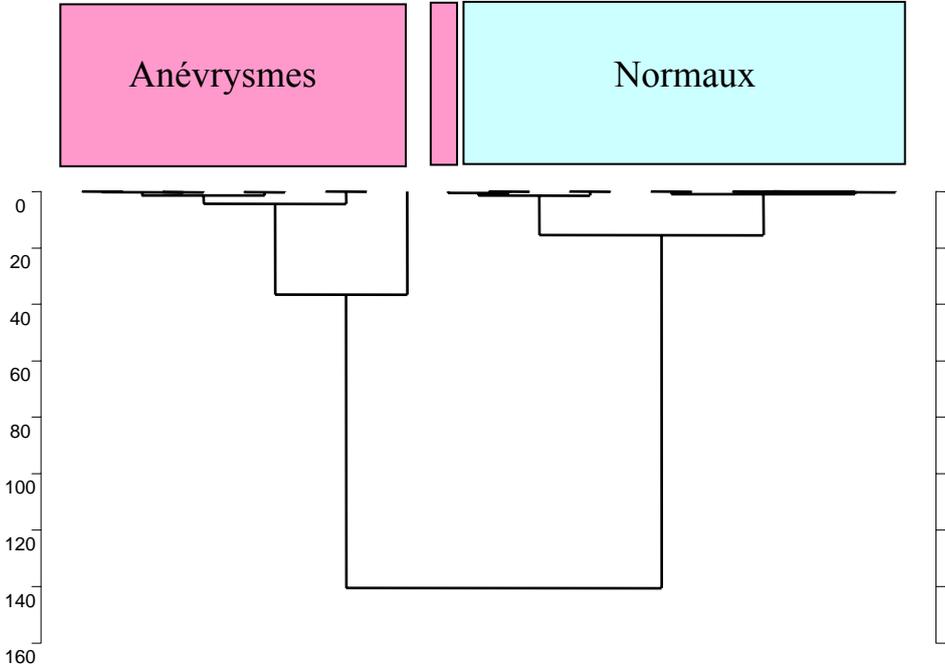


FIGURE 59 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES MOYENNES SPECTRALES UTILISANT LA GAMME 1636-1618 cm⁻¹

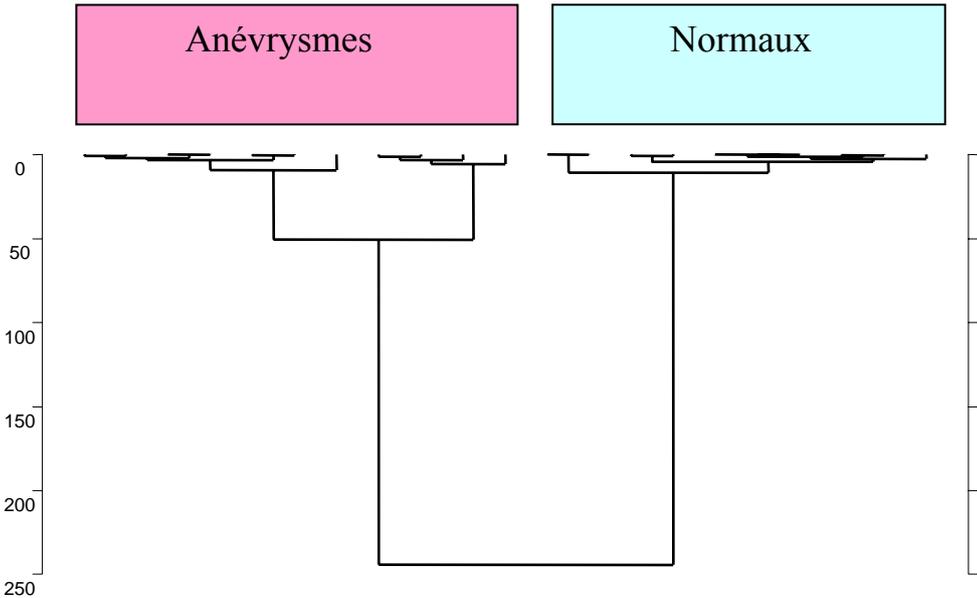


FIGURE 60 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES MOYENS SELON LA GAMME 1696-1647 cm⁻¹

-- enfin, les zones 1471-1449 et 1637-1570 cm^{-1} ont été testées avec pour la première une classification décevante puisque la sensibilité n'est que de 70 % et la spécificité de 58 %. Pour la gamme 1637-1570 cm^{-1} , la classification permet d'obtenir un bras ne comportant que des anévrismes (spécificité 100 %).

Pourtant, ce dernier ne comporte que 6 échantillons, faisant chuter la sensibilité à 60 %. En comparant avec les résultats obtenus en utilisant la gamme 1636-1618 cm^{-1} , on note que l'élargissement modéré la gamme spectrale utilisée peut considérablement dégrader les résultats des classifications.

Ceci tend à prouver que le seuil de significativité p inférieur à 0,01 que nous nous sommes fixé pour le test de Student permet d'améliorer nettement les classifications par rapport à un seuil à 0,05.

2.1.7.2. Analyse des résultats des classifications hiérarchiques des dérivées secondes

Pour déterminer les zones d'intérêt des dérivées secondes, nous avons appliqué, comme pour les spectres, un test de Student bilatéral. De nombreuses et petites zones spectrales ont présenté un p inférieur à 0,01. La figure 61 liste ces zones d'intérêt et permet de visualiser les bandes correspondantes sur la dérivée des moyennes normales. Du fait de la multitude des zones significatives nous n'avons conservé que les zones supérieures à 5 cm^{-1} . Sur cette même illustration, on visualise les variations du test de Student en fonction des nombres d'onde (partie droite de l'illustration). Pour une meilleure appréciation, l'échelle des ordonnées, correspondant aux valeurs du Student test, est représentée sous forme logarithmique.

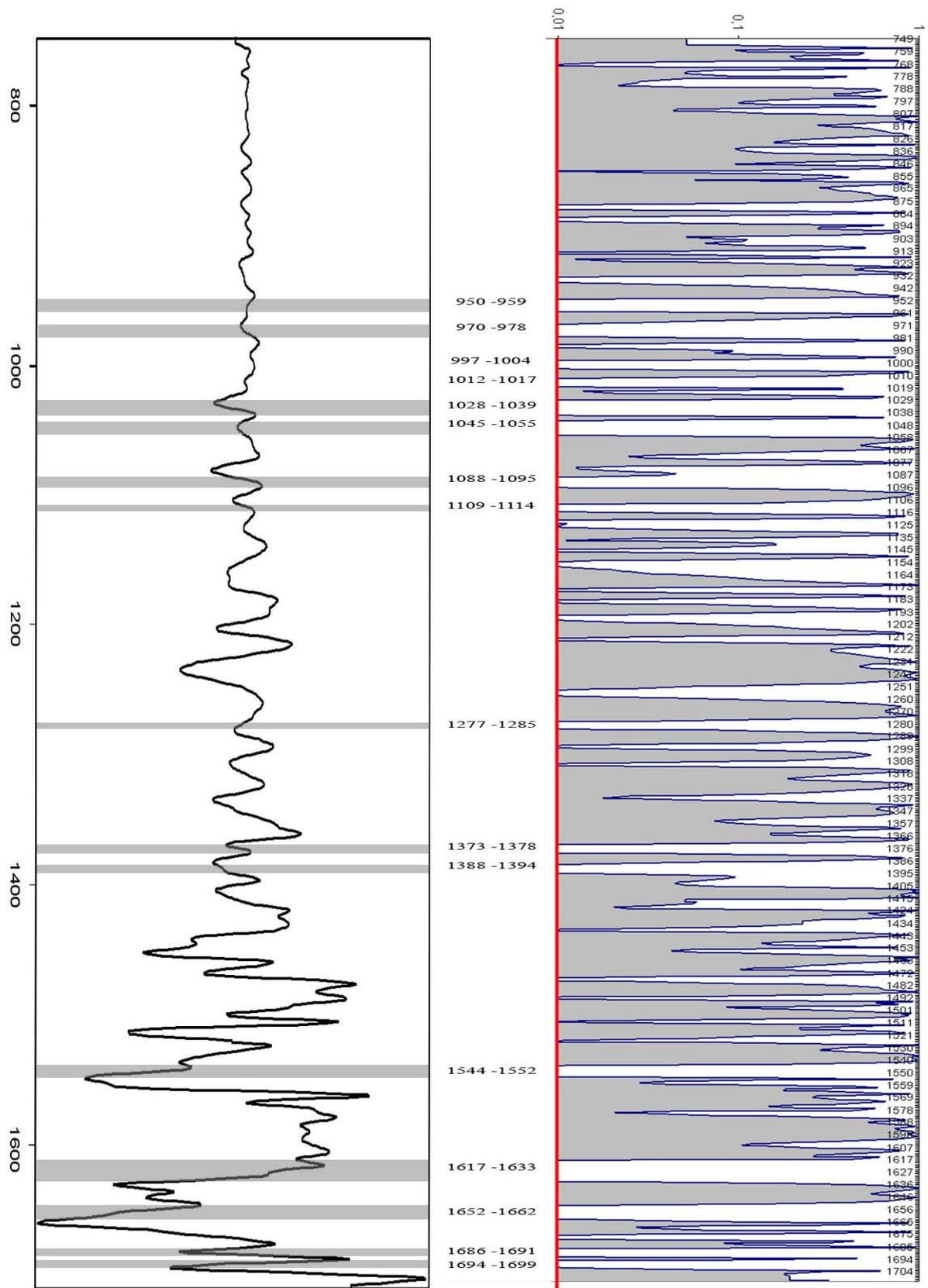


FIGURE 61 : BANDES SIGNIFICATIVES DES DERIVEES MOYENNES DES AORTES NORMALES ET ANEVRYSMALES (dérivée seconde à gauche et résultats logarithmiques du test de Student à droite)

Le tableau XV compile les différentes zones d'intérêt déterminées par le test de Student des dérivées secondes des spectres moyens :

**TABLEAU XV : RESULTAT DU STUDENT TEST DES DERIVEES SECONDES
DES MOYENNES NORMALES ET ANEVRYSMALES**

Gammes spectrales discriminantes (cm ⁻¹)	
950-959	1277-1285
970-978	1373-1378
997-1004	1388-1394
1012-1017	1544-1552
1028-1039	1617-1633
1045-1055	1652-1662
1088-1095	1686-1691
1109-1114	1694-1699

La réalisation de la classification hiérarchique associant l'ensemble des zones sus-citées ne permet d'obtenir qu'un dendrogramme déséquilibré. Le premier bras comporte 6 anévrysmes des 19 échantillons et le deuxième bras se subdivise en 3 sous ensembles dont deux sont exclusivement peuplés par des échantillons normaux alors que le troisième comporte les 4 anévrysmes restants. L'hétérogénéité entre les deux bras principaux est très importante (supérieure à 1000) et celles visualisées pour les divisions suivantes sont de 500 et 350. La sensibilité liée au diagnostic d'anévrysme n'est donc que de 60 % même si la spécificité est de 100 %.

Devant les difficultés à classer correctement les échantillons nous avons essayé plusieurs de ces bandes de façon individuelle.

Le tableau XVI suivant donne les sensibilité et spécificité liées au diagnostic des anévrysmes pour les zones les plus discriminantes :

TABLEAU XVI : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DU TEST VIS-A-VIS DES ANEVRYSMES SELON LES ZONES DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	sensibilité	spécificité
950-959	80 %	100 %
1045-1055	90 %	100 %
1277-1285	80 %	88 %
1373-1378	70 %	78 %
1617-1633	70 %	100 %
1652-1662	70 %	100 %

Malgré une bonne spécificité liée à la plupart des zones sélectionnées, la sensibilité reste en retrait. Nous avons donc associé différentes zones pour améliorer les résultats et étudié plusieurs pondérations pour chaque bande.

Avant d'utiliser les bandes sélectionnées par le Student's test, nous avons essayé les zones représentatives de différentes classes de molécules.

La zone 1700-1480 cm⁻¹ correspondant aux régions Amide I et II des protéines a, dans un premier temps, été testée. La classification hiérarchique obtenue isole 7 des 10 anévrysmes dans un bras et l'ensemble des échantillons normaux associé aux anévrysmes restants dans l'autre (figure 62).

Devant les différences visualisées sur les dérivées secondes ce résultat peut paraître décevant. En fait on remarque que de faibles variations dans la gamme spectrale utilisée pour réaliser cette classification hiérarchique peuvent totalement changer l'aspect du dendrogramme. En effet, dans le cas de la région des protéines, certaines modifications mineures (2cm⁻¹) de la gamme spectrale retenue pouvaient faire chuter la sensibilité de 90 à 60 %.

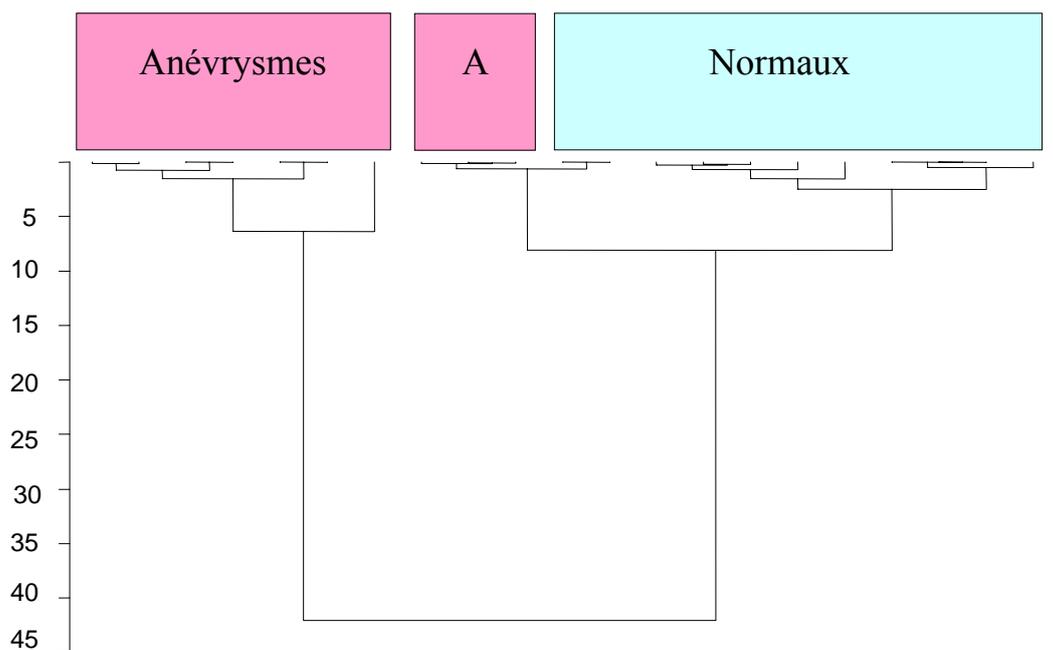


FIGURE 62 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE SUR LA ZONE 1700-1480 cm^{-1}
DES DERIVES SECONDES DES SPECTRES MOYENS

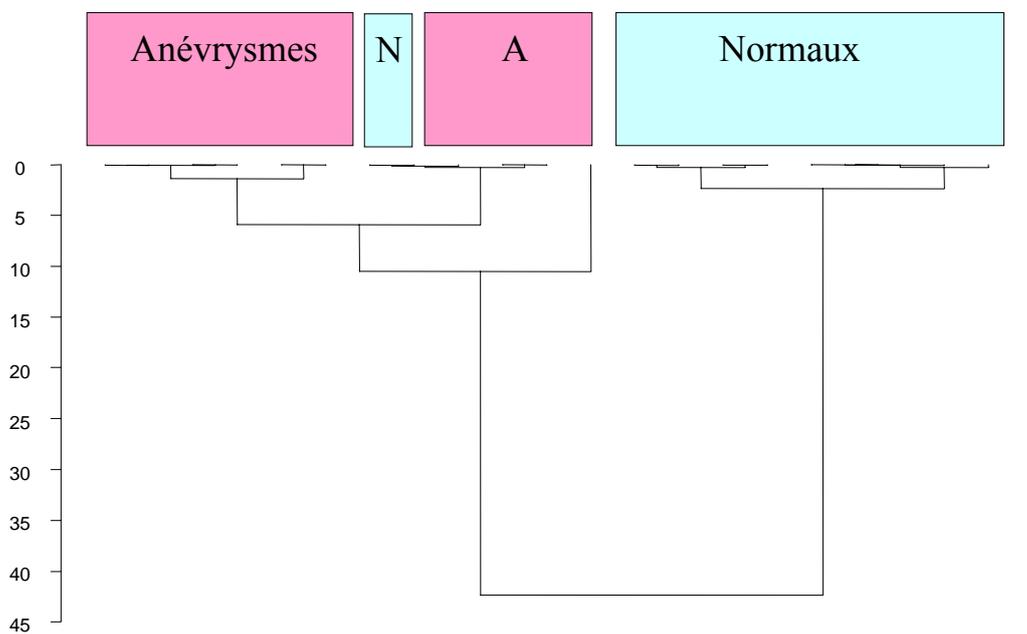


FIGURE 63 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE SUR LA ZONE 1700-1580 cm^{-1}
DES DERIVES SECONDES DES SPECTRES MOYENS

Une restriction de la zone utilisée à la bande amide I ($1700\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$) donne une sensibilité à 100 % et une spécificité à 91 % (figure 63) alors que la bande amide II donne respectivement 85 % et 60 %. Pourtant dans les deux cas l'hétérogénéité maximum ne dépasse pas 45.

Pour sa part, la bande amide III (1230-1330 cm^{-1}) ne permet pas de séparer plus de trois anévrysmes des 19 échantillons initiaux et son association aux bandes Amides I et II ne permet pas d'améliorer la sensibilité obtenue avec ces deux bandes associées (70 %).

Nous avons essayé de multiples combinaisons de bandes et de pondération afin d'améliorer les résultats tant du point de vue de la sensibilité que de la spécificité. On peut remarquer que l'ensemble des zones spectrales étudiées donne des résultats compris entre 70 et 100 % pour la sensibilité et entre 64 et 100 % pour la spécificité. Ceci tend à prouver que ces zones ont un haut pouvoir de discrimination. Devant les quelques erreurs observées, nous avons essayé d'associer des zones possédant une forte sensibilité avec des zones de forte spécificité.

Zones testées (cm^{-1})		Sensibilité %	Spécificité %
1667-1650	I	70	100
1641-1614	II	100	83
1562-1533	III	90	64
1408-1367	IV	90	100
I + II + III + IV		70	100
I + 2xII + III + IV		90	100
I + II		90	100
I + II + III		80	100
I + II + IV		90	100

Malgré de nombreux essais avec de multiples combinaisons, ces premiers résultats ne permettent pas une parfaite séparation entre anévrysmes et aortes normales ; pourtant, on observe que les zones I et II semblent particulièrement utiles à la classification hiérarchique tant au niveau de la sensibilité que de la spécificité même si la discrimination reste imparfaite. En effet, lors de l'association des 4 zones spectrales sélectionnées par le Student test des dérivées secondes, on obtient une sensibilité de 70 % et une spécificité de 100 % alors que la seule association des zones I et II permet d'augmenter cette sensibilité à 90 %.

Nous en avons donc conclu que la zone II (1641-1614 cm^{-1}) était particulièrement utile à l'amélioration de la sensibilité liée au diagnostic des anévrysmes.

Suite à cette observation nous avons appliqué une pondération égale à 2 puis 3 à cette dernière zone sans pour autant atteindre une sensibilité de 100 %.

Nous avons alors essayé de modifier légèrement les bandes sélectionnées en fonction des zones visuellement très dissemblables sur les dérivées secondes des spectres moyens normaux et anévrysmaux.

La zone 1641-1614 cm^{-1} a été progressivement réduite à 1633-1616 cm^{-1} en diminuant simplement les bornes supérieures ou inférieures de 2 cm^{-1} à chaque pas et en refaisant pour chaque modification le dendrogramme correspondant. Les dernières valeurs des bornes haute et basse ne modifiant pas le dendrogramme ont été retenues. De cette façon nous avons éliminé les zones spectrales n'influençant pas la classification tout en gardant un maximum d'informations spectrales. Pourtant, les classifications réalisées en association avec les bandes I, III et IV précédemment retenues n'ont pas été améliorées. La solution est venue, comme souvent, d'une erreur de manipulation concernant la pondération d'une zone spectrale : voulant revenir aux régions Amides j'ai omis « d'éteindre » la bande 1055-1095 (pondération à 0) présentant entre autre des vibrations du collagène, de l'élastine et de l'ADN cellulaire. Cette bande a alors été associée aux gammes spectrales 1633-1616 cm^{-1} et 1667-1650 cm^{-1} . La classification hiérarchique issue de cette analyse présente « enfin » les 100 % de sensibilité et spécificité. Ce n'est qu'en vérifiant les zones spectrales utilisées que je me suis rendu compte de cette heureuse erreur. Le test de Student donnait d'ailleurs un $p < 3.10^{-7}$ pour le pic de significativité à 1092.

Devant cette très haute significativité, j'ai supprimé la zone 1667-1650 cm^{-1} ce qui n'a eu aucune conséquence sur la classification. Les deux zones permettant donc une classification hiérarchique parfaite sont donc 1055-1095 cm^{-1} et 1633-1616 cm^{-1} . La figure 64 illustre le dendrogramme obtenu. On remarquera l'hétérogénéité intergroupe très élevée alors que les hétérogénéités intragroupes sont respectivement 4 et 6 fois inférieures pour les anévrysmes et des aortes normales donnant une marge de sécurité importante lors de l'utilisation de cette classification hiérarchique comme test diagnostique.

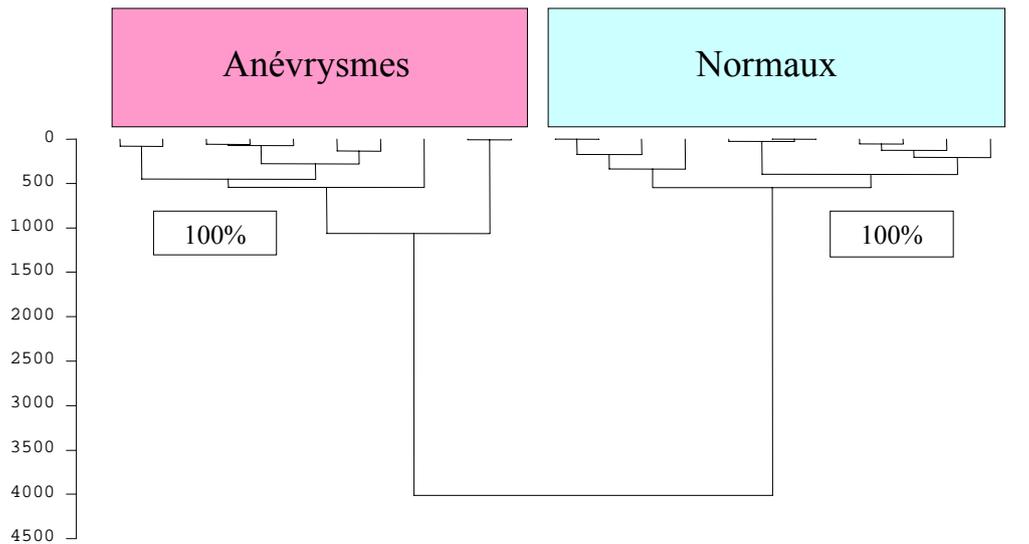


FIGURE 64 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE ETABLIE SUR LES ZONES 1055-1095 ET 1616-1633 cm^{-1}

Pourtant la proximité des modes de vibration des oses nous faisait craindre certaines interférences pouvant fausser cette dernière classification. Nous avons donc volontairement ajouté aux zones déjà utilisées des régions connues pour être très influencées par les oses (Cf tableau II page 89) avec un très faible impact sur la classification hiérarchique. De plus lorsque l'on compare les dérivées secondes des moyennes anévrysmales et normales avec celle de l'élastine, on comprend qu'une très grande partie du signal sur la gamme 900-1250 cm^{-1} est liée à l'élastine (homologie de plus de 95 % pour les aortes normales). L'illustration suivante met en lumière cette observation figure 65.

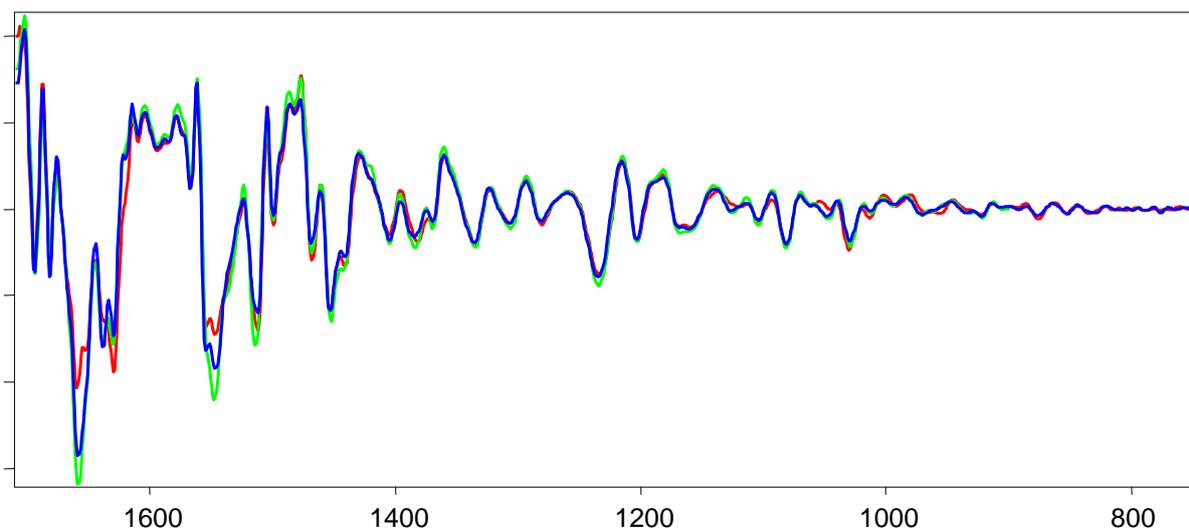


FIGURE 65 : COMPARAISON DES DERIVEES SECONDES DE L'ELASTINE EN VERT, DE LA MOYENNE NORMALE EN BLEU ET DE LA MOYENNE DES ANEVRYSMES EN ROUGE

On peut donc interpréter cette classification associant une région de la bande Amide I et la région 1055-1095 de deux façons : soit on considère que les deux régions sont directement liées aux structures et compositions des deux protéines majeures de la paroi aortique que sont le collagène et l'élastine ou on considère que la zone 1055-1095 cm^{-1} peut être influencée par des modifications au sein de l'ADN des cellules présentes dans le tissu aortique. En effet, nous savons que les cellules musculaires lisses des anévrismes ont le pouvoir de changer de phénotype ce qui implique des changements conformationnels au niveau de l'ADN. Ces modifications s'expriment à plusieurs niveaux du spectre mais la gamme spectrale 1080-1090 cm^{-1} est fortement influencée par la vibration ν (P=O) de l'ADN (cf tableau VI p 101). On peut aussi émettre l'hypothèse que l'apoptose des cellules musculaires lisses rencontrée au sein du tissu anévrysmal, rendant les noyaux cellulaires picnotiques, influe sur l'absorption infrarouge de l'ADN. Cette hypothèse expliquerait pourquoi cette zone spectrale présente un haut potentiel de discrimination.

Pour conclure, les différences spectrales infrarouges sont peut être le fruit de perturbations protéiques et cellulaires. Ces dernières sont probablement en rapport avec de profondes modifications nucléaires nécessaires au changement de phénotype des cellules musculaires lisses (contractile en sécrétoire) ainsi que celles liées à l'apoptose de ces mêmes cellules. Bien sûr, des analyses ultérieures seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

2.2. Etude infrarouge à l'aide de l'imageur SPOTLIGHT 300 (PerkinElmer®)

2.2.1. Avantages de l'imageur spectral

Les résultats IRTF que nous avons rapportés concernant la méthode point par point, bien que satisfaisants, doivent être pondérés par le nombre de spectres réalisés. En effet, comme nous l'avons déjà développé, la variabilité des résultats spectroscopiques sur un même échantillon nous a conduit à nous poser la question suivante : avons-nous suffisamment de spectres pour calculer des moyennes réellement représentatives de l'ensemble du tissu ? De même, la grande difficulté à relocaliser les résultats spectroscopiques au sein du tissu n'était-elle pas un frein à l'analyse des tissus dans leurs moindres détails ?

Ces interrogations ont trouvé leur réponse lorsque nous avons utilisé l'imageur SPOTLIGHT de la société Perkin Elmer[®]. Il nous a apporté de nouvelles caractéristiques et fonctionnalités qui nous faisaient jusqu'alors défaut. La sensibilité du capteur et la rapidité des acquisitions nous ont permis d'améliorer les données recueillies ainsi que de pousser notre analyse encore plus loin.

Le module d'optimisation d'énergie permettant de corriger la focalisation et l'alignement du faisceau infrarouge en temps réel ont permis une optimisation du signal, améliorant encore le rapport signal sur bruit. Ceci a amélioré considérablement les spectres obtenus et a ainsi permis de pouvoir diminuer le nombre d'accumulations nécessaires pour l'obtention de spectres de bonne qualité. Ce facteur, influant directement la durée d'acquisition, nous a permis d'obtenir des images spectrales d'excellente qualité pour des durées de mesure acceptables.

Finalement, les raisonnements ne se font plus sur quelques dizaines ou centaines de spectres mais sur plus de 10.000 par échantillon. Il est fort probable que les spectres moyens ainsi calculés sont plus représentatifs que ceux calculés sur un faible nombre de spectres. De plus, cette approche nous ouvre de nouvelles possibilités avec, par exemple, le calcul de spectres moyens provenant de petites zones tissulaires réparties dans l'épaisseur du tissu là où nous devons travailler sur 5 à 10 spectres avec la méthode point par point. Tous ces avantages nous ont permis de travailler plus vite, plus efficacement et d'approfondir encore notre étude du tissu aortique.

Enfin, le capteur de cet imageur nous a offert la possibilité de réaliser des images spectrales de plus grandes dimensions et ainsi d'analyser des images allant jusqu'à quelques millimètres.

Pourtant, cette profusion de données spectrales n'allourdit pas les processus de prétraitement. Les logiciels accompagnant l'imageur SPOTLIGHT 300 permettent la manipulation d'images spectrales sans qu'il soit nécessaire d'en dissocier les spectres. On conserve donc la position exacte des acquisitions tout en pouvant apprécier les résultats des traitements directement sur l'image spectrale. C'est par exemple le cas de l'analyse de l'amplitude d'un pic, d'un rapport de bandes prédéfini ou encore de la corrélation des données de l'image avec un spectre de référence etc...

Là où des jours étaient nécessaires au traitement des spectres individualisés (mode point par point), l'imageur permet de traiter l'intégralité d'une image en quelques minutes. De plus, l'opérateur a toujours le choix de travailler directement sur les images ou d'en extraire des spectres, moyennés ou pas, à n'importe quel moment. La rapidité des prétraitements proposés dans le logiciel SPOTLIGHT, nous a conduit à appliquer ces fonctions de façon systématique sur l'ensemble des images. Par la suite, nous avons utilisé deux voies d'analyse des données : soit en traitant les données directement sur l'image soit en les extrayant sous forme de spectres isolés ou moyens afin de réaliser différentes analyses selon les méthodes précédemment décrites (HCA et ACP).

2.2.2. Résultats de l'analyse des images spectrale des tissus aortiques

2.2.2.1. Analyse des résultats en absorbance totale

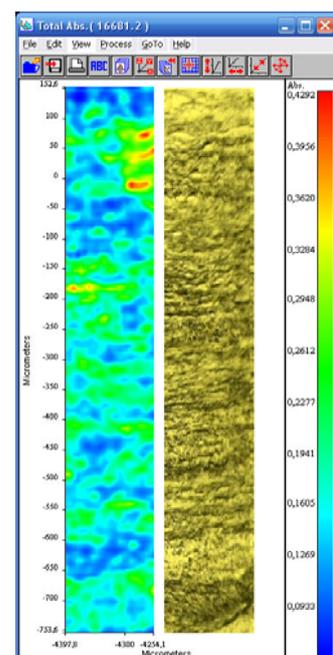
Pour cette série d'acquisitions, nous avons utilisé 9 échantillons sains associés à 10 anévrysmes dont 4 étaient couplés à une bicuspidie aortique. Deux autres patients présentant une bicuspidie aortique sans dilatation de l'aorte ascendante ont également été analysés.

A l'ouverture de l'image spectrale, les données sont représentées comme illustré par la figure 66 ci contre. L'absorbance totale en chaque point est codée sur une échelle en fausse couleur.

FIGURE 66 : IMAGE SPECTRALE BRUTE PROVENANT DE L'IMAGEUR SPOTLIGHT ASSOCIE (A DROITE) A L'IMAGE VISIBLE CORRESPONDANTE

Comme le montre l'illustration 66, il est toujours possible de confronter les images visibles aux données spectrales ce qui se révèle intéressant en cas de doute sur une zone de l'échantillon.

Pourtant, les images spectrales en absorbance totale n'ont finalement que peu d'intérêt. Il en est de même pour les dérivées premières et secondes sur l'ensemble du spectre. Seule une appréciation globale du tissu est possible et permet éventuellement d'écarter certaines zones de l'image anormalement différentes du reste de l'échantillon.



De plus, le logiciel spotlight ne permet pas de corriger la ligne de base ce qui impose des analyses basées sur les dérivées après normalisation ou sur des rapports de bandes s'affranchissant de la correction de ligne de base.

Pour l'analyse sur les absorbances totales nous avons appliqué les fonctions de correction atmosphérique et de lissage avant de normaliser les images spectrales. Après quelques essais, nous nous sommes rendu compte que la fonction de normalisation proposée par défaut se fait sur un maximum spectral. Elle normalise le pic maximum du spectre ou de la gamme spectrale sélectionnée après autodétermination du zéro puis établit un rapport de proportionnalité avec les autres pics du spectre. De ce fait, le pic Amide I est toujours d'intensité constante (valeur arbitraire et fixée d'absorbance), comme le montre la figure 67.

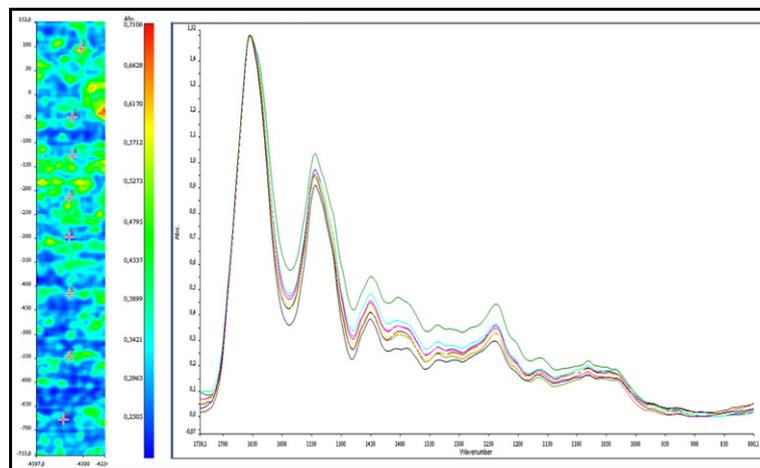


FIGURE 67 : ASPECT DE LA NORMALISATION SUR LA BANDE AMIDE I (MAXIMUM SPECTRAL)

Cette méthode de normalisation est problématique puisque les autres pics du spectre sont normalisés non pas par rapport à l'intégration du spectre mais par rapport à celle du pic amide I. Ceci rend donc impossible l'analyse directe des intensités des pics tout au long de l'échantillon mais n'infue pas sur les analyses basées sur des rapports de bandes ou des dérivées secondes.

Finalement, il est possible de paramétrer la fonction de normalisation pour que cette dernière ne se fasse plus sur un maximum, avec tout de même dans ce cas, la persistance de problème puisque certains spectres présentent des intensités très supérieures aux autres sur l'ensemble de la gamme spectrale !

Ces constatations nous ont conduit à délaisser ce mode de visualisation en absorbance totale et à nous intéresser aux autres fonctions de traitement des images spectrales.

a. Analyse des échantillons selon des zones spectrales définies

Malgré les problèmes de normalisation précédemment décrits, nous avons essayé d'analyser l'hétérogénéité des échantillons normaux en utilisant différentes zones spectrales.

b. Analyse selon les bandes amides I, II et III

Pour effectuer cette analyse nous avons utilisé les zones spectrales suivantes :

- 1720-1587 cm^{-1} : pour la bande Amide I
- 1587-1480 cm^{-1} : pour la bande Amide II
- 1330-1230 cm^{-1} : pour la bande Amide III

Nous avons commencé par une simple analyse des images spectrales bidimensionnelles réalisées sur les différentes gammes spectrales décrites ci-dessus. Lorsque l'on considère la bande Amide I (Figure 68), on remarque des variations plus ou moins importantes de l'absorbance de ce pic dans l'épaisseur du tissu. Pourtant, il est très difficile voire impossible d'en apprécier la variabilité sur ces vues bidimensionnelles. Aucune sorte de classification n'est donc possible. Pour permettre de comparer ces différentes images il serait nécessaire que ces dernières soient combinées dans un seul fichier pour être traitées de façon simultanée et identique. En effet, si l'on peut penser que les corrections atmosphérique et lissage sont suffisamment standardisées, il en va tout autrement de la normalisation. On remarque, en effet, après normalisation que les intensités du pic Amide I sont très variables. Ceci s'exprime sur l'illustration ci-dessous par des codages couleurs différents entre les échantillons. Pourtant la variabilité de cette intensité est quasiment impossible. Cette approche 2D n'apporte donc que peu d'informations. Aucune sorte de classification ou séparation entre les échantillons dilatés et « normaux » n'est donc possible sur ces images d'absorbance.

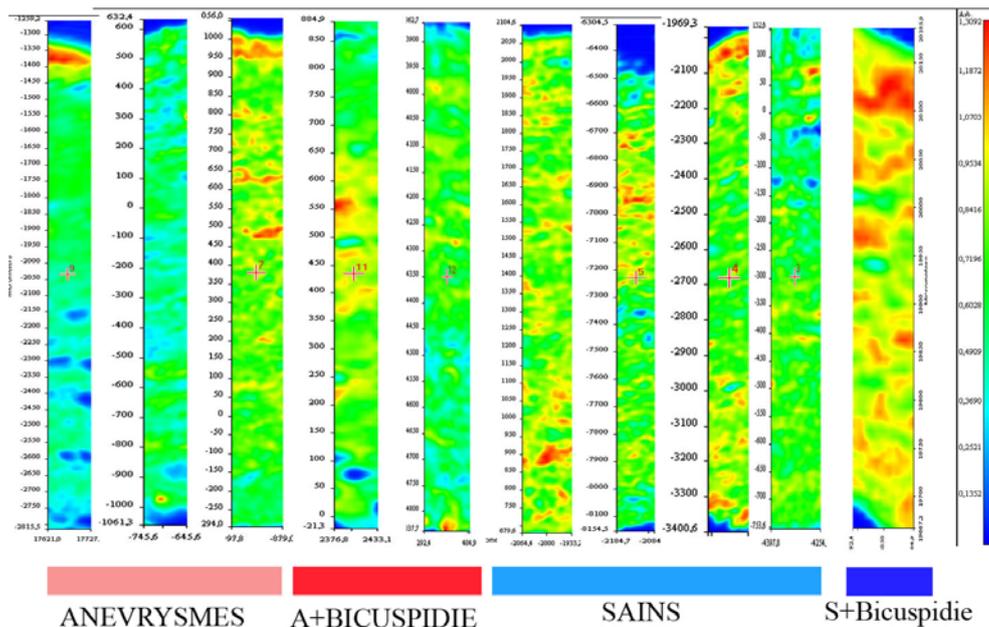


FIGURE 68 : IMAGES SPECTRALES 2D EN ABSORBANCE TOTALE D' ECHANTILLONS SAINS, ANEVRYSMAUX OU PROVENANT D' AORTE DE BICUSPIDIE

Devant l'incapacité des images 2D à restituer la variabilité du signal spectral, nous avons utilisé une fonction permettant d'obtenir une image tridimensionnelle à partir des données prétraitées. Les axes des abscisses et des ordonnées représentent respectivement la largeur et la hauteur (profondeur) de l'échantillon alors que l'axe Z code pour l'intensité de l'absorbance (unités arbitraires). La représentation par défaut assigne la même dimension aux deux axes X et Y ce qui revient à comprimer l'échantillon dans le sens de sa hauteur et à renforcer la visualisation des variations d'intensité.

Il est alors possible en normalisant le plus possible cet axe d'avoir une appréciation semi-quantitative des variations de l'absorbance permettant, dans une certaine mesure, de comparer les échantillons. Pourtant, il faut garder à l'esprit les réserves que nous avons développées quant à la normalisation des absorbances.

La figure ci après illustre l'aspect 3D des variations du pic Amide I. Ainsi mises en lumière, les variations ne paraissent pas très différentes entre les échantillons normaux (à droite) et les anévrismes (à gauche).

Par contre, sur la dernière représentation 3D de droite, correspondant à un homme de 66 ans présentant une bicuspidie non dilatée, on remarque que si l'intensité globale semble assez identique à celles des autres tissus, les variations sont beaucoup plus marquées. Il est donc probable que ces variations soient le fait d'une hétérogénéité dans la composition protéique de ce tissu. Des analyses biochimiques ont déjà établi certaines altérations concernant la quantité et la qualité des macromolécules de la paroi aortique des aortes de bicuspidie. D'autres analyses plus précises seront nécessaires pour déterminer la réelle nature de ces variations spectrales.

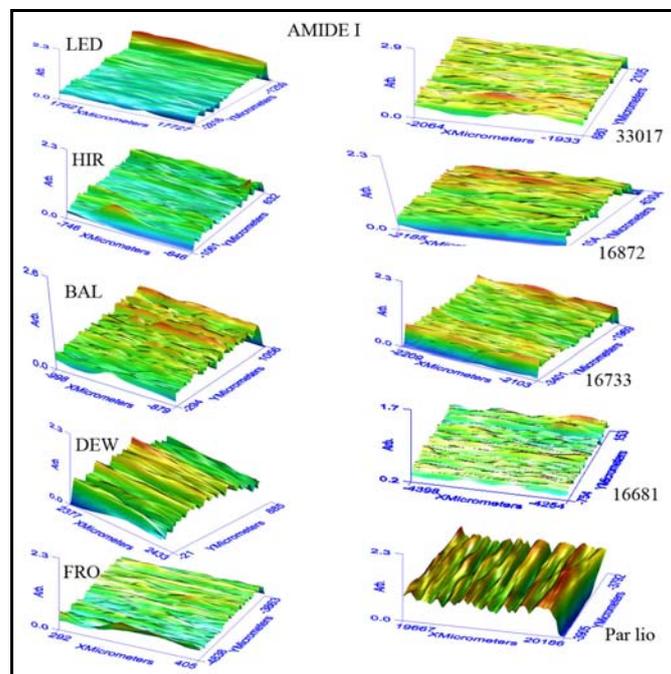


FIGURE 69 : ASPECT 3D DE LA BANDE AMIDE I APRES PRETRAITEMENT ET NORMALISATION DE L'ECHELLE

L'analyse de la bande Amides II retrouve des résultats similaires avec pour certains anévrysmes une tendance, comme le tissu provenant de l'aorte de bicuspidie non anévrysmale, à une hétérogénéité plus marquée. Pourtant quelques anévrysmes semblent plus homogènes que certains tissus sains.

Les résultats sont comparables pour la bande Amide III en dehors de l'aorte de bicuspidie non dilatée qui cette fois présente une remarquable homogénéité entre 1230 et 1330 cm^{-1} .

c. Analyse selon la bande spectrale 1100-1050 cm⁻¹

L'analyse 3D en considérant la bande spectrale 1000-1100 cm⁻¹ retrouve approximativement les mêmes résultats et les mêmes variations.

Malgré ces quelques résultats, il est clair que l'approche des images spectrales en considérant les absorbances ne permet pas une analyse satisfaisante des échantillons. Nous avons donc choisi d'analyser les images spectrales en utilisant des rapports de bandes sélectionnés. Nous avons testé de très nombreux rapports de bandes. Dans un premier temps nous avons réalisé des images basées sur des rapports utilisant une bande donnée rapportée à la bande amide I.

2.2.2.2. Analyse selon un rapport de bande

Nous avons étudié le rapport entre la bande Amide I et la région spectrale 1100-1050 cm⁻¹, qui s'était révélée forte intéressante lors de l'analyse des résultats en mode point par point.

Pour permettre une analyse la plus objective et la plus représentative possible, nous avons évalué ce rapport de bande sur toute l'épaisseur du tissu à 5 positions différentes dans la largeur de l'échantillon. Cette approche nous a permis de créer 5 « cross-sections » relatant l'évolution du rapport en fonction de la profondeur du tissu. Après de nombreuses conversions de format de fichier, il nous a été possible d'obtenir les coordonnées de ces courbes sous format texte et de construire des représentations graphiques permettant d'apprécier ces rapports de bande ou « Band Ratio ».

La figure 70 ci-dessous illustre les cinq cross sections d'un échantillon non dilaté en bleu et d'un échantillon anévrysmal en rouge. On remarque une certaine homogénéité des résultats au sein d'un même tissu selon la position longitudinale où l'on se trouve. Par contre, on remarque que les deux échantillons ne présentent pas les mêmes band ratio moyen. Nous avons calculé l'écart type lié de chaque valeur moyenne de band ratio.

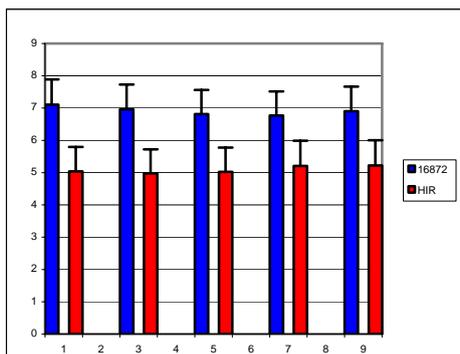


FIGURE 70 : CROSS-SECTIONS DU RAPPORT DE BANDE 1700-1600 / 1100-1050 cm^{-1}
 POUR UN ECHANTILLON SAIN (BLEU) ET ANEVRYSMAL (ROUGE)

Devant ces résultats encourageants, nous avons appliqué cette procédure à un plus grand nombre d'échantillons en y incluant des anévrismes sur « aorte de bicuspidie ». De la même façon, nous avons réalisé cinq cross-sections, moyennées par échantillon avant de les comparer par un test de Student (bilatéral à variance inégale). L'écart type a aussi été calculé de façon individuelle puis pour chaque groupe.

La figure 71 présente la valeur moyenne des rapports de bandes obtenus à partir de 5 cross-sections dans l'épaisseur de chaque échantillon ; les anévrismes étant en rouge, les aortes non dilatées en bleu et les anévrismes sur bicuspidie aortique en vert.

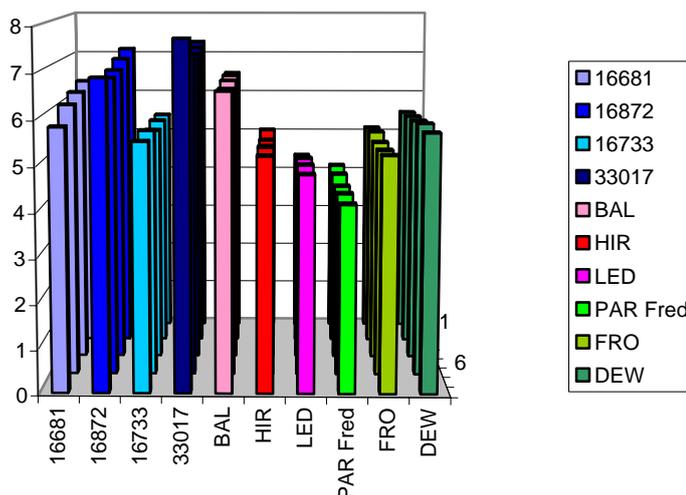


FIGURE 71 : CROSS-SECTIONS DU RAPPORT DE BANDE 1700-1600 / 1100-1050 cm^{-1}

On remarque, à l'observation de ce graphique, que ce rapport de bandes n'est pas identique entre les différents groupes. Pour confirmer cette impression visuelle, nous avons appliqué le test de Student à ces valeurs de band ratio moyens.

Ce test statistique a mis alors en lumière des différences significatives entre les aortes non dilatées et anévrysmales ($p= 6,9.10^{-4}$) et entre les aortes non dilatées et les anévrysmes sur bicuspidie aortique ($p=4,1.10^{-6}$). Par contre, la différence entre les anévrysmes sur valve tricuspide ou bicuspidie en considérant le rapport de bande $1700-1600 / 1100-1050 \text{ cm}^{-1}$ n'est pas significative ($p= 0,1$).

En analysant plus finement ces résultats et en considérant l'âge et le sexe de chaque patient, il apparait que le sexe ne semble pas influencer ce rapport de bande. Par contre, il est probable que l'âge puisse jouer un rôle. En effet, si l'on analyse l'ensemble des échantillons, on peut remarquer que ceux présentant le plus fort band ratio sont en général plus jeunes : un des échantillons d'aorte anévrysmale présentant un rapport de bande relativement élevé correspond à une femme de 37 ans alors que l'un des plus faibles correspond à un homme de 64 ans. Il faut donc être prudent sur l'interprétation de ces variations car les âges moyens entre ces trois groupes ne sont pas identiques (41 ans pour le groupe sains ; 50 ans pour le groupe des anévrysmes et 53 pour les anévrysmes sur bicuspidie).

Pourtant l'écart d'âge semble faible pour engendrer des différences significatives aussi marquées. Enfin, l'un des patients, âgé de 23 ans et présentant un anévrysme sur bicuspidie aortique, remet en cause cette hypothèse puisque malgré son âge, il présente le plus faible band ratio de la série.

On connaît les différentes attributions spectrales de la gamme comprise entre 1100 et 1050 cm^{-1} mais il est, à ce stade de l'analyse, impossible de définir avec certitude les molécules impliquées dans ces expressions différentielles. Pourtant, ce band ratio ne semble pas influencé par la présence ou non d'une hyperglycémie ou d'un diabète (pour les échantillons renseignés à ce sujet). Ceci nous laisse à penser que les différences visualisées concernent le collagène et/ou l'élastine et/ou l'ADN des cellules musculaires lisses. Ici, s'ouvre un vaste champs d'investigations où de nombreuses collaborations seront nécessaires...

2.2.2.3. Analyse de band ratio de bandes spécifiques des protéines

Nos observations spectrales entre les anévrysmes et les aortes non dilatées nous ont conduit à sélectionner des régions spectrales comme étant modifiées en fonction des différents type de tissus. Nous avons donc utilisé ces zones pour réaliser de nouveau rapport de bande. Les premiers band ratio ont été « construits » en comparant la bande sélectionnée et l'ensemble du massif Amide I et II ($1700-1485\text{ cm}^{-1}$). Cette analyse, particulièrement chronophage, à été conduite sur les absorbances puis sur les dérivées secondes des spectres de chaque image.

Le premier rapport étudié ($1700-1485\text{ cm}^{-1} / 1445-1335\text{ cm}^{-1}$) qui confronte le massif protéique Amide I et II à une zone comportant quelques bandes significatives n'a pas permis de distinguer les différents groupes, que cela soit en utilisant les rapports d'absorbance ou les rapports de dérivés secondes. Le test de Student n'a d'ailleurs retrouvé aucune différence significative entre les moyennes des cross-sections de chaque groupe ou entre leurs écarts types.

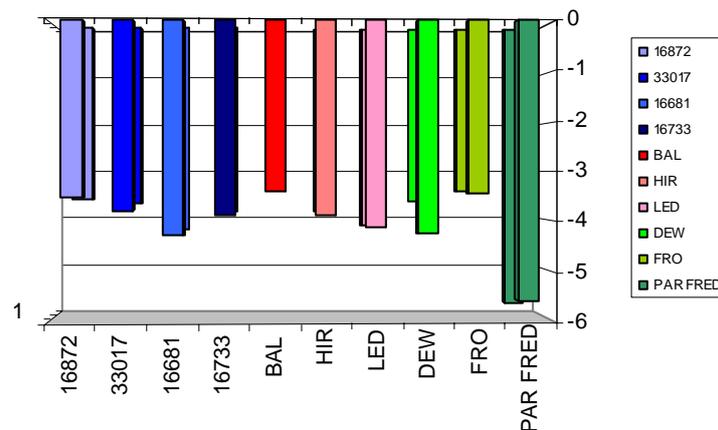


FIGURE 72: CROSS-SECTIONS ETABLIES SUR LE RAPPORT DE BANDE $1700-1485 / 1445-1335\text{ cm}^{-1}$ DES DERIVES SECONDES DE CHAQUE IMAGE SPECTRALE

A la suite de cette tentative nous avons essayé de restreindre la bande spectrale analysée jusqu'à aboutir au rapport de bande $1700-1485 / 1345-1335\text{ cm}^{-1}$. Alors que les représentations 3D semblaient très prometteuses (figure 73), les résultats ne se sont que très sensiblement améliorés avec un p du test de Student juste égal à 0,05 entre les aortes anévrysmales avec et sans bicuspidie. Par contre, là encore, aucune différence significative n'a pu être mise en lumière en considérant les variations des autres moyennes des cross-sections, de leur variance ou de leur écart-type.

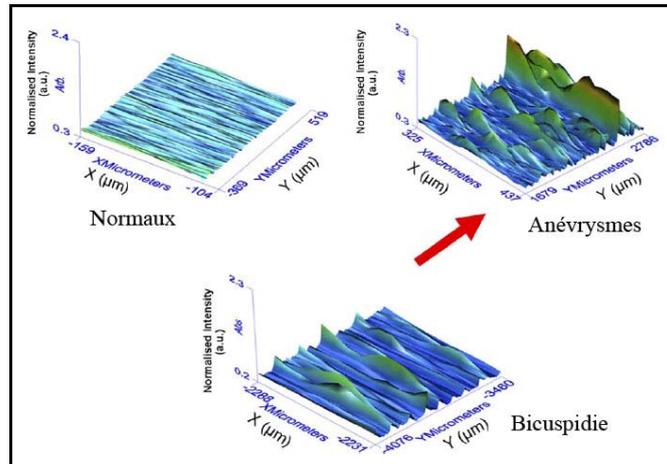


FIGURE 73 : IMAGES SPECTRALES REPRESENTANT LE RAPPORT DE BANDE $1700-1485 / 1345-1335 \text{ cm}^{-1}$ ENTRE LES ECHANTILLONS NORMAUX, ANEVRYSMES AVEC OU SANS BICUSPIDIE

Il apparaît donc que cette approche par la simple observation des images spectrales ne permet pas de classer correctement les échantillons. Deux hypothèses peuvent expliquer cet échec : la première est que les variations visualisées sur la gamme spectrale comprise entre 1720 et 900 cm^{-1} sont diffuses et touchent de façon égale le massif Amide I+II et le reste du spectre. De ce fait, le rapport de bande minimise voire annule ces variations. L'autre hypothèse qui retient actuellement toute notre attention est que si l'on étudie les cross-sections de près on se rend compte que les variations du rapport de bande pour les échantillons pathologiques ont une fréquence de variation plus élevée que celle des échantillons non dilatés ; par contre la valeur moyenne et l'amplitude des variations sont peu différentes entre les différents groupes.

D'autre part, les variations visualisées sur les images 3D sont relativement peu nombreuses comparées à l'ensemble des données de l'échantillon. Dans ce cas, les moyennes lissent complètement ces différences et, de ce fait, masquent en grande partie l'information. Ceci expliquerait pourquoi les moyennes, écarts types et variances sont semblables alors que visuellement les images semblent différentes.

Enfin, la dernière explication est que cette bande n'est tout simplement pas informative. Il est donc impératif d'analyser ces images après avoir déterminé, comme nous l'avons fait pour la méthode point par point, les zones spectrales les plus discriminantes.

Ces dernières ont été sélectionnées par l'analyse des dérivées secondes des spectres moyens extraits directement des images prétraitées (fonction : Co-add spectra).

Les dérivées secondes moyennes présentées ci dessous (figure 74) montrent que le massif Amide I et II est très influencé par les différentes pathologies (Légende de la figure = A : aorte normale – B : aorte non dilatée et valve bicuspidie – C : Anévrisme sans bicuspidie –D : Anévrisme avec bicuspidie aortique). On remarque en particulier de nettes différences entre 1700 et 1600 cm^{-1} avec des variations marquées sur les deux pics principaux (négatifs) du pic Amide I.

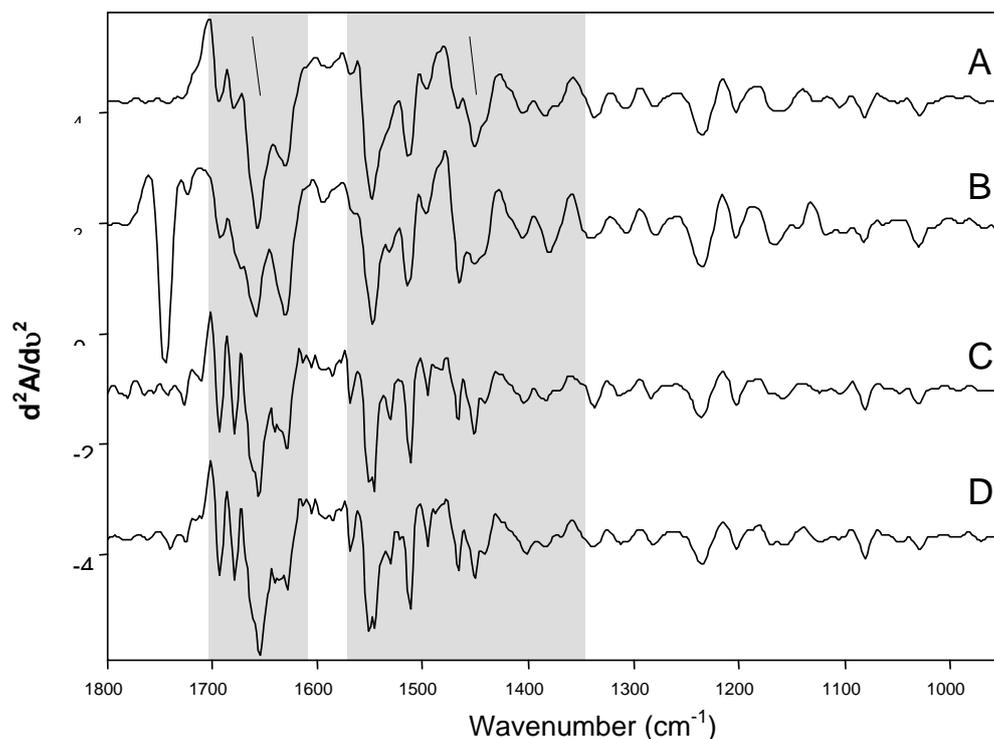


FIGURE 74 : ASPECT DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS DES DIFFERENTS GROUPES D'ECHANTILLONS SAINS ET PATHOLOGIQUES

De cette façon, nous avons défini plusieurs zones du spectre présentant des différences significatives entre les différents groupes. Nous avons en particulier utilisé deux zones de la bande amide I fortement influencées par la présence d'un anévrisme ou l'association à une bicuspidie.

Plus spécifiquement nous avons utilisé le rapport de bande 1667-1643 / 1642-1628 cm^{-1} pour refaire l'analyse de l'ensemble des images. En fait, ces deux gammes sont principalement influencées par la structure secondaire des protéines.

La gamme 1667-1643 cm^{-1} est connue pour être liée aux protéines dont la structure secondaire est en hélice α alors que la gamme 1642-1628 cm^{-1} est principalement influencée par l'architecture en feuillets β . En utilisant ce rapport de bande nous avons en fait étudié la proportion relative d'une structure secondaire par rapport à l'autre.

De la même façon que précédemment, nous avons défini des cross-sections de ce rapport de bande pour chaque échantillon en considérant les absorbances totales et leurs dérivées secondes.

L'analyse sur les absorbances totales dont nous n'attendions rien de particulier puisque les deux bandes sont contiguës et que le rapport ne peut varier dans de grandes proportions a montré une capacité discriminante pour le moins surprenante.

TABLEAU XVII : RESULTATS DU TEST DE STUDENT SUR LE RAPPORT DE BANDE D'ABSORBANCE 1667-1643 / 1642-1628 CM^{-1} DES DIFFERENTS GROUPES D'ECHANTILLONS

Echantillons utilisés pour le test de Student	Valeur du p
Aortes normales vs anévrismes	0,4239
Aortes normales vs ensemble des anévrismes	0,0865
Aortes normales vs bicuspidie non dilatée	0,0036
Aortes normales vs anévrismes avec bicuspidie	0,0248
Anévrismes vs anévrismes avec bicuspidie	0,0497
Anévrismes vs bicuspidie non dilatée	0,0042
Anévrismes avec bicuspidie vs bicuspidie non dilatée	0,3849

On peut constater que plusieurs des tests de Student se sont révélés significatifs. Il faut de suite pondérer les résultats concernant les échantillons de bicuspidie sans dilatation puisque le groupe ne comporte que deux échantillons et que l'un d'entre eux présentait de nombreuses déchirures en dehors de la zone que nous avons sélectionnée pour réaliser les mesures. Pourtant en réalisant le test de Student avec ou sans cet échantillon, la significativité reste très bonne (p inférieur à 10^{-3}).

Il semble donc que la bande Amide I soit le siège de différences permettant d'isoler les bicuspidies non dilatées des tissus sains et anévrysmaux bien que ce rapport de bande ne permette pas de différencier les bicuspidies non dilatées des anévrysmes sur bicuspidie. On peut donc raisonnablement conclure que ces modifications sont principalement le fait de la bicuspidie aortique plus que de la présence d'une dilatation anévrysmale

D'autre part, le test de Student retrouve des significativités, certes plus faibles, mais présentes entre les aortes normales et les anévrysmes sur bicuspidie ainsi qu'entre les anévrysmes avec ou sans bicuspidie. Il semble donc que la présence d'une bicuspidie soit un élément décisif quant à la significativité du Student's test.

En rapprochant ces résultats des connaissances que nous avons de la gamme spectrale étudiée, nous pouvons conclure que les aortes provenant de patients présentant une bicuspidie aortiques sont caractérisées par une diminution du rapport de bande [structure secondaire en hélice α / feuillet β]. Dès lors, deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette diminution : soit le pourcentage de protéines en hélice α diminue, soit le pourcentage de protéines en feuillet β augmente. Or, comme nous l'avons déjà remarqué, la protéine présentant majoritairement une structure secondaire en feuillet β est l'élastine et il n'existe pas de néosynthèse de cette molécule au sein du tissu aortique. Il est donc probable que ces modifications soient en fait liées à une diminution ou à une altération des protéines majoritairement en hélice α dont font partie les collagènes.

Pourtant, ces pourcentages ne reflètent que des proportions relatives entre les structures secondaires en hélice α ou en feuillet β et non la quantité totale de ces mêmes protéines.

En effet, même si le ratio est en faveur des structures en feuillet β , il est possible, comme le rapportent certains articles récents [80], que les quantités totales des différentes protéines de la paroi aortique diminuent globalement mais de façon plus prononcée pour les protéines riches en hélice α .

Selon ces observations, la bicuspidie aortique serait donc liée à des perturbations portant essentiellement sur « le collagène » et peu sur l'élastine. Ceci pourrait expliquer pourquoi les anévrismes sur bicuspidie surviennent fréquemment chez des patients relativement jeunes.

En effet, l'élastine non stabilisée par un réseau de collagène efficace serait soumise à des forces plus importantes ce qui pourrait alors altérer progressivement ses propriétés physiques jusqu'à induire une dilatation. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour comprendre exactement le mécanisme de ces dilatations aortiques sur bicuspidie. Pourtant, on peut d'ores et déjà dire que les aortes de patients porteurs de bicuspidie aortique sans anévrisme présentent des caractéristiques tissulaires comparables à celle retrouvées dans les tissus anévrysmaux sur bicuspidie.

L'analyse du même rapport de bande établie sur les dérivées secondes des spectres confirme et amplifie la discrimination des différents tissus. Le tableau XVIII ci-dessous rapporte les différentes valeurs du test de Student selon les tissus comparés.

TABLEAU XVIII : RESULTATS DU TEST DE STUDENT SUR LE RAPPORT DE BANDE DES DERIVEES SECONDES DES ZONES 1667-1643 / 1642-1628 cm^{-1}

Echantillons utilisés pour le test de Student	Valeur du p
Aortes normales vs anévrismes	0,0478
Aortes normales vs ensemble des anévrismes	0,0011
Aortes normales vs bicuspidie non dilatée	0,0101
Aortes normales vs anévrismes avec bicuspidie	0,0015
Anévrismes vs anévrismes avec bicuspidie	0,0101
Anévrismes vs bicuspidie non dilatée	0,0205
Anévrismes avec bicuspidie vs bicuspidie non dilatée	0,4225

On constate que ce rapport de bande, établi sur les dérivées secondes des spectres, est très informatif et discriminant. Il permet en effet une discrimination entre l'ensemble des tissus que nous avons utilisés pour cette étude à l'exception des bicuspidies non dilatées vs les anévrismes sur bicuspidie. Ces résultats confirment la puissance discriminante de la spectroscopie infrarouge appliquée aux structures biologiques complexes. De plus cela conforte nos précédents résultats selon lesquels le tissu aortique non dilaté sur bicuspidie présente des altérations comparables à celles retrouvées pour les anévrismes sur bicuspidie. Si cette hypothèse se confirmait sur une plus large série, nous aurions peut-être mis en évidence un possible marqueur (prédictif ?) de dilatation pour les aortes de bicuspidie. Seules des études prospectives et des suivis de cohorte pourront nous dire si ce facteur est prédictif ou non d'une éventuelle dilatation.

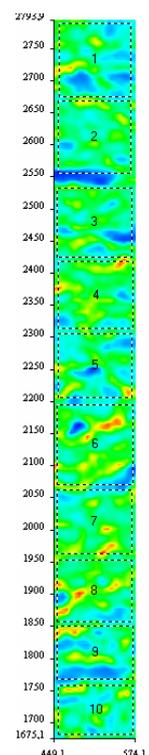
Enfin, pour conclure sur l'analyse des images spectrales, il semble que cette analyse puisse orienter nos investigations sans pouvoir pour le moment devenir un véritable test facilement utilisable sans avoir recours à l'analyse des spectres eux-mêmes et de leur dérivées secondes. Pourtant, l'amélioration probable des logiciels disponibles et des procédures d'analyse d'image pourrait rapidement changer ce constat en permettant le traitement de plusieurs images en même temps ce qui permettrait d'appliquer le même prétraitement à toutes les données les rendant directement comparables entre elles. Plusieurs approches à ce sujet sont d'ailleurs envisagées et développées au sein de l'unité MéDian et de l'INRA de Nantes (Dr. D.Bertrand).

2.2.3. Résultats après extraction de spectres provenant de l'image spectrale

Comme nous venons de le voir il est actuellement difficile d'analyser directement des images sans en extraire les données comme nous l'avons fait pour le mode point par point. Même si des méthodes sont en cours de développement, l'analyse des spectres à l'aide des classification hiérarchique ascendante et analyse en composante principale reste, pour le moment, nos méthodes de référence.

2.2.3.1 Hétérogénéité des données spectrales dans l'épaisseur de l'échantillon

Comme nous l'avons précédemment précisé, l'aorte est un tissu inhomogène. L'analyse en mode point par point avait souligné ce fait.



Pourtant, nous avons tenu à refaire ces expérimentations pour s'assurer que nos résultats n'étaient pas influencés par le nombre relativement restreint de spectres utilisé pour établir chaque spectre moyen correspondant aux trois zones retenues dans la profondeur tissulaire.

Nous avons donc repris la série d'échantillons et avons fait 10 spectres moyens (co-added spectra) se répartissant dans la profondeur du tissu, comme le montre la figure précédente (FIGURE 75 : ZONES DE L'ECHANTILLON UTILISEES POUR L'ETUDE DE L'HETEROGENEITE DU TISSU AORTIQUE).

Ces spectres ont été exportés manuellement du logiciel Spotlight vers le logiciel Spectrum 3.3 pour être convertis en fichiers « spc » analysables par le logiciel OPUS dans lequel ils seront enfin enregistrés au format OPUS après avoir été dérivés (dérivée seconde). Nous avons réalisé une analyse hiérarchique par échantillon pour visualiser l'hétérogénéité des tissus.

Les anévrysmes analysés ont montré des différences spectrales suffisantes pour permettre une classification quasiment correcte en s'intéressant principalement aux bandes Amides I et II. La figure 76 montre un exemple de dendrogramme réalisé sur un échantillon anévrysmal sans bicuspidie.

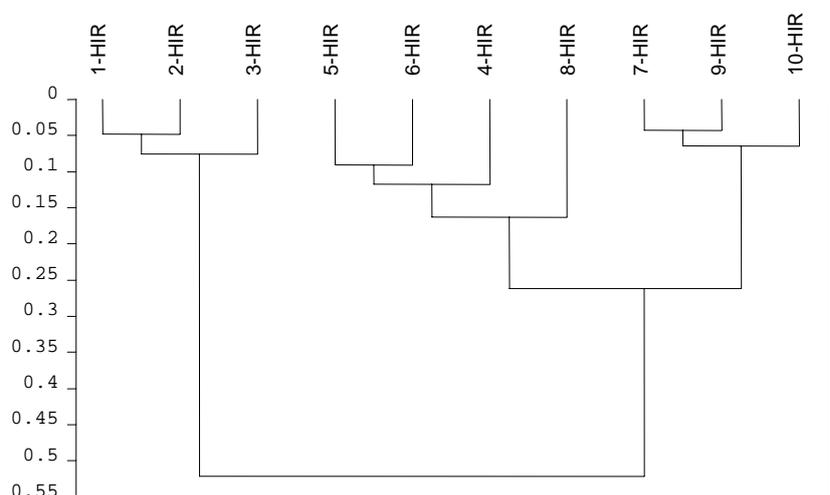


FIGURE 76 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES MOYENS DANS L'ÉPAISSEUR D'UNE AORTE ANEVRYSMALE (BANDES AMIDES I+II)

L'analyse visuelle des dérivées secondes nous faisait espérer ces résultats avec, comme le montre la figure 77, des shifts (décalages des pics négatifs) relativement importants concernant la bande Amide I (en rouge : les spectres les plus internes, en vert les spectres centraux et en bleu les spectres les plus externes). Comme nous l'avons déjà précisé, ces pics sont directement liés à la structure secondaire des protéines de la paroi aortique. Certains auteurs ont attribué ces shifts à des perturbations au sein des liaisons hydrogènes stabilisant la structure secondaire des protéines ainsi qu'aux liaisons intermoléculaires au sein du réseau protéique [81]. Il est possible que ces modifications soient le reflet des fragmentations de l'élastine et accumulation de collagène polyglycosylé, habituelles dans les anévrysmes. Cette hypothèse semble plausible puisque de façon concomitante les zones spectrales fortement influencées par les oses présentent des variations importantes comme le montre la région 1450-1480 cm^{-1} .

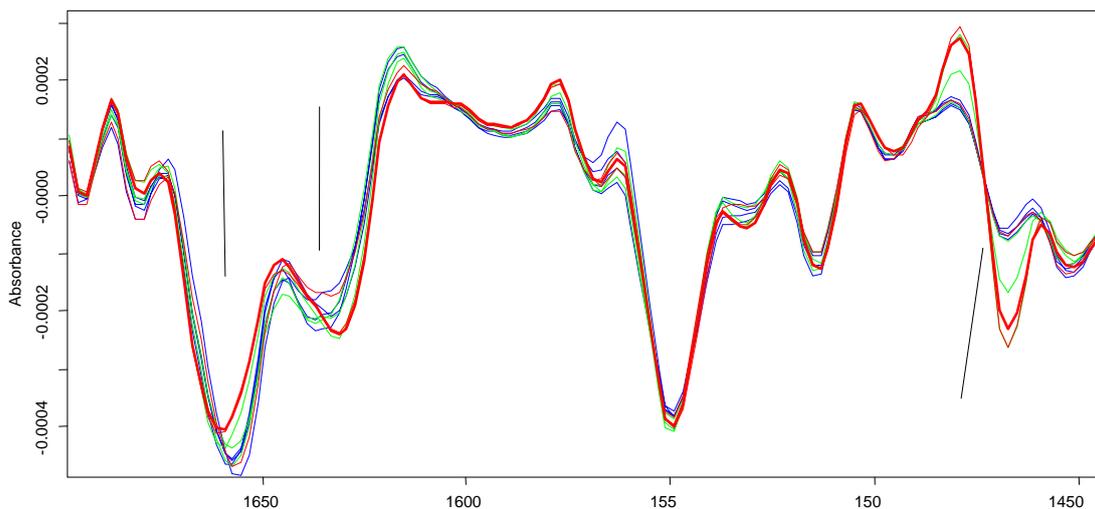


FIGURE 77 : VARIATIONS DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS REALISES DANS L'ÉPAISSEUR D'UN TISSU AORTIQUE ANEVRYSMAL

Des observations similaires ont été réalisées, chez des patients présentant un anévrysme sur bicuspidie, en utilisant dans certains cas le massif Amide I+II, ou dans d'autres, ces bandes de façon séparée comme le montre la figure 78 réalisées sur la bande Amide II. Les dérivées secondes correspondantes sont présentées sur la figure 78.

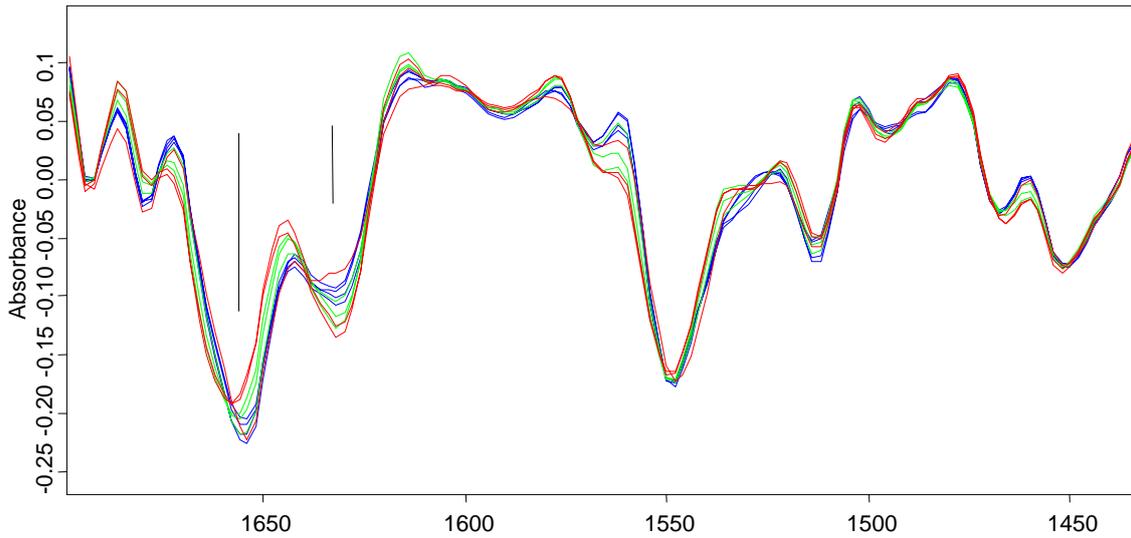


FIGURE 77 : DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS RECUEILLIS DANS L'ÉPAISSEUR D'UNE AORTE DE BICUSPIDIE

On remarque un décalage progressif du pic entre 1658 cm^{-1} dans la région sous intimale et 1653 cm^{-1} dans le tiers externe de la média comme pour les anévrismes sur valve aortique normale. Du fait des pics du collagène (1662 cm^{-1}) et de l'élastine (1657 cm^{-1}), il est probable que des modifications du collagène au profit de l'élastine et/ou d'autres protéines soient en cause.

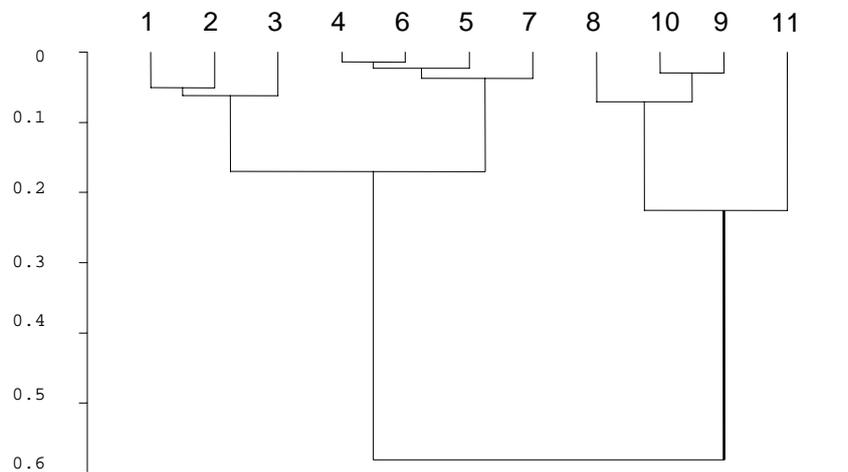


FIGURE 79 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES MOYENS DANS L'ÉPAISSEUR D'UNE AORTE ANEVRYSMALE SUR BICUSPIDIE (BANDE AMIDE II)

Les tissus anévrysmaux avec ou sans bicuspidie présentent donc trois « couches » distinctes du point de vue de leur composition protéique. Pourtant, à l'inverse des anévrysmes sur valve aortique normale, le maximum d'hétérogénéité des anévrysmes sur bicuspidie se situe entre les deux tiers internes et le tiers externe de la paroi aortique pouvant impliquer des phénomènes différents tant dans leurs natures que dans leur topographie. Ceci devra pourtant être vérifié sur une large série pour voir si cette architecture est relativement constante.

Dans un second temps, nous avons réalisé les mêmes longues et fastidieuses manipulations pour les échantillons normaux. Le dendrogramme suivant (Figure 80) illustre l'un des meilleurs résultats obtenus. En fait, l'observation des spectres moyens et de leur dérivée seconde ne montre que très peu de différence entre les spectres moyens selon leur position.

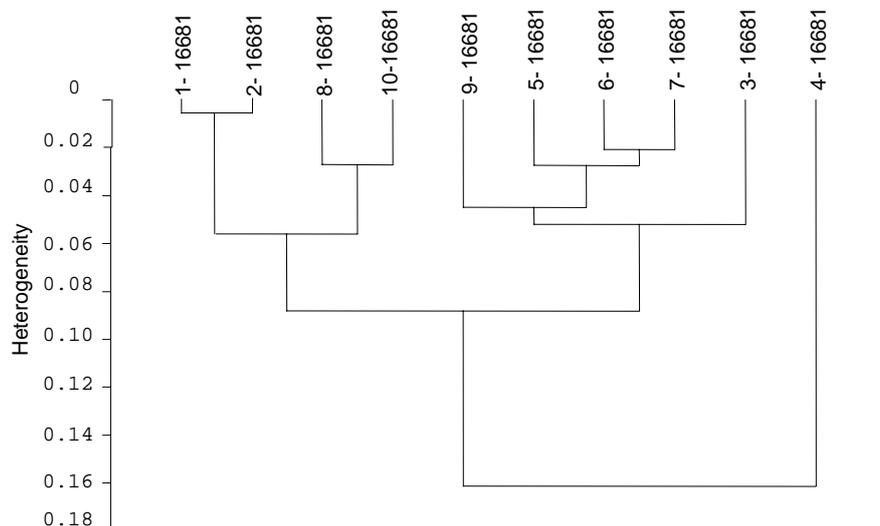


FIGURE 80 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES MOYENNES EXTRAITS D'UN ECHANTILLON D'AORTE NON DILATEE

Plusieurs explications peuvent être avancées : le tissu est finalement plus homogène que nous le pensions. En effet, en réalisant des moyennes spectrales sur de larges zones de tissu, nous avons probablement lissé certaines variations spectrales. Pourtant, pour que cette hypothèse soit valide, il faut que ces variations soient de faibles intensités et/ou réparties de façon homogène dans le tissu. Il est aussi probable que l'utilisation de zones contiguës ne permet pas d'obtenir d'importantes différences entre des spectres moyens adjacents.

On remarquera tout de même que les spectres provenant des extrémités de l'échantillon (sous-intima et partie profonde de la média) se classent ensemble, confirmant ainsi nos précédentes observations en mode point par point : on retrouve bien une architecture en trois couches avec une zone centrale individualisée séparant deux zones relativement semblables.

Comme le dendrogramme le laissait supposer, les dérivées secondes des spectres moyens d'aortes saines (figure 81) sont bien moins hétérogènes que celles provenant d'aortes anévrysmales. Seule les bandes Amides I+II et la gamme spectrale 1100-1000 cm^{-1} présentent quelques variations, sinon le reste du spectre est rigoureusement identique pour l'ensemble des spectres moyens de cet échantillon. Il faut pourtant préciser que ce tissu provenait d'une femme âgée de 23 ans (suicide médicamenteux) sans antécédant particulier ni athérome.

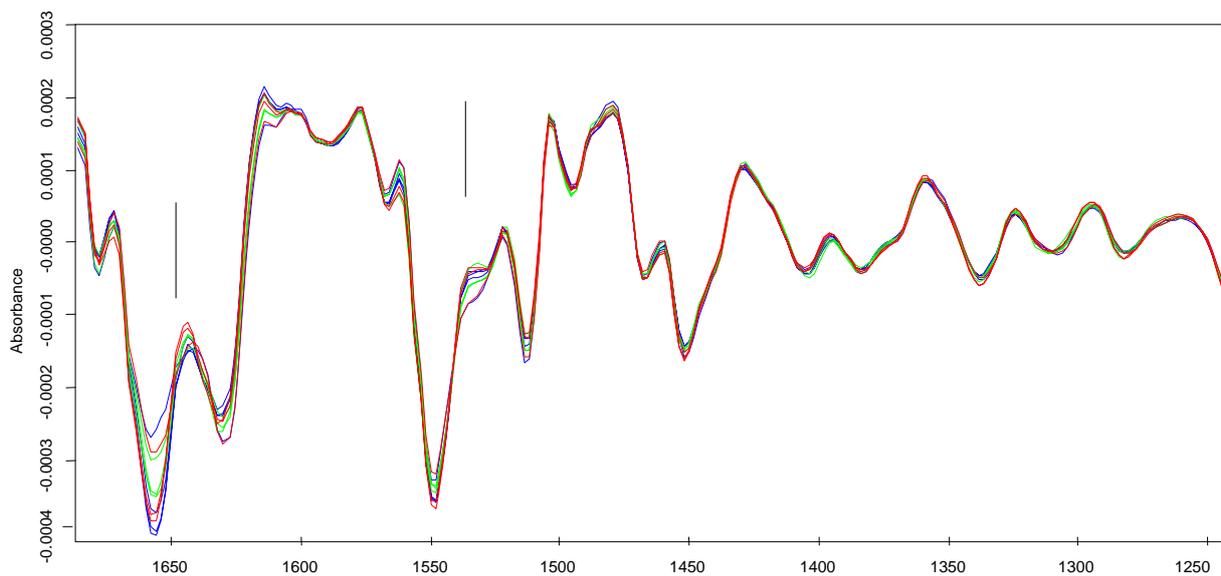


FIGURE 80 : VARIATIONS DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS ISSUS DE L'ÉPAISSEUR D'UNE PAROI AORTIQUE NORMALE

2.2.3.2. Analyses et classifications des différents types de tissus à partir des Images Spotlight

a. Analyses basées sur la classification hiérarchique ascendante

Nous avons utilisé de larges moyennes spectrales représentant, pour l'ensemble des tissus, plus de 90 % de leur surface. Dans un premier temps, nous avons utilisé le test de student pour tenter de déterminer les zones spectrales les plus significatives.

Le tableau XIX ci-dessous illustre les bandes définies par ce test statistique à partir des spectres et des dérivées secondes des spectres moyens.

TABLEAU XIX : BANDES SPECTRALES SIGNIFICATIVES ENTRE LES ANEVRYSMES ET LES AORTES SAINES

Bandes spectrales significatives entre les anévrysmes et les aortes saines ($p < 0,05$) en cm^{-1} (imageur FTIR)	
Sur le spectre	Sur la dérivée seconde
1654-1634	1714-1710
1528-1476	1574-1568
1120-1116	1564-1558
1088-1034	1464-1458
	1126-1112
	1042-1034

Certes, des zones ont pu être sélectionnées par ce test statistique, mais on remarque des significativités modeste et jamais inférieures à 10^{-3} . Comme nous l'avons fait pour les acquisitions en mode point, nous avons réalisé les classifications hiérarchiques correspondant à plusieurs combinaisons de ces bandes. Elles s'avèrent, pour la plupart, assez décevantes avec des sensibilités et spécificités dépassant rarement les 80 %. Pourtant nous avons trouvé quelques régions permettant des classifications plus satisfaisantes comme les régions $1654-1634 \text{ cm}^{-1}$ et $1126-1110 \text{ cm}^{-1}$ du spectre. Il n'a pas été possible de réaliser une classification 100 % juste des échantillons dont nous disposons. L'analyse sur les spectres retrouve une hétérogénéité globalement assez importante entre les deux bras du dendrogramme.

Lorsque l'on utilise les dérivées secondes de ces mêmes spectres, on retrouve des classifications hiérarchiques assez semblables à celles obtenues avec les spectres eux mêmes. Pourtant, l'hétérogénéité entre les groupes est très faible et ne permet qu'une classification imparfaite, que l'on retrouve pour plusieurs gammes spectrales des dérivées secondes. La figure 82 ci-dessous illustre la classification obtenue en utilisant les bandes $1652 - 1610 / 1568 - 1504 / 1126-1112 \text{ cm}^{-1}$.

Malgré de très nombreux essais il a été impossible de classer correctement l'un des échantillons sains qui s'est toujours classé avec ceux provenant d'anévrysmes de l'aorte.

Cet échantillon provient d'un homme de 52 ans aux antécédants d'hypertension et de tabagisme. Il est possible que cette classification soit faussée du fait de ces facteurs intercurrents sans que nous puissions l'affirmer avec certitude.

De plus, si les deux premières bandes comprises au sein des bandes amides orientent vers des modifications protéiques, la bande 1126-1112 cm^{-1} est influencée par deux types de composés : les oses et l'ADN. Comme nous l'avons déjà remarqué, en confrontant ces observations avec la physiopathologie des anévrismes, il semble tout à fait possible que ces deux types de composés soient impliqués. Là encore une expérimentation à plus grande échelle est nécessaire pour déterminer si ces facteurs ont un rôle positif ou négatif sur la classification entre aortes saines et pathologiques.

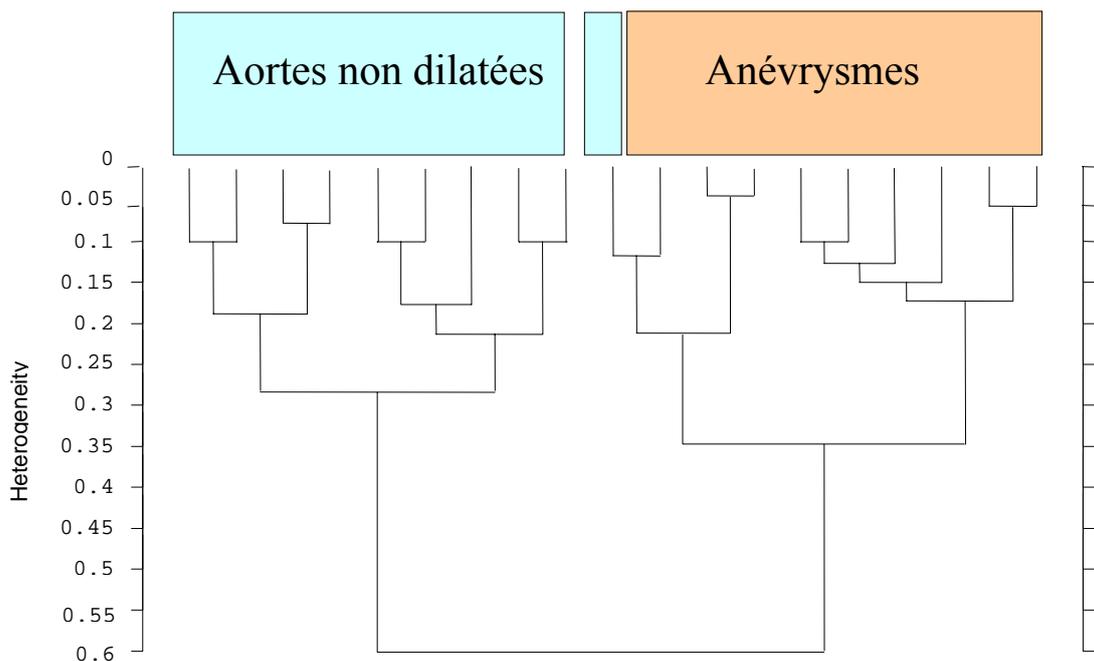


FIGURE 82 : CLASSIFICATION OBTENUE EN UTILISANT LES BANDES 1652 - 1610 / 1568 - 1504 / 1126-1112 cm^{-1}
DES DERIVEES SECONDES DES SPECTRES MOYENS

Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible de tester toutes les bicuspidies aortiques mais celle incluse au groupe des anévrismes n'a pu être séparée de ce groupe par aucune bande.

En effet, le test de Student ne retrouve comme significatives ($p < 0,05$) que les bandes $1634-1644 \text{ cm}^{-1}$ / $1192-1204 \text{ cm}^{-1}$ / $936-940 \text{ cm}^{-1}$ sur le spectre et quasiment aucune différence sur la dérivée seconde (bandes $1240-1236 \text{ cm}^{-1}$ et $938-942 \text{ cm}^{-1}$).

b. Analyses en composantes principales

Nous avons réalisé l'analyse en composante principale de la gamme $950-1720 \text{ cm}^{-1}$ des spectres moyens de nos échantillons et la figure 83 expose les résultats obtenus.

On observe que la première composante qui exprime 33 % de la variance permet de discriminer les tissus sains par rapport aux autres tissus. La seconde composante principale, pour sa part permet une discrimination des tissus aortiques non dilatés provenant d'aorte de bicuspidie du reste des échantillons.

L'association de ces deux composantes permet une discrimination assez nette du groupe Anévrisme avec ou sans bicuspidie des échantillons non dilatés avec ou sans bicuspidie.

Ceci confirme notre approche en classification hiérarchique puisqu'il semble relativement aisé de discriminer les échantillons dilatés des non dilatés alors qu'il est quasi impossible, sur les données Spotlight, de séparer les anévrysmes sur valves aortiques normales de ceux développés sur valve bicuspidie.

Il est possible que ces difficultés soient essentiellement liées au processus de lissage qui jalonnent la procédure. En effet, le prétraitement inclut un lissage et la genèse des dérivées secondes établie sur 9 points amplifie le phénomène. Ceci est probablement à l'origine de pertes d'informations relativement importantes.

Il nous sera nécessaire de standardiser cette approche pour éliminer un maximum de bruit tout en préservant le plus possible l'information spectrale.

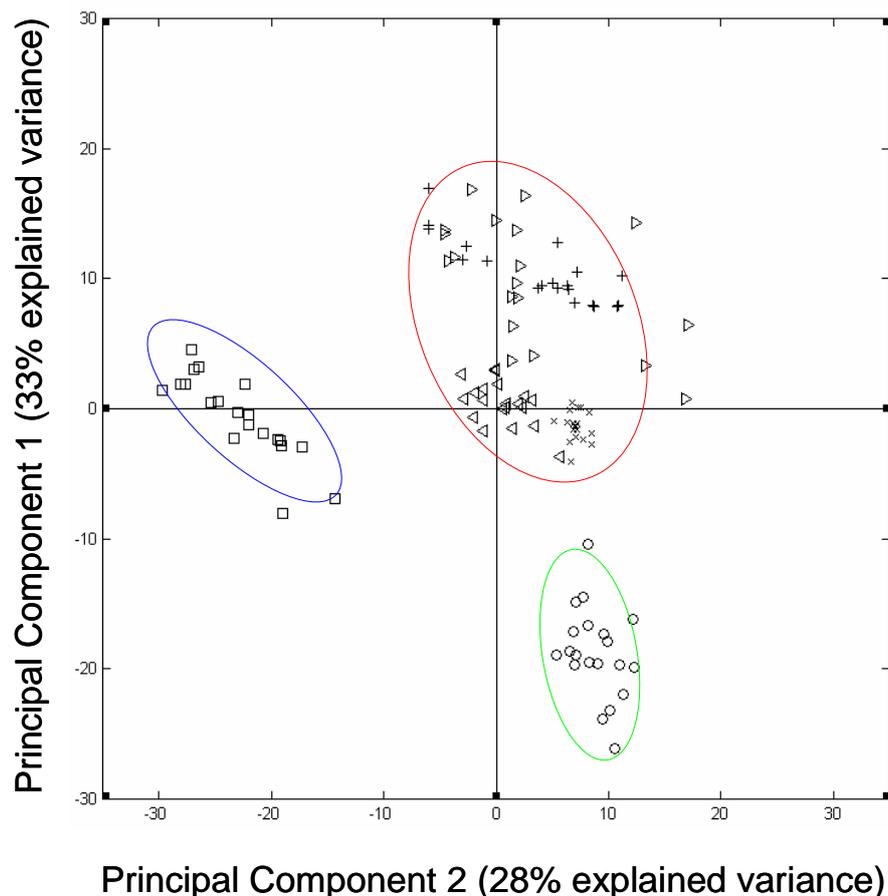


FIGURE 83 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES ECHANTILLONS SAINS, ANEVRYSMAUX ET DE BICUSPIDIE NON DILATEES

Nous avons tenté de refaire ces analyses sur des bandes spectrales plus étroites mais malheureusement notre logiciel ne permet pas d'obtenir un jeu de composantes principales pour des bandes spectrales de quelques dizaines de cm^{-1} .

Du fait du manque de souplesse de ce logiciel et de ces limitations (ancienneté), un nouveau logiciel est en phase de développement et nous apportera probablement la puissance nécessaire pour affiner ce type d'analyse. En effet nous avons préféré l'approche de la classification hiérarchique du fait d'une plus grande simplicité de mise en oeuvre et des nombreuses possibilités de paramétrages. Pourtant il est probable que cette puissante méthode d'analyse qu'est l'ACP puisse nous rendre de grands services dans l'avenir.

Pour conclure sur cette étude réalisée en spectroscopie infrarouge, qui a représenté la grande majeure partie de notre travail de thèse, nous avons pu montrer que l'approche en spectroscopie vibrationnelle infrarouge permet une étude approfondie du tissu aortique. Les analyses statistiques des données issues de ces expérimentations permettent la classification des tissus selon leur caractère anévrysmal ou non et, dans certains cas, autorisent une discrimination encore plus fine des échantillons selon la présence ou non de facteurs associés comme la bicuspidie aortique.

Cette approche sera poursuivie dans l'avenir avec l'utilisation de nouvelles techniques d'analyse d'image, de données (Curve Fitting, réseau de neurones ?) pour améliorer nos résultats et pouvoir proposer un modèle permettant cette analyse de façon standardisée et automatisée.

2. LA SPECTROSCOPIE RAMAN APPLIQUEE AU TISSU AORTIQUE

A la différence de la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman est basée sur des phénomènes de diffusion et ne nécessite pas que le rayonnement traverse l'échantillon pour obtenir l'information [82]. Cet aspect particulièrement intéressant dans l'étude des échantillons biologiques nous a conduit à nous pencher sur deux approches : la première, purement de laboratoire, à l'aide de l'imageur Raman Labram et la seconde à l'aide d'une fibre optique [83] associée à un spectromètre Raman miniaturisé. Ce dernier, bien qu'actuellement en phase de développement, a retenu notre attention puisque ce système ouvre la voie d'une utilisation de ces techniques spectroscopiques en pratique clinique à moyen terme.

Pourtant, la législation française, suivant celle instaurée au niveau européen, impose que ce matériel ait une certification CE médicale pour pouvoir être utilisé au sein de l'hôpital. Cette procédure longue et forcément coûteuse est pourtant un préalable indispensable à l'exportation hospitalière de telles techniques, dans le cadre de projet de recherche clinique. Les contraintes liées à la réalisation des coupes histologiques pourraient être totalement éliminées si cette technologie était employée directement au contact du tissu aortique pendant les interventions chirurgicales.

De plus, aucune contrainte ne nous empêcherait plus de réaliser des acquisitions sur des sujets sans dilatation aortique puisque la plupart des patients opérés de chirurgie cardiaque ne présente pas d'anévrisme de l'aorte ascendante.

Nous avons débuté l'expérimentation de la spectroscopie Raman de façon relativement récente ce qui explique encore le peu de résultats concrets, mais nos efforts vont se porter sur cette technologie dans les mois à venir pour achever un modèle d'analyse efficace permettant des classifications sur la base des données Raman in vitro, ex vivo et/ou in vivo.

2.1. Analyse des tissus aortiques à l'aide du spectromètre Labram

2.1.1. Le spectre Raman du tissu aortique

Nous avons utilisé des échantillons provenant de la collection employée pour l'analyse en spectroscopie infrarouge. En effet, à la différence de la spectroscopie infrarouge, le support ne perturbe pas ou très peu le signal Raman et permet même des analyses sur de simples lames de verre. Nous avons donc réutilisé ces échantillons déposés sur des fenêtres de ZnSe.

Le spectre Raman d'un tissu aortique sain (en rouge) est illustré par la figure 84. En le comparant avec le spectre Raman du collagène obtenu à partir d'une extraction chez le rat, on voit très nettement des similitudes entre ces derniers. Pour le moment, nous ne disposons pas de spectres Raman de l'élastine et nous ne pouvons donc pas étudier les similitudes et les différences qui pourraient exister entre ces différents spectres.

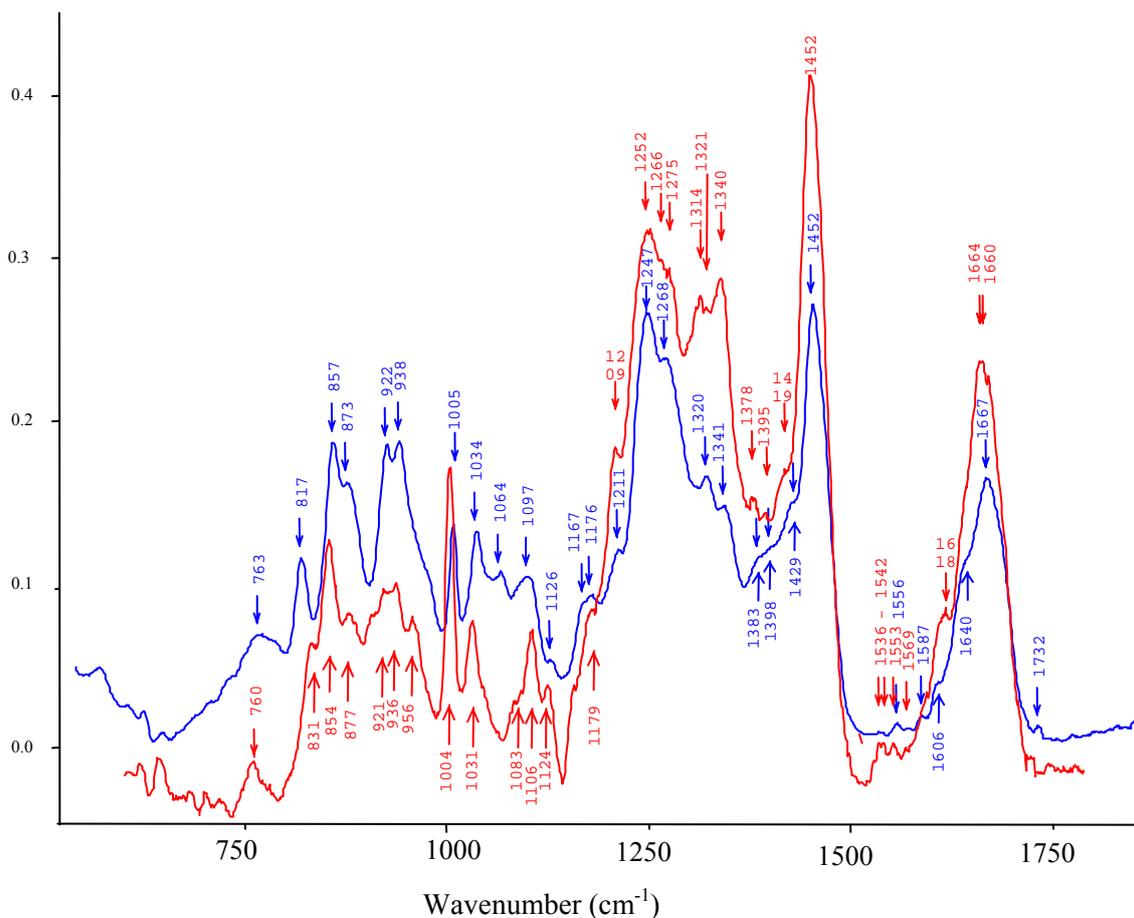


FIGURE 84 : ASPECT DES SPECTRES DU TISSU AORTIQUE NON DILATÉ ET DU SPECTRE DU COLLAGÈNE (BLEU)

Comme on peut aussi le remarquer, le spectre Raman est beaucoup plus résolu que celui obtenu en spectroscopie infrarouge ce qui apporte des informations complémentaires ou supplémentaires.

L'analyse concomitante des spectres infrarouge et Raman permet de mieux préciser l'architecture de la molécule étudiée. En effet, la règle « d'exclusion mutuelle » spécifie que si la molécule présente un centre de symétrie alors toutes les vibrations actives en Raman seront inactives en infrarouge et inversement (cf. théories relatives aux deux spectroscopies). Dans le cas de molécules simples comme le CO₂, on observe les activités spectroscopiques suivantes (tableau XX) :

TABLEAU XX : MODE DE VIBRATION EN SPECTROSCOPIE RAMAN ET INFRAROUGE DU CO₂

Mode de vibration du CO₂	Raman	Infrarouge
v1 : élongation symétrique	Active	Inactive
v2 : déformation	Inactive	Active
v3 : élongation antisymétrique	Inactive	Active

Par contre, si la molécule ou l'un de ces groupements chimiques (macromolécules) ne possède pas de centre de symétrie alors certaines de ses vibrations seront à la fois active en IR et en Raman. La relation inverse est aussi vraie : si l'observation des spectres IR et Raman d'une molécule ne montrent aucune bande commune, la molécule est symétrique (et inversement). Cependant, il faut être prudent puisque certaines vibrations de faible intensité peuvent être totalement masquées au sein du spectre. En conclusion, l'analyse de molécules complexes nécessite l'étude de ces deux spectres pour en approcher leurs structures.

Même si certaines caractéristiques peuvent être définies au sein d'un tissu, la superposition des informations spectrales provenant de plusieurs molécules rend relativement difficile ce type d'analyses sans avoir recourt à des extractions et purifications des différents composés.

2.1.2. Etude préliminaire des tissus aortiques non dilatés et anévrysmaux en spectroscopie Raman

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les spectres Raman étaient suffisamment informatifs pour permettre de séparer les différents échantillons deux à deux.

Pour ce faire nous avons réalisé des acquisitions Raman sur de petites zones au centre des tissus aortiques sélectionnés. La figure 85 illustre les variations obtenues entre les différents spectres. Entre les différents tissus, on remarque des variations bien plus marquées que celles visualisées en spectroscopie infrarouge, en particulier sur la gamme du spectre comprise entre 750 et 1500 cm^{-1} . Ces constatations associées à la possibilité de monitorer certains acides aminés spécifiques comme ceux du collagène ou de l'élastine devraient nous permettre de réaliser des analyses encore plus spécifiques [zones 820-860 cm^{-1} (tyrosine des chaînes latérales de l'élastine) et 930-950 cm^{-1} (liaisons C-C de la proline présente dans le Collagène)].

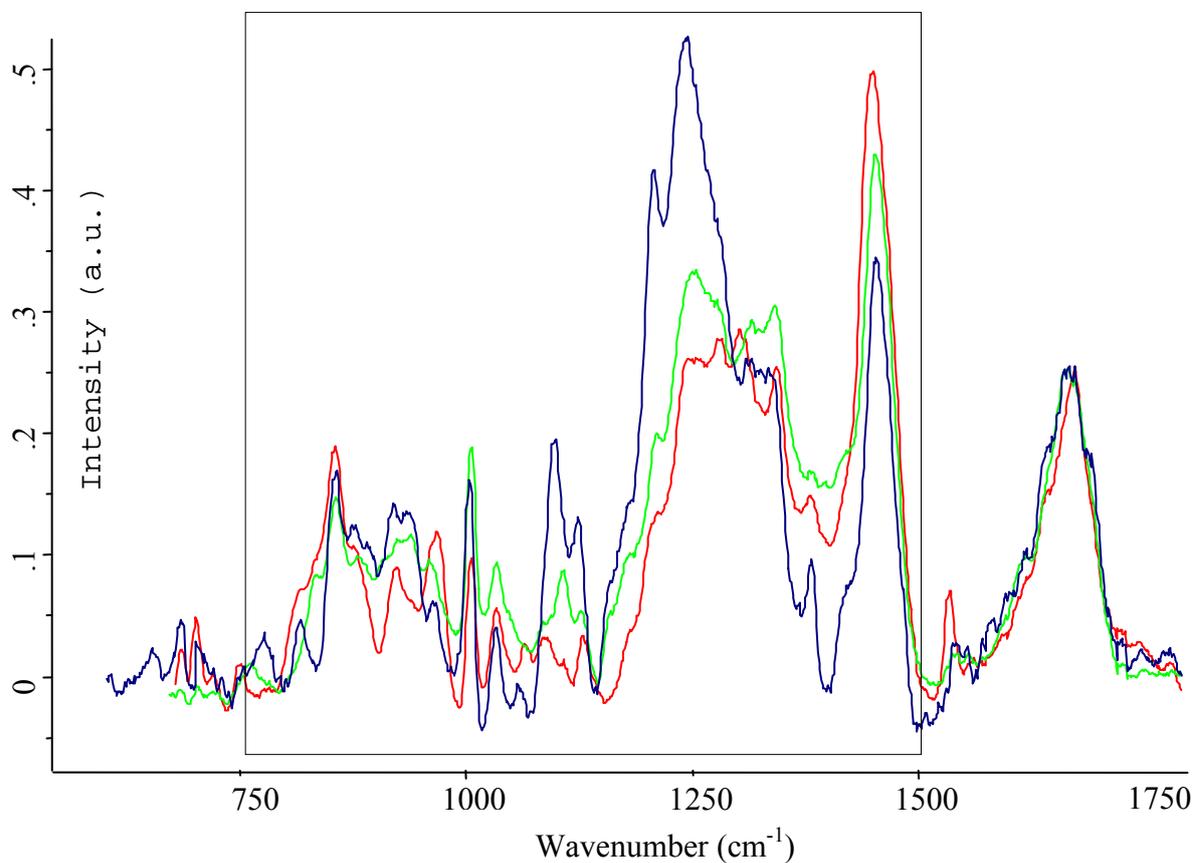


FIGURE 85 : EXEMPLE DE VARIATIONS DE SPECTRES MOYENS RAMAN POUR UN TISSU SAIN (BLEU), ANEVRYSMAL (ROUGE) ET PROVENANT D'UN ANEVRYSMESUR BICUSPIDIE (VERT)

Nous avons extrait et traité les spectres à l'aide des logiciels Laspec et OPUS avant d'entreprendre la réalisation de classifications hiérarchiques ascendantes.

Pour les premières classifications nous avons utilisé plusieurs spectres provenant de mêmes échantillons afin de vérifier que la variabilité entre les échantillons était supérieure à celle présente au sein d'un seul. La figure 86 illustre l'une des classifications hiérarchiques obtenues. Ici nous avons utilisé la gamme 800-950 cm^{-1} des dérivées secondes de quelques spectres de chaque échantillon. On remarque que la classification respecte bien l'appartenance des spectres en dehors d'un cas. L'un des spectres d'un échantillon non dilaté se retrouve classé par erreur au sein du deuxième échantillon sain. Pourtant, cette classification préliminaire semble assez intéressante puisqu'elle permet de séparer les anévrismes du reste des échantillons.

Par contre avec un seuil d'hétérogénéité fixé à 1.4, il serait impossible de classer les deux échantillons sains dans un même groupe.

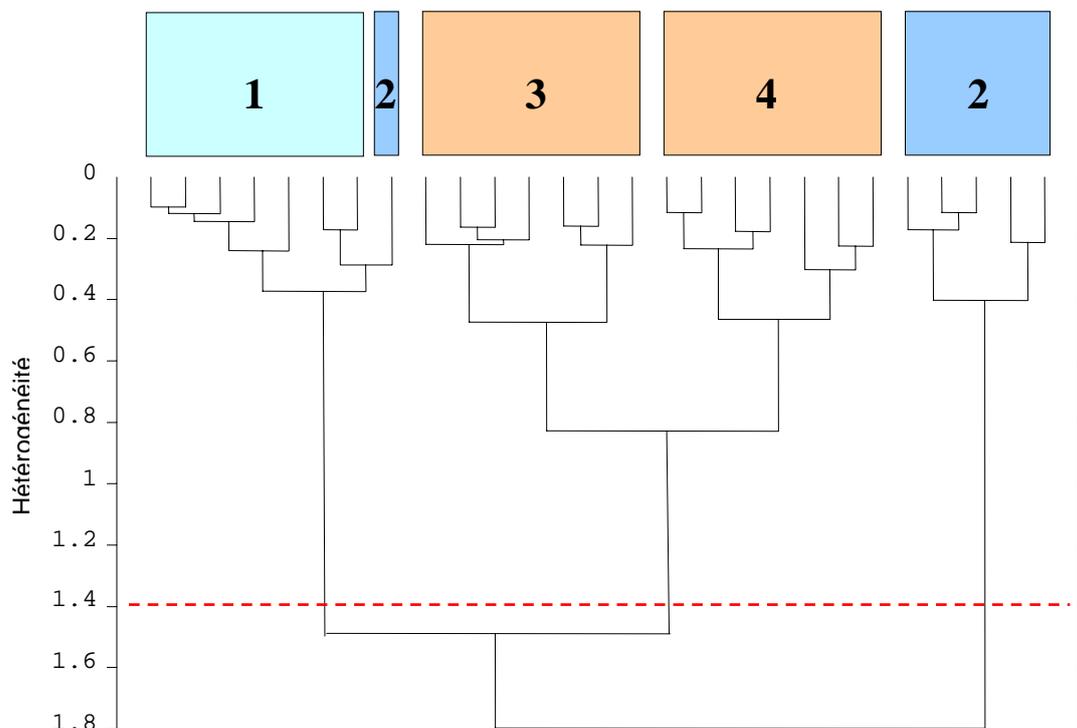


FIGURE 86 : DENDROGRAMME REALISE SUR LES DERIVEES SECONDES DE LA REGION SPECTRALE 800-950 cm^{-1}
D'AORTES NON DILATEES (1 ET 2) ET ANEVRYSMALES (3 ET 4)

En fait, ces deux échantillons proviennent de personnes d'âge très différents (1 = homme de 52 ans et 2 = femme de 23 ans). Il est probable que cette mauvaise classification soit liée aux effets de l'âge produisant certaines altérations proches de celles retrouvées dans les anévrismes.

Ces observations nous ont fait ressentir le besoin d'étudier l'influence de l'âge sur nos classifications. Pour ce faire, nous avons utilisé 6 échantillons provenant d'aortes non dilatées d'âges et de sexes différents. 4 d'entre elles provenaient de patients âgés de moins de 35 ans alors que les deux autres provenaient d'hommes de 66 et 48 ans. Nous avons réalisé une classification hiérarchique basée sur la gamme spectrale 970-800 cm^{-1} (dérivées secondes) dont le dendrogramme est présenté dans la figure 87.

Les hommes sont représentés en bleu et les femmes en rose. Les hommes jeunes sont représentés en bleu clair et les hommes plus âgés en bleu foncé ; pour leur part, les 2 femmes appartiennent toutes les deux au groupe « jeunes».

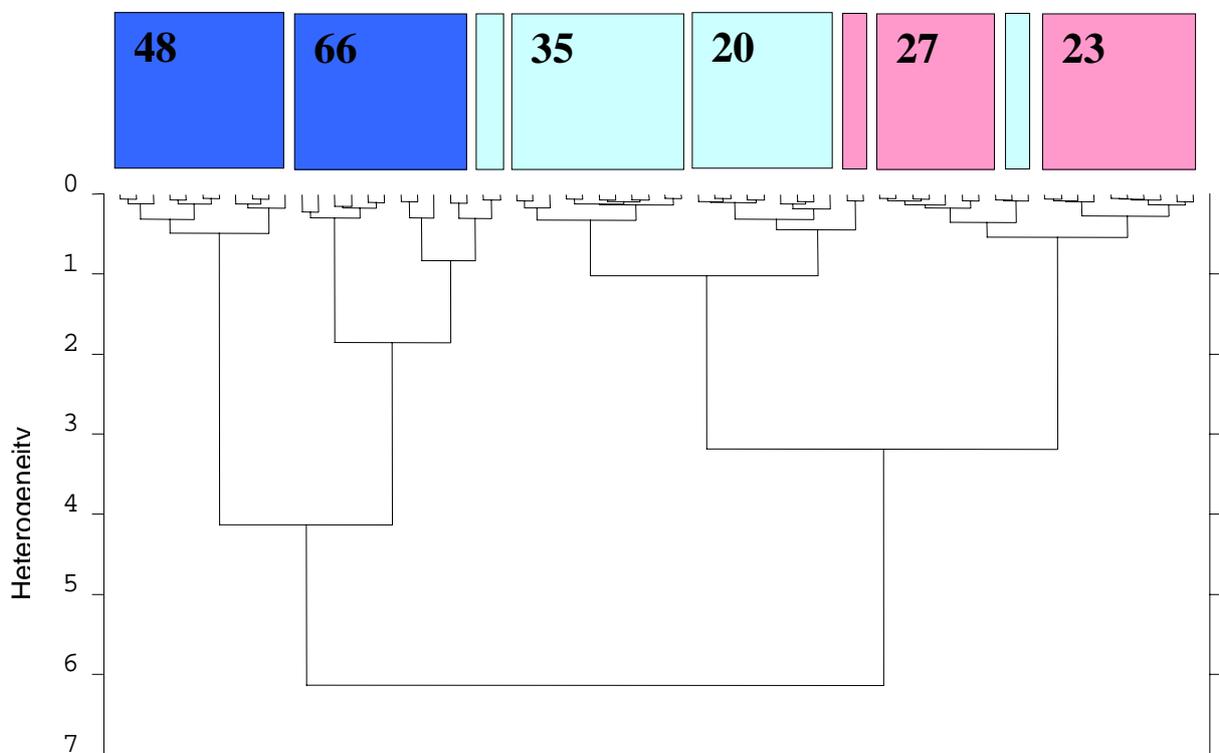


FIGURE 87 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE SUR LA GAMME SPECTRALE 970-800 cm^{-1} (DERIVEES SECONDES) DE PATIENTS D'AGE ET DE SEXE DIFFERENTS SANS ANEVRYSMES

On remarque sur ce dendrogramme que les deux échantillons provenant d'hommes plus âgés se classent à part, sans que les deux échantillons ne se confondent. Il existe donc des différences, autres que l'âge, qui expliquent cette discrimination (hétérogénéité à 4). Le bras de droite comprend l'ensemble des échantillons de patients plus jeunes, exception faite de 2 spectres.

On remarque que les paires d'échantillons provenant d'hommes et de femmes sont classés ensemble. Pourtant un plus grand nombre d'erreurs entre homme et femme nous font penser que si ce paramètre peut avoir une importance, celle-ci est moindre que l'âge des patients. Comme pour l'ensemble de nos travaux, seule l'analyse de véritables populations d'échantillons représentatifs pourra définir les influences respectives des différents facteurs épidémiologiques et médicaux.

Devant ces résultats encourageants nous avons voulu poursuivre ces travaux mais des problèmes liés aux différentes calibrations et paramétrages du spectromètre ont rendu ininterprétables nos nouvelles acquisitions. De plus il est probable que nous ayons des interférences liées à l'eau au sein des tissus. En effet, on retrouve sur plusieurs échantillons des ondulations pouvant être produites par l'eau. Il est effectivement possible que le stockage de nos échantillons en congélation affecte les mesures. Des essais d'acquisitions après passage au dessiccateur devraient être faits prochainement pour savoir s'il est possible de minimiser voire d'annuler les effets de l'eau.

De plus quelques problèmes de compatibilité entre les logiciels Labspec et OPUS causent des déformations des spectres dans ce dernier logiciel, utilisé pour la classification hiérarchique. Il est donc impératif de définir un protocole de préparation et de fixer nos problèmes de traitement de données avant d'envisager des classifications dans lesquelles nous pourrions avoir toute confiance.

L'un des moyens les plus sûrs de s'affranchir des conditions de préparation et de conservation des échantillons est de ne pas préparer ni conserver ces échantillons aortiques avant de réaliser les acquisitions spectrales. Deux voies sont alors possible avec l'analyse ex vivo extemporanée pour la première et l'analyse in vivo pour la deuxième.

2.2. Etude préliminaire ex vivo d'une crosse aortique à l'aide de la « fibre Raman »

Nous avons récemment utilisé un nouvel appareillage, encore en phase de développement, qui associe une fibre optique multicanal et un spectromètre Raman axial (cf chapitre 5 : La fibre Raman). Nous avons étudié, pour la première fois, une crosse aortique dans son intégralité en spectroscopie Raman et sans aucune préparation. Cette crosse aortique a été obtenue lors d'un prélèvement multi-organes chez une femme de 31 ans (figure 88). L'allogreffe mitrale a été cryopréservée et nous avons donc pu utiliser l'aorte ascendante et horizontale pour nos recherches.

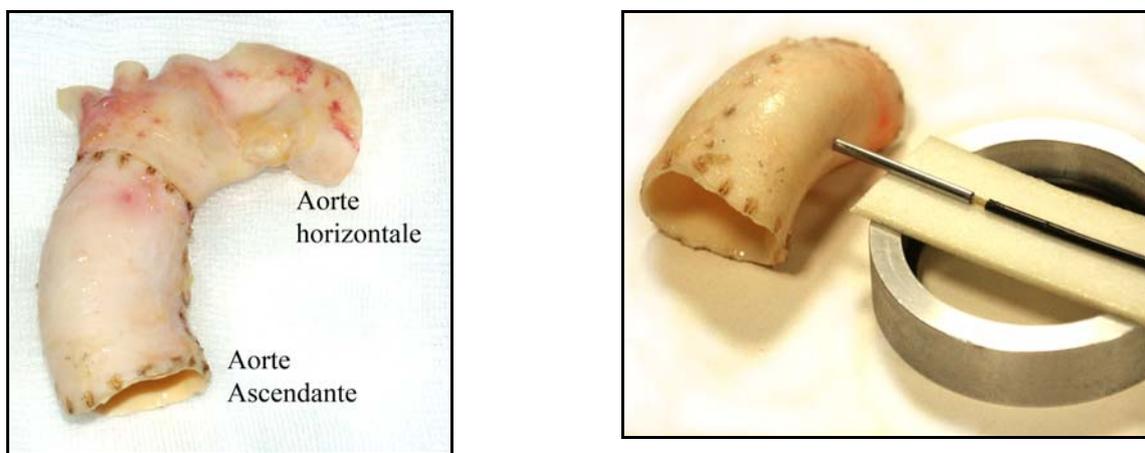


FIGURE 88 : PHOTOGRAPHIES DE LA CROSSE AORTIQUE ET D'UNE PRISE DE MESURE

Nous avons réalisé 8 mesures circonférentielles pour chaque niveau étudié ce qui a permis une cartographie complète de l'aorte ascendante et horizontale. La figure 89 montre les positions des différentes mesures réalisées à l'aide de la fibre Raman.

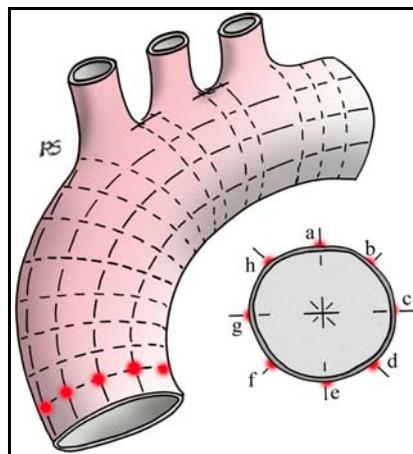


FIGURE 89 : SCHEMATISATION DES POSITIONS DE MESURE AVEC LA FIBRE

En associant quelques points supplémentaires (pieds des vaisseaux supra-aortiques) nous avons réalisé 108 acquisitions ex vivo. Les spectres obtenus montrent tout le travail de développement et d'optimisation qu'il reste à faire sur ce type d'appareillage.

Le Docteur Olivier Piot, qui s'occupe plus spécifiquement de cet appareil au sein de l'unité MéDIAN, a tenté une classification hiérarchique basée sur les spectres obtenus à l'aide de la fibre. La figure 90 illustre la séparation relativement nette qu'il existerait entre l'aorte ascendante et horizontale. Il semble toutefois difficile d'imaginer que le signal soit si différent entre le dernier point de l'aorte ascendante et le premier de l'aorte horizontale, seulement espacés par quelques millimètres.

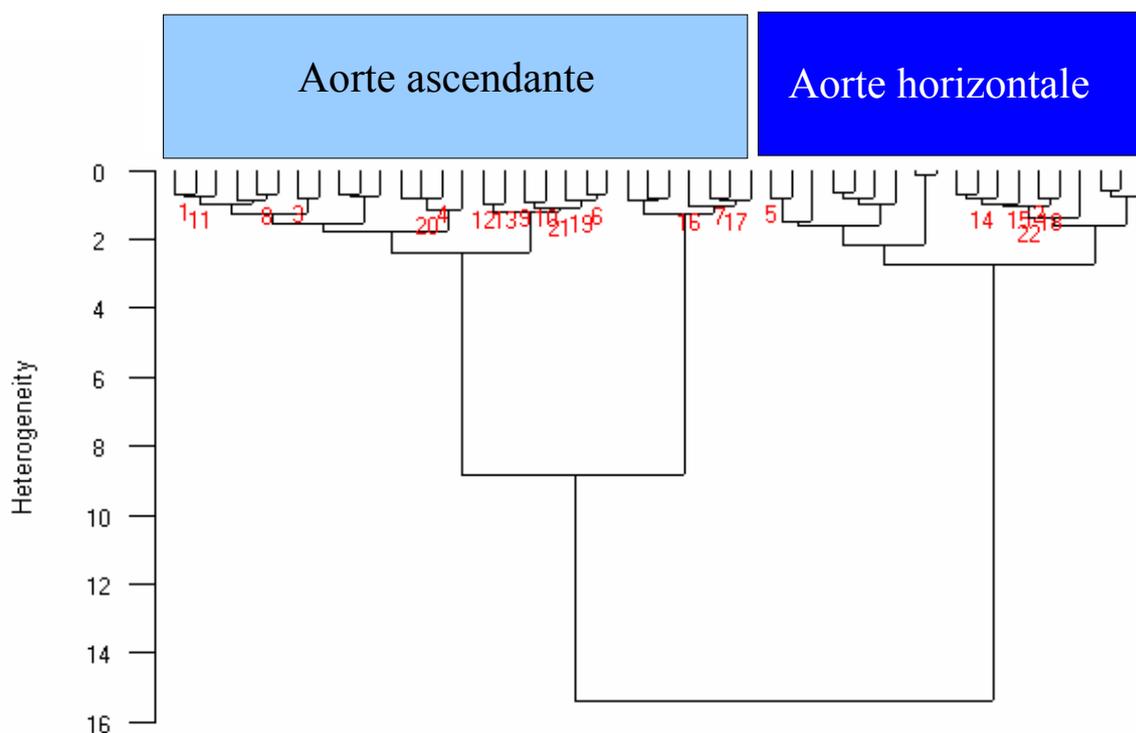


FIGURE 90 : CLASSIFICATION HIERARCHIQUE DES SPECTRES DE LA CROSSE AORTIQUE (FIBRE RAMAN-AXIAL)

Même si ces résultats sont à prendre avec certaines réserves, cette expérimentation a eu le mérite de nous avoir fait prendre conscience du travail qu'il restait à effectuer pour optimiser le rapport signal sur bruit. Malgré ces problèmes de mise au point, cette approche et le spectromètre axial ne sont nullement remis en cause et pourraient même devenir assez rapidement le pivot central de nos travaux en spectroscopie Raman. En effet, depuis ces travaux sur l'aorte, d'autres séries d'acquisitions ont été réalisées sur des tissus différents et ont donné des résultats plus concluants.

2.3. Conclusion concernant les méthodes spectroscopiques Raman

Si l'analyse de nos échantillons en spectroscopie Raman a laissé apparaître quelques limites, essentiellement liées à des problèmes de mise au point, cette approche semble pouvoir nous apporter des informations supplémentaires et complémentaires à celles obtenues en spectroscopie infrarouge.

En effet, ces premiers résultats ont permis d'entrevoir le potentiel discriminant de cet outil même si le développement d'applications de traitement des données suffisamment puissantes et souples devra rester l'un de nos objectifs prioritaires. Il est vrai que la multiplication des acquisitions génère des quantités impressionnantes de données à gérer.

Outre le caractère non destructif de la spectroscopie Raman, la possibilité de travailler sur des tissus ou organes sans aucune préparation, est l'un des aspects les plus remarquables de ce type d'analyse spectrale. Ces caractéristiques nous ont déjà permis de réaliser quelques expériences ex vivo, prélude, je l'espère rapidement, à des applications in vivo grâce à la « fibre raman » et au spectromètre axial. Pourtant, l'obtention des certifications requises pour ce type d'appareillage est un premier pas « de géant » incontournable avant d'envisager le développement d'applications en recherche clinique.

3. APPROCHE EN MICROSCOPIE CONFOCALE

La microscopie confocale est utilisée depuis de nombreuses années dans des domaines très divers. La capacité de certains composés biologiques et de fluorophores à émettre une fluorescence de longueur différente de l'onde excitatrice a permis le développement d'un grand nombre d'applications dans tous les domaines de la biologie.

Nous avons la chance d'avoir accès à l'un de ces microscopes au sein de la Faculté de Médecine / Pharmacie de Reims et Hervé Kaplan, ingénieur, nous a donné l'occasion d'apprécier le potentiel de cette technologie. Nul doute que nous allons poursuivre ces expérimentations en parallèle de notre approche Infrarouge et Raman.

Le principe global de cette microscopie repose sur deux principes

- le premier est la possibilité qu'ont certaines molécules d'émettre une fluorescence naturelle lorsqu'elles sont soumises à une illumination de longueur d'onde définie. Par ailleurs, de nombreuses molécules fluorescentes de synthèse ont été développées pour permettre d'identifier des molécules n'exprimant pas de fluorescence naturelle. De nombreux anticorps monoclonaux marqués par un fluorophore et dirigés contre un épitope donné sont actuellement commercialisés.

- le second est le principe de confocalité, lié à la présence d'un trou confocal sur le trajet optique permettant de ne laisser passer que les ondes lumineuses situées dans le plan focal. Les signaux provenant des couches de tissu hors du plan focal sont alors stoppés par le trou confocal comme le montre la figure 91. En modifiant le plan de focalisation, la confocalité permet de faire des acquisitions sériées en fonction de l'axe Z, chaque coupe ne contenant alors que les informations qui lui sont propres. Le traitement logiciel de ces images permet par la suite de reconstruire le tissu étudié en 3D selon la fluorescence qu'il exprime.

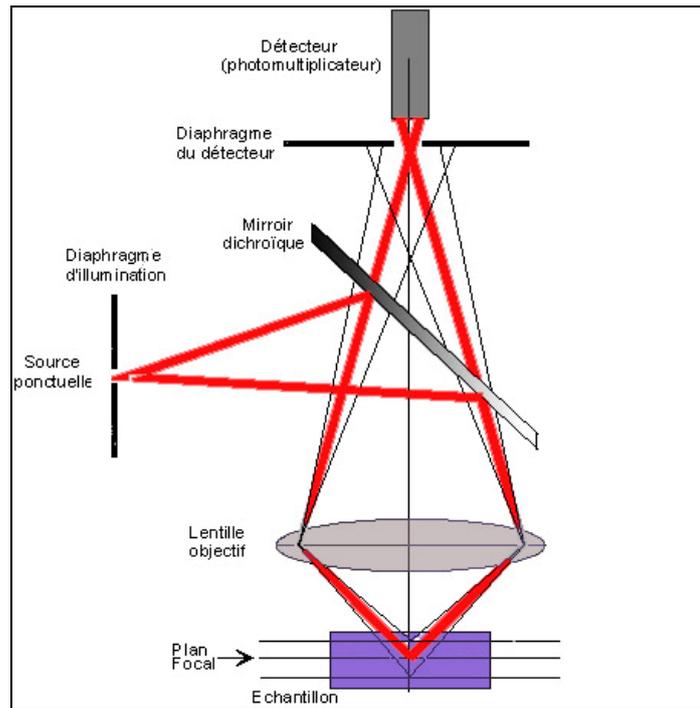


FIGURE 91 : PRINCIPE DU MICROSCOPE CONFOCAL

Les propriétés de fluorescence de la matrice extracellulaire ont été mises en évidence depuis de nombreuses années [84] et nous ont permis, dans un premier temps, de réaliser une étude globale de l'architecture de la matrice au sein de tissus aortiques sans utiliser de marqueur spécifique.

Cette expérimentation préliminaire à été réalisée sur deux coupes histologiques de 20 μm d'épaisseur, l'une provenant d'une aorte non dilatée et d'une aorte anévrysmale, issues respectivement de 2 patientes de 27 et 49 ans.

Comme on peut le voir sur la figure 92 pour le tissu non dilaté et 93 pour le tissu anévrysmal, la fluorescence naturelle de la matrice (collagène et élastine) permet une étude fine de son architecture. L'élastine est visualisée sous forme de fibres nettement individualisées alors que le collagène prend un aspect cotonneux réalisant des sortes de franges entourant l'élastine.

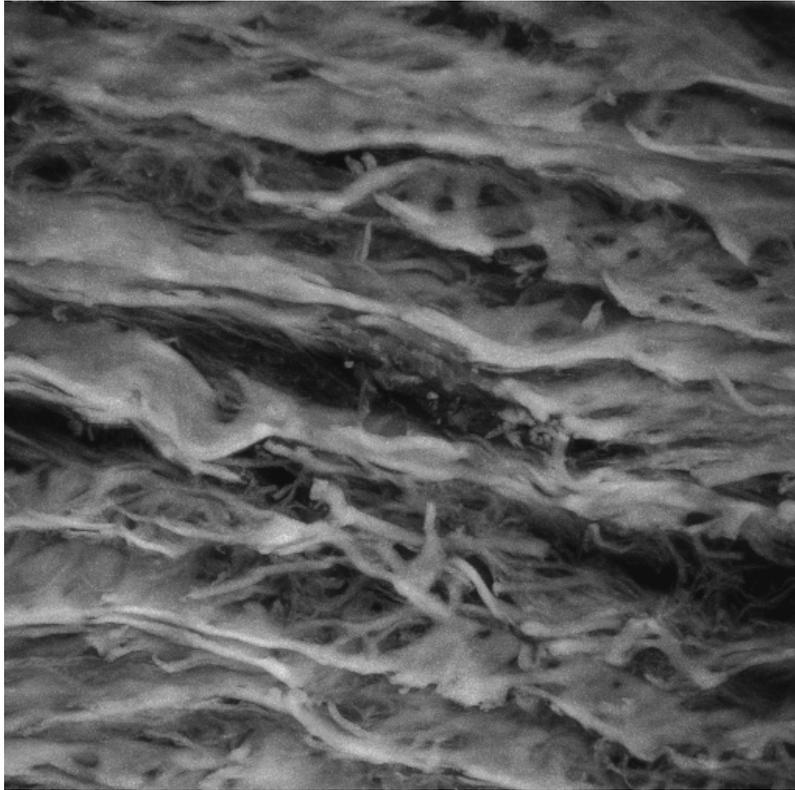


FIGURE 92 : ASPECT D'UNE PAROI AORTIQUE NORMALE EN MICROSCOPIE CONFOCALE

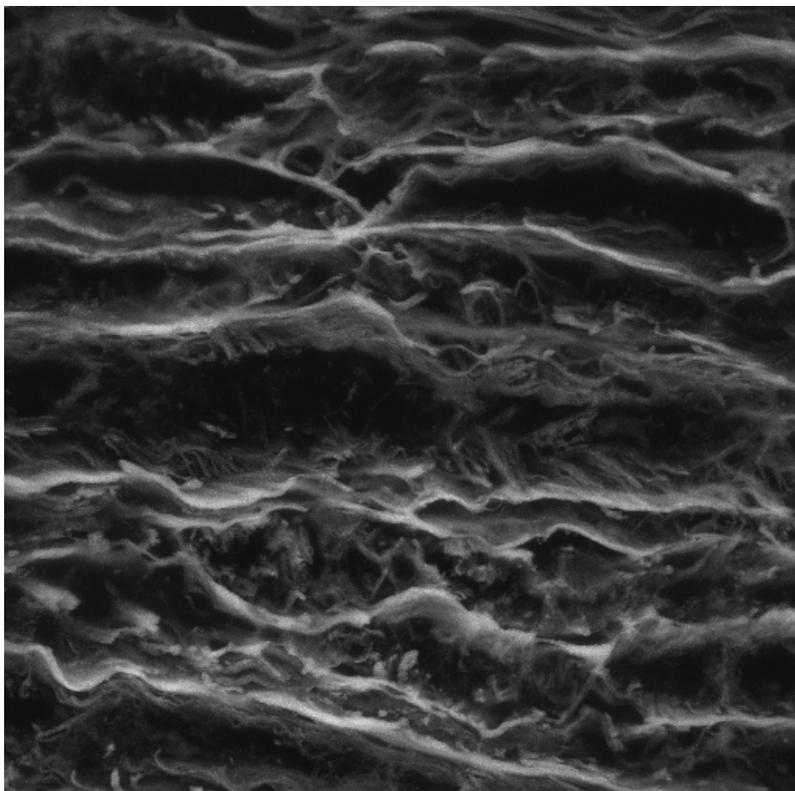


FIGURE 93 : ASPECT D'UNE PAROI AORTIQUE ANEVRYSMALE EN MICROSCOPIE CONFOCALE

En analysant ces deux images, on remarque immédiatement de grandes disparités entre les deux tissus. L'échantillon sain présente une matrice extracellulaire dense, avec de nombreuses ramifications ; on y distingue bien des fibres denses, longues et très peu fragmentées correspondant aux fibres élastiques ainsi qu'un réseau unissant des lames élastiques correspondant essentiellement aux collagènes. Les cellules musculaires lisses ne sont pas spontanément visibles par cette technique et il sera nécessaire d'employer des marqueurs fluorescents spécifiques pour les mettre en évidence.

L'observation du tissu anévrysmal est édifiante ! l'architecture du tissu aortique est totalement remaniée ; les fibres élastiques sont très fines, fragmentées et semblent même disparaître par endroit. Dans la partie centrale de l'image, on observe même la disparition de toute connexion entre les différentes fibres élastiques. Le réseau de collagène paraît lui aussi très altéré avec disparition complète de son aspect cotonneux.

Il n'est pas difficile d'imaginer les conséquences que ces altérations majeures peuvent avoir sur les propriétés physiques de l'aorte en terme de compliance et d'élastance. Le chirurgien comprend alors aussi beaucoup mieux la fragilité des tissus et les difficultés qu'il peut rencontrer lors d'interventions visant à traiter ce type d'anévrysme de l'aorte ascendante.

Une série d'acquisitions, prévue prochainement, devrait nous permettre de comparer nos résultats Infrarouge et Raman à cette technique en fournissant une appréciation directe de l'altération des constituants de la matrice extracellulaire aortique. L'emploi de nouvelles techniques d'analyse d'images sera alors nécessaire pour obtenir une information objective et quantifiable (taux de fragmentation, distances entre les fibres élastiques, étude du contraste etc...).

Même s'il ne s'agit que d'une étude préliminaire, il semble que cette approche puisse conforter certains de nos résultats. Elle pourrait, par exemple, mettre en lumière des altérations de la matrice extracellulaire d'aortes non dilatées et difficiles à classer en spectroscopie IR et Raman. En conclusion, un nouveau champs d'investigation s'ouvre à nous pour mieux comprendre nos résultats qui se sont révélés parfois, assez déroutants.

4. APPROCHE EN IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Cette deuxième approche préliminaire nous a conduit à analyser deux échantillons aortiques (sain et anévrysmal) en RMN. Le principe de l'analyse par RMN du proton (H-RMN) est d'étudier la relaxation du spin électronique des protons d'un échantillon après l'application d'un champ magnétique de haute intensité. Ce champ magnétique généré au sein de cet « imageur RMN » de taille imposante (figure 94A) peut être modulé par un système complexe « d'aimants » interfacé à un ordinateur (Figure 94B).

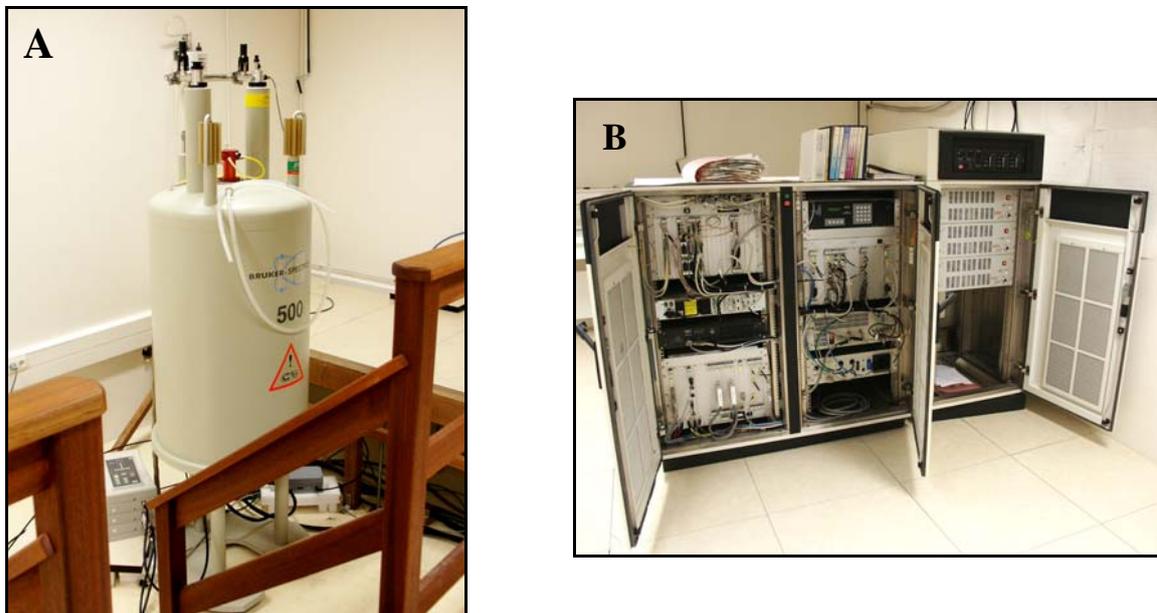


FIGURE 94 : A : SPECTROMETRE RMN, B : MODULE DE CONTROLE

De nombreux protocoles existent et fixent, entre autre, le nombre d'impulsions électromagnétiques, leur amplitude, leur fréquence et le délai de relaxation avant d'effectuer la mesure etc... Pourtant, il n'avait jamais été défini de protocole concernant le tissu aortique avec cet appareillage et une grande partie de ces manipulations a servi à préciser les différents paramètres à utiliser pour avoir un signal RMN correct.

L'interprétation de ce signal selon ses coordonnées X, Y et Z a permis de reconstruire des images bi et tridimensionnelles des échantillons étudiés en fonction du comportement des protons dans le tissu.

Nous avons utilisé deux fragments d'aorte de 2 mm de large sur 20 mm de haut, disposés dans des tubes de verre ne perturbant pas ou très peu le signal RMN. Ce tube a été ensuite inséré dans le Spectrospin de la société Bruker qui le dispose de façon automatique au centre d'une antenne chargée d'appliquer le champ magnétique.

L'étroitesse des rapports entre l'antenne, le tube et l'échantillon conditionne la qualité du signal ; c'est pourquoi nous avons à disposition plusieurs antennes permettant d'analyser des échantillons allant d'un millimètre de diamètre jusqu'au petit animal.

Pour ce type d'analyse, la puissance du champ magnétique développé par cette RMN est supérieure à 11 Teslas quand les IRM médicales de dernière génération atteignent au maximum 3 Teslas. Les paramètres de réglage ne seront pas décrits dans cette introduction à la RMN car, il faut bien l'avouer, certains restent encore très obscures pour un non initié...

Après de nombreux essais infructueux où rien ne pouvait être discerné, nous avons enfin obtenu deux images qui nous ont pour le moins étonnés. En effet, si l'anatomopathologiste est habitué aux coupes histologiques, le spectroscopiste RMN l'est beaucoup moins et les paramètres retenus nous ont permis d'obtenir une résolution spatiale de 5 μm .

Sur ces images de 256 points carré, on devine déjà certaines structures, l'organisation en couches successives de la paroi aortique et l'adventice clairement individualisable (flèche) sur la figure 95.

La figure 96 présente l'image obtenue en utilisant une aorte anévrysmale. Même si au premier abord et en dehors de l'épaisseur, les différences semblent bien faibles, on remarque que le signal RMN est plus faible dans la partie profonde de la média aortique et que l'organisation stratifiée semble moins évidente.

Bien que l'explication ne soit pas encore connue avec précision, on peut penser que la quantité de proton, et donc d'eau, est moins importante dans cette partie du tissu. Quand on sait que l'élastine et les protéoglycanes sont des constituants très hydratés, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle ces variations de signal pourraient être liées à des modifications concernant ces molécules et/ou leurs liaisons Hydrogène.

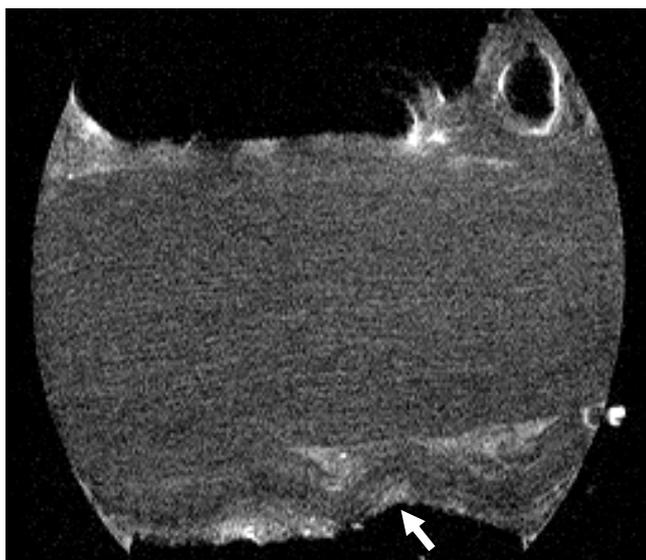


FIGURE 95 : IMAGE RMN D'UNE AORTE NON DILATEE

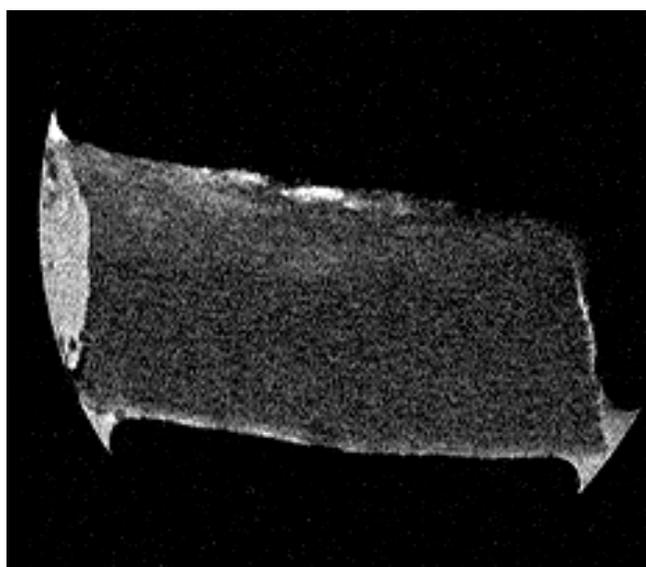


FIGURE 96 : IMAGE RMN D'UNE AORTE ANEVRYSMALE

Pourtant, l'imagerie RMN ne répondra pas à cette question ; par contre la spectrométrie RMN, possible avec ce dispositif, pourra nous apporter une nouvelle approche qualitative et quantitative de la paroi aortique. Il sera alors intéressant de comparer ces données RMN à nos résultats en spectroscopie Infrarouge et Raman puis de les confronter à des techniques biochimiques classiques.

En conclusion, ces quelques résultats préliminaires nous montrent que la spectroscopie RMN est une technique qu'il serait intéressant de développer en parallèle de celles déjà exposées.

L'acquisition récente d'une IRM médicale trois Tesla par le CHU de Reims pourrait nous donner l'opportunité de transposer ces recherches à l'Homme sans passer par l'échantillon mais, de nombreux écueils seront à éviter avant d'imaginer une application de cette approche d'imagerie non invasive en pratique clinique.

CONCLUSION

L'anévrisme de l'aorte est une pathologie remarquable à plus d'un titre. Il compte parmi les pathologies vasculaires les plus connues du grand public mais reste probablement l'un des sujets les plus méconnus du monde médical et scientifique. Pourtant, des travaux toujours plus nombreux commencent à approcher les mécanismes complexes des altérations du tissu aortique. La biochimie, l'histopathologie, la génétique ou l'enzymologie ont été tour à tour questionnées pour caractériser le tissu aortique normal et pathologique. Ces méthodes, de référence pour la plupart, ne se conçoivent pourtant pas sans la notion de prélèvement de tissu, ces analyses destructives nécessitant systématiquement le recours à la biopsie. S'il est aisé de réaliser certaines biopsies au sein du corps humain, l'aorte s'y révèle particulièrement réfractaire pour des raisons évidentes.

Le chirurgien se retrouve donc fréquemment devant le dilemme suivant : laisser en place un tissu aortique déjà dilaté mais en dehors des recommandations opératoires ou remplacer l'aorte de façon systématique en exposant son patient à un risque supplémentaire et en s'exposant à la critique de ses pères (*et experts*). A ce jour, pourtant, aucune méthode rapide et « non invasive » ne lui permet d'évaluer le tissu aortique au cours de l'intervention. Certains d'entre eux avanceront leur expertise pour justifier une attitude qui ne se basera que sur un sentiment subjectif ou pire, une habitude...

De ces interrogations est né notre projet. Ambitieux et probablement sous estimé à son origine, il est devenu au fil des années un objectif raisonnable et colossal tant mes connaissances de l'ensemble des domaines qu'il nous fallait aborder étaient initialement rudimentaires. Puis le temps a fait son œuvre en nous apportant toujours plus d'informations engendrant à leurs tours toujours plus de questions. Ce travail, reposant sur de multiples approches en spectroscopie et en imagerie, nous a apporté certaines réponses en établissant les caractéristiques spectroscopiques de tissus aortiques « normaux » et anévrysmaux, qu'ils soient ou non associés à une bicuspidie aortique.

L'essentiel de notre travail s'est focalisé sur l'approche en spectroscopie infrarouge et à permis d'établir des descripteurs spectroscopiques qui, un fois combinés, forment une véritable empreinte spectrale du tissu aortique.

Cette technique a révélé tout son pouvoir de discrimination en s'appuyant principalement sur des modifications spectrales liées aux protéines et probablement aussi aux acides nucléiques.

Même si les référentiels établis orientent l'interprétation de ces données, il est maintenant essentiel et crucial de confronter nos résultats aux méthodes de référence pour valider nos hypothèses.

L'approche en spectroscopie Raman, bien que plus récente, nous a montré qu'elle était capable de discriminer efficacement des tissus non dilatés et anévrysmaux en se basant, là encore, sur des gammes spectrales fortement influencées par les protéines. Même si notre première expérience avec la « fibre Raman » peut être l'objet de certaines critiques, il n'en reste pas moins que pour la première fois il était possible d'obtenir une information spectrale du tissu aortique dans des conditions proches de la physiologie. À terme, la définition de profils spectraux caractéristiques, établis sur de larges séries, permettra l'exportation de ce puissant outil au bloc opératoire. Dès lors, l'analyse non invasive ne sera plus un fantasme mais une réalité et légitimera la décision du chirurgien.

Enfin, l'association d'approches complémentaires, qu'elles soient biochimiques, histologiques ou d'imagerie (RMN, confocal) devrait nous permettre, en utilisant nos échantillons comme autant de *Pierre de Rosette*, de décrypter le signal spectroscopique.

En conclusion, nous avons démontré le potentiel de discrimination de tissus aortiques par différentes méthodes spectroscopiques au laboratoire. Pourtant, cette thèse n'est nullement un aboutissement mais une étape, le premier bilan d'un travail qui doit s'amplifier, tirer partie de ses erreurs et s'ouvrir à de nouvelles collaborations pour aboutir.

Toute la volonté des médecins, chercheurs et industriels sera nécessaire à l'achèvement de ce projet qui n'a pour seul objectif que d'améliorer les soins que nous prodiguons quotidiennement à nos patients.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- [1] Klein DG. Thoracic aortic aneurysms. *J Cardiovasc Nurs*. 2005 ; 20:245-50. Review.
- [2] Thompson MM, Bell PR. ABC of arterial and venous disease. Arterial aneurysms. *BMJ*. 2000 ; 320:1193-6.
- [3] Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms: indications for surgery, and surgical versus nonsurgical risks. *Ann Thorac Surg*. 2002 ; 74:S1877-80.
- [4] Zehr KJ, Orszulak TA, Mullany CJ, Matloobi A, Daly RC, Dearani JA, Sundt TM 3rd, Puga FJ, Danielson GK, Schaff HV. Surgery for aneurysms of the aortic root: a 30-year experience. *Circulation*. 2004;110:1364-71. Review.
- [5] Braverman AC, Guven H, Beardslee MA, Mekan M, Kates AM, Moon MR. The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30:470-522. Review.
- [6] David TE, Feindel CM, Webb GD, Colman JM, Armstrong S, Maganti M. Long-term results of aortic valve-sparing operations for aortic root aneurysm. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 ; 132:347-54.
- [7] Warren AE, Boyd ML, O'Connell C, Dodds L. Dilatation of the ascending aorta in paediatric patients with bicuspid aortic valve: frequency, rate of progression and risk factors. *Heart*. 2006 ; 92:1496-500.

[8] Kallenbach K, Karck M, Pak D, Salcher R, Khaladj N, Leyh R, Hagl C, Haverich A. Decade of aortic valve sparing reimplantation: are we pushing the limits too far? *Circulation*. 2005 ; 112:1253-9.

[9] Cotrufo M, Della Corte A, De Santo LS, Quarto C, De Feo M, Romano G, Amarelli C, Scardone M, Di Meglio F, Guerra G, Scarano M, Vitale S, Castaldo C, Montagnani S. Different patterns of extracellular matrix protein expression in the convexity and the concavity of the dilated aorta with bicuspid aortic valve: preliminary results. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 ; 130:504-11.

[10] Hager A, Kaemmerer H, Rapp-Bernhardt U, Blucher S, Rapp K, Bernhardt TM, Galanski M, Hess J. Diameters of the thoracic aorta throughout life as measured with helical computed tomography. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 ; 123:1060-6.

[11] Cecconi M, Manfrin M, Moraca A, Zanoli R, Colonna PL, Bettuzzi MG, Moretti S, Gabrielli D, Perna GP. Aortic dimensions in patients with bicuspid aortic valve without significant valve dysfunction. *Am J Cardiol*. 2005 ; 95:292-4.

[12] Garcier JM, Petitcolin V, Filaire M, Mofid R, Azarnouch K, Ravel A, Vanneuville G, Boyer L. Normal diameter of the thoracic aorta in adults: a magnetic resonance imaging study. *Surg Radiol Anat*. 2003 ; 25:322-9.

[13] Capps SB, Elkins RC, Fronk DM. Body surface area as a predictor of aortic and pulmonary valve diameter. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 ; 119:975-82.

- [14] DuBois D; DuBois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Int Med 1916 ; 17:863-71.
- [15] Roman MJ, Devereux RB, Kramer-Fox R, O'Loughlin J. Two-dimensional echocardiographic aortic root dimensions in normal children and adults. Am J Cardiol. 1989 ; 64:507-12.
- [16] Ramachandran.S, Vasan.D, Larson.MG, Levy.D. Determinants of Echocardiographic Aortic Root Size - The Framingham Heart Study. Circulation. 1995 ; 91:734-740.
- [17] Ben-Dor I, Sagie A, Weisenberg D, Ben Zekry S, Fraser A, Sahar G, Iakobishvili Z, Battler A, Shapira Y. Comparison of Diameter of Ascending Aorta in Patients With Severe Aortic Stenosis Secondary to Congenital Versus Degenerative Versus Rheumatic Etiologies. Am J Cardiol 2005 ; 96:1549-1552.
- [18] David TE. Aortic valve-sparing operations in patients with ascending aortic aneurysms. Curr Opin Cardiol. 1997 ; 12:391-5. Review.
- [19] Hager A, Kaemmerer H, Rapp-Bernhardt U, Blucher S, Rapp K, Bernhardt TM, Galanski M, Hess J. Diameters of the thoracic aorta throughout life as measured with helical computed tomography. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002 ; 123:1060-6.
- [20] Kannel WB, Dawber TR, McGee DL. Perspectives on systolic hypertension. The Framingham study. Circulation. 1980 ; 61:1179-82.

- [21] Aronberg DJ, Glazer HS, Madsen K, Sagel SS. Normal thoracic aortic diameters by computed tomography. *J Comput Assist Tomogr.* 1984 ; 8:247-50.
- [22] Lesauskaite V, Tanganelli P, Sassi C, Neri E, Diciolla F, Ivanoviene L, Epistolato MC, Lalinga AV, Alessandrini C, Spina D. Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Hum Pathol.* 2001 ; 32:1003-11.
- [23] Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002 ; 115:2817-28. Review.
- [24] Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *J Exp Biol.* 1999 ; 202:3305-13. Review.
- [25] Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94:1852-6.
- [26] Hoh BL, Rabinov JD, Pryor JC, Ogilvy CS. A modified technique for using elastase to create saccular aneurysms in animals that histologically and hemodynamically resemble aneurysms in human. *Acta Neurochir.* 2004 ; 146:705-11.
- [27] Halloran, B.G., and Baxter, B.T.. Pathogenesis of aneurysms. *Semin. Vasc. Surg* 1995 ; 8:85–92.

- [28] O'Rourke MF, Nichols WW. Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension. *Hypertension*. 2005 ; 45:652-8. Review.
- [29] Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 ; 31:261-72. Review.
- [30] Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 ; 49:235-44. Review.
- [31] Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci*. 2002 ; 115:2817-28. Review.
- [32] Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 ; 49:326-32. Review.
- [33] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 ; 55:1531-46. Review.
- [34] Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Volker W. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2003 ; 166:1-11. Review.
- [35] van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991 ; 5:2814-23. Review.

- [36] Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif.* 2004 ; 37:207-20. Review.
- [37] Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 ; 49:203-20. Review.
- [38] Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 ; 23:2146-54. Review
- [39] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 ; 84:767-801. Review.
- [40] McCarthy NJ, Bennett MR. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 ; 45:747-55. Review.
- [41] Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 ; 274:21491-4. Review.
- [42] Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med.* 2002 ; 7:117-33. Review.
- [43] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005 ; 85:1-31. Review.

[44] Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec.* 2000 ; 258:1-14.

[45] Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003 ; 57:195-202. Review.

[46] Robert L. Cellular and molecular mechanisms of aging: a review. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1991 ; 185:97-109. Review.

[47] Carmo M, Colombo L, Bruno A, Corsi FR, Roncoroni L, Cuttin MS, Radice F, Mussini E, Settembrini PG. Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002 ; 23:543-9.

[48] Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003 ; 57:195-202. Review.

[49] Takasaki I, Chobanian AV, Sarzani R, Brecher P. Effect of hypertension on fibronectin expression in the rat aorta. *J Biol Chem.* 1990 ; 265:21935-9.

[50] Bezie Y, Lacolley P, Laurent S, Gabella G. Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998 ; 32:166-9.

[51] Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol.* 2005 ; 4 :9. Review.

[52] Rubin E, Farber JL. Atherosclerosis.

In : Pathology, Second Edition

Ed J. B. Lippincott Co, Philadelphia, 1994 : 466-482.

[53] Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms: indications for surgery, and surgical versus nonsurgical risks. *Ann Thorac Surg.* 2002 ; 74:S1877-80; discussion S1892-8.

[54] Borger MA, Preston M, Ivanov J, Fedak PW, Davierwala P, Armstrong S, David TE. Should the ascending aorta be replaced more frequently in patients with bicuspid aortic valve disease? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 ; 128:677-83.

[55] La Canna G, Ficarra E, Tsagalau E, Nardi M, Morandini A, Chieffo A, Maisano F, Alfieri O. Progression rate of ascending aortic dilation in patients with normally functioning bicuspid and tricuspid aortic valves. *Am J Cardiol.* 2006 ; 98:249-53.

[56] Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. *J Med Genet.* 2000 ; 37:9-25. Review.

[57] Brooke BS, Karnik SK, Li DY. Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol.* 2003 ; 13:51-6. Review.

[58] Braverman AC, Guven H, Beardslee MA, Makan M, Kates AM, Moon MR. The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol.* 2005 ; 30:470-522. Review.

[59] Nkomo VT, Enriquez-Sarano M, Ammash NM, Melton LJ 3rd, Bailey KR, Desjardins V, Horn RA, Tajik AJ. Bicuspid aortic valve associated with aortic dilatation: a community-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 ; 23:351-6.

[60] Lesauskaite V, Ivanoviene L, Valanciute A. Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects. *Medicina.* 2003 ; 39:529-34.
Review

[61] Fedak PW, de Sa MP, Verma S, Nili N, Kazemian P, Butany J, Strauss BH, Weisel RD, David TE. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 ; 126:797-806.

[62] Houel R, Soustelle C, Kirsch M, Hillion ML, Renaut C, Loisançe DY. Long-term results of the Bentall operation versus separate replacement of the ascending aorta and aortic valve. *J Heart Valve Dis.* 2002 ; 11:485-91.

[63] Yacoub MH, Fagan A, Stassano, Radley-Smith R. Results of valve conserving operations for aortic regurgitation. *Circulation.* 1983 ; 68 : III-321

[64] David TE, Feindel M. An aortic valve-sparing operation for patients with aortic incompetence and aneurysm of the ascending aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 ; 103:617-622

[65] Rama A, Rubin S, Bonnet N, Gandjbakhch I. A new technic of aortic root reconstruction with aortic valve annuloplasty in ascending aortic aneurysm. *Annals of Thoracic Surgery*. In press 2006

[66] Bentall HH, de Bono A. A technique for complete replacement of the ascending aorta. *Thorax*. 1968 ; 23:338 –339.

[67] Kacurakova M, Capek P, Sasinkova V, Wellner N, Ebringerova A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carb Polymers* 2000 ; 43 : 195-203.

[68] Mourant JR, Gibson RR, Johnson TM, Carpenter S, Short KW, Yamada YR, Freyer JP. Methods for measuring the infrared spectra of biological cells. *Phys Med Biol*. 2003 ; 48 : 243-57

[69] Fernandez DC, Bhargava R, Hewitt SM, Levin IW. Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. *Nat Biotechnol*. 2005 ; 23:469-74.

[70] Moreno PR, Lodder RA, Purushothaman KR, Charash WE, O'Connor WN, Muller JE. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by near-infrared spectroscopy. *Circulation*. 2002 ; 105:923-7.

[71] Krishna CM, Kegelaer G, Adt I, Rubin S, Kartha VB, Manfait M, Sockalingum GD. Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines. *Biopolymers*. 2006 ; 82:462-70.

[72] Sandt C, Madoulet C, Kohler A, Allouch P, De Champs C, Manfait M, Sockalingum GD. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *J Appl Microbiol*. 2006 ; 101:785-97.

[73] Adt I, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Arch Microbiol*. 2006 ; 185:277-85.

[74] Chrit L, Bastien P, Sockalingum GD, Batisse D, Leroy F, Manfait M, Hadjur C. An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006 ; 19:207-15.

[75] Bonnier F, Rubin S, Venteo L, Krishna CM, Pluot M, Baehrel B, Manfait M, Sockalingum GD. In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2006 ; 1758:968-73.

[76] Barbillat J, Bougeard D, Buntinx G, Delahaye M, Dhamelincourt P, Fillaux F. La spectroscopie Raman. *Tech. ing., Anal. caractér*. 1999 ; 4, P2865.

[77] Judd KP. Hyperelasticity syndromes. *Cutis*. 1984 ; 33: 494-6. Review.

[78] Milewicz DM, Urban Z, Boyd C. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol.* 2000 ; 19:471-80. Review.

[79] Rohleder D, Kocherscheidt G, Gerber K, Kiefer W, Kohler W, Mocks J, Petrich W. Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of serum. *J Biomed Opt.* 2005 ; 10:031108.

[80] Cattell MA, Anderson JC, Hasleton PS. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clin Chim Acta.* 1996 ; 245:73-84.

[81] Vass E, Hollosi M, Besson F, Buchet R. Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins. *Chem Rev.* 2003 ; 103:1917-54. Review.

[82] van de Poll SW, Romer TJ, Puppels GJ, van der Laarse A. Imaging of atherosclerosis. Raman spectroscopy of atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk.* 2002 ; 9:255-61. Review.

[83] Utzinger U, Richards-Kortum RR. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2003 ; 8:121-47. Review.

[84] Stelzer EH, Wacker I, De Mey JR. Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology. *Semin Cell Biol.* 1991 ; 2:145-52. Review.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1.1. Publications de niveau internationales

▶ F.H. Lei, J.L. Nicolas, M. Troyon, G.D. Sockalingum, S. Rubin, M. Manfait. Shear-force detection by using bimorph cantilever with enhanced Q-factor

J. Appl. Phys. 96; 2003: 2236-2243

▶ C.Murali Krishna, G.D.Sockalingum, G.Kegelaer, S.Rubin, V.B.Kartha, M.Manfait. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations

Vibrational Spectroscopy ; 2005 : 95-100

▶ Murali Krishna C, Kegelaer G, Adt I, Rubin S, Kartha VB, Manfait M, Sockalingum GD. Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy.

Biochim Biophys Acta. 2005 ;1726:160-7.

▶ Bonnier F, Rubin S, Venteo L, Krishna CM, Pluot M, Baehrel B, Manfait M, Sockalingum GD. In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy.

Biochim Biophys Acta. 2006;1758:968-73.

▶ Krishna CM, Kegelaer G, Adt I, Rubin S, Kartha VB, Manfait M, Sockalingum GD. Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines.

Biopolymers. 2006 ;82:462-70.

▶ Rama.A, Rubin S, Bonnet.N, Gandjbakhch.I : A new technic of aortic root reconstruction with aortic valve annuloplasty in ascending aortic aneurysm - Annals of Thoracic Surgery.

Accépté – in press

1.2. Articles soumis à publication

▶ Mid-Infrared Microscopy Reveals Structural Changes in Normal and Aneurysmal Human Aortic Tissues. S. Rubin S, F. Bonnier F, Sandt.C, Ventéo.L, Pluot. M, Baehrel.B, Manfait.M, Sockalingum.GD. Revue « Circulation ».

1.3. Présentations internationales

Communications écrites (affiches)

▶ Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Analysis of Normal and Aneurysmal Human Aortas. Rubin.S, Sockalingum.GD, Sandt.C , Venteo.L, Pluot.M, Baehrel.B, Manfait .M: SPEC 2002: “Shedding New Light On Disease: optical diagnostics for the new millennium” - 2th international symposium - Reims, juin 2002

▶ Diagnostic and classification of normal, aneurysmal and dilated aortas from patients with bicuspid aortic valve by FTIR imaging. Rubin.S, Sockalingum.GD, Venteo.L, Pluot.M, Baehrel.B, Manfait .M - RISBM: Raman and IR Spectroscopy in Biology and medicine congress Jena – Allemagne, 1 Mars 2004

▶ Structural comparison between normal ascending aortas, aneurysms and aortas from bicuspid aortic valve by infrared spectrometry: Rubin.S, Sockalingum.GD, Manfait .M, Baehrel.B -Aortic surgery symposium IX – New York – USA, 22, 23 avril 2004

▶ Vibrational Spectroscopy and Chemometric Approachs for the Diagnostic of Aneurysms in Human Aortic Tissues : F. Bonnier, S. Rubin, D. Bertrand, L. Ventéo, M. Pluot, B. Baehrel, M. Manfait, G.D. Sockalingum : DATA-SPEC 2005 - Reims, 30 juin et 1er Juillet 2005

▶ None dilated ascending aortas associated to bicuspid aortic valve are pathological: a FTIR spectral imaging analysis : S. Rubin, F. Bonnier, C.Sandt, B. Baehrel, G.D. Sockalingum - Aortic surgery symposium X – New York – 27, 28 avril 2006

Communications orales

▶ Analysis of normal and aneurismal ascending aortic tissues by FT-IR microscopy. S.Rubin, F.Bonnier, C.Sandt, L.Ventéo, M.Pluot, B.Baehrel, M.Manfait, GD.Sockalingum : SPEC 2006 Shedding Light on Disease: Optical diagnosis of the new Millenium :Heidelberg Allemagne, Mai 2006 (communication réalisée par GD.Sockalingum)

1.4. Présentations nationales

Communications écrites (affiches)

▶ FTIR study of Normal and Aneurismal Human Aortas: Microspectroscopic and Imaging system approaches. Rubin.S, Sockalingum.GD, Sandt.C ,Belloy.N, Venteo.L, Pluot.M, Baehrel.B, Manfait .M –Congrès Biophotonique – Parc des expositions : Paris - 22 Oct 2003

▶ La spectroscopie vibrationnelle et l'aorte : 2eme Carrefour Européen de la Recherche et de L'Innovation Biophotonique (Conférencier de la table ronde) : PARIS – Porte de Versailles Mai 2006

Communications orales

▶ Similitudes structurales entre l'aorte ascendante des valves aortiques bicuspidées et les anévrismes. Intérêt de l'analyse tissulaire par micro-spectroscopie infrarouge. Rubin.S, Dayawa.H, Sockalingum.GD, Manfait .M, Baehrel.B : 57e Congrès de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire – Toulouse 16-19 juin 2004

1.5. Participation à présentation

▶ Optical Spectroscopy of Cells and Tissues. M. Manfait, G. Kejelaer, H. Nasrallah, S. Dukic, S. Rubin, G.D. Sockalingum. SPEC 2002 - Shedding New Light on Disease: optical diagnostics for the new millennium - 2nd international symposium - Reims, juin 2002

▶ Laser Raman (micro) Spectroscopy of Cells and Tissues. G.D. Sockalingum, G. Kejelaer, P.Lamaze, C.Sandt, S. Rubin, S. Dukic, H. Nasrallah, M.Manfait, L.Venteo, M.Pluot, C.Murali Krishna, V.B. Kartha

Présenté au « Dae-Brns National Laser Symposium » - New Delhi - Inde : 14-16 Novembre 2002 et Publié dans : « Proceedings of DAE-BRNS NATIONAL LASER SYMPOSIUM 14-16 November 2002 » Editions: Allied publishers pvt.limited – India

▶ Spectral imaging and characterization of pathological tissues. M.Manfait, F. Bonnier, S. Rubin, D.Bertrand, G.D. Sockalingum. International workshop on Vibrational spectroscopy Applied to Microbiology and Biomedical Research : La Plata – Argentine – 21-23 Nov 2004

Sylvain RUBIN

CARACTERISATION DU TISSU AORTIQUE ET DIAGNOSTIC PRECOCE DES ANEVRYSMES DE L'AOORTE ASCENDANTE PAR SPECTRO-IMAGERIE

Th. Pharm. Univ. : Reims : 2006

Résumé :

Le diagnostic précoce des anévrismes de l'aorte ascendante reste, aujourd'hui, un véritable écueil. Aucun test diagnostique non destructif ne peut mettre en évidence les altérations infra-cliniques conduisant à la dilatation aortique. Nous avons utilisé différentes approches en spectro-imagerie pour étudier le tissu aortique non dilaté et anévrysmal, avec ou sans bicuspidie aortique. L'analyse en spectroscopie infrarouge a porté sur 19 échantillons, et a permis de caractériser les tissus sains et pathologiques puis de discriminer 100% de ces tissus en utilisant des bandes spectrales liées aux protéines et possiblement à la conformation de l'ADN. La structure secondaire des protéines semble à la base de ces classifications avec en particulier des variations spécifiques du rapport feuillets β sur hélice α en fonction des différents tissus. La mise en évidence d'anomalies similaires entre aortes de bicuspidie, dilatées ou non, nous fait penser que nous avons mis en évidence un facteur spécifique des bicuspidies. La spectroscopie Raman nous a permis, sur un plus faible nombre d'échantillons, de discriminer par classification hiérarchique ascendante les anévrismes des tissus non dilatés en se basant sur des gammes spectrales influencées par les acides aminés majoritaires du collagène et de l'élastine. Pourtant, le traitement fastidieux des données nécessitera le développement de méthodes suffisamment souples et puissantes pour analyser les millions de données qui seront générées par l'extension de ces travaux. En conclusion, nous avons pu caractériser et discriminer différents tissus en utilisant plusieurs approches dont certaines peuvent avoir un débouché en pratique clinique.

Mots clés :

Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier, Spectroscopie Raman, Aorte, Anévrisme, Classification

JURY

Pr Alain PRAT	Rapporteur
Pr Patrice PROGNON	Rapporteur
Pr Bernard BAEHREL	
Dr Marie Paule JACOB	
Pr Michel MANFAIT	
Dr Ganesh SOCKALINGUM	

Adresse de l'auteur

M. Sylvain RUBIN - 68 rue du Barbâtre - 51100 Reims