

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

ANNEE 2007

N° :

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Reims Champagne Ardenne

Discipline : Ingénierie de la Santé

Spécialité : Biophysique

Par

**Franck BONNIER**

Soutenue le Vendredi 23 NOVEMBRE 2007

**Diagnostic des dilatations aortiques, approche *in-vitro* et *ex-vivo*  
par spectroscopies vibrationnelles optiques**

**Directeurs de Thèse**

**Professeur Michel MANFAIT**

**Docteur Ganesh D. SOCKALINGUM**

**JURY**

Dr Paul Dumas - Président

Dr Marie Paule Jacob - Rapporteur

Pr Jean-Marie Perrier-Cornet - Rapporteur

Dr Dominique Bertrand - Examineur

Dr Sylvain Rubin - Examineur

Dr Ganesh Sockalingum - Directeur de thèse

Pr Michel Manfait - Co Directeur de thèse

# Résumé

Véritable source de dilemme lors d'une intervention de chirurgie thoracique, la découverte d'une aorte ascendante modérément dilatée amène directement la question du remplacement systématique ou non de celle-ci. Le risque opératoire lié à cet acte chirurgical supplémentaire couplé à l'incertitude de l'évolution vers un futur anévrisme iraient à l'encontre d'une telle procédure; pourtant, le risque d'une réintervention quelques mois ou années plus tard reste élevé.

Dans l'optique de développer un nouvel outil de diagnostic concernant l'aorte, nous avons fait l'hypothèse que les spectroscopies vibrationnelles pourraient apporter des réponses. Nous avons donc analysé des tissus aortiques humains à l'aide des techniques de microspectroscopies vibrationnelles optiques Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et Raman. Dans un premier temps, nous avons utilisé la microspectroscopie infrarouge avec pour principal objectif la discrimination entre les tissus aortiques provenant de patients sans dilation et ceux provenant d'une aorte pathologique, possédant un diamètre supérieur à la normale. Grâce à l'emploi d'analyses statistiques multivariées sophistiquées, nous avons pu étudier de larges jeux de données spectrales. Cette analyse a mis en lumière des informations discriminantes au sein des spectres infrarouges permettant de discriminer de manière reproductible les différents échantillons. Par la suite, la microspectroscopie Raman a permis de se rapprocher des conditions réelles d'acquisition, telles qu'on peut les imaginer au bloc opératoire. Après avoir démontré la reproductibilité des résultats obtenus en spectroscopie infrarouge, l'analyse sur les fragments d'aorte *ex vivo* a permis de valider de manière solide le potentiel de la spectroscopie Raman dans le diagnostic des dilatations aortiques.

Mots clés :

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Spectroscopie Raman, Anévrisme de l'aorte thoracique, , Elastine, Collagènes.

# Remerciements

Après plusieurs années de travail au sein de l'unité Médián, ma thèse est maintenant achevée. Bien que pour moi ces trois années soient un aboutissement et la fin d'une grande aventure, ce projet lui, va continuer encore bien des années après mon départ.

Le travail mené ici ne fut pas toujours facile et de nombreuses personnes ont contribué à la réalisation de celui-ci, personnes sans lesquelles il ne me serait pas possible aujourd'hui d'écrire ces quelques mots depuis L'Irlande.

Tout d'abord je remercie les membres du jury, sans qui, le bon déroulement de ce grand jour qu'est l'oral de thèse ne pourrait avoir lieu....

*Mr. Le Dr Paul Dumas*, Je voudrais tout d'abord vous remercier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et qui plus est d'en avoir été le président. Ce fut pour moi un honneur de vous rencontrer. Vos conseils et remarques sur mes travaux de thèse sont pour moi maintenant une ligne de conduite et j'espère qu'au cours des prochaines années, nos carrières de « spectroscopistes » nous amèneront à nous rencontrer à nouveau.

*Mme le Dr Marie Paul Jacob*, Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté la lourde tâche qui est celle des rapporteurs et d'avoir su accorder le temps et l'attention nécessaires à la correction de ce manuscrit. Je garde à l'esprit l'intense et intéressante discussion que nous avons eu à la suite de mon oral et je suis très heureux d'avoir vu l'intérêt que vous portiez à ces travaux.

*Mr le Pr Jean Marie Perrier Cornet*, vous vous êtes engagé à être rapporteur de ce manuscrit bien que les spectroscopies vibrationnelles ne soient pas votre spécialité et c'est pour cela que la confrontation de nos points de vue fut pour moi très enrichissante. Je vous remercie d'avoir été présent au sein de mon jury de thèse et de l'intérêt que vous avez porté à cette application des spectroscopies vibrationnelles.

*Mr le Dr Dominique Bertrand*, vous avez pris part à ce projet au cours de ma thèse et m'avez apporté un grande aide et de nombreuses connaissances concernant le traitement des données spectrales. Il fut pour moi fort agréable de vous rencontrer à diverses reprises et d'avoir accompli une partie de ces travaux avec votre soutien. Vous voir présent dans le jury de ma thèse fut donc pour moi un grand plaisir et je vous remercie de votre engagement sincère dans cette étude. Je serais très honoré de pouvoir un jour mener de nouvelles études en collaboration avec vous.

*Mr le Dr Ganesh D. Sockalingum*, que dire de plus que vous avez été mon mentor en spectroscopies vibrationnelles. Vous m'avez initié à ces techniques et fut mon encadrant pendant ces 4 dernières années. Je vous remercie du temps accordé et de l'enseignement apporté tout au long de mon doctorat. Nous avons accompli beaucoup de choses ensemble et je pense que de nombreuses collaborations verront le jour dans l'avenir. Je l'espère très sincèrement.

*Mr le Pr Michel Manfait*, il y a 4 ans déjà vous m'avez reçu au sein de l'unité Médian pour, je me souviens très bien, un demande de stage au sein de votre laboratoire. Suite à ma maîtrise, j'étais quelque peu perdu. Vous m'avez alors proposé de me joindre aux autres étudiants en DEA et au lieu de perdre du temps avec un stage de passer un diplôme supplémentaire. Beaucoup de gens dans la vie espèrent un jour avoir une chance de montrer de quoi il sont capable, et vous, vous me l'avez accordé en m'accueillant au sein de l'unité Médian. J'ai pu jusque maintenant réaliser ma thèse et commencer une carrière dans le monde scientifique. Je compte bien ne pas gâcher cette chance et un jour j'espère bien vous montrez que vous avez eu raison de me l'accorder. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir ouvert les portes à ce que je l'espère sera une longue carrière.

*Mr le Dr Sylvain Rubin*, Frères d'arme de la première heure, nous avons traversé de nombreuses épreuves ensemble au cours de ces 3 dernières années. Bien que tous deux novices dans les spectroscopies vibrationnelles, nous avons su nous épauler afin de toujours avancer. Je te remercie d'avoir été à mon écoute et d'avoir partagé toutes ces connaissances avec moi. Avoir des échanges avec toi fut toujours très enrichissant et fort intéressant. Collègue ou amis, difficile à dire ou nous en sommes après toutes ces années, mais j'espère ne pas perdre le contact avec toi et maintenant pouvoir te revoir en dehors du cadre professionnel. Je te souhaite par la même occasion une bonne continuation dans ta carrière

hospitalière et pense sincèrement que ce sont les personnes comme toi qui font tourner le monde.

De nombreuses personnes ont contribué à ces travaux. Sans elles je n'aurais pas pu accomplir tout ce projet. Il n'est jamais facile de ne pas oublier quelqu'un.....Je remercie donc :

*Herve Kaplan* pour m'avoir initié à la microscopie confocale, de s'être engagé dans ce projet mais également pour la bonne humeur qu'il partage.

*Laurent Debelle*, toujours présent en cas d'interrogation et pour ces précieuses connaissances qu'il a partagé avec moi sur l'élastine.

*William Hornebeck*, pour m'avoir ouvert de nombreuses voies et d'avoir contribué, par sa grande expérience, à éclaircir de nombreuses parts d'ombre.

A toutes les personnes du CHU Robert Debré qui ont participé à ces travaux, notamment *Micheline* que j'ai dérangé à de nombreuses reprises mais qui m'a toujours accueilli avec le sourire.....

A tous les membres de l'unité Médian qui furent toujours présents. (Je ne peu citer tout le monde)

Un gros merci à *Flo Alias La belge, la little Nadia, Cécé l'américaine, Manou la sale môme, Miss Linda, Olivier alias le glouton, Niko, Isa la spécialiste du crumble...* pour les bons moments passés ensemble.

A *Mr Ali*, arrivé en même temps que moi dans cette aventure. Nous prenons aujourd'hui chacun notre route mais je n'oublie pas toutes ces aventures !!!

*Au Père,*

*A la Mère,*

*Au Frangin,*

*A toute ma famille merci !*

Merci « en vrac »,

qui l'eu cru hein ? je l'ai fait !!

Loic  
Baloche  
Pig et Sylvia  
Doroté  
Kmel et steph  
Roulio le biker  
Maréline  
Gounet et Amandine  
Orély  
Burno  
Nath  
Patrice  
Vergnolle Family  
AnneSo  
Geoff  
Champo  
Céline et olivier  
P'tite petote  
Kemp et Marlon  
Arnote et Marie et enzo  
Julien et aude  
Olivier  
Loic et Ninine  
Kub et A.C.  
Jc et Noémie  
Célin  
ALEX  
Isa la sv girl  
P'tit Toine  
Joel et Mathilde  
Emilie et Xavier  
Gros et Nawak  
Boris  
Loodie et Emilien  
Cline  
Alex et Vaness  
Elsa  
Audrey  
Toctoc  
Rico  
Poux  
Delphine  
Rèmi et Poline  
Zoxix et Zozole  
Eddy  
Sandra  
Guiguite  
Mato et Angel  
Quenzo  
Titi  
Catherine  
Ponri  
Willio et Blandine  
Labru  
Riton et Dreumadate  
Tita  
Julie  
Couettecouette  
Jack  
Terry et Emilie

Et à tous les autres Zamis ☺

Spéciale Dédicace pour :

**la team des gros du 02**



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>I) Préambule .....</b>	<b>16</b>
<b>II) Description anatomique .....</b>	<b>16</b>
II.1 L'aorte thoracique.....	16
II.2 L'aorte ascendante.....	17
II.2.1 La racine aortique .....	19
II.2.5 La partie sus-coronaire de l'aorte ascendante.....	20
II.3 Dimensions des différents segments de l'aorte thoracique .....	21
II.3.1 Le diamètre de l'anneau aortique .....	21
II.3.4 Diamètre de l'aorte ascendante au niveau dans sa partie « tubulaire » .....	22
II.4 Aspect hémodynamique concernant l'aorte .....	23
II.5 Structure de la paroi aortique.....	26
II.5.1 L'intima : .....	27
II.5.2 La media : .....	28
II.5.3 L'adventice : .....	28
II.6 La matrice extracellulaire .....	29
II.6.1 Les fibres élastiques.....	30
<i>a Description</i> .....	30
<i>b Biosynthèse de l'élastine</i> .....	30
<i>c Réticulation de l'élastine</i> .....	32
<i>d L'étude de l'élastine</i> .....	32
<i>e Relation entre structure et élasticité de l'élastine</i> .....	33
<i>f La structure secondaire de l'élastine</i> .....	34
II.6.2 Les collagènes.....	35
<i>a description</i> .....	35
<i>b Biosynthèse du collagène</i> .....	36
II.6.3 Les glycoprotéines.....	38
II.6.4 Les protéoglycanes .....	38
II.6.5 Les cellules musculaires lisses .....	39
II.7 Le vieillissement des artères.....	40
II.7.1 Modifications morphologiques : .....	40
II.7.2 Modifications cellulaires : .....	41
<i>a Les cellules endothéliales</i> : .....	41
<i>b La fonction endothéliale</i> : .....	42
<i>c Les cellules musculaires lisses</i> .....	43
<i>d Les autres cellules</i> : .....	43
II.7.3 Modification de la matrice extracellulaire : .....	44
II.7.4 Dynamique du vieillissement artériel : .....	45
<b>III) L'anévrisme de l'aorte thoracique.....</b>	<b>46</b>
III.1 Physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte thoracique .....	47
III.2 Les méthodes d'imagerie actuelles appliquées au diagnostic de l'anévrisme thoracique .....	50

III.2.1 Échographie trans-thoracique et transoesophagienne .....	51
III.2.2 Aortographie.....	51
III.2.3 Tomodensitométrie (scanner multibarrettes) .....	52
III.2.4 IRM et angio-RM (ARM) .....	53
III.2.5 Écho-Doppler intravasculaire.....	54
III.3 Indication d'une intervention chirurgicale .....	54
<b>IV) La chirurgie de l'aorte ascendante .....</b>	<b>56</b>
<b>V) La problématique complexe du diagnostic des dilatations modérées de l'aorte thoracique .....</b>	<b>57</b>
<b>VI) Les spectroscopies vibrationnelles optiques.....</b>	<b>59</b>
VI.1 La spectroscopie vibrationnelle infrarouge.....	60
a. Rappel de la loi de Beer Lambert.....	61
b. Rappel du fonctionnement de l'interféromètre de Michelson .....	62
VI.2 La spectroscopie vibrationnelle de diffusion Raman.....	64
VI.3 Modes de vibrations des molécules .....	66
VI.4 Complémentarité entre la spectroscopie infrarouge et Raman .....	68
VI.5 Pics et Attributions en spectroscopies Raman et infrarouge.....	70
VI.5.1 En spectroscopie infrarouge.....	70
a. Notion de fréquence de groupe .....	70
b. Région des vibrations de valence des principaux groupes fonctionnels.....	70
VI.5.2 En spectroscopie Raman .....	73
<b>VII) Les différentes applications des spectroscopies vibrationnelles infrarouge et Raman dans le domaine médical.....</b>	<b>74</b>
<b>Chapitre I : Analyse des changements structuraux dans les tissus aortiques humains normaux et anévrismaux par microspectroscopie IRTF.....</b>	<b>76</b>
<b>I) Les échantillons tissulaires d'aorte ascendante humaine .....</b>	<b>77</b>
I.1 Réalisation de la banque de tissus.....	77
I.2 Réalisation des cryosections de tissu aortique .....	78
<b>II) Le spectromètre infrarouge Equinox 55 associé au microscope IRscope II (Bruker optics, Germany) .....</b>	<b>79</b>
II.1 Pré-Traitement des données spectrales IRTF .....	81
II.1.1 La fonction de lissage .....	81
II.1.2 La correction de la ligne de base .....	82
II.1.3 La normalisation .....	82
II.1.4 La dérivée seconde .....	82
II.1.5 L'Analyse en cluster ou classification hiérarchique ascendante .....	83
<b>III) Objectifs de l'analyse structurale de l'aorte humaine ascendante par IRTF.....</b>	<b>85</b>
Article n°1: Analysis of Structural Changes in Normal and Aneurysmal Human Aortic Tissues using FT-IR Microscopy.....	87
<b>IV) Conclusion sur l'analyse structurale de l'aorte humaine ascendante par IRTF ..</b>	<b>98</b>

## **Chapitre II : Analyse *in-vitro* de l'aorte ascendante humaine normale et anévrismale par microspectroscopie IRTF ..... 104**

<b>I) L'imageur infrarouge Spectrum Spotlight 300 (Perkin Elmer, France) .....</b>	<b>105</b>
I.1 L'avantage de l'imageur Spotlight 300 face au FPA.....	108
I.2 Paramètres d'acquisition retenus .....	109
I.3 Observation et analyse des images spectrales.....	109
I.4 L'analyse en composante principale.....	111
<b>II) Objectifs de l'analyse <i>in vitro</i> de tissus aortiques.....</b>	<b>113</b>
<b>Article n°2: <i>In-vitro</i> analysis of normal and human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy .....</b>	<b>115</b>
<b>III) Approche complémentaire par analyse multivariée des données infrarouge.....</b>	<b>122</b>
II.1 Le logiciel Matlab (MathWorks*).....	122
II.2 L'analyse factorielle discriminante .....	122
III.3 Analyse multivariée des données spectrales infrarouge.....	123
<b>IV) Conclusion sur l'analyse IFTR <i>in vitro</i> de l'aorte ascendante humaine.....</b>	<b>127</b>

## **Chapitre III : Analyse de la structure secondaire des protéines de l'aorte ascendante humaine par microspectroscopie IRTF ..... 129**

<b>I) La microscopie confocale à épifluorescence dans l'analyse des coupes aortiques .</b>	<b>130</b>
I.1 La source laser .....	130
I.2 Le balayage du faisceau laser .....	130
I.3 La détection.....	130
I.4 L'iris.....	131
I.5 Observation des coupes de tissus aortique.....	131
<b>II) La vidéomicroscopie pour l'observation des coupes aortiques .....</b>	<b>132</b>
<b>III) Objectifs de l'étude des structures secondaires de protéines du tissu aortique par microspectroscopie IRTF .....</b>	<b>133</b>
<b>Article n°3: FTIR protein secondary structure analysis of human ascending aortic tissues .....</b>	<b>134</b>
<b>IV) Conclusion sur l'analyse des structures secondaires des protéines de la paroi aortique .....</b>	<b>151</b>

## **Chapitre IV : Détection des tissus aortiques pathologiques par imagerie multispectrale et analyses chemométriques ..... 153**

<b>I) Le Kmeans.....</b>	<b>154</b>
<b>II) Objectifs de l'analyse multispectrale et chémométrique des tissus aortiques.....</b>	<b>156</b>
<b>Article n°4: Detection of pathological aortic tissues by infrared multispectral imaging and chemometrics.....</b>	<b>158</b>
<b>III) Conclusion sur l'analyse multispectrale et chémométrique des tissus aortiques</b>	<b>177</b>

## **Chapitre V : Analyse des fragments d'aorte par microspectroscopies IRTF et Raman : De l'*in-vitro* à l'*ex-vivo* ..178**

<b>I) Le microspectromètre Raman, Labram (Jobin Ivan, Horiba, Lille, France).....</b>	<b>179</b>
<b>II) Application de la microspectroscopie Raman à l'étude du tissu aortique.....</b>	<b>182</b>
II.1 Calibration du système .....	183
II.2 Correction des spectres .....	185
II.3 Importance du support .....	187
II.4 Traitement.....	187
<b>III) Objectifs de l'analyse <i>ex-vivo</i> des fragments aortiques.....</b>	<b>188</b>
<b>Article n°5: Normal and Aneurismal Human Ascending Aortas analysis using FTIR and Raman Microspectroscopies from <i>in-vitro</i> to <i>ex-vivo</i>.....</b>	<b>190</b>
<b>IV) Résultats complémentaires en microspectroscopie Raman.....</b>	<b>211</b>
IV.1 Caractérisation du tissu aortique, analyse des coupes fines.....	211
IV.1.1 Observation des spectres du collagène de type I et de l'élastine bovine purs	211
IV.1.2 Analyse des spectres caractéristiques du tissu aortique en microspectroscopie Raman.....	213
IV.1.3 Signal Raman des lattis de collagène.....	215
IV.2 Caractérisation du tissu aortique, analyse des aortes <i>ex-vivo</i> .....	217

## **Chapitre VI : Une nouvelle voie à explorer, Résultats préliminaires en microspectroscopie Raman .....221**

<b>I) Un marqueur spécifique de l'anévrisme thoracique.....</b>	<b>222</b>
I.1 Un pic atypique .....	222
I.2 Marqueur spectroscopique ou artefact ? .....	222
I.3 Apport de l'analyse <i>ex-vivo</i> .....	224
I.4 Analyse <i>in- vitro</i> d'un composé dense : l'apatite.....	225
<b>II) Rétrospective sur l'analyse <i>in-vitro</i> des coupes fines aortiques .....</b>	<b>226</b>
<b>III) La calcification de la média : un nouvelle voie ? .....</b>	<b>227</b>

## **Discussion générale.....229**

<b>I) Une approche originale .....</b>	<b>230</b>
<b>II) Une information biochimique pour le diagnostic.....</b>	<b>231</b>
<b>III) Une forte orientation médicale.....</b>	<b>231</b>
<b>IV) Localisation des prélèvements .....</b>	<b>233</b>
<b>V) Le pronostic de l'anévrisme de l'aorte ascendante .....</b>	<b>234</b>

## **Conclusion et perspectives .....235**

## **Bibliographie.....241**

# Table des figures

Figure 1: Les différents compartiments de l'anatomie thoracique.....	17
Figure 2: Représentation de l'aorte ascendante et de la racine aortique .....	18
Figure 3: Aspect d'une valve tricuspide (à gauche) face à une valve bicuspidie (à droite).....	19
Figure 4: Schémas fonctionnels de la racine aortique.....	19
Figure 5: Modifications de la racine aortique au cours de l'insuffisance valvulaire aortique .	20
Figure 6: Représentation graphique du diamètre de l'anneau aortique en fonction de la surface corporelle.....	22
Figure 7: Diagramme tension-rayon de la paroi aortique, influence des composantes élastique et collagénique.....	24
Figure 8: Diagramme tension-rayon en fonction de l'âge.....	25
Figure 9: Compliance de l'aorte et rôle sur le débit cardiaque .....	25
Figure 10: La paroi aortique, coloration Hematoxyline et éosine.....	26
Figure 11: Organisation concentrique de la paroi aortique .....	27
Figure 12: Biosynthèse de l'élastine .....	31
Figure 13: Interaction de l'élastine avec les autres constituants de la matrice extracellulaire.	31
Figure 14: Résidus desmosine et isodesmosine .....	32
Figure 15: Modèle simplifié d'une molécule d'élastine hydratée.....	33
Figure 16: Rôle de l'eau dans l'élasticité de l'élastine.....	34
Figure 17: Les différentes structures secondaires des protéines .....	35
Figure 18: Biosynthèse du tropocollagène .....	37
Figure 19: Organisation des fibres de collagène .....	38
Figure 20: Interactions des cellules musculaires lisses avec les protéines matricielles .....	40
Figure 21: L'anévrisme fusiforme.....	47
Figure 22: La dissection aortique .....	49
Figure 23: Remplacement de la portion aortique ascendante .....	56
Figure 24: Les domaines du spectre électromagnétique .....	59
Figure 25: Diagramme de Jablonski, l'absorption IR .....	60
Figure 26: L'interféromètre de Michelson .....	62
Figure 27: Spectre de référence en spectroscopie infrarouge .....	63
Figure 28: Obtention du spectre en spectroscopie infrarouge.....	64
Figure 29: La diffusion Raman .....	65
Figure 30: Diagramme de Jablonski, principe de la diffusion Raman.....	65
Figure 31: Les différents types de diffusion Raman.....	66
Figure 32: Modes de vibrations moléculaires .....	67
Figure 33: Spectres Raman et infrarouge sur un film de polystyrène.....	69
Figure 34: Modes de vibrations du CO <sub>2</sub> .....	69
Figure 35: Photographie d'une bandelette de tissu aortique avant la réalisation des cryosections.....	77
Figure 36: Photographie d'une cryosection sur un support de ZnSe .....	78
Figure 37: Vue d'ensemble du dispositif infrarouge Equinox 55 .....	79
Figure 38: Représentation des dérivées première et seconde d'une bande d'un spectre en absorbance.....	83
Figure 39: Coloration spécifique des fibres élastiques (orcéine) et collagéniques (trichrome de Masson) au sein des aortes élastiques (A) et musculaires (B) .....	99
Figure 40: Localisation des fibres élastiques et de collagène à l'aide de la microscopie de fluorescence biphotonique.....	101

Figure 41: Vue d'ensemble du dispositif Spotlight 300.....	105
Figure 42: Trajet optique en mode transmission.....	105
Figure 43: Représentation schématique des deux détecteurs dans le dewar.....	107
Figure 44: Le balayage du détecteur.....	107
Figure 45: Comparaison des tailles des différents détecteurs.....	108
Figure 46: Comparaison des tailles des zones d'acquisition pour chaque détecteur.....	108
Figure 47: Exemples de prétraitement réalisable avec le logiciel Spotlight.....	110
Figure 48: Image spectrale vue en 3D associée à la représentation d'une « cross-section » symbolisée par la flèche blanche.....	111
Figure 49: Représentation graphique du principe de l'ACP.....	112
Figure 50: Représentation graphique de la méthode de dépliage des images spectrales.....	123
Figure 51: Les différentes étapes de l'analyse statistique.....	124
Figure 52: Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante.....	125
Figure 53: Images spectrales repliées où les spectres sont colorés en fonction de leur appartenance à un groupe tissulaire.....	126
Figure 54: Détails du trajet optique au sein du microscope MRC-1024.....	132
Figure 55: Principe du K-means.....	155
Figure 56: Vue d'ensemble du Labram.....	179
Figure 57: Schéma optique du Labram.....	179
Figure 58: Réalisation d'une cartographie Raman.....	182
Figure 59: Comparaison des deux types d'échantillons pour l'analyse Raman (coupe de 20 µm sur support de ZnSe à gauche ; fragùent d'aorte sur lame de verre à droite).....	183
Figure 60: Spectre du silicium.....	184
Figure 61: Spectres des produits de référence.....	184
Figure 62: Les différents signaux utilisés pour la correction du spectre Raman A : courant noir ; B : lumière blanche ; C : signal du support.....	186
Figure 63: Analyse comparative des spectres du collagène (bleu) et de l'élastine (rouge) ...	212
Figure 64: Localisation des deux spectres typiques enregistrés sur l'aorte.....	214
Figure 65: Analyse comparative des spectres issus de la media (A) et l'adventice (B).....	214
Figure 66: Représentation schématique de la préparation du lattis de collagène.....	215
Figure 67: Comparaison des spectres obtenus sur le lattis de collagène : sur le gel (B), et sur le gel après séchage (A).....	216
Figure 68: Analyse comparative entre des spectres enregistrés sur les fragments ex vivo (A) et (C) et les spectres de l'élastine et du collagène (B) et (D).....	218
Figure 69: Spectre enregistré sur une calcification de la plaque d'athérome au niveau de l'intima.....	219
Figure 70: Spectre caractéristique d'un adipocyte.....	220
Figure 71: Observation du spectre particulier enregistré (vert) comparé au spectre typique de la média (rouge).....	222
Figure 72: Observation des spectres mesurés sur la média des fragments <i>ex vivo</i> d'aorte après désolidarisation de l'adventice.....	224
Figure 73: Comparaison des spectres associés à la calcification de la média chez différents patients. (A) : Aorte anévrismale, (B) : Aorte normale mal classée lors des études précédentes, (C) : Aorte normale bien classée lors des études précédentes.....	227
Figure 74: Les différents sites de prélèvement possibles.....	233
Figure 75: Mesure Raman sur un cœur de rat fraîchement explanté.....	237
Figure 76: Comparaison des spectres obtenus sur l'aorte humaine (bleu) et celle du rat (rouge).....	238
Figure 77: Exemple de sonde Raman utilisable <i>in-vivo</i> .....	239

Figure 78: Spectres du collagène (noir) et de l'aorte (bleu) mesurés grâce à une sonde Raman miniaturisée ..... 240

# Index des tableaux

Tableau 1: Fréquences des différents groupes de valence .....	71
Tableau 2: Exemples de pics identifiés sur le tissu aortique normal .....	72
Tableau 3: Principales attributions du spectre Raman .....	73
Tableau 4: Taille de la zone analysée en fonction de l'objectif et de l'ouverture.....	80
Tableau 5: Matrice de confusion suite à l'analyse multivariée.....	125
Tableau 6: Attribution des pics sur la gamme 800-1150 cm <sup>-1</sup> des spectres de collagène et d'élastine .....	213

# INTRODUCTION

## **I) Préambule**

Le sang, porteur de tous les éléments essentiels à la vie, est propulsé sans cesse au rythme incessant des battements cardiaques. L'appareil circulatoire comprend plus de 100 kms de vaisseaux et 100 000 kms de capillaires sanguins et, au centre, une pompe qui donne la cadence : le cœur humain. D'une masse moyenne chez l'adulte de 300g (soit 0.4% du corps) ce n'est pas moins de 100 000 battements par jour qui sont nécessaires pour véhiculer le sang. Le temps nécessaire pour faire un tour du circuit sanguin est d'environ 30s. C'est le ventricule gauche du cœur, de capacité moyenne de 150 ml, qui éjecte le sang chargé en oxygène dans la circulation générale au moment de la systole ventriculaire. Suite à cette contraction myocardique, le sang est expulsé dans l'aorte ascendante puis la valve aortique se ferme, empêchant ainsi tout reflux de sang dans le cœur. L'activité cardiaque débute dès les premiers mois de la vie intra-utérine et il est donc facilement compréhensible qu'une altération de la paroi aortique, aussi minime soit-elle, puisse au fil du temps engendrer une pathologie tel que l'anévrisme.

## **II) Description anatomique**

### **II.1 L'aorte thoracique**

L'aorte est la plus grosse artère du corps humain. Elle prend naissance directement à la sortie du cœur au niveau du ventricule gauche, dont elle est séparée par la valve aortique. Elle irrigue le thorax puis l'abdomen en donnant naissance à l'ensemble des collatérales artérielles du corps humain. Elle se termine en donnant naissance à deux collatérales terminales, essentiellement à destinée des membres inférieurs, au niveau de la bifurcation aorto-iliaque (fig.1).

Le segment A correspond à l'aorte ascendante. Il va de la valve aortique au départ du tronc artériel brachio-céphalique (TABC). Ce segment est intrapéricardique, il est divisé en 2 parties:

- le sinus Valsalva, dont sont issues les 2 coronaires, dit segment 0,
- l'aorte ascendante, qui débute 1 à 2 cm au-dessus des ostia coronariens.

Le segment B ou aorte horizontale débute au pied du TABC et se termine après l'artère sous-clavière gauche, incluant ainsi la carotide primitive gauche. Ce segment, vascularisant le cerveau, fait passer l'aorte du médiastin antérieur au postérieur où elle se retrouve en position antéro-gauche par rapport au rachis dorsal.

Le segment C ou aorte descendante s'étend de l'artère sous-clavière gauche jusqu'à l'orifice aortique du diaphragme. Il comprend l'isthme aortique, petit rétrécissement situé 1 à 3 cm en aval de l'ostium de l'artère sous-clavière. La partie distale de ce segment participe le plus souvent à la vascularisation de la moelle épinière par l'intermédiaire de l'artère d'Adamkiewicz.

Le segment D correspond à l'aorte abdominale donnant de nombreuses collatérales à destinées viscérales.

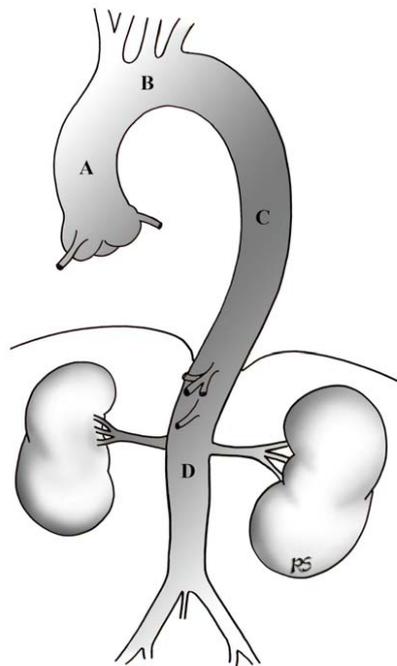


Figure 1: Les différents compartiments de l'anatomie thoracique

A: Aorte ascendante ; B: Aorte horizontale ; C: Aorte descendante ; D: Aorte abdominale

## II.2 L'aorte ascendante

La valve aortique est située entre le cœur et la racine de l'aorte ascendante (fig.2). Bien qu'anatomiquement séparée de l'aorte, la valve aortique est impliquée dans différents

processus pathologiques concernant l'aorte ascendante et donc fait une partie intégrante de la racine aortique.

Normalement, elle présente trois feuillets ou valvules sigmoïdes semi-lunaires (valve tricuspide). En diastole, la valve aortique empêche, un flux sanguin rétrograde entre l'aorte et le ventricule gauche et permet donc d'assurer une perfusion optimale de l'ensemble des collatérales aortiques. Cependant, dans environ 1 à 2 % des cas, la valve aortique n'est seulement composée que de 2 valvules sigmoïdes (valve bicuspide) (Braverman 2005).

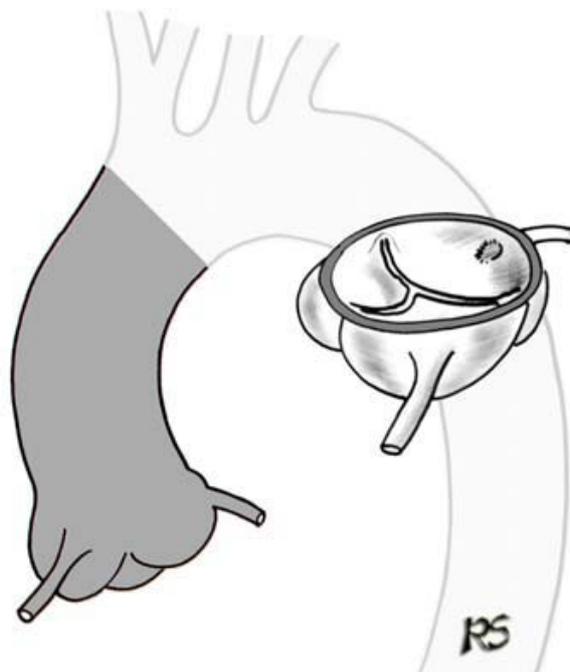


Figure 2: Représentation de l'aorte ascendante et de la racine aortique

La valve bicuspide est liée à un « désordre structural » dans l'agencement de certains composants constitutionnels de la matrice extracellulaire (fig.3). Ce même désordre se retrouve donc au niveau du tissu constituant l'aorte ascendante. Des études considèrent même la valve bicuspide comme nettement pathologique du fait de la mise en évidence de liens étroits entre une dilation de l'aorte ascendante et la présence d'une bicuspidie aortique (Kallenbach 2005; David 2006; Warren 2006).

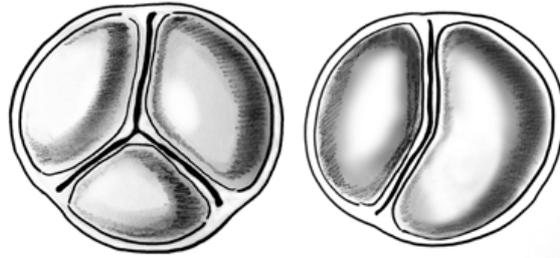


Figure 3: Aspect d'une valve tricuspide (à gauche) face à une valve bicuspide (à droite)

## II.2.1 La racine aortique

Globalement circulaire, elle peut se subdiviser en plusieurs structures bien distinctes : une base qui sert à l'implantation ventriculaire (VG) ; une structure intermédiaire nommée anneau aortique (AA) et au sommet la jonction sino-tubulaire (JST) (Fig.4).

L'anneau aortique est une structure fibreuse complexe qui répond à la forme des sigmoïdes et présente 3 indentations correspondant aux commissures de la valve aortique (en cas de vraie bicuspidie, seulement deux sont présentes). Le squelette fibreux a un rôle de maintien pour assurer la bonne coaptation des valves aortiques.

Les sinus de Valsalva, résultant d'une légère dilatation de la racine aortique, sont au nombre de trois (valve tricuspide) et se positionnent entre les commissures de la racine aortique. Leur rôle est d'éviter le contact entre les valves et la paroi aortique pendant la systole.

La JST fait la jonction entre la racine aortique et la partie sus-coronaire de l'aorte ascendante.

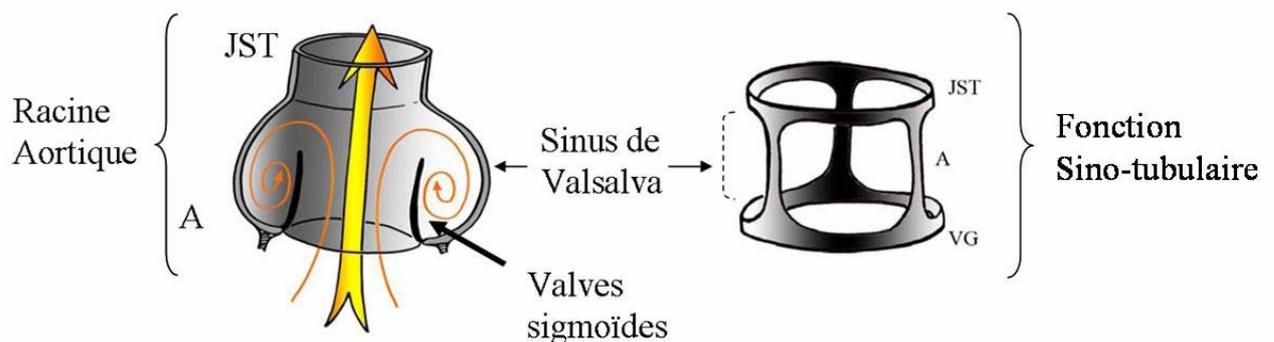


Figure 4: Schémas fonctionnels de la racine aortique

A : Anneau aortique ; JST : Jonction sino-tubulaire

Différents phénomènes pathologiques concernant la valve ou l'aorte peuvent être à l'origine d'une insuffisance valvulaire. Ils doivent être analysés avant d'envisager une intervention chirurgicale.

La figure 5.1 représente schématiquement deux cuspidés normales (C) naissantes de l'anneau (A) et suspendues par les commissures (CO), elles mêmes fixées à la jonction sino-tubulaire (JST).

La figure 5.2 illustre l'insuffisance aortique par dilatation de la jonction sino-tubulaire ; la flèche rouge schématise la dilatation. C'est le cas de l'anévrisme de l'aorte ascendante simple.

La figure 5.3 illustre la dilatation de l'anneau responsable de la fuite aortique.

La figure 5.4 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.

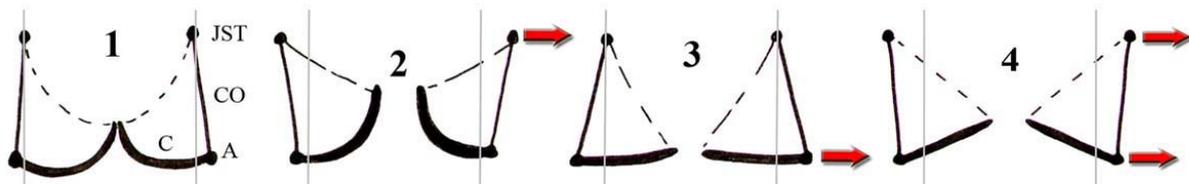


Figure 5: Modifications de la racine aortique au cours de l'insuffisance valvulaire aortique

## II.2.5 La partie sus-coronaire de l'aorte ascendante

Elle est comprise entre la jonction sinotubulaire et les ostia du TABC. 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 (Cotrufo 2005). Ceci est principalement lié à la courbure et l'orientation de l'aorte par rapport à la valve aortique. En effet, il existe en moyenne un angle de 12 degrés, 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.

### II.3 Dimensions des différents segments de l'aorte thoracique

Afin de diagnostiquer une dilatation aortique, il convient de connaître le diamètre normal du segment observé.

Compte tenu des variations morphologiques entre patients, il est nécessaire de rendre comparable les mesures en les indexant par rapport à la surface corporelle. Cette dernière est définie en fonction de la taille et du poids du patient. Deux personnes de sexe opposé et de morphologie très différentes présenteront des calibres aortiques normaux tout aussi différents. Afin d'étudier et de comparer des diamètres aortiques ne dépassant pas les 50 mm, il est utile de calculer le diamètre aortique indexé à la surface corporelle.

Plusieurs méthodes d'estimation de la surface corporelle ont été publiées mais la plus fréquemment utilisée est celle de Dubois (DuBois D 1916) :

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

#### II.3.1 Le diamètre de l'anneau aortique

Capps et al. (Capps 2000) 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 moyenne de l'anneau aortique indexée à la surface corporelle était de 2,02 +/- 0,52 cm/m<sup>2</sup> (Fig.6).

Cette publication démontre, par ailleurs, que le diamètre de l'anneau aortique augmente progressivement au cours de la vie. Plus de 85 % de cette variation est statistiquement liée à l'âge des patients (analyse univariée). 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 a permis d'établir l'équation prédisant le diamètre de l'anneau aortique (Dp) en mm en fonction de la surface corporelle (SC) en m<sup>2</sup>. Elle s'établit de la façon suivante pour tout patient :

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

Ainsi en considérant que la surface corporelle dans la population est d'environ 2 m<sup>2</sup>, 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.

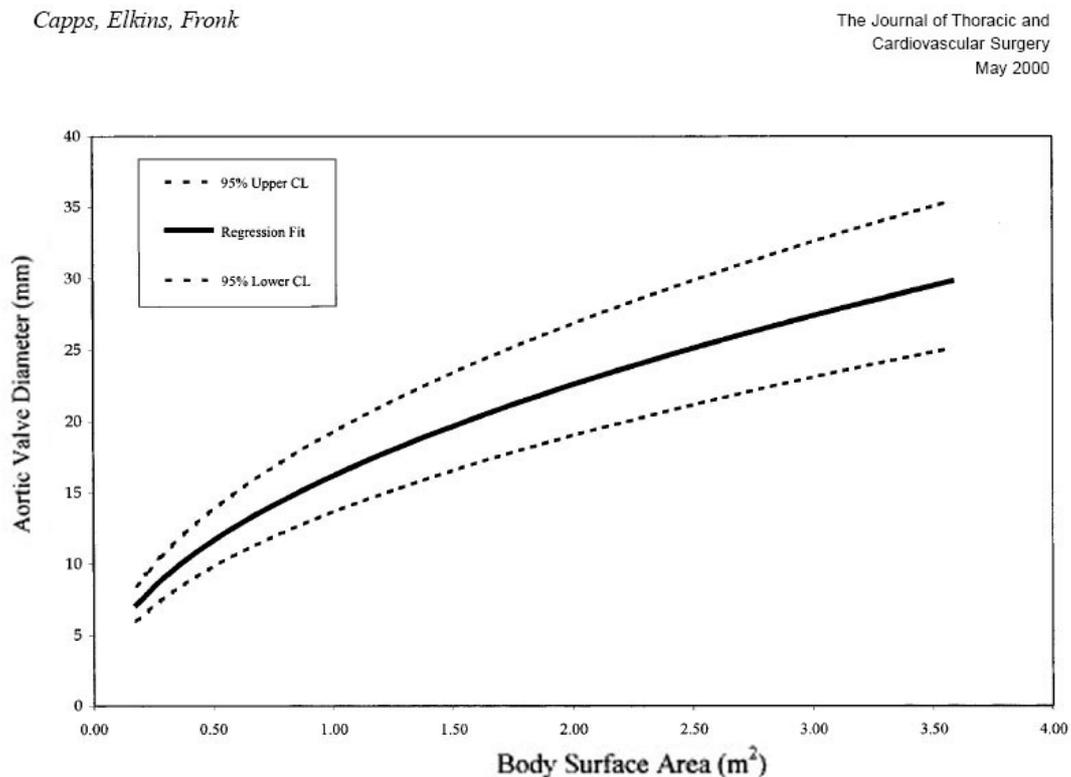


Figure 6: Représentation graphique du diamètre de l'anneau aortique en fonction de la surface corporelle

Concernant le diamètre de la racine aortique au niveau des sinus de Valsalva et de la jonction sinotubulaire, peu de données existent malgré leur importance dans l'anatomie de la racine aortique. Ainsi les diamètres normaux de ces deux structures restent assez vagues.

#### II.3.4 Diamètre de l'aorte ascendante au niveau 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-Céphalique. 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 associée :

- 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 normaux retrouvés à différents niveaux de l'aorte ascendante tubulaire en IRM ou tomodensitométrie (Scanner), sont assez proches des valeurs normales maximales évaluées et ont été mesurés 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 (Hager 2002; Garcier 2003).

#### II.4 Aspect hémodynamique concernant l'aorte

Les pressions normales dans l'appareil circulatoire varient entre 120 mmHg, en sortie du ventricule gauche, et -3 ou -4 mmHg dans l'oreillette droite (pressions mesurées par rapport à la pression atmosphérique).

Deux systèmes vasculaires sanguins sont à distinguer:

- Un système haute pression qui comprend le ventricule gauche et la totalité des artères et artérioles de la circulation systémique. Ce système contient environ 15% du volume sanguin total.
- Un système basse pression constitué du réseau capillaire, du réseau veineux comprenant les veines, l'oreillette droite, le ventricule droit ainsi que la totalité de la circulation pulmonaire associée à l'oreillette gauche. Ce système contient les 85% restant du volume sanguin total.

Il est dit qu'un corps est élastique si après avoir été allongé ou déformé par une force F, il reprend son état initial lorsque cette force cesse d'être exercée. Le rapport  $\Delta V/\Delta P$  permet d'estimer la compliance définie comme la variation de volume  $\Delta V$  consécutive à une variation de pression  $\Delta P$  ; à l'inverse le rapport  $\Delta P/\Delta V$  définit l'élastance.

En physiologie cardiovasculaire, la notion de compliance exprime la facilité de l'aorte à se dilater sous l'effet de la pression tandis que l'élastance traduit sa facilité à reprendre son

volume ou diamètre initial. La loi d'élasticité de Hooke (1976) s'écrit :  $F/s = Y(\Delta L/L)$ , où  $F/s$  est la force par unité de surface, c'est-à-dire la contrainte,  $Y$  le module d'élasticité et  $\Delta L/L$  la variation relative de longueur.  $Y$  est une constante pour un corps purement élastique mais en réalité varie en fonction de l'allongement pour la plupart des corps doués d'élasticité. Le point de rupture du matériau considéré peut-être atteint pour des valeurs de  $F$  au delà du seuil pour lequel les déformations deviennent inélastiques et irréversibles.

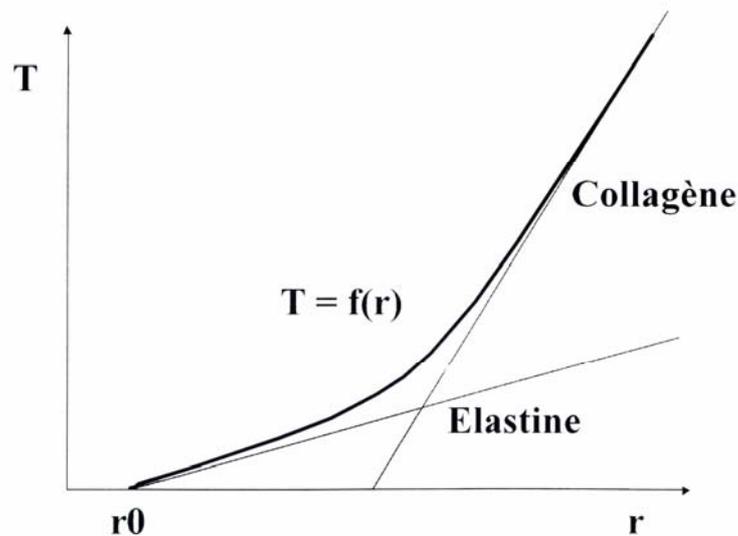


Figure 7: Diagramme tension-rayon de la paroi aortique, influence des composantes élastique et collagénique

Lors de la systole cardiaque, l'élasticité aortique se manifeste principalement par de grandes modifications de diamètre et peu de longueur. La courbe des variations de la tension en fonction du rayon, illustrée sur le diagramme tension-rayon ci-dessus (Fig.7), n'est pas rectiligne mais curviligne, comme le prévoit la loi de Hooke.

Ce résultat s'explique par la composition inhomogène de l'aorte lui conférant un comportement différent de celui d'un corps élastique pur. L'observation du comportement du collagène et de l'élastine séparément donne des courbes linéaires (Fig.7). L'élastine présente une pente plus faible puisque que son élasticité est plus grande que celle du collagène. L'élastine est donc mise en jeu dès l'augmentation du rayon alors que le collagène entre en action plus tardivement, une fois les boucles de sa structure moléculaire déroulées. Ainsi s'explique le redressement du diagramme tension-rayon de la paroi artérielle pour des valeurs élevées du diamètre aortique.

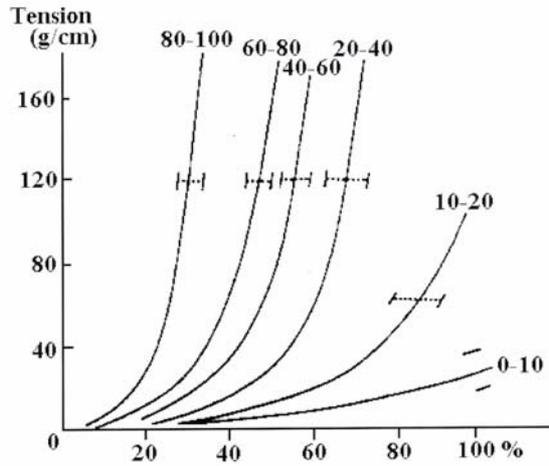


Figure 8: Diagramme tension-rayon en fonction de l'âge

Ceci permet de comprendre pourquoi le vieillissement de l'aorte, caractérisé par une augmentation de la quantité de fibres de collagène altérées et par une rigidification de l'aorte, entraîne une augmentation de la tension artérielle (Fig.8).

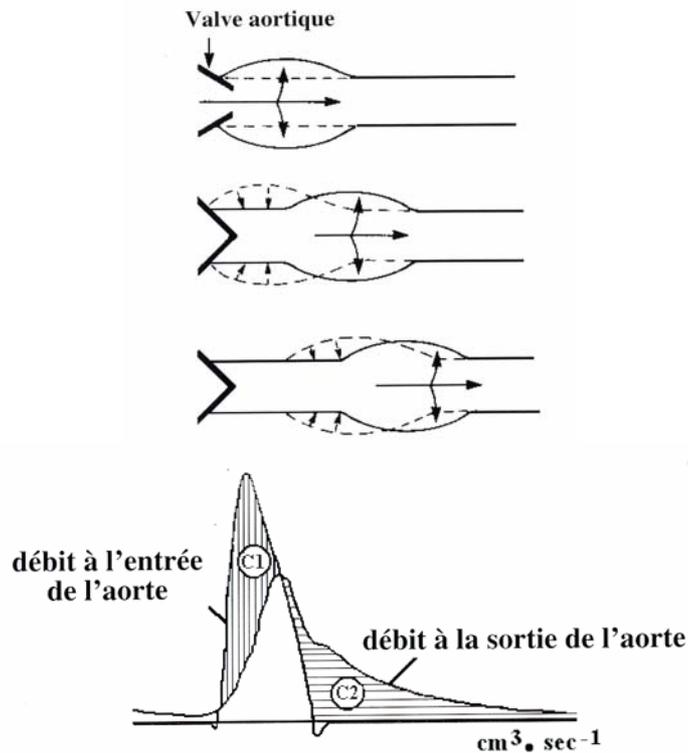


Figure 9: Compliance de l'aorte et rôle sur le débit cardiaque

L'aorte ascendante a donc un rôle d'amortisseur et de régulateur vis-à-vis de la pression artérielle. Sa compliance lui permet de stocker du sang pendant l'onde systolique et de le

restituer pendant la phase diastolique grâce à son élastance, régulant la tension artérielle et économisant le travail du cœur (Bouvrain 1981). Grâce à cet effet d'amortissement de la pulsion cardiaque, le débit sanguin est régularisé et les variations tensionnelles sont amoindries (Fig.9).

## II.5 Structure de la paroi aortique

L'aorte fait partie des artères élastiques, soumise à des grandes variations de pression dues au flux sanguin sortant du cœur. Sa principale fonction est de résorber l'onde de pression systolique en se distendant tout en conservant son organisation pour retrouver sa forme initiale avant le cycle suivant.

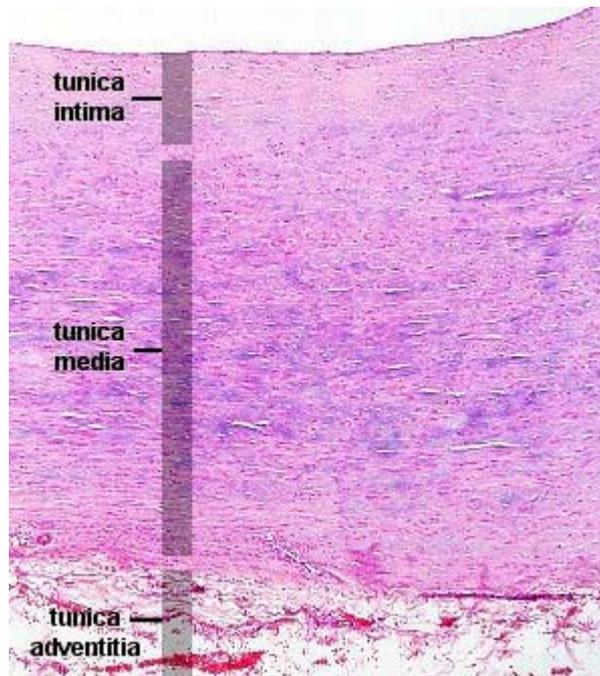


Figure 10: La paroi aortique, coloration Hematoxyline et éosine

La paroi aortique présente une structure complexe. Elle est organisée en trois couches concentriques successives, l'intima (en contact direct du sang), la média (la partie centrale), et l'adventice (couche la plus externe) (Fig.10).

## II.5.1 L'intima :

C'est la tunique la plus interne et la plus fine; c'est à ce niveau que se développe l'athérosclérose (Fig.11).

- Elle est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales, imbriquées les unes dans les autres et formant une couche unicellulaire relativement étanche.

Cette monocouche de cellules endothéliales repose sur une trame de tissu conjonctif qualifié de fibro-élastique.

- Il faut également noter la présence d'une fine lame de fibres élastiques constituée d'élastine nommée : la limitante élastique interne. Elle mesure environ 50  $\mu\text{m}$  et est principalement retrouvé dans le vaisseaux de gros calibre à fort caractère élastique.

La couche sous-endothéliale de tissu conjonctif, où se forme les plaques d'athérome, contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques, quelques cellules musculaires lisses et fibroblastes qui produisent des protéoglycannes, des glycosaminoglycannes (en particulier des héparane-sulfates), du glycogène, de l'élastine et de la laminine. Elle renferme également un grand nombre de cellules du système immunitaire (Munsch 1995).

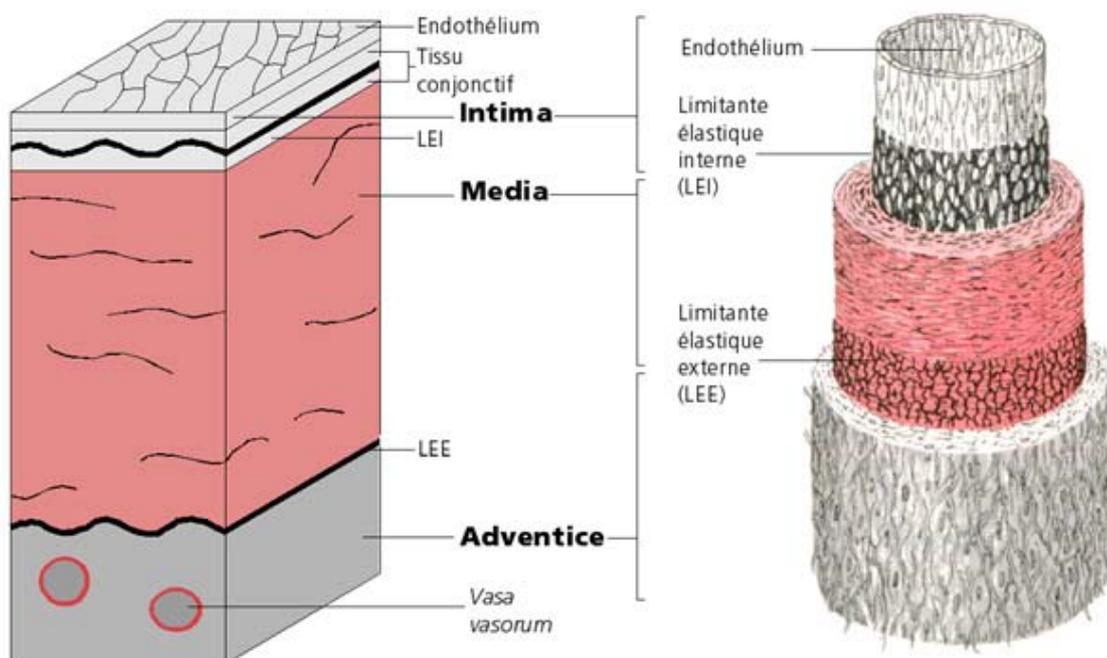


Figure 11: Organisation concentrique de la paroi aortique

### II.5.2 La media :

Il s'agit de la couche moyenne de la paroi aortique et représente la plus épaisse des trois tuniques du vaisseau (Fig.10 et 11).

La média contient des cellules musculaires lisses (CML) séparées par une matrice extracellulaire dense composée de fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, glycoprotéines et protéoglycannes. La matrice extracellulaire est organisée sous forme de plusieurs lames élastiques concentriques entre lesquelles les CML sont retrouvées et forment l'unité lamellaire (Wolinsky 1967). Le nombre d'unités lamellaires est proportionnel au diamètre du vaisseau, et augmente progressivement avec le poids et la taille. Dans l'épaisseur du tissu aortique adulte, jusque 50 unités lamellaires peuvent être retrouvées. Cette organisation en structures lamellaires n'existe que dans les artères élastiques, les artères musculaires ne possédant pas cette architecture. Cette notion a été complétée en 1985 par celle plus précise de feuillet musculo-élastique: c'est un groupe de cellules enveloppées par une matrice constituée d'une lame basale et de fibrilles de collagène, le tout enveloppé dans un tapis de fibres élastiques (Clark 1985).

Comme au niveau de l'intima, il existe de nombreuses interconnexions entre les cellules musculaires lisses et le tissu conjonctif. Celles-ci synthétisent de nombreuses macromolécules de la matrice extracellulaire après transformation de leur phénotype initialement «contractile» en «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 anévrismes et les dissections artérielles (Lesauskaite 2001).

De manière générale, la média est avasculaire, sauf dans sa partie la plus externe qui reçoit l'irrigation des *vasa vasorum* de l'adventice.

Uniquement retrouvée dans les vaisseaux de gros calibres, une limitante élastique externe d'environ 50 µm est présente à la jonction entre la média et l'adventice.

### II.5.3 L'adventice :

C'est la tunique externe de l'aorte (Fig.10 et 11).

Il s'agit d'un tissu conjonctif qui semble peu organisé. Il est tout de même riche en collagènes et en fibres élastiques, mais ne présente pas l'organisation lamellaire typique de la média. Les principales cellules retrouvées sont des fibroblastes et des adipocytes.

L'adventice est constituée :

- d'une enveloppe qui assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes,
- par des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média,
- d'un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés actifs sur les fibres musculaires lisses de la média,
- par des fibres musculaires lisses longitudinales.

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.

## II.6 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire a deux rôles distincts : le soutien des structures responsables de l'élasticité et de la résistance de l'aorte ainsi qu'un rôle de régulation cellulaire (Jacob 2001). Les fibres de collagène assurent la résistance à l'étirement et la rigidité, les lames élastiques permettent la distensibilité et les cellules musculaires lisses sont responsables du tonus vasculaire. La composition de la matrice extracellulaire varie le long de l'axe artériel, au cours du développement, du vieillissement ou encore de certaines pathologies (Dingemans 2000).

Finalement, quatre grandes familles de composants sont présentes au niveau de l'aorte: les fibres élastiques, les collagènes, les glycoprotéines de structure et les protéoglycannes.

## II.6.1 Les fibres élastiques

### *a Description*

L'élastine représente 90% des fibres élastiques et représente 33% des protéines de l'aorte thoracique humaine (Rosenbloom 1993). La quantité d'élastine décroît tout au long de l'arbre artériel pour ne plus représenter que 1/5 de sa valeur initiale au niveau de l'aorte abdominale. Les cellules vasculaires exprimant majoritairement l'élastine sont les cellules musculaires lisses (Sauvage 1998). L'élastine est résistante à de nombreuses protéases lui conférant une durée de vie extrêmement longue (Jacob 1993). Pour se donner une idée de cette résistance, les fibres élastique peuvent subir  $10^9$  phases d'élongation/relaxation avant de présenter les premières fractures de fatigue, ceci correspond aux battements cardiaques enregistrés en 40 ans.

L'élastine est synthétisée sous la forme d'un précurseur soluble : la tropoélastine. Ce monomère de 760 résidus pour un poids moléculaire de 70 kDa contient 30% de glycine et environ 50% de sa séquence est composée des trois acides aminés hydrophobes Valine, Alanine et Proline (Vrhovski 1998). Sa partie C-terminale contient les deux seuls résidus Cystéine de la protéine et serait impliquée dans l'accrochage des différentes glycoprotéines formant les microfibrilles (Trask 2000). Le reste de la protéine est une alternance de domaines hydrophobes et hydrophiles, riche en Alanine-Lysine, sites de formation de pontage covalents de l'élastine initiée par la *lysyl oxidase* (Pasquali-Ronchetti 1997).

### *b Biosynthèse de l'élastine*

Le gène humain de l'élastine est situé sur le chromosome 7 et comporte 34 exons. La synthèse débute chez le fœtus et atteint son pic à la naissance. Elle se poursuit dans les organes en croissance et s'arrête lorsqu'ils atteignent leur maturité (Debelle 1999b).

La synthèse de l'élastine (Fig.12) nécessite la présence de l'« Elastin Binding Protein » (EBP), protéine de 67 kDa générée par l'épissage alternatif des ARN pré-messagers de la  $\beta$ -galactosidase. Elle jouerait le rôle de protéine chaperonne en se liant aux monomères de tropoélastine nouvellement synthétisés dans la cellule et empêchant leur agrégation et leur dégradation prématurées (Hinek 1995). Elle escorte la tropoélastine à travers les voies de sécrétion jusqu'à la surface cellulaire et interagit avec les glycosaminoglycannes et les

microfibrilles, entraînant un changement conformationnel et libérant la tropoélastine dans l'espace intercellulaire. Cette dernière va pouvoir directement s'associer aux glycoprotéines, fibrillines ou MAGPs (Microfibril Associated GlycoProteins) (fig 13).

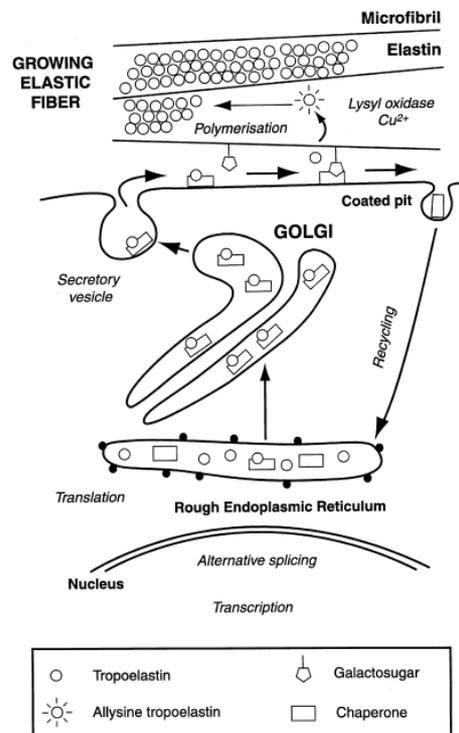


Figure 12: Biosynthèse de l'élastine

Les microfibrilles associées à l'élastine jouent aussi un rôle primordial dans l'élastogénèse. Elles apparaissent dans le tissu avant l'élastine et sont un support sur lequel les molécules de tropoélastine vont s'aligner correctement avant la formation de pontage (Robb 1999). Les microfibrilles d'un diamètre de 10 à 12 nm sont composées de fibrilline 1 et 2, MAGP-1, MAGP-2 et MAGP-36 et les émilines (Doliana 1999; Doliana 2001).

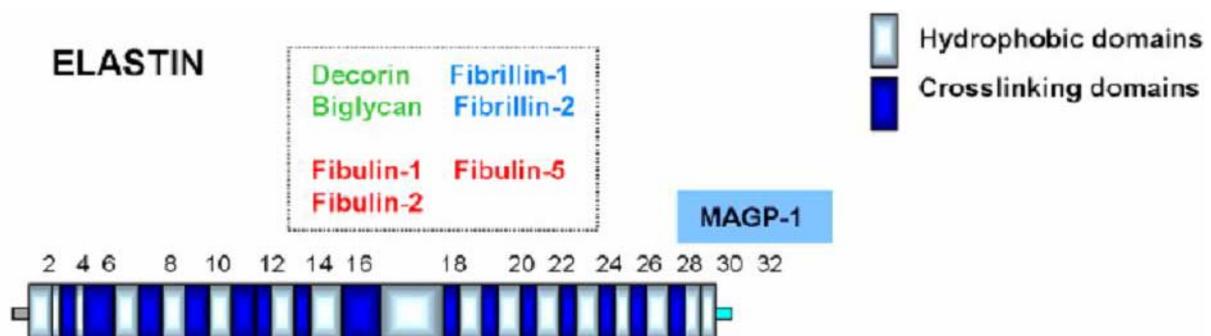


Figure 13: Interaction de l'élastine avec les autres constituants de la matrice extracellulaire



molécule. Cette hypothèse sera appuyée par Gosline (Gosline 1978) qui confirme que l'absorption de l'eau par les parties hydrophiles contribue à l'élasticité.

Gray (Gray 1973) est le premier à tenter de définir un modèle spécifique de l'élastine pouvant expliquer sa fonction élastique : le « oiled coil », avec de larges zones hydrophobes responsables de l'élasticité tandis que des domaines principalement formés d'hélice  $\alpha$  sont attribués aux « cross-links ».

L'obtention de la séquence complète en acides aminés de la tropoélastine pour de nombreuses espèces a permis des avancées conséquentes concernant l'identification des régions spécifiques de la fonction élastique de l'élastine (Bressan 1987; Wydner 1994). Chaque domaine de « cross-link » est soit riche en alanine ou en proline et contient 2 ou 3 résidus lysyl. Les régions hydrophobes responsables de l'élasticité sont donc composées de répétitions de séquences peptidiques CGGXG ou XPGXG avec pour X des résidus valine, alanine, leucine ou isoleucine.

#### *e Relation entre structure et élasticité de l'élastine*

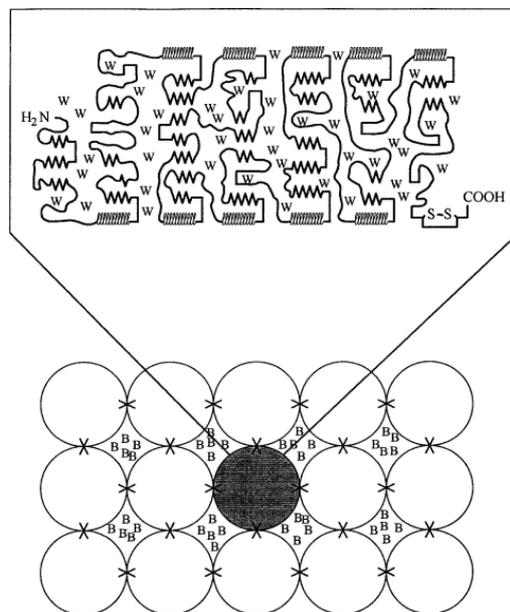


Figure 15: Modèle simplifié d'une molécule d'élastine hydratée

Les molécules de tropoélastine sont organisées de manière régulière (sous forme de cercle dans la figure 15, ci-dessus) et sont associées les unes aux autres par des « cross-links » intermoléculaires schématisés par des croix. Les molécules d'eau sont représentées dans les espaces interstitiels par la lettre B. Les régions en hélices alpha responsables des « cross-

links » sont situées à la surface de la molécule. Les régions hydrophobes sont alternativement dans des conformations ordonnées puis désordonnées. Des molécules d'eau sont présentes à la surface de la macromolécule mais également dans les monomères (w) (Debelle 1999a).

Dans un état relaxé, l'équilibre structurel est en faveur d'une conformation désordonnée (Fig.16). L'eau interstitiel (B) joue un rôle important et est fortement liée à l'eau d'hydratation (w) et restreint la mobilité des chaînes formant les molécules. Quand le polymère est étiré, les molécules de tropoélastine se déplient, ce qui expulse l'eau interstitielle des espaces intermoléculaires. De ce fait, son interaction avec l'eau d'hydratation est alors fortement réduite. Les chaînes du polypeptide subissent alors une force unidirectionnelle et entrent en contact les unes avec les autres. Dans ces conditions, la formation de structures régulières est possible, avec par exemple la formation de liaisons hydrogènes entre les feuilletts  $\beta$ . Quand la force d'étirement cesse, la molécule revient à un état de relaxation et les chaînes de tropoélastine se replient pour retourner à la forme relaxée de la structure élastique.

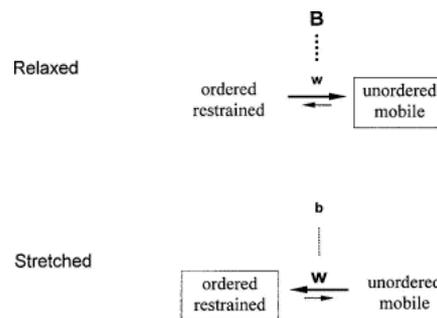


Figure 16: Rôle de l'eau dans l'élasticité de l'élastine

### *f La structure secondaire de l'élastine*

Bien que de l'eau soit présente au niveau des espaces interstitiels et qu'elle semble jouer un rôle primordial dans la fonction élastique de l'élastine, cette dernière reste insoluble. Cette caractéristique rend difficile les études liées à l'organisation conformationnelle de l'élastine. Les techniques utilisées sont variées et donnent de résultats légèrement différents : l'élastine semble majoritairement formée de structures secondaires désordonnées associées à des structures secondaires en hélice  $\alpha$ , toujours moins nombreuses que celles en structure  $\beta$  (Fig.17). Des analyses faites par spectroscopies Infrarouge et Raman permettent de chiffrer les hélices  $\alpha$  à environ 8%, les structures  $\beta$  à 36% et les formes indéterminées à 56% (Debelle

1999a). La forte proportion de structure  $\beta$  semble être en relation directe avec l'élasticité de l'élastine.

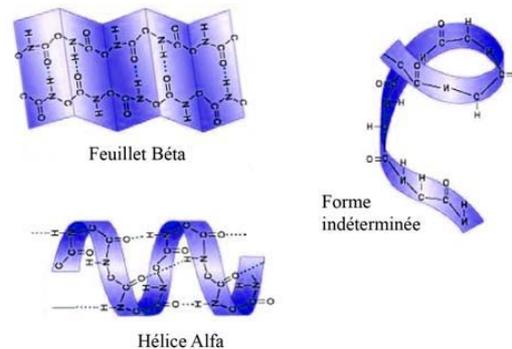


Figure 17: Les différentes structures secondaires des protéines

## II.6.2 Les collagènes

### *a description*

Le terme collagène définit en fait une colle biologique qui retient et forme l'ensemble de tous les tissus conjonctifs de l'organisme. C'est le principal constituant des tissus conjonctifs. Il est organisé en un réseau protéique structurant de nombreux tissus. Le collagène est une protéine fibreuse sécrétée par les fibroblastes puis secondairement assemblée à l'extérieur des cellules, dans la matrice extracellulaire. On le retrouve dans tous les tissus avec une forte présence dans les tissus résistants. Il contient essentiellement 3 acides aminés : la Glycine (33%), la Proline (7 à 9%) et l'Hydroxyproline (12 à 14%) en fonction des types de collagène. Il se caractérise par sa structure en triple hélice, résultant de l'association de 3 chaînes, formées par une répétition de triplets d'acides aminés suivant le modèle Gly-X-Y avec X qui est majoritairement une proline et Y l'hydroxyproline. C'est la présence de ces deux acides aminés qui permet l'association des 3 chaînes et la formation de la super hélice droite du collagène.

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 (Gelse 2003). On décrit:

- 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. Les collagènes de type I et III sont les plus représentés au sein de la matrice extracellulaire artérielle avec respectivement 60 et 30% des collagènes vasculaires. 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 (Plenz 2003). 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.

#### *b Biosynthèse du collagène*

Les différentes étapes post-traductionnelles sont présentées par la figure 18 :

Etape 1 : Dans le réticulum endoplasmique, le peptide signal est coupé.

Etape 2 : Certaines proline et lysine du polypeptide sont hydroxylées. La partie C-terminale est modifiée par N-glycosylation. Plusieurs Hydroxylysine sont O-glycosylées.

Etape 3 : La formation de ponts disulfure entre les peptides C-terminaux des trois chaînes permet ensuite leur alignement.

Etape 4 : Après la phase d'alignement, la triple hélice s'enroule, en direction de l'extrémité N-terminale.

Etape 5 : Dans l'appareil de Golgi et après transit dans le réticulum endoplasmique, des régions non-hélicoïdales sont associées de part et d'autre à la triple hélice.

Etape 6 : Le propeptide est sécrété dans l'espace extracellulaire par exocytose. Des procollagène peptidases coupent alors les peptides N- et C-terminaux et libèrent une triple hélice mature de tropocollagène, formée de 1050 a.a. et d'environ 300 nm de longueur.

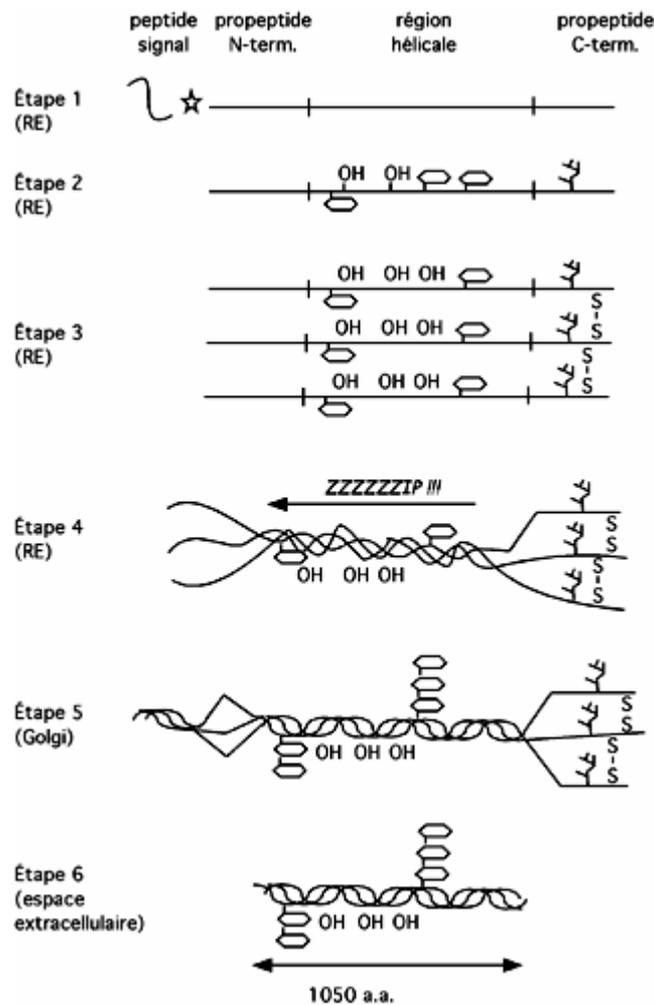


Figure 18: Biosynthèse du tropocollagène

Les molécules de tropocollagène s'assemblent côte à côte mais avec un décalage de 67 nm (Fig.19). Des lysines de la partie N-terminale d'une molécule sont pontées de façon covalente à d'autres lysines de la partie C-terminale d'une molécule voisine par l'action de la Lysyl oxydase.

Ceci permet aux molécules de tropocollagène de s'auto-assembler en une fibrille de 50 nm de diamètre. Ces fibrilles s'agrègent en des fibrilles d'ordre supérieur de 500nm, qui peuvent à leur tour former une fibre de collagène de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre.

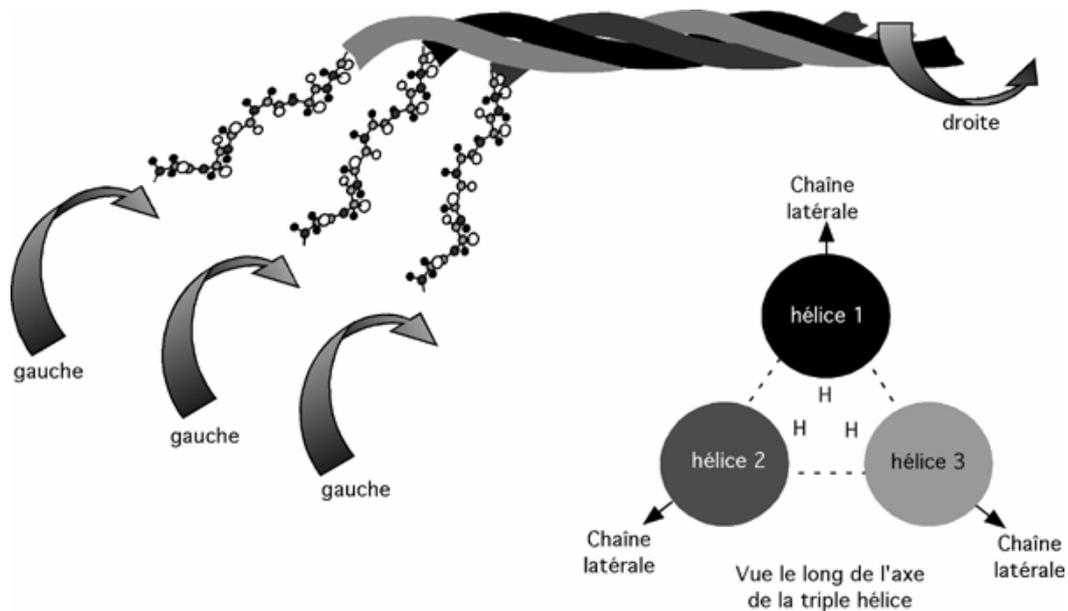


Figure 19: Organisation des fibres de collagène

### II.6.3 Les glycoprotéines

Les principales glycoprotéines de structure de la matrice extracellulaire retrouvées dans la paroi aortique sont les fibronectines, les laminines, les thrombospondines, les tenascines, l'ostéopontine et les protéines de la famille des CCN. Ces protéines sont caractérisées par des structures modulaires similaires et des séquences qui leur permettent de s'associer aux autres protéines de la matrice ou d'interagir avec les cellules via les intégrines. Ces protéines matricielles sont impliquées dans le remodelage tissulaire, la morphogénèse ou encore la croissance des vaisseaux.

### II.6.4 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. Ils sont retrouvés de façon abondante dans les tissus

devant résister à des forces de compression importante (ex : cartilages, disques intervertébraux etc...).

Seul l'héparane 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.

#### II.6.5 Les cellules musculaires lisses

Des études immunohistochimiques utilisant des marqueurs de différenciation des cellules musculaires lisses montrent que la population dans la média est hétérogène. Deux phénotypes caractéristiques semblent présent, avec la présence ou non de protéine contractiles (alpha-actine, SM-myosine) et par leur capacité de migrer et proliférer (Holifield 1996). Principalement composée de cellules à phénotype contractile, la présence d'autres phénotypes cellulaires serait due à différentes différenciations au cours du développement de l'artère. Cette diversité phénotypique dans la média saine peut expliquer la grande capacité des cellules musculaires lisses à s'adapter à différentes situations comme la cicatrisation ou de régénération vasculaire.

Les cellules musculaires lisses matures se caractérisent par une incapacité à migrer et un pouvoir de prolifération très faible. Par ailleurs, elles sécrètent des protéines contractiles et du cytosquelette ainsi que plus faiblement des protéines de la matrice extracellulaire. Elles possèdent également des canaux ioniques ainsi que les molécules de signalisation indispensables à leur fonction contractile (Chamley-Campbell 1981; Sanders 1994). Ce sont des cellules allongées (25/50  $\mu\text{m}$  de long et 5  $\mu\text{m}$  de diamètre), mononuclées et entourées d'une lame basale. Elles interagissent avec la lame basale et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant les jonctions « cellule-matrice » et sont connectées entre elles par des jonctions de types *maculae adherent* et desmosomes (Fig.20). Ces connexions permettent la transmission de la force contractile d'une cellule à l'autre. Dans chaque cellule musculaire lisse, les protéines contractiles constituent la majeure partie du cytosquelette. Ces protéines sont organisées en myofilaments épais et fins composés d' $\alpha$ -actine, d' $\alpha$ -tropomyosine, h-caldesmone, de calponine et de la protéine SM-22 $\alpha$ .

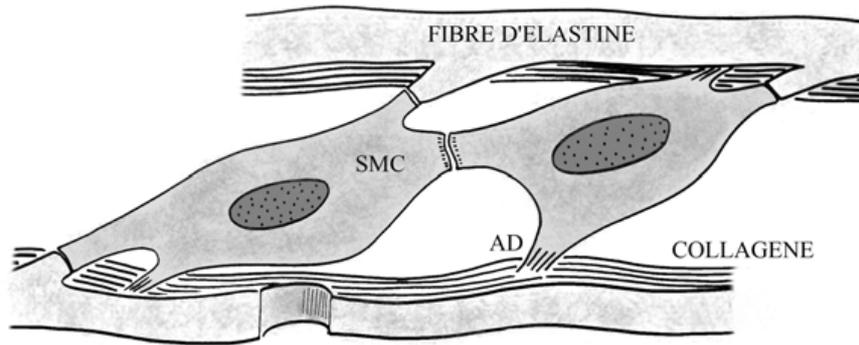


Figure 20: Interactions des cellules musculaires lisses avec les protéines matricielles  
 SMC : Célule musculaire lisse ; AD : Adhérence à la matrice extracellulaire

## II.7 Le vieillissement des artères

Dans le système cardiovasculaire, le compartiment artériel supporte des modifications importantes au cours du vieillissement.

Il est important de noter la différence entre ce vieillissement physiologique et les différentes pathologies de l'arbre artériel. Le vieillissement artériel touche l'ensemble des artères avec des localisations préférentielles en fonction des contraintes qu'elles subissent. Par comparaison, les maladies de la paroi aortique peuvent être des processus plus localisés ou s'exprimant sur des segments particuliers des artères. Pourtant, il est parfois difficile de différencier les lésions tissulaires liées au vieillissement et celles liées à une pathologie telle que l'anévrisme aortique.

### II.7.1 Modifications morphologiques :

Le phénomène de vieillissement apparaît précocement au niveau des artères coronaires (vers 5 ans) et plus tardivement au niveau de l'aorte (vers 18 ans) ; il est plus marqué à certains endroits de l'arbre vasculaire de géométrie variable: bifurcations, courbures et embranchements.

De plus, le vieillissement artériel affecte différemment les artères suivant le type du vaisseau :

- Les grosses artères de type élastique voient leur diamètre interne et externe augmenter de façon importante, ainsi que leur longueur ; il en résulte l'apparition de tortuosités artérielles.

- Les petites artères de type musculaire voient leur diamètre externe peu modifié, alors que leur diamètre interne diminue, du fait de l'épaississement intimal.

Virmani *et al.* (Virmani 1991) a étudié les variations de morphologie de l'aorte humaine en fonction de l'âge. Cette étude montrait que la circonférence aortique augmente avec l'âge, quelle que soit la section de l'aorte considérée : crosse de l'aorte, aorte thoracique descendante, aorte abdominale haute (suprarénale) et basse (au dessus de la bifurcation aortique). L'épaississement intimal progresse lui aussi avec l'âge, mais est surtout marqué au niveau de l'aorte abdominale.

Grâce au scanner, le diamètre de l'aorte ascendante, est estimé entre 2.5 et 3.8 cm (Erbel 2001). La loi de Laplace définit la pression exercée sur la paroi en fonction de la pression circulante, au rayon du vaisseau et l'épaisseur de la paroi.

Loi de Laplace :  $\sigma = (pr)/(2h)$

$\sigma$  = pression exercée sur la paroi aortique

$p$  = pression circulante

$r$  = rayon du vaisseau

$h$  = épaisseur de la paroi

En plus des phénomènes de vieillissement, l'hypertension et la médianécrose sont des facteurs intervenant dans le développement de pathologies aortiques.

Au niveau de l'aorte ascendante le taux d'expansion annuel est évalué à 1.3+/- 1.2 mm (McNamara 1978).

Le vieillissement des artères consiste donc :

- essentiellement en un épaississement continu et symétrique de l'intima, lié à l'hypertrophie des cellules musculaires lisses
- et à un moindre degré à un épaississement de la media

II.7.2 Modifications cellulaires :

*a Les cellules endothéliales :*

L'aspect morphologique des cellules endothéliales n'est que peu modifié au cours du vieillissement. On retrouve toutefois chez l'adulte âgé une proportion importante de cellules endothéliales géantes et multinucléées (jusqu'à 40 % des cellules), alors que ces cellules sont beaucoup plus rares chez l'enfant. Certains auteurs ont montré que la présence de ces cellules serait plus encore corrélée à la progression des lésions athéroscléreuses qu'à l'âge des patients (Hariri 1986).

L'agression des cellules endothéliales par différents éléments (lipides sanguins, hypoxie tissulaire, complexes antigène-anticorps, hypertension artérielle, traumatismes...) et le vieillissement entraînent :

- une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire vis-à-vis des macromolécules plasmatiques, aussi bien mise en évidence chez l'homme que sur des cultures de couches unicellulaires de cellules endothéliales chez le rat. Cette perméabilité semble liée à l'accumulation de protéines glycosylées au cours du vieillissement mais aussi du diabète (Esposito 1989),
- un enrichissement de la paroi en constituants sanguins (lipoprotéines) au niveau du sous-endothélium et des couches internes de la media.

De plus, avec l'âge, l'activité métabolique des cellules endothéliales augmente et pourrait contribuer à l'apparition de matériel fibreux dans l'intima (élastine microfibrillaire et protéoglycanes).

#### *b La fonction endothéliale :*

Au cours du vieillissement, les différentes fonctions des cellules endothéliales semblent s'altérer, avec une :

- Diminution de la sécrétion de substances vasodilatatrices,
- Diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium, induite par l'« Endothelium Dependant Relaxing Factor » (EDRF). Elle est diminuée chez le rat âgé et laisse place à une vasoconstriction au cours du vieillissement chez l'homme. Ceci pourrait être lié :
  - o à une diminution de production d'EDRF,

- ou à une diminution de l'effet de l'EDRF qui aurait plus de mal à atteindre la couche musculaire des artères du fait de l'épaississement intimal et de la faible demi-vie de ce médiateur.

- Diminution de la réponse contractile à l'endothéline-1 (chez le rat) (Ishihata 1991).

- Diminution de la synthèse de prostacycline PGI<sub>2</sub> (par des cellules endothéliales en culture) (Tokunaga 1991). Cependant, les cellules musculaires lisses de la couche intimale semblent pouvoir mettre en place un mécanisme permettant de substituer en partie cette synthèse. Cette diminution de synthèse de prostacycline pourrait avoir un rôle dans le développement et la progression de l'athérosclérose et la thrombose.

### *c Les cellules musculaires lisses*

Au cours du vieillissement, la masse constituée par les cellules musculaires lisses augmente, alors que leur densité diminue dans le tissu artériel. Ce phénomène s'explique par l'hypertrophie des cellules compensant la diminution de leur nombre.

Les cellules musculaires lisses âgées (chez le rat) prolifèrent plus rapidement que les cellules jeunes (McCaffrey 1988). Cette activité prolifératrice a été rattachée :

- à une production accrue de PDGF (« Platelet Derived Growth Factor »)
- à une diminution de la sécrétion de facteurs inhibiteurs comme les héparane-sulfates.

De plus, au cours du vieillissement, les cellules musculaires lisses adoptent un phénotype « *jeune* », c'est-à-dire sécrétoire et prolifératif; elles perdent leurs caractéristiques de contractilité et passent donc d'un phénotype « *contractile* » (cellules quiescentes dans la paroi adulte normale) à un phénotype « *synthétique* » (cellules musculaires lisses proliférantes myo-intimales). Les cellules musculaires lisses de la media subiraient une dédifférenciation pour retrouver un potentiel prolifératif amplifié, similaire à celui des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle fœtale et du nouveau-né.

### *d Les autres cellules :*

Concernant les fibroblastes de l'adventice, le vieillissement *in vivo* est mal connu. On sait que, placés en culture, les fibroblastes prolifèrent jusqu'à épuisement ; mais ce phénomène a rarement été observé *in vivo*.

D'autre part, on note la présence de cellules immunitaires, comme les cellules mononucléées, situées dans l'intima des artères âgées, sans que leur présence soit liée à l'athérosclérose. Ces cellules sont rares, voire absentes, dans les parois artérielles jeunes. Les différents rôles de ces cellules sont mal connus :

- Les macrophages possèdent des récepteurs capables de reconnaître les protéines ayant subi une glycation non enzymatique et qui s'accumulent au cours du vieillissement du fait de la diminution de la perméabilité endothéliale. La liaison aux récepteurs entraîne la sécrétion d'IL-1 (Interleukine 1) et de TNF (« Tumor Necrosing Factor » ou cachectine) qui, à leur tour, entraînent :

- o des processus de dégradation par induction de la sécrétion d'enzymes protéolytiques par les cellules de la paroi artérielle;
- o ou des phénomènes de prolifération cellulaire.

- Les cellules mononucléées pourraient aussi entraîner une dégradation de l'élastine (par libération d'élastase leucocytaire) ou au contraire participer à des processus de réparation de la paroi vasculaire.

### II.7.3 Modification de la matrice extracellulaire :

Au cours du vieillissement, la matrice extracellulaire subit elle aussi d'importantes modifications. On observe une augmentation du contenu en protéines fibreuses avec augmentation du rapport collagène/élastine, ce qui entraîne une rigidification des artères.

Selon la partie de la paroi artérielle, différentes observations sont possibles :

De nouvelles fibrilles et micro-fibrilles d'élastine apparaissent au niveau de l'intima et elles pourraient participer à la formation de nouvelles lamelles élastiques observées à la face luminale de la limitante élastique interne. Certains auteurs pensent aussi que les lames élastiques les plus internes subissent des phénomènes de fragmentation : la disparition d'une ou plusieurs de ces lames pourrait aboutir à l'incorporation des couches les plus internes de la media dans l'intima et participer à l'épaississement de cette dernière.

En ce qui concerne la média, l'élastine et le collagène sont modifiés à la fois quantitativement mais également qualitativement. Ainsi, les fibres élastiques se raréfient, se fragmentent et se dispersent dans l'espace inter-lamellaire. Cette dégénérescence pourrait être due à la

production accrue, avec l'âge, d'élastases par les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les leucocytes. La synthèse d'élastine, déjà très faible, diminue, ce qui exclut le remplacement des fibres dégradées.

Concernant le collagène, une augmentation de la concentration est observée, associée avec une dispersion de certaines de ces fibres de collagène dans la matrice extracellulaire, d'où une désorganisation autour des lames élastiques.

La limitante élastique interne est très épaissie alors que les fibres qui la composent se fragmentent et apparaissent moins bien organisées.

Dans l'épaississement intimal se forment des plaques fibreuses, constituées de collagène, de protéoglycanes, de fibres élastiques associées à des cellules musculaires lisses. La formation de ces plaques fibreuses participe à la rigidification des artères, elle-même majorée par certaines modifications du collagène. En effet, avec l'âge, le collagène subit des glycations non enzymatiques conduisant à sa rigidification et à une plus grande résistance aux collagénases entraînant son accumulation.

#### II.7.4 Dynamique du vieillissement artériel :

Le déroulement du vieillissement artériel est encore mal connu. Le remodelage progressif de la paroi artérielle est toutefois considéré comme une adaptation aux nouvelles conditions mécaniques et biochimiques auxquelles sont soumises les artères. Plusieurs étapes sont décrites :

La dégénérescence des fibres élastiques due à leur destruction enzymatique accrue et à la diminution de leur synthèse. Par ailleurs, les fibres élastiques semblent aussi se fragmenter en raison des contraintes mécaniques que subit la paroi artérielle lors de chaque systole.

L'augmentation du calibre artériel, au cours du vieillissement, est plus importante dans les gros troncs artériels, c'est-à-dire dans les artères de type élastique (riches en élastine), que dans les artères de plus faible calibre. La perte progressive du matériel élastique serait ainsi responsable de cette augmentation de calibre. Associée à la dégradation élastique, l'hypertension artérielle entraîne aussi un remodelage de la paroi par augmentation des contraintes exercées sur cette dernière.

Les forces mécaniques, exercées sur la paroi, ont également un rôle dans le remodelage vasculaire par leur action sur les cellules endothéliales qui induit les synthèses de certains facteurs de croissance et de composants de la matrice sous-endothéliale, expliquant ainsi l'hypertrophie de l'intima.

Malgré tous ces éléments, les mécanismes du vieillissement artériel sont encore mal connus. Et, même si des cas d'athérosclérose ont été observés chez des sujets jeunes, la prévalence de cette pathologie reste fortement corrélée à l'âge et fait du vieillissement le premier facteur de risque cardiovasculaire.

### **III) L'anévrisme de l'aorte thoracique**

L'anévrisme de l'aorte thoracique est un phénomène dégénératif qui entraîne un affaiblissement de la paroi associé à une augmentation du diamètre aortique qui, en absence de traitement, peut évoluer jusqu'au stade fatal de la rupture. Les anévrismes de l'aorte thoracique, moins fréquent que ceux de l'aorte abdominale, ont tout de même une incidence de 6/100 000 individus par an et sont associés à un risque de rupture dans 50 à 75% des cas.

Dans un premier temps, le traitement des dilatations aortiques modérées est médical puis chirurgical. La chirurgie s'impose en cas de diamètre dépassant, dans le cas général, les 50 mm et/ ou en présence de symptômes évoquant une complication telle que la fissuration ou la rupture. Cependant, la chirurgie aortique sous circulation extracorporelle reste lourde. Seuls les patients présentant un risque opératoire acceptable peuvent bénéficier de ce type d'intervention alors que ces opérations réalisées en urgence sont grevées d'une lourde mortalité.

Le traitement principal de l'anévrisme avéré est chirurgical et consiste au remplacement de la partie pathologique par un tube prothétique. Sur les zones autres que l'aorte ascendante, il est possible d'utiliser une endoprothèse, composée d'une structure métallique cylindrique, droite ou conique, recouverte d'un matériau protéique souple et étanche. Une fois déployée dans la lumière aortique, elle reconstitue une paroi en excluant la zone anévrismale. Cette intervention permet de minimiser des risques opératoires liés au traitement des anévrysmes et est donc principalement employée pour les patients à haut risque chirurgical.

### III.1 Physiopathologie de l'anévrisme de l'aorte thoracique

Différentes localisations sont identifiées pour les anévrysmes thoraciques. Dans 51% des cas il se situe sur l'aorte ascendante (segment A), dans 11% sur la section horizontale (segment B) et dans 38% sur l'aorte descendante (segment C). Certains anévrysmes peuvent toucher plusieurs, voire l'ensemble des trois segments. L'anévrisme est la conséquence d'une faiblesse structurelle de la paroi aortique, provoquée par divers processus acquis ou congénitaux qui, en fragilisant la média, provoque la dilatation de l'aorte.

L'anévrisme peut être de plusieurs formes. L'anévrisme fusiforme se présente sous l'aspect d'une dilatation progressive en fuseau, qui après avoir atteint son diamètre maximum diminue pour retrouver son calibre initial (Fig.21). L'anévrisme sacciforme débute de façon brutale et forme un sac appendu latéralement à l'aorte ; cette forme est extrêmement rare au niveau de l'aorte ascendante et peut parfois être confondue avec un faux anévrisme (sorte de rupture contenue de la paroi aortique).

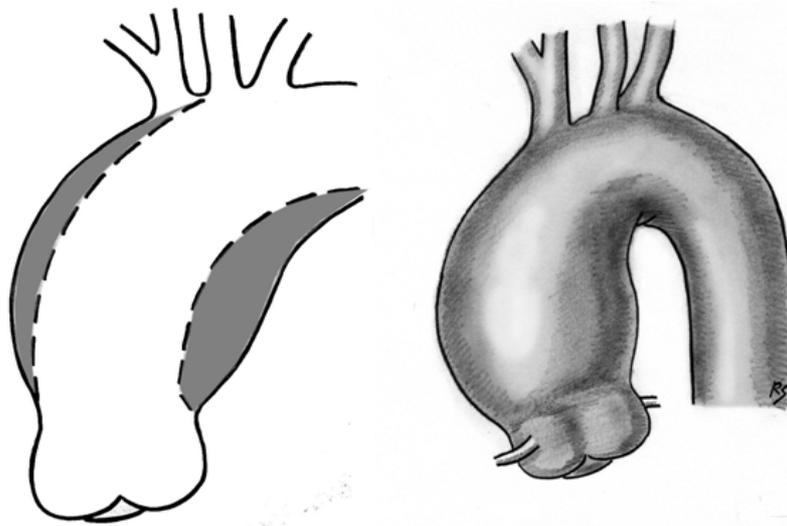


Figure 21: L'anévrisme fusiforme

- D'après l' « *Européan Society of Cardiology* », l'athérosclérose est responsable de la moitié des anévrysmes de l'aorte thoracique. Il se caractérise par un épaissement de l'intima due à la présence anormalement élevée d'acide gras extracellulaires associés à une plaque fibreuse et plus ou moins calcifiée. Les histiocytes dégradent la matrice extracellulaire, fragilisant ainsi la couche interne de la paroi aortique. Une cellularité réduite et une hyalinisation des fibres de

collagènes sont généralement observées. Les abords des plaques athéromateuses sont des zones où l'intima est très sensible à la rupture essentiellement chez des patients de plus de 50 ans.

D'autre part des anomalies du tissu conjonctif peuvent être à l'origine d'un anévrisme :

- Le syndrome de Marfan lié à une mutation du gène de la fibrilline-1 (FBN-1), composant primordial des microfibrilles associées à l'élastine. Il s'agit du syndrome autosomique dominant qui affecte le tissu conjonctif avec une incidence évalué à 1/5 000.
- Le syndrome d'Ehler Danlos : il s'agit d'un dysfonctionnement héréditaire des tissus conjonctifs caractérisé par une hyperlaxité articulaire, une hyperdistensibilité cutanée et une fragilité tissulaire accrue. Dans le syndrome de type IV, autosomique dominant, l'atteinte primaire concerne l'aorte et est due à un défaut structural de la chaîne  $\text{pro}\alpha 1(\text{III})$  du collagène de type III.
- La maladie annulo-ectasiente : aucune anomalie structurale ni fonctionnelle des collagènes (types I et III) ou des fibrillines n'a été mise en évidence dans ce syndrome. Pourtant, en cas de maladie annulo-ectasiente, 5% à 10% des patients subissent un remplacement de la valve aortique pour régurgitation, associé ou non à un remplacement de l'aorte ascendante.
- Les dysplasie héréditaire conjonctive élastique et dystrophies de la média : elles affectent surtout l'aorte ascendante chez des patients jeunes avec médianécrose kystique.
- Une partie des dissections aortiques peuvent également évoluer vers un anévrisme (10% des anévrismes thoraciques sont associés à une dissection). La dissection aortique est définie comme le clivage longitudinal de la paroi aortique au niveau de la média suite à l'irruption de sang provenant de la lumière aortique via une déchirure intimale (Fig.22). Cette « porte d'entrée » ou brèche intimale fait communiquer le vrai et le faux chenal circulant.

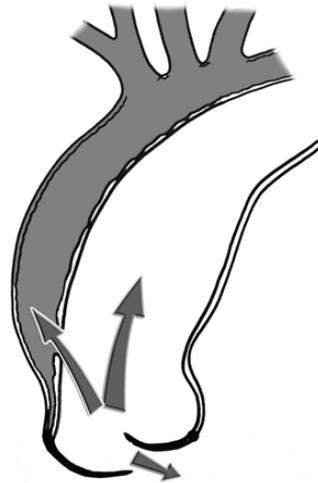


Figure 22: La dissection aortique

- Certains processus inflammatoires ou infectieux peuvent également avoir une répercussion sur la paroi aortique et concourir à l'apparition d'un anévrisme.
- La valve bicuspide, présente chez 1 à 2% de la population, est une malformation de la valve aortique probablement d'ordre génétique. Un examen attentif de ces valves bicuspidales individualise deux cuspidales au lieu de trois, 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 cuspidale 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. La bicuspidie génère des forces hémodynamiques particulières. De récentes études ont rapporté de nombreuses modifications de la paroi de l'aorte ascendante en présence d'une bicuspidie aortique (Lesauskaite 2003). 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 de leurs inhibiteurs, comme les TIMP 1 et 2. L'action protéolytique de ces MMPs conduit alors à la fragmentation progressive des fibres élastiques expliquant la nette propension de l'aorte ascendante de bicuspidie à se dilater précocement (Fedak 2003).
- l'hypertension artérielle qui modifie le phénotype des cellules musculaires lisses favorise la synthèse de MMPs et de collagènes peut aussi être incriminée,

- Le diabète, engendrant une accumulation de « vieilles » macromolécules polyglycosylées et activant divers systèmes de « nettoyage » dégradant aussi la matrice extracellulaire peut intervenir dans l'aggravation des lésions liées à l'athérome et ainsi favoriser la survenue d'anévrismes,

- Le tabac en étant responsable, comme dans de nombreux états inflammatoires, d'une sécrétion inappropriée de protéases dans les espaces intercellulaires peut entraîner une altération de la paroi aortique...etc.

Le risque naturel de rupture d'un anévrisme de l'aorte thoracique varie de 46% à 74% et le taux de mortalité relatif à la rupture est considérablement élevé. Il est en général admis que le risque de rupture est statistiquement proche de zéro pour un diamètre aortique inférieur à 50 mm.

### III.2 Les méthodes d'imagerie actuelles appliquées au diagnostic de l'anévrisme thoracique

Les anévrismes de l'aorte thoracique sont généralement découverts de manière fortuite ou à l'occasion d'un bilan d'anévrisme de l'aorte abdominale sous-rénale ou devant des symptômes tels qu'une toux, une dyspnée, une dysphonie ou une pneumopathie récidivante. Ces symptômes résultent de la compression d'organes ou de structures intrathoraciques (embolie périphérique, fistules aorto-bronchiques ou aorto-oesophagienne, ou fissuration et rupture dans le médiastin ou dans la plèvre).

Cinq méthodes complémentaires, directes et indirectes, invasives et non invasives peuvent être utilisées : l'échographie, la tomodensitométrie (TDM ou scanner), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'aortographie et l'écho-Doppler intravasculaire. Pour les AAT, ils conduisent à :

- localiser le sac anévrisimal et définir son type (sacciforme, fusiforme...);
- préciser ses dimensions maximales (longueur et diamètre), la présence de thrombus et l'importance des collatérales ;
- identifier une éventuelle insuffisance valvulaire aortique associée ;
- analyser l'implication de vaisseaux artériels collatéraux.

### III.2.1 Échographie trans-thoracique et transoesophagienne

L'échographie trans-thoracique (ETT) et la voie transoesophagienne (ETO) complémentaire sont utilisées pour le diagnostic des anévrismes et des dissections de l'aorte thoracique. Aveugle pour la jonction des segments 1 et 2 de l'aorte thoracique, l'ETO peut être réalisée au lit du malade, après sédation, et à toute heure en service de soins intensifs cardiologiques.

La sensibilité et la spécificité de l'ETT varient respectivement de 77 % à 80 % et de 93 % à 96 % pour ce qui concerne l'aorte ascendante. Pourtant, certaines études concernant le diagnostic des dilatations aortiques par l'ETT ont rapporté une sensibilité de 70 %.

### III.2.2 Aortographie

C'était l'examen de référence, mais elle a été remplacée par le scanner et l'IRM. Généralement, elle n'est plus utilisée que dans un but thérapeutique, pour un traitement endoluminal. Pour la visualisation de l'aorte, d'une dissection ou d'un anévrisme, 40 ml à 50 ml de produit de contraste sont injectés à différents niveaux de l'aorte selon différentes incidences. L'artériographie médullaire est parfois réalisée pour identifier l'artère d'Adamkiewicz.

Le diagnostic angiographique s'appuie sur une visualisation directe de l'aorte, d'une membrane de dissection (image négative, souvent oblique et linéaire), d'un sac anévrisimal, ou de la présence de deux lumières aortiques séparées. L'aortographie permet une analyse anatomique fine des dilatations et anévrismes de l'aorte thoracique. La spécificité de l'aortographie dans le diagnostic des DAT est supérieure à 95 %, mais sa sensibilité peut être inférieure à celle offerte par d'autres systèmes d'imagerie, particulièrement dans les cas de DAT atypiques.

Les limites de l'artériographie sont son caractère invasif et la néphrotoxicité du produit de contraste. En cas de DAT, la membrane intimale et l'extrémité distale de la DAT ne sont pas clairement identifiables du fait d'un flux sanguin ralenti. De plus, l'épaisseur de la paroi aortique ne peut pas être évaluée avec précision, de même que le diamètre de la lumière peut être sous-estimé en présence d'un thrombus. Dans le cadre de l'urgence, le temps nécessaire pour rassembler l'équipe angiographique, conduire le patient en salle d'angiographie et

pratiquer l'examen en lui-même peut s'avérer trop long. Ceci doit être gardé en mémoire puisque le retard du diagnostic est associé à une augmentation de la mortalité.

### III.2.3 Tomodensitométrie (scanner multibarrettes)

Depuis son apparition, le scanner multibarrettes a fortement amélioré la qualité des images et du diagnostic scanographiques en raison de la minimisation des artefacts de mouvement et de respiration. Il offre aussi une visualisation de l'anneau aortique et des coronaires qui peut s'avérer utile pour la chirurgie. On associe également le scanner multibarrettes à des reconstructions multiplanaires tridimensionnelles dans tous les plans de l'espace.

Cet examen nécessite l'injection de 120 ml de produit iodé, qui est détecté par le logiciel spécifique dans une zone déterminée, définissant ainsi le temps initial. Les images sont ensuite reconstruites tous les 2 millimètres, voire tous les millimètres, avec chevauchement. Les reconstructions sont générées en projections sagittales, coronales et obliques. Une seule acquisition en apnée permet de couvrir la totalité de l'aorte thoracique et abdominale, une deuxième acquisition est nécessaire pour explorer le faux chenal et les signes d'ischémie viscérale en cas de dissection.

Dans le cas des DAT, le diagnostic est basé sur la mise en évidence d'une membrane de dissection séparant le vrai chenal du faux et apparaissant comme une légère structure linéaire dans la lumière aortique.

Dans les années 90, certaines études ont rapporté des niveaux de sensibilité allant de 83 % à 94 % et une spécificité comprise entre 87 % et 100 % pour le scanner non hélicoïdal. Les bénéfices du scanner multibarrettes sont depuis 2005 bien établis et incluent la réduction du temps d'investigation, une meilleure évaluation de l'aorte et l'obtention des images lors du maximum d'opacification. La sensibilité moyenne du scanner multibarrettes se situe au-delà de 95 %.

Les limites du scanner sont la néphrotoxicité et l'irradiation. En l'état actuel des performances, les coronaires ne sont pas parfaitement visualisées et la dynamique valvulaire aortique ne peut pas être appréciée.

### III.2.4 IRM et angio-RM (ARM)

La résonance magnétique apporte les mêmes informations que l'angio-scanner avec l'avantage supplémentaire de permettre des coupes dans tous les plans de l'espace, en particulier dans le grand axe de l'aorte donnant des images pseudo angiographiques en oblique antérieure gauche déroulant la crosse aortique. Elle a également comme avantage de ne pas nécessiter d'injection de produit de contraste néphrotoxique et de ne pas être irradiante.

En 2005, le temps d'acquisition de l'IRM s'est réduit à celui de la respiration retenue, pour atteindre un temps comparable à celui requis pour une étude ETO. Les nouveaux équipements d'acquisition en temps réel devraient faciliter le diagnostic chez des patients instables. L'ARM constitue un outil supplémentaire dérivé de l'IRM qui permet d'obtenir des images similaires à celles d'une aortographie invasive mais avec un champ de vision plus large. Les premières études montrent que le diagnostic des pathologies aortiques semble fiable. Ainsi, la combinaison de l'ARM et des vues IRM permettrait l'obtention d'une vue d'ensemble anatomique de l'aorte, ainsi que les détails de la paroi aortique, du sac anévrysmal ou de la membrane de dissection.

L'IRM fournit clairement des informations relatives à l'étendue de la pathologie concernant l'aorte ascendante distale ainsi que la crosse aortique avec plus de détails que l'ETO.

L'IRM a une précision, une sensibilité et une spécificité des plus élevées (voisine de 100 %) pour la détection de toutes les formes de dissection à l'exception des DAT de formes discrètes. La sensibilité de l'IRM dans la localisation des portes d'entrée et de réentrée est comparable à celle de l'ETO (90%)

Malgré une très bonne précision, certains inconvénients et artefacts existent. Des artefacts peuvent être rencontrés au maximum dans 64 % des cas mais, en général, sur une seule coupe. L'étude des coupes avoisinantes permet d'identifier ces artefacts. Une bonne expérience de la lecture d'images IRM est donc indispensable. La distribution des équipements et leur disponibilité constituent la principale limitation, surtout en situation d'urgence. Le plus souvent, l'IRM est utilisée dans des conditions hémodynamiques stables et pour le suivi d'anévrysmes et de dissections chroniques. Sa résolution d'image est actuellement inférieure à celle de l'angio-scanner. Elle est surtout utilisée pour la surveillance après traitement chirurgical des anévrysmes ou des DAT.

### III.2.5 Écho-Doppler intravasculaire

La technique d'écho-Doppler intravasculaire repose sur le cheminement d'un cathéter échographique sous guidage fluoroscopique monté sur cathéter-guide conventionnel. La procédure peut être effectuée en 10 minutes.

Les données de l'écho-Doppler intravasculaire complètent les informations diagnostiques angiographiques. Au cours d'un cathétérisme cardiaque, cet examen peut repousser la plupart des limites et des inconvénients de l'angiographie conventionnelle. L'architecture de la paroi aortique et/ou artérielle est directement visualisée depuis la lumière du vaisseau. Ainsi, cette technique permet la caractérisation de la paroi et une description de la pathologie aortique. Elle complète les informations indirectes « en ombre chinoise » offertes par les techniques angiographiques.

Chez les patients ayant des formes classiques de DAT, cette technique de visualisation offre une image très intéressante de la membrane de dissection, de ses mouvements pulsatiles, de sa circonférence, de son étendue longitudinale et du degré de compromission de la vraie lumière. Sa sensibilité et sa spécificité avoisinent les 100 % dans certains rapports. Aussi, elle détecte la thrombose du faux chenal de dissection avec une sensibilité et une spécificité supérieures à celles de l'ETO.

### III.3 Indication d'une intervention chirurgicale

D'après le *Regence Group Medical Policy*, il n'y a pas de critère standard dans la sélection des patients pour le traitement des AAT. Les décisions sont prises en fonction des symptômes, du risque de rupture de l'anévrisme, de comorbidité et de la durée de vie attendue.

En raison d'une morbi-mortalité importante, l'identification de critères de sélection des patients pouvant bénéficier d'une réparation chirurgicale reste très complexe. Plusieurs auteurs ont recommandé une approche individuelle, basée sur la comparaison entre les risques calculés de rupture et ceux de décès ou de paraplégie postopératoire. Le pronostic des AAT est fonction du risque de rupture, de la taille de l'anévrisme et de sa localisation (aorte ascendante, descendante, ou thoracoabdominale). De nombreuses études se sont attachées à évaluer le risque de rupture en l'absence de traitement. Pourtant l'histoire naturelle des AAT est peu connue en raison d'un nombre croissant de patients opérés avant le stade de rupture.

Toutefois, la chirurgie est considérée pour les patients qui présentent une réserve physiologique suffisante et dont l'anévrisme mesure plus de 50 mm ainsi que pour des patients présentant un AAT symptomatique de dimensions moindres ou pour des anévrismes dont la croissance est supérieure à 6 mm en 6 mois. Le diamètre de 50 mm doit être revu à la baisse dans le cas des anévrismes sacciformes, chez les femmes et les patients de petites tailles. Une autre étude conduite par Davies *et al* (Davies 2002) s'est focalisée sur le risque de rupture et de dissection dans une population de 721 patients présentant un AAT. Au cours de l'évaluation de référence, 304 patients étaient indemnes de DAT ; leur évolution naturelle a été suivie quant aux événements de rupture, de dissection et de décès. Les patients ont été exclus de l'étude une fois opérés. Les auteurs ont constaté que le diamètre de l'anévrisme influence fortement les résultats. Le risque annuel de rupture ou de dissection pour des diamètres supérieurs à 6 cm est au minimum de 6,9 % et celui de décès de 11,8 %. Les mêmes auteurs avaient suggéré dans un précédent travail que l'intervention chirurgicale était justifiée pour un AAT descendant si son diamètre atteignait 6,5 cm. Aujourd'hui l'acte chirurgical est indiqué dans le cas où le diamètre maximal du sac anévrisimal excéderait les 60 mm, les mesures étant faites sur les clichés obtenus par scanner ou angio-RM, la mesure devant être faite strictement dans un plan perpendiculaire à la lumière aortique, éventuellement en s'aidant des reconstructions multiplanaires. L'anévrisme doit également être opéré si l'histoire clinique du patient mentionne des antécédents d'embolie systémique à partir des dépôts de fibrine ou une compression symptomatique des structures adjacentes. La fissuration, la rupture et la dissection aortique aiguë à partir de l'anévrisme constituent enfin les indications chirurgicales d'urgence. Les ruptures peuvent être intrapéricardiques pour le segment A, médiastinales pour le B et pleurales gauches pour le segment C. En effet, si les anévrismes chroniques post-traumatiques s'assimilent tout à fait aux anévrismes dégénératifs, à la différence près que l'aorte sus- et sous-jacente est saine, les cas de rupture aiguë posent un problème de conduite à tenir en urgence. Compte tenu de la possibilité d'implantation d'endoprothèse, souvent différée, et la possibilité d'une chirurgie immédiate, le chirurgien est mis en porte à faux sur le plan médico-légal. Sa responsabilité chirurgicale peut être alors mise en cause et, à l'inverse, la survenue d'une paraplégie peut être discutée en arguant le fait que l'endoprothèse ait pu être le traitement adéquat.

Les patients âgés de plus de 80 ans, essentiellement sur le plan de leur âge physiologique, constituent une contre-indication de l'acte chirurgical. Entre autres facteurs de contre-indication, se trouvent aussi l'insuffisance respiratoire chronique, l'insuffisance rénale, les coronaropathies et enfin les maladies généralisées (néoplasie, etc.). Ces patients peuvent

éventuellement constituer des indications pour le traitement par prothèses endo-aortiques (PEA).

#### **IV) La chirurgie de l'aorte ascendante**

L'anévrisme de l'aorte ascendante est une pathologie asymptomatique jusqu'à l'apparition de complications parfois fatales. Dans les années 50, Charles Dubost réussissait le premier remplacement d'un segment aortique par une homogreffe aortique. Le remplacement de l'aorte ascendante (ou mise à plat greffe) (Fig 23) est une intervention lourde qui nécessite un arrêt cardiaque, la mise en place d'une circulation extracorporelle ainsi que la perfusion d'une solution de cardioplégie riche en potassium. En cas d'une atteinte simultanée de l'aorte ascendante et de la valve aortique, il 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.

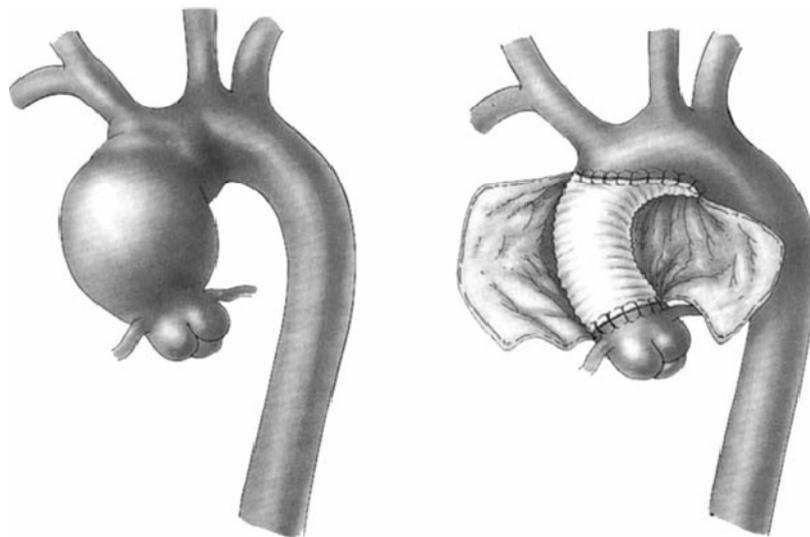


Figure 23: Remplacement de la portion aortique ascendante

Dans un travail similaire sur le remplacement chirurgical de la portion aorte ascendante et de la crosse aortique, Hagl *et al.* (Hagl 2001) ont démontré l'utilité de la protection cérébrale tout en identifiant des facteurs de risque, conduisant à une définition des patients à haut risque pour cette chirurgie. Ainsi l'âge au-delà de 60 ans, une symptomatologie neurologique préopératoire, le remplacement simultané de la valve mitrale, le pontage d'artères coronaires, ou toute autre opération concomitante ont été reconnus comme facteurs prédictifs de complications neurologiques majeures.

Les taux de mortalité et de complications neurologiques majeures précoces sont relativement élevés après chirurgie de l'aorte ascendante et/ou horizontale. Hagl *et al.* ont rapporté un taux de mortalité hospitalière de 10 %, où 41 % des décès sont dus à des AVC majeurs. Dans cette étude le taux d'AVC hospitaliers était de 12,4 %, incluant les AVC fatals. Ehrlich *et al.* (Ehrlich 1999) ont publié en 1999 des taux de mortalité hospitalière et de déficits neurologiques permanents hospitaliers de 15 % et 9 % avec utilisation d'une perfusion cérébrale rétrograde. Ces taux étaient respectivement de 31 % et 27 % en l'absence d'une protection cérébrale. En 2000, Yagdi *et al.* (Yagdi 2000) ont publié les résultats d'une série de 144 remplacements de l'aorte ascendante +/- horizontale, avec perfusion cérébrale rétrograde. Ils ont rapporté une mortalité précoce de 18,7 % et un taux de complications neurologiques de 7,7 %, dont seulement 1,4 % de déficits permanents.

#### **V) La problématique complexe du diagnostic des dilatations modérées de l'aorte thoracique**

Différentes techniques d'imagerie existent et présentent des sensibilités plus ou moins importantes. Cependant, le diagnostic des différentes pathologies se base sur des modifications anatomiques majeures de l'axe aortique. Le diagnostic d'anévrisme de l'aorte est principalement fait devant un diamètre supérieur à 50 mm ou dans le cadre de l'apparition de symptômes. Mise à part un critère de taille des dilatations aortiques, aucune méthode fiable et reproductible n'est accessible aux chirurgiens pour orienter le choix des patients à opérer.

Cette problématique se pose essentiellement lors d'interventions chirurgicales (remplacements valvaires) durant lesquelles le chirurgien se retrouve face à une dilatation modérée de l'aorte thoracique. Compte tenu du risque lié au remplacement de la partie anévrismale, il semble que ce dernier, réalisé de manière systématique, ne soit pas l'alternative optimale pour les patients. Il faut également prendre en compte le coût économique lié à des interventions lourdes.

D'autre part, le vieillissement naturel de l'aorte contribue à une augmentation de son diamètre, sans pour autant qu'elle ne devienne pathologique. Cependant, chez certaines personnes, des facteurs physiologiques ou génétiques prédisposent des dilatations aortiques modérées à évoluer vers des anévrismes de l'aorte thoracique.

Des études réalisées sur l'évolution du diamètre des aortes dites anévrismales sont claires et confirment que le stade final de la pathologie est la rupture (Masuda 1992). Dans le cas d'aorte franchement anévrismale, le geste chirurgical est à pratiquer de manière systématique. Cependant, des patients devant subir un remplacement de la valve aortique présentent souvent une dilatation modérée de l'aorte ascendante. De rares études suivent l'évolution du diamètre aortique suite à une intervention de remplacement de la valve aortique (Nancarrow 1984; Natsuaki 1998). Une étude récente de Andrus et al (Andrus 2003), se basant sur le suivi de 185 patients ayant subi un remplacement de la valve aortique sans étendre le geste à l'aorte ascendante, confirme que toutes les aortes ne se dilatent pas de manière excessive après l'intervention. Il semblerait que le rétablissement du flux sanguin normal soit suffisant dans de nombreux cas pour amoindrir la dilatation. Environ 15% des patients présentent une augmentation du diamètre de plus de 0,3 cm dans les 30 mois suivant la chirurgie. Des investigations prenant en compte des patients avec des pathologies de la valve aortique mettent en évidence des facteurs prédictifs comme la présence de valves bicuspidées. Cependant, ces études affichent des taux voisins de 60% de cas de dilatation ce qui renforce encore la nécessité d'orienter le choix des patients à opérer de l'aorte ascendante (Hahn 1992; Crawford 2001).

Il apparaît nécessaire de développer une nouvelle technique pour le diagnostic des dilatations aortiques de l'aorte thoracique. Jusqu'à maintenant, les techniques utilisées sont des méthodes d'imagerie qui donnent des informations morphologiques sur l'aorte thoracique et permettent de visualiser le diamètre.

Il est clair que lors du développement anévrismal des modifications ont lieu, notamment au niveau des protéines telles que les collagènes et l'élastine. Il est donc nécessaire d'appliquer une technique capable de déterminer les variations biochimiques des composants tissulaires et de mettre en évidence des altérations en relation avec la pathologie.

Pour cela, nous avons choisi d'appliquer les techniques de spectroscopies vibrationnelles infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et Raman qui sont par définition non invasives, non destructives et biochimiquement informatives.

## VI) Les spectroscopies vibrationnelles optiques

L'objectif des spectroscopies optiques est d'obtenir des informations sur la matière à partir de son interaction avec le rayonnement. Selon la fréquence du rayonnement incident (Fig 24) (c'est-à-dire son énergie), typiquement l'ultraviolet (UV), le visible ou l'infrarouge (IR), l'interaction matière-rayonnement concerne divers types de niveaux d'énergie de la matière. Le type d'information obtenu dépendra de la sensibilité de l'appareillage (et, donc, de la méthode d'enregistrement du spectre) et de la nature de l'échantillon (état physique : gaz, liquide, solide...). Le type de renseignement obtenu peut être qualitatif ou bien quantitatif.

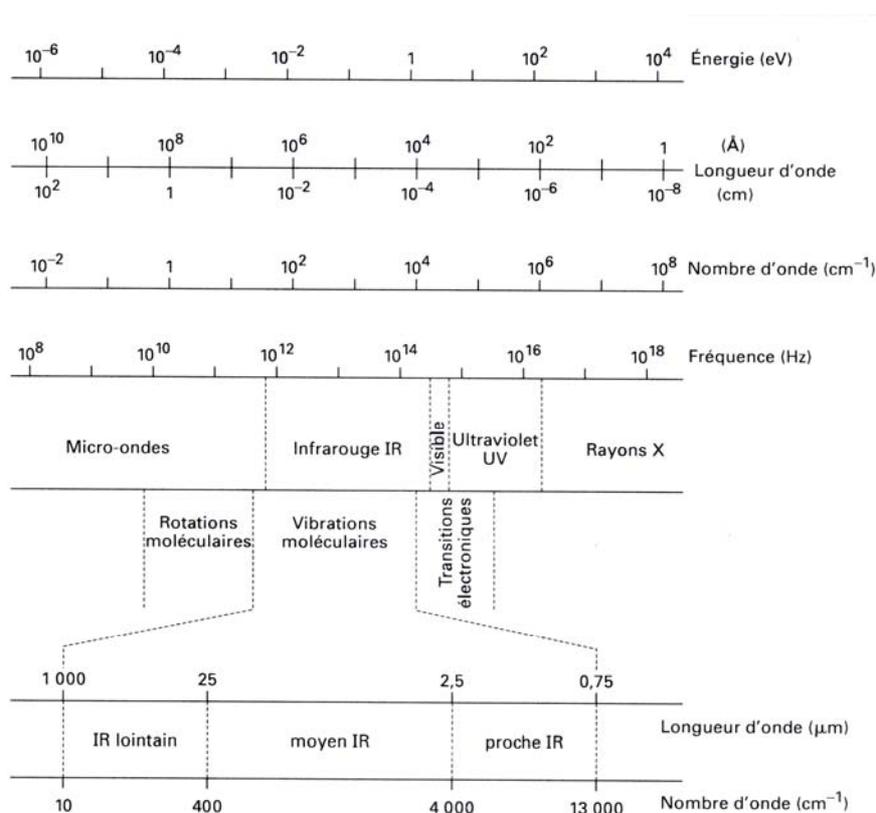


Figure 24: Les domaines du spectre électromagnétique

Les spectroscopies vibrationnelles apportent des informations sur la composition chimique des échantillons et cela de manière quantitative. Cette information s'exprime sous forme de spectres infrarouge ou Raman et sont rattachés à une échelle d'intensité en fonction de la fréquence de vibration de la molécule considérée. La grosse évolution de la spectroscopie est le passage à une approche qualifiée d'imagerie, en combinant l'information chimique avec la notion de répartitions spatiales des constituants de l'échantillon. L'utilisation de ces

techniques présente de nombreux avantages comme une forte sensibilité (identification d'un groupement chimique spécifique à une fréquence donnée) ou encore l'absence de préparation des échantillons (pas de produits de contraste ou de coloration). Bien que la diffusion Raman s'exprime de manière moins intense que l'absorption infrarouge, l'imagerie en spectroscopie Raman a longtemps été préféré dans de nombreux domaines d'application, surtout en raison du coût moins élevé des détecteurs CCD. Cependant l'accès à des technologies jusque maintenant réservées au domaine militaire et au téléguidage des missiles, va permettre à la spectroscopie infrarouge de s'imposer dans le domaine de l'imagerie.

### VI.1 La spectroscopie vibrationnelle infrarouge

Un échantillon est constitué d'un ensemble de niveaux vibrationnels différents. Lorsqu'un faisceau le traverse, si la fréquence du faisceau incident est telle que l'énergie véhiculée par l'onde est égale à la différence d'énergie entre 2 niveaux, le phénomène d'absorption est alors possible (passage à un état excité) (Fig.25).

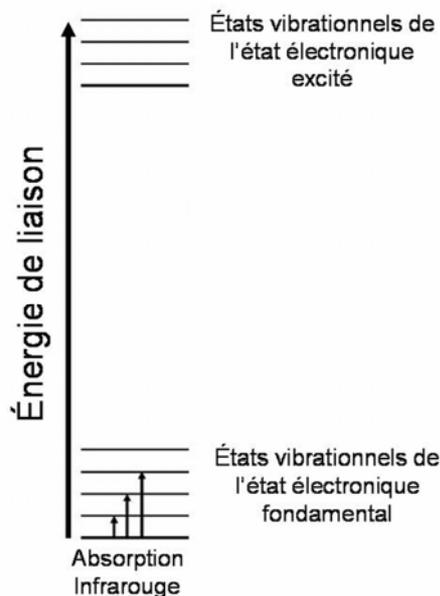


Figure 25: Diagramme de Jablonski, l'absorption IR

Les photons absorbés ne sont pas transmis. L'absorption aura lieu si les niveaux d'énergie concernés et la polarisation du rayonnement incident vérifient certaines propriétés : on parle de règle de sélection.

La condition nécessaire est exprimée par :

$$h\nu_0 = \Delta E$$

$\nu_0$  = Fréquence du rayonnement incident

$h$  = constante de Plank ( $6.626 \cdot 10^{-34}$  Js)

$\Delta E$  = différence entre 2 niveaux d'énergie

#### *a. Rappel de la 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 du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire  $\epsilon$  dépendant de la substance traversée.*

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

*Cette relation permet de déduire la transmittance  $T$  :*

$$T = I/I_0$$

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

$$A = -\log T = -\log (I/I_0) = \epsilon cl$$

*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.*

*Le spectre infrarouge est la représentation graphique de cette absorbance en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$  exprimée sous forme de nombre d'onde  $\bar{\nu}$  (en  $\text{cm}^{-1}$  avec  $\lambda$  en m).*

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

*Le spectre infrarouge moyen s'étend de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .*

La cartographie : les détecteurs de type MCT (mercure-cadmium-telluride) ne sont formés que d'un seul élément et l'obtention d'une information spectrale sur une large zone peut prendre plusieurs heures à plusieurs jours suivant la dimension et la résolution spectrale souhaitée.

L'imagerie : Une évolution des détecteurs et le développement des FPA (Focal Plane Array) a rapidement permis de créer une nouvelle discipline : l'imagerie chimique. Les FPA sont formés d'un nombre important de pixels qui, par exemple pour un détecteur de 64x64 pixels, permet l'acquisition simultanée de 4096 spectres aboutissant à un gain de temps énorme (Lewis 1995). Les FPA permettent la mesure dans une gamme allant de 10000 à 500  $\text{cm}^{-1}$  avec des détecteurs possédants plus d'un million de pixels (1024x1024).

Bien qu'amenant un gain de temps conséquent dans l'analyse, la qualité d'un spectre unique issue d'un pixel du détecteur FPA est de qualité inférieure à celle obtenue sur le mono détecteur.

L'obtention des spectres se fait globalement de la même manière pour les deux approches avec l'utilisation d'un interféromètre de Michelson classique.

#### *b. Rappel du fonctionnement de l'interféromètre de Michelson*

Le dispositif est composé de deux miroirs, un fixe et l'autre mobile, et d'une lame séparatrice (Fig.26). Le faisceau infrarouge entrant est alors divisé en deux et le décalage de marche optique créé par le mouvement du miroir engendre des variations d'intensité arrivant sur le détecteur qui enregistre alors l'interférogramme. Associée à ce dispositif, une formule mathématique permet de représenter le spectre sous la forme de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde : La transformée de Fourier.

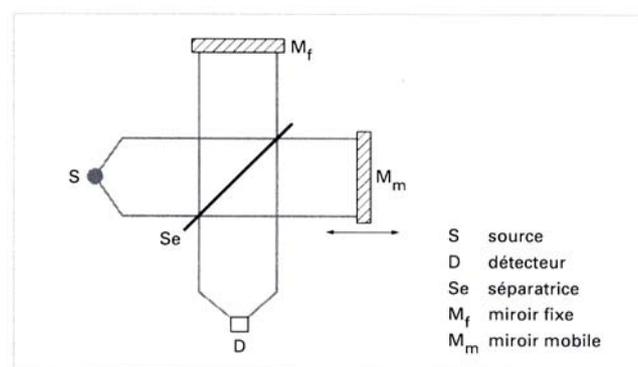


Figure 26: L'interféromètre de Michelson

*Certains avantages associés à ce dispositif sont décrits :*

*L'avantage de Fellgett pour un ensemble de  $M$  éléments spectraux permet avec les mêmes conditions techniques d'améliorer le Rapport signal/bruit (S/B) d'un facteur  $M^{1/2}$ .*

*L'avantage de Jacquinot est associé à l'utilisation d'un trou circulaire à la place d'une fente qui permet d'améliorer également le rapport S/B.*

*L'avantage de Connes décrit une meilleure sensibilité et reproductibilité de la calibration et donc au niveau des longueurs d'onde mesurées.*

La première étape nécessaire est la mesure du spectre dit de référence, avant de passer à la mesure sur l'échantillon (Fig.27). Ce spectre va contenir toutes les interventions extérieures à l'échantillon mesurer et sera soustrait à tous les spectres. Comme présenté sur la figure 27 on remarque que la grande partie du signal de la référence provient de la vapeur d'eau et du CO<sub>2</sub> atmosphérique.

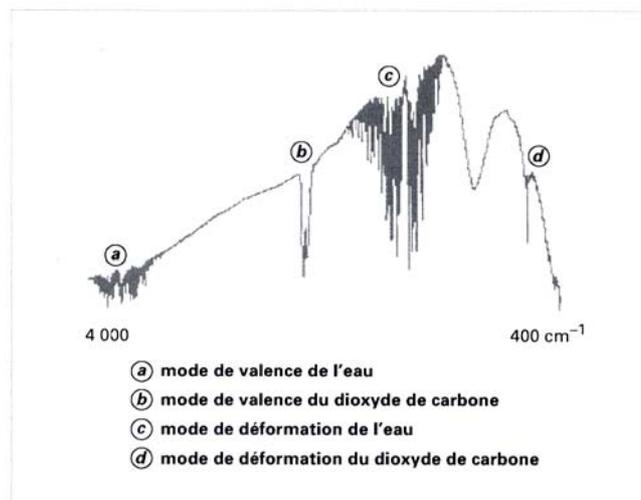


Figure 27: Spectre de référence en spectroscopie infrarouge

- Pour le FPA (64x64), dans un premier temps un interférogramme de référence est calculé sur chaque pixel du détecteur et le signal correspondant est calculé par transformé de Fourier. Dans un deuxième temps un interférogramme est également mesuré sur l'échantillon pour chaque pixel du détecteur et converti en signal. Dans l'étape finale, une opération mathématique simple permet de faire la différence entre les deux signaux et d'obtenir les spectres correspondant aux 4096 pixels.

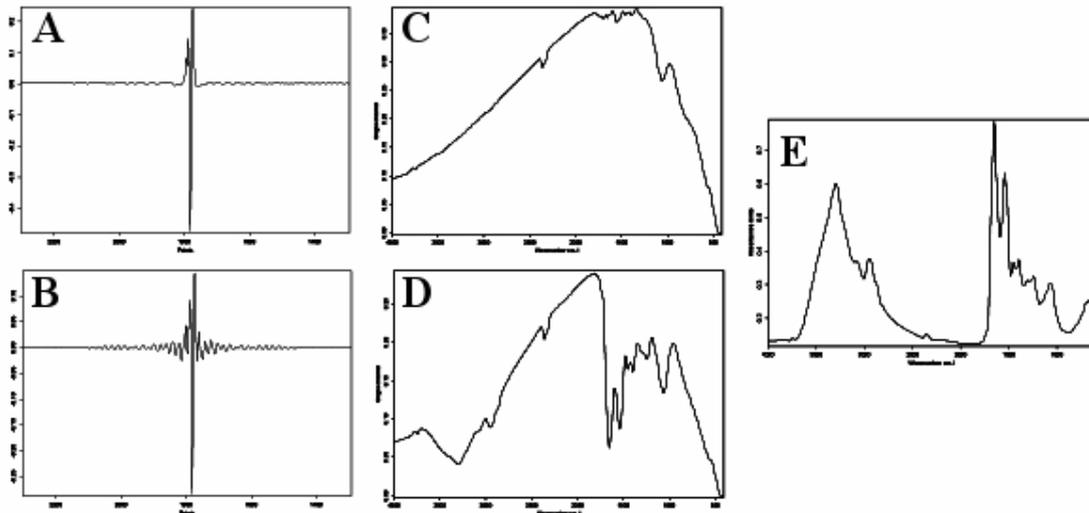


Figure 28: Obtention du spectre en spectroscopie infrarouge

A : interférogrammes de référence ; B : interférogramme échantillon ; C : spectre simple faisceau de référence ; D : spectre simple faisceau échantillon ; E : spectre résultant exprimé en absorbance.

- Dans le cas du monodétecteur, il est d'abord possible par un système de cache de modifier la taille de la zone d'acquisition. En effet les monodétecteurs peuvent avoir des tailles allant jusque  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ , étant donnée que des structures de plus petite taille sont présentes dans les échantillons biologiques, il est important de pouvoir réduire cette zone d'acquisition. Lorsque la zone d'acquisition est sélectionnée, la première étape est également de mesurer une référence, puis de calculer le spectre (Fig.28). Une fois le calcul terminé, le spectre est obtenu et le dispositif bouge jusqu'à la deuxième position de l'échantillon. Cette technique d'acquisition s'appelle le step-scan ou encore la mesure en point par point. Le temps nécessaire à ce dispositif pour réaliser l'acquisition d'une zone de taille équivalente à celle d'un FPA sera donc beaucoup plus élevé.

## VI.2 La spectroscopie vibrationnelle de diffusion Raman

L'effet Raman fut découvert simultanément en 1928 par Raman et Krishnan lors de l'étude de la diffusion de la lumière par les liquides et par Landsberg et Mandelstam lors de travaux sur les solides. Raman fut récompensé par le prix Nobel en 1930. Cet effet consiste en l'existence d'un spectre décalé en fréquence dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique (Fig.29).

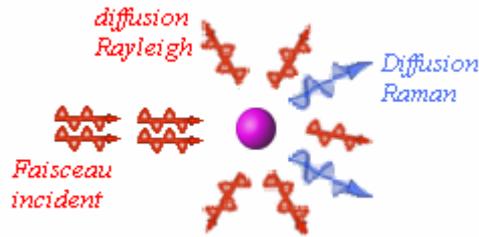


Figure 29: La diffusion Raman

Le spectre Raman comme en spectroscopie infrarouge permet l'observation de états vibrationnels d'une molécule. Quand la fréquence de l'onde électromagnétique est loin de toutes les fréquences de vibration moléculaire, nous sommes face au phénomène de diffusion lié à la polarisabilité de la molécule (Fig.30). Cette dernière traduit l'efficacité de l'interaction entre le dipôle électrique (E) et le nuage électronique. E produisant une oscillation, le noyau est attiré vers le pôle négatif de E et les électrons vers le pôle positif.

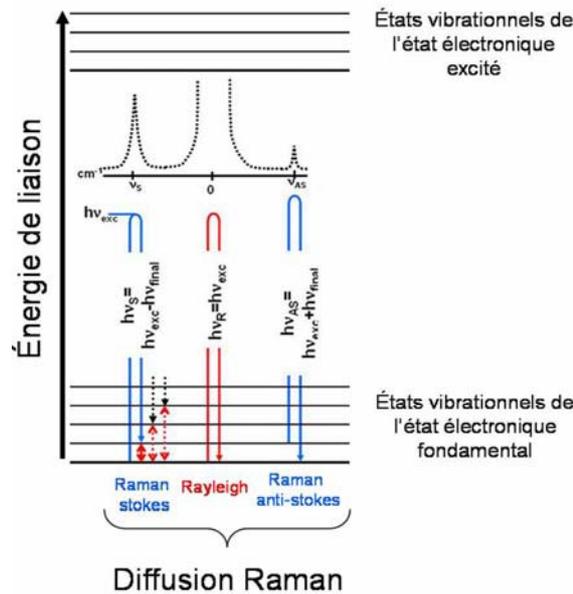


Figure 30: Diagramme de Jablonski, principe de la diffusion Raman

Lors de l'interaction entre une source monochromatique et un échantillon, la lumière diffusée peut présenter des changements de longueur d'onde, C'est l'effet Raman. Ainsi l'interaction de la lumière caractérisée par un photon d'énergie  $h\nu$  et une molécule se trouvant dans un état donné peut engendrer différents phénomènes (Fig.31).

Si  $v = v_v$ , la transition la plus probable est le passage d'un niveau  $v \rightarrow v+1$  ce qui correspond au phénomène d'absorption comme en spectroscopie infrarouge.

Si  $\nu$  est très grand par rapport à toutes les  $\nu_v$ , le phénomène le plus probable sera la diffusion.

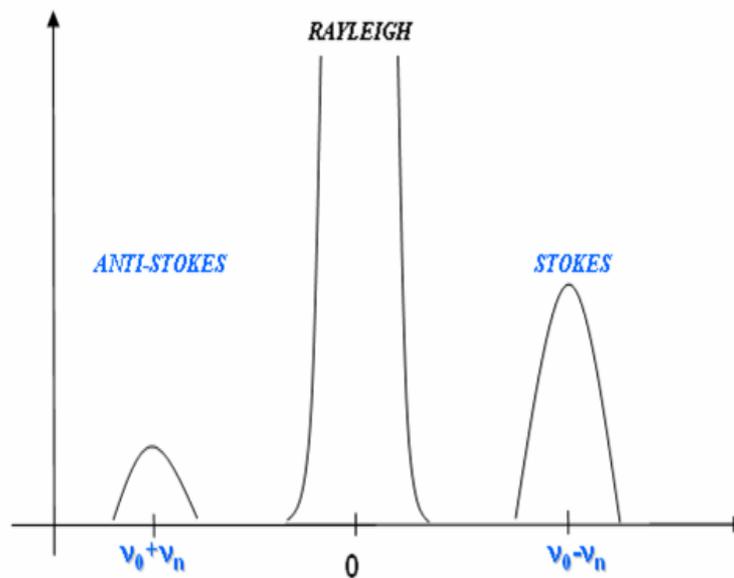


Figure 31: Les différents types de diffusion Raman

Lors de l'interaction des photons d'une source monochromatique avec les molécules d'un échantillon, 1 sur 10000 photons sera diffusés élastiquement par ces molécules (sans changement d'énergie); on appelle cette diffusion: la diffusion Rayleigh.

Occasionnellement 1 photon sera diffusé inélastiquement (1 sur 100000000) avec une légère variation de son énergie, ce qui correspond à la diffusion Raman. Plusieurs phénomènes sont présents :

- une onde diffusée à la même fréquence  $\nu_0$  que l'onde électromagnétique incidente, c'est la **diffusion Rayleigh** ou diffusion élastique car il y a conservation de l'énergie,
- deux diffusions inélastiques aux fréquences  $\nu_0+\nu_v$  et  $\nu_0-\nu_v$ . correspondant au couplage des deux fréquences. Ce sont ces deux diffusions inélastiques que l'on appelle diffusions Raman, **Stokes** ( $\nu_0-\nu_v$ ) et **anti-Stokes** ( $\nu_0+\nu_v$ ).

### VI.3 Modes de vibrations des molécules

Une molécule diatomique ne présente qu'un seul mode de vibration qui est l'élongation de la liaison. Le modèle le plus simple de cette élongation est un ressort qui s'apparente à une oscillation harmonique. Ce mode se caractérise par un nombre d'onde, directement dépendant des masses  $m$  et  $M$  des atomes et de la constante de raideur de la liaison  $k$ .

$$v_0 = [1/2\pi(k/\mu)]^{1/2}$$

Avec  $\mu = mM/(m+M)$ , masse réduite de l'oscillateur reliant entre elles deux masses  $m$  et  $M$

Pour les molécules polyatomiques, plusieurs modes de vibrations existent : l'élongation des liaisons, la déformation des angles et les déformations « hors du plan ». Chacun des ces modes, appelés mode normal de vibration, se comporte comme un oscillateur harmonique. A chaque mode de vibration normal est associé un nombre d'onde.

Une molécule avec  $N$  atomes présente  $3N$  degrés de liberté, 3 sont associées aux mouvements de translation de la molécule dans son ensemble (le long des 3 axes  $x,y,z$ ) et 3 autres pour les rotations autour de chacun des axes. Finalement les vibrations internes d'une molécule seront déterminées par les  $3N-6$  coordonnées restantes ( $3N-5$  si la molécule est linéaire) (Fig.32).

Les fréquences de vibrations dépendent des masses des atomes et des forces de liaisons. Deux groupes de vibrations se distinguent:

- Les vibrations de valence ou élongation (symétrique ou asymétrique), qui présentent des modifications des longueurs de liaisons sans changement des angles.
- Les vibrations de déformation, qui inversement, présentent des liaisons de même longueur mais une variation des angles intramoléculaires.

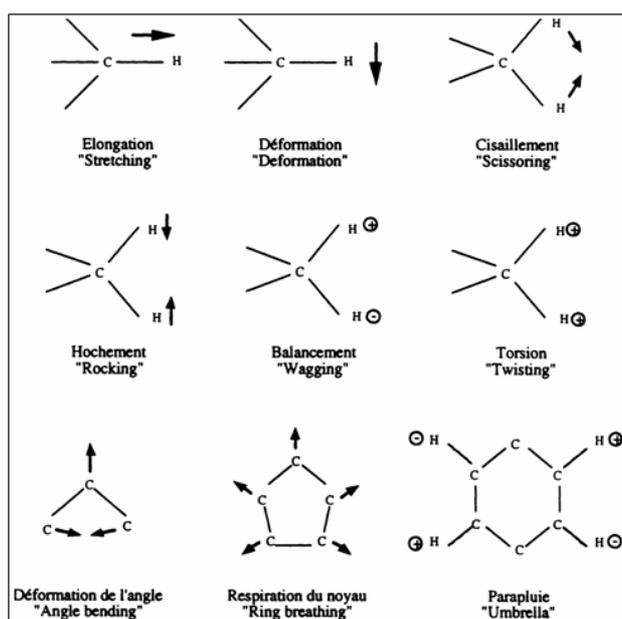


Figure 32: Modes de vibrations moléculaires

#### VI.4 Complémentarité entre la spectroscopie infrarouge et Raman

Les techniques sont complémentaires, puisque d'après le diagramme de Jablonski, le passage d'un état stable à un état excité pendant l'absorption infrarouge correspond à la différence d'énergie en diffusion Raman ce qui explique que les modes de vibrations soient localisés à la même fréquence. Cependant toutes les vibrations ne sont pas actives en Raman et infrarouge.

Les spectres infrarouge et Raman permettent la caractérisation des modes de vibrations mais elle se base sur des règles de sélection différente.

Pour qu'il y ai absorption infrarouge, il est nécessaire que le mouvement de vibration considéré induise une variation du moment dipolaire. En d'autres termes, un mode de vibration selon une coordonnée normale  $Q$  est actif si la dérivée du moment dipolaire  $(\partial\mu/\partial Q)_0$  est non nulle.

Pour qu'il y ai diffusion Raman il est nécessaire que le mouvement de vibration étudié entraîne une variation de la polarisabilité moléculaire, donc un mode de vibration selon une coordonnée normale  $Q$  est actif si la dérivée de la polarisabilité  $(\partial\alpha/\partial Q)_0$  est non nulle.

Les deux types de spectroscopies révèlent des niveaux énergétiques de vibration par des mécanismes différents et apportent souvent des informations complémentaires.

De manière schématique :

- Les liaisons polaires possèdent de forts moments dipolaires et présenteront donc une forte absorption infrarouge.
- Les liaisons covalentes sont elles plus polarisables et donneront par conséquent un spectre Raman significatif.

Cela explique le choix des solvants pour les études spectroscopiques. Ainsi l'eau ne pourra pas être utilisée en infrarouge car elle présentent une trop forte absorption. Par contre l'étude des solutions aqueuses en spectroscopie Raman sera possible car l'eau ne présente qu'un signal faible formé de très peu de raies. L'exemple caractéristique est la molécule diatomique  $N_2$  qui ne possède pas de moment dipolaire et est donc inactive en infrarouge alors qu'en Raman une raie est observée à  $2331\text{ cm}^{-1}$ . Pour les molécules polyatomiques, l'analyse des

modes actifs en infrarouge ou Raman est plus délicat et repose sur des considérations de symétrie précises. (Théorie des groupes)

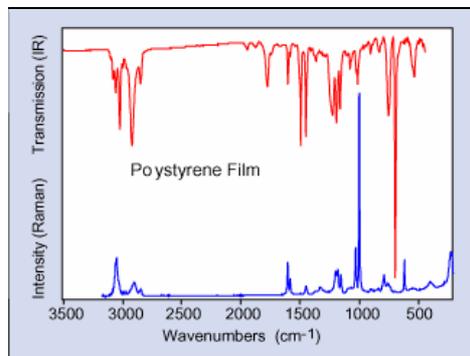


Figure 33: Spectres Raman et infrarouge sur un film de polystyrène

La figure 33 présente les spectres Raman et infrarouge (en transmission) obtenus sur un film de polystyrène. Il apparaît clairement la complémentarité des techniques puisque, associée à une forte intensité en Raman, nous voyons correspondre une forte absorption infrarouge.

Une règle d'exclusion existe spécifiant que si une molécule présente un centre de symétrie alors aucun de ces modes de vibrations ne sera actif à la fois en Raman et en infrarouge (Fig.34).

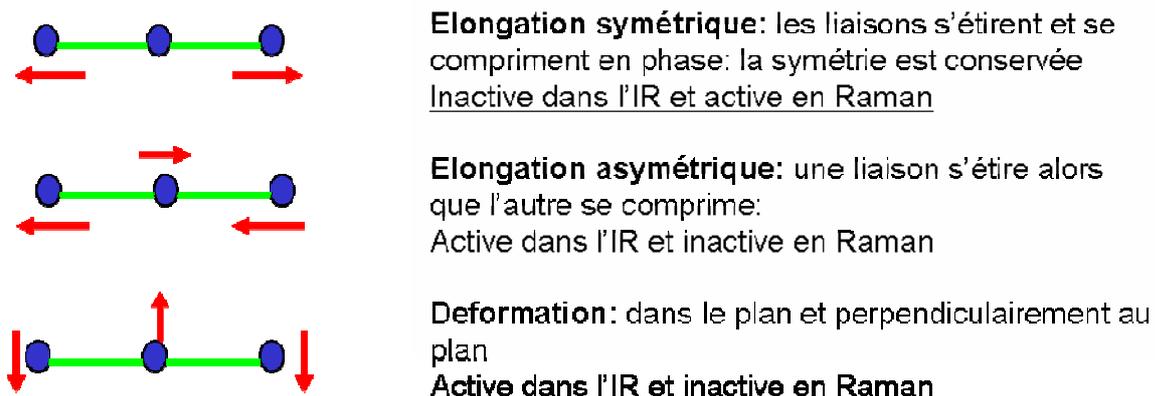


Figure 34: Modes de vibrations du CO<sub>2</sub>

## VI.5 Pics et Attributions en spectroscopies Raman et infrarouge

### VI.5.1 En spectroscopie infrarouge

#### *a. Notion de fréquence de groupe*

Pour les petites molécules (par exemple diatomique), la différence d'énergie entre deux niveaux vibrationnels adjacents est constante et toutes les transitions possibles se font à la même fréquence, ce qui se caractérise par la présence d'un pic unique sur le spectre.

Pour les molécules plus grandes, le nombre de vibration normal est plus grand et en théorie chaque atome vibre à la même fréquence. Cependant expérimentalement, il apparaît que par exemple le groupement C-H ne vibre pas à la même fréquence en fonction du radical R. Ainsi la forme R-CH présente une fréquence vibration à  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $R_2\text{-CH}$  à  $3620\text{ cm}^{-1}$  ou encore  $R_3\text{-CH}$  à  $2960\text{ cm}^{-1}$ . S'il est vrai que pour un mode normal de vibration tous les atomes vibrent à la même fréquence, les amplitudes des oscillations sont différentes ce qui permet de caractériser les groupements chimiques.

#### *b. Région des vibrations de valence des principaux groupes fonctionnels*

Entre  $1\ 550\text{ cm}^{-1}$  et  $4\ 000\text{ cm}^{-1}$ , on trouve une zone peu encombrée et présentant des raies intenses caractéristiques des principaux groupes fonctionnels (Table.1).

Vibration de valence des liaisons A-H : Les liaisons, présentent leurs élongations entre  $2\ 700$  et  $3\ 500\text{ cm}^{-1}$ , exceptionnellement de  $2\ 500$  à  $3\ 700\text{ cm}^{-1}$ . Nous verrons en détail l'influence de la structure sur la position de ces bandes, en particulier les groupes OH présentant une liaison hydrogène avec un autre oxygène dans une structure du type mésomère très symétrique. Lorsque la distance O...O dans le cristal devient inférieure à  $2,5\text{ \AA}$  ( $0,25\text{ nm}$ ), on peut observer des fréquences inférieures à  $1\ 000\text{ cm}^{-1}$ .

Vibration de valence des liaisons  $A \equiv B$  : Vient ensuite la région des liaisons triples dont les vibrations de valence varient de  $2\ 100$  à  $2\ 250\text{ cm}^{-1}$ , plus exceptionnellement de  $1\ 800$  à  $2\ 500\text{ cm}^{-1}$ . C'est donc la région des nitriles, des acétyléniques, des métaux carbonyles.

Tableau 1: Fréquences des différents groupes de valence

Nombre d'ondes (cm <sup>-1</sup> )	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≡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 <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> , 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

Vibration de valence des liaisons A=B : On trouve ensuite la région des liaisons doubles dont les fréquences varient de 1 600 à 1 850 cm<sup>-1</sup>, exceptionnellement à 2 300 cm<sup>-1</sup>. La région est donc précieuse pour l'étude des composés éthyléniques, des fonctions carbonylées, des dérivés imines et analogues.

La chance de l'infrarouge est que, sauf exceptions (harmoniques, combinaisons de bandes peu intenses), ces régions sont dégagées et généralement exemptes de tout autre signal. Toutefois, la dernière région est limitrophe de la zone de vibrations de valence des liaisons des cycles aromatiques (environ 1 400 à 1 620 cm<sup>-1</sup>).

Empreinte : Au-dessous de 1 500 cm<sup>-1</sup>, on trouve, pêle-mêle, les vibrations de valence des liaisons simples ( $\nu_{C-C}$ ,  $\nu_{C-O}$ ,...), les vibrations des déformations de groupes de plus de deux atomes (cisaillement des CH<sub>2</sub>, déformations des CH<sub>3</sub>...), des déformations planes des éthyléniques ou aromatiques...L'analyse devient beaucoup plus délicate : c'est pourtant dans cette région que l'on peut et doit recueillir les renseignements les plus précieux sur certains détails de structure. Mais les chimistes tirent profit de cette complexité à des fins d'identification car elle constitue « l'empreinte digitale » du produit.

Zone « dite des aromatiques » : Une troisième zone (au-dessous de  $1\ 000\text{ cm}^{-1}$  et jusque vers  $600\text{ cm}^{-1}$ ), quelquefois appelée « zone des aromatiques », est intéressante à examiner car souvent peu encombrée et contenant des raies intenses. On y trouve en particulier les raies des déformations gauches des aromatiques et éthyléniques. Ces raies peuvent être précieuses pour préciser le nombre et la position relative des hydrogènes. Mais on y trouve aussi la déformation des acétyléniques ainsi que les élongations des liaisons (D'ailleurs, les solvants chlorés sont habituellement opaques dans cette région).

Pour l'étude des tissus aortiques par spectroscopie infrarouge les zones les plus analysées sont la région dite d'empreinte de  $1000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  mais également les bandes amide I et II de  $1500\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ . Ces zones sont denses en information et, concernant l'étude de tissus biologiques, sont la somme de nombreuses contributions des différents éléments présents dans l'échantillon. Ainsi le tableau.2 présente quelques exemples des principales contributions au niveau des bandes observées dans le tissu aortique (Gentner 1998; Colley 2004).

Tableau 2: Exemples de pics identifiés sur le tissu aortique normal

Tissu aortique normal Position des pics (en $\text{cm}^{-1}$ )	Attribution des bandes
1653	Amide I
1542	Amide II
1451	Déformation des $\text{CH}_2$
1403	Elongation des C-H du collagène et des protéines
1342	Mouvement des $\text{CH}_2$ des chaînes latérales de proline du collagène
1238	Amide III
1205	Contribution du collagène
1163	Elongation des C-O des protéines et du glycogène
1080	Elongation des C-O des fonctions CHO du collagène
1030	Elongation des C-O du groupement CH-O du collagène et du glycogène

## VI.5.2 En spectroscopie Raman

Tableau 3: Principales attributions du spectre Raman

Nombre d'onde en $\text{cm}^{-1}$	Attributions Raman
619	Cycle de la Phénylalanine
642	Cycle de la Tyrosine et $\nu$ C-S
671	$\nu$ C-S Cystéine
699	$\nu$ C-S Cystéine
722	Phospholipides et $\nu$ C-S Cystine
746	Cycle aromatique "puckering"
758	Tryptophane et $\nu$ 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	$\nu$ CH <sub>3</sub> , $\gamma_w$ CH <sub>2</sub> ; $\rho$ CH <sub>2</sub> Polypeptides
935	$\rho$ CH <sub>3</sub> terminal, $\nu$ CC hélice $\alpha$ Phospholipides
957	$\nu$ P-O ADN et $\nu$ C-C (hélice $\alpha$ et aléatoire) Cholestérol, $\delta$ CCH oléfinique
987	$\nu$ P-O-C phospholipides
1003	Respiration sym. du cycle de Phénylalanine et Tryptophane
1032	C-H de Phénylalanine
1045	$\nu$ C-C, $\nu$ C-O, $\nu$ S-O
1062	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i> et $\nu$ C-O ADN
1086	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche
1102	Lipides : chaîne hydrocarbonée gauche
1127	Lipides : chaîne hydrocarbonée <i>trans</i>
1157	$\nu$ C-C, $\rho$ CH <sub>3</sub> , C-C vibration du squelette
1175	CH Tyrosine, Phénylalanine et $\nu$ sym C-O-C Lipides
1207	$\nu$ C-C <sub>6</sub> -H <sub>5</sub> , Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine
1250	Amide III random coil
1284	Amide III hélice $\alpha$
1296	Amide III, CH <sub>2</sub> phospholipides
1319	C=C, Guanine, $\delta$ CH protéines
1339	$\nu$ C-C, CH bend et Phe, Tryptophane, Adénine, Guanine
1382	CH <sub>3</sub> bend, $\delta$ CH <sub>3</sub>
1443	$\delta$ CH protéines et lipides
1555	Tryptophane
1651	Amide I

$\nu$  : élongation ;  $\gamma_w$  : balancement ;  $\delta$  : déformation ;  $\rho$  : hochement (rocking)

Le spectre Raman présente une information plus diffuse et des pics assez bien individualisés caractéristiques des liaisons moléculaires fréquemment rencontrées dans les tissus biologiques. Le recouplement des nombreuses études sur les échantillons d'origine biologique

permet d'identifier les principales attributions présentes au sein des spectres Raman. (Debelle 1995; Hata 2000; Buschman 2001; Huang 2003) Suivant les types d'échantillons analysés certains constituants changent mais globalement la composition des tissus biologiques reste relativement constante et la majorité de ces constituants sont identifiés de manière récurrente. En recoupant les différentes études réalisées, il est possible de dresser un inventaire (tableau.3) regroupant les principales attributions retrouvées dans les échantillons biologiques.

## **VII) Les différentes applications des spectroscopies vibrationnelles infrarouge et Raman dans le domaine médical**

La sensibilité et la spécificité des spectroscopies les mettent en avant dans de nombreux domaines d'application. Elles peuvent très souvent apporter des informations utiles au diagnostic de certaines pathologies. Ce fort potentiel associé à la reproductibilité et la rapidité des acquisitions font des spectroscopies des instruments d'investigation puissants dans les domaines biologique et médical. En effet, de faibles variations dans la composition biochimique des échantillons permettent d'identifier de manière précise différentes populations cellulaires ou tissulaires. Au sein même de l'unité MÉDIAN, les spectroscopies vibrationnelles ont été utilisées dans un grand nombre de domaines en lien direct avec le médical.

En 2007, Toubas et al. ont rapporté une étude mettant en avant le potentiel de la spectroscopie infrarouge dans le typage des souches de *Candida*. Sachant que la culture de ce champignon est très lente mais que l'infection peut être rapidement grave, voire dans certains cas associée à de faibles chances de survie, un test diagnostique rapide et fiable est nécessaire afin d'entreprendre un traitement adapté dans les plus brefs délais (Toubas 2007).

Les techniques mises en œuvre pour comprendre la pathologie tumorale sont multiples et là encore la spectroscopie trouve sa place. En effet, une étude combinant les spectroscopies Raman et infrarouge a permis d'identifier des cellules de type MDR (« multidrug resistant ») dans des lignées cellulaires cancéreuses. Cette approche peut apporter une aide précieuse en identifiant rapidement chez un patient d'éventuelles résistances permettant ainsi d'adapter au mieux le traitement.

D'autre part, de nombreuses autres études basées sur l'analyse de tissus se mettent actuellement en place. Amharref et al. ont montré en 2006 une approche permettant la

caractérisation d'un modèle de gliome cérébral chez le rat. Cette approche *in vitro*, sur un modèle animal tel que le rat, a pour ambition d'être transposée chez l'homme, permettant ainsi d'identifier une zone cancéreuse au sein d'un tissu cérébral sain par la caractérisation de marqueurs spécifiques présents dans la zone pathologique (Amharref 2006).

Récemment, deux nouvelles études basées sur l'analyse de tissus cancéreux humains ont mis en évidence toute la puissance des spectroscopies dans l'identification de ce type de tissus et prouve la faisabilité de telles investigations en apportant des informations utiles au médecin (Krishna 2006).

Nous avons aussi étudié l'intérêt de la spectroscopie appliquée au tissu cutané dans deux domaines bien distincts : l'administration d'un médicament transcutané et l'application d'un produit cosmétique (Chrit 2007; Tfayli 2007). Dans ces deux domaines, la spectroscopie Raman s'est illustrée de part ses capacités à être utilisée *in vivo*, principalement en raison du développement d'une sonde miniaturisée.

CHAPITRE I : ANALYSE DES  
CHANGEMENTS STRUCTURAUX DANS  
LES TISSUS AORTIQUES HUMAINS  
NORMAUX ET ANÉVRISMAUX PAR  
MICROSPECTROSCOPIE IRTF

## **D) Les échantillons tissulaires d'aorte ascendante humaine**

### **I.1 Réalisation de la banque de tissus**

La collecte et la conservation des fragments de tissus aortiques a été réalisée grâce à la collaboration du service d'anatomopathologie du CHU Robert Debré de Reims dirigé par le professeur Pluot.

Deux origines distinctes sont à l'origine des différents tissus analysés :

- Les tissus formant le groupe des échantillons normaux proviennent de coeurs explantés de patients en état de mort cérébrale. Ces coeurs étaient adressés au service de chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire de l'hôpital de Reims pour prélèvements des valves aortiques et/ou mitrales (allogreffes). Simultanément, un anneau d'environ 1 cm de l'aorte ascendante était prélevé pour l'étude.

- Concernant les tissus anévrysmaux (pathologiques), le prélèvement était effectué pendant un geste de remplacement chirurgical d'une aorte ascendante anévrysmale.

Les échantillons étaient alors découpés en bandelette de 5x20 mm et stockés dans des tubes permettant leur cryocongélation à -80°C et leur conservation pendant de longues périodes sans altération des structures tissulaires (Fig.35). Ce procédé rapide de congélation permet de ne pas altérer les cellules alors que la formation de cristaux de glace est la règle pendant les processus lents de congélation compris entre -5 et -20°C.



Figure 35: Photographie d'une bandelette de tissu aortique avant la réalisation des cryosections

## I.2 Réalisation des cryosections de tissu aortique

La spectroscopie infrarouge se base sur le principe de l'absorption du rayonnement incident ce qui implique une limitation liée à l'épaisseur des échantillons analysés. Il est nécessaire que le rayonnement puisse passer au travers de la coupe tissulaire mais sans dépasser le seuil d'absorbance limite rendant inapplicable la loi de Beer-Lambert. Pour autant des coupes trop fines ne permettent pas la conservation des structures tissulaires présentes dans la paroi aortique. Dans un premier temps, des coupes de 7  $\mu\text{m}$  ont été réalisées pour l'étude spectroscopique infrarouge.

Un microtome réfrigéré à  $-25^{\circ}\text{C}$  a été utilisé pour la réalisation des coupes tissulaires. Les fragments d'aorte sont fixés sur le dispositif à l'aide d'OCT, colle biologique durcissant à faible température. Une fois fixée, la cryosection est réalisée et déposée sur le support d'analyse par simple contact, la différence de température étant suffisante à l'adhésion de la coupe aortique sur la pastille de ZnSe (Fig.36). Considérant des fragments d'aorte de près de 5 mm de large et la faible épaisseur des cryosections, il n'est pas possible de couper le tissu et l'OCT sur la même cryosection évitant toute confusion dans l'interprétation des données.

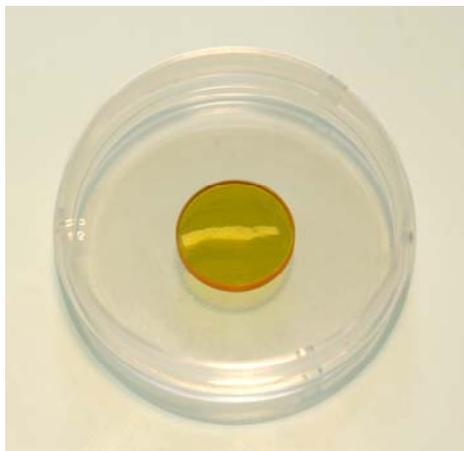


Figure 36: Photographie d'une cryosection sur un support de ZnSe

Le choix du support est aussi en adéquation avec la technique utilisée puisque qu'il est nécessaire qu'il ne présente pas de signal interférent avec celui de l'échantillon. Une lame de verre classique ne peut donc pas être utilisée puisque elle présente une absorption propre en spectroscopie infrarouge. Par contre, le ZnSe est caractérisé par sa faible absorbance en

spectroscopie infrarouge et offre une gamme de fréquences suffisamment large pour permettre une analyse optimale des données spectrales.

## **II) Le spectromètre infrarouge Equinox 55 associé au microscope IRscope II (Bruker optics, Germany)**

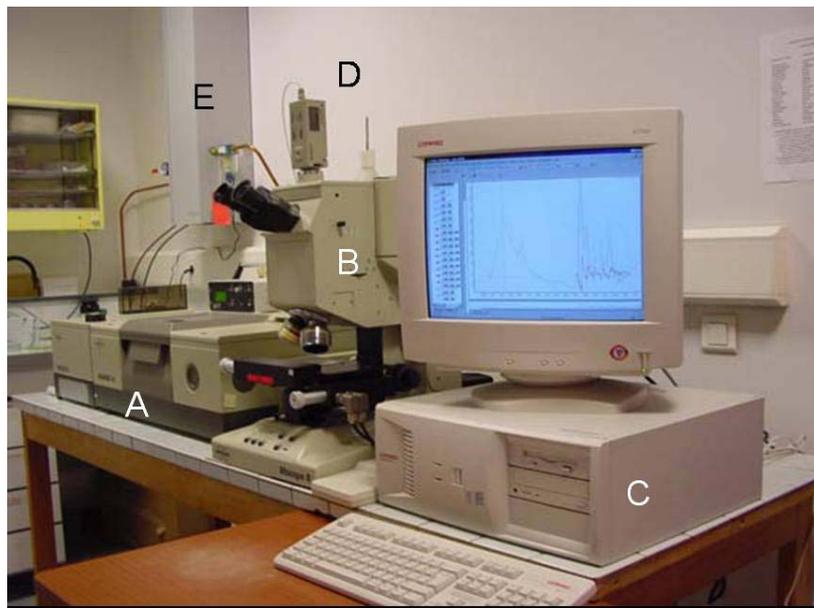


Figure 37: Vue d'ensemble du dispositif infrarouge Equinox 55

Comme représenté sur la figure 37, le spectromètre est formé de différents sous-ensembles:

A : Le spectromètre Equinox 55 : Il contient la source de type globar, d'un interféromètre de type Rocksolid<sup>TM</sup> à miroir cubique, d'une séparatrice en KBr isolée de l'atmosphère et d'un laser Hélium-Néon (Il contient également un compartiment purgé pour les mesures en mode macro, ainsi qu'un système de roue pour les mesures multiples).

B : L'IRscope II : Il s'agit d'un microscope IRTF permettant les mesures de type microscopique grâce à ses deux objectifs infrarouges (x15 et x36). L'association de ces différents objectifs à un système de trou circulaire permet de sélectionner la taille du spot utilisé pour l'acquisition sur l'échantillon en limitant le diamètre du faisceau infrarouge incident (tableau.4). Seule la source est commune avec le spectromètre puisque que l'IRscope possède son propre détecteur, de type MCT, qui nécessite un refroidissement à l'azote liquide

pour l'obtention d'un signal optimum. L'autonomie de travail est d'environ 5 à 6 heures après refroidissement.

L'échantillon est alors disposé sur la platine motorisée du microscope qui permet un déplacement en XY contrôlé par l'ordinateur. Ceci permet un repérage précis des coordonnées de la zone d'acquisition tant sur l'image visible que sur les données infrarouges.

Tableau 4: Taille de la zone analysée en fonction de l'objectif et de l'ouverture

Ouverture (mm)	Zone étudiée avec l'objectif x15 ( $\mu\text{m}$ )	Zone étudiée avec l'objectif x36 ( $\mu\text{m}$ )
3,75	104	250
3	83	200
2,5	69	166
2,1	58	140
1,8	50	120
1,5	42	100
1,2	33	80
0,9	25	60
0,75	21	50
0,6	16,7	40
0,45	12,5	30
0,3	8,3	20

C : L'ordinateur permet à la fois le stockage des images visibles et également de l'ensemble des spectres obtenus sur les différents échantillons.

D : La camera CDD : placée en haut du microscope, elle permet de visualiser l'image sur le moniteur de l'ordinateur et d'enregistrer les différentes zones de travail repérées visuellement grâce aux deux oculaires du microscope.

E : Le système de purge

Ce type de spectromètre permet de travailler en mode point par point et de réaliser une cartographie du tissu aortique. Afin d'optimiser le rapport signal sur bruit, nous avons utilisé l'objectif x15 avec une ouverture du trou circulaire de 0.45 mm ce qui donne un spot infrarouge utile d'environ 30  $\mu\text{m}$ . En dessous de cette valeur, le rapport S/B diminue de

manière importante ne permettant pas l'obtention de données exploitables pour un temps d'acquisition acceptable.

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  $\mu\text{m}$  de haut pour 150  $\mu\text{m}$  de large
- le domaine spectral analysé : 600-4000  $\text{cm}^{-1}$
- la résolution spectrale : 4  $\text{cm}^{-1}$
- 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 $\mu\text{m}$  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.

## II.1 Pré-Traitement des données spectrales IRTF

### II.1.1 La fonction de lissage

Le temps d'acquisition des spectres n'étant pas infini, il faut souvent faire un choix entre la qualité des spectres et la taille de la zone de travail. Il est donc habituel de devoir réaliser un prétraitement débutant par un lissage afin de réduire le bruit induit par la mesure. Il est important de trouver un équilibre entre l'importance du lissage et la qualité du spectre final puisqu'un lissage trop important engendrera la perte inéluctable d'informations spectrales et que le manque de lissage rendra le traitement des données difficile. En fait, en poussant à l'extrême cette fonction, le spectre final ne serait plus qu'une droite! Pour ne pas trop altérer les données spectrales, nous nous sommes fixés comme limite un lissage Savitsky-Golay de 9 points.

### II.1.2 La correction de la ligne de base

L'interaction lumière-matière ne produit pas qu'un phénomène d'absorption infrarouge mais est aussi accompagnée de phénomène physique de diffusion, d'aberrations chromatiques ou encore de diffraction en relation avec les changements d'épaisseur de l'échantillon. Suivant la longueur d'onde, la déviation du spectre est plus ou moins importante et est d'autant plus importante que les nombres d'ondes sont élevés. Cela se traduit donc par une inclinaison anormale du spectre qu'il est nécessaire de corriger afin de rendre possible l'observation et la comparaison des spectres. Cette correction peut être automatique ou manuelle et correspond à la détermination des minima à appliquer au spectre. Une fois définie, une soustraction point par point est réalisée pour ramener les minima à zéro et ainsi reconstruire la ligne de base du spectre.

### II.1.3 La normalisation

La différence de longueur de trajet optique en différents points de l'échantillon, ou encore l'état de surface de ce dernier fait varier la quantité de matière interagissant avec le faisceau et donc l'intensité du signal arrivant sur le détecteur. Pour compenser ces différences, il est possible de normaliser le spectre. Cette normalisation vectorielle calcule l'aire entre deux bornes définies par l'opérateur et ramène chaque spectre à la même surface sous la courbe les rendant alors comparables. Ce procédé élimine donc l'information quantitative brute puisque l'échelle de chaque spectre est modifiée. Pourtant, cette opération conserve les proportions relatives entre chaque bande d'un même spectre permettant alors le calcul de rapport de bande influencé par la prépondérance d'un composé par rapport à un autre.

### II.1.4 La dérivée seconde

Les fonctions de dérivation du spectre sont présentes dans tous les logiciels de traitement de données et sont utilisées afin d'obtenir une information plus pointue sur les bandes du spectre (Fig.38). La dérivée première permet d'éliminer les offset de la ligne de base tandis que la dérivée seconde corrige les effets de pente présents dans le spectre. En général, la dérivée seconde est la plus utilisée puisque pour un maxima observé sur le spectre de départ on obtiendra un minima sur le spectre dérivé. Les spectres infrarouges présentent généralement des régions regroupant un nombre important de bandes se chevauchant entre elles et donc

difficilement dissociables. La dérivée seconde va aussi permettre d'identifier des pics beaucoup plus fins et de bien les individualiser, ce qui est très utile dans les zones complexes des spectres infrarouges.

- Le spectre doit cependant être de bonne qualité avec un bruit de fond faible pour ne pas obtenir un rapport signal/bruit trop mauvais sur la dérivée seconde et créer ainsi des pics aberrants.

- Il est admis que le calcul de la dérivée seconde permet d'augmenter la résolution spectrale d'un facteur 2.5 permettant alors d'obtenir une information beaucoup plus précise concernant la position des pics.

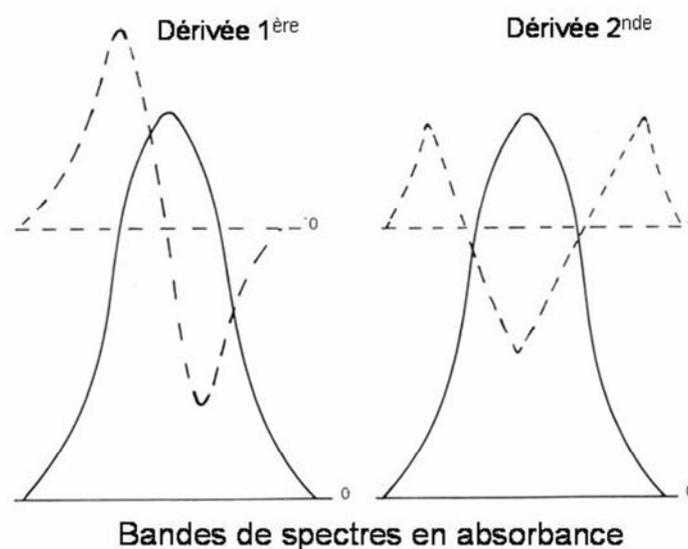


Figure 38: Représentation des dérivées première et seconde d'une bande d'un spectre en absorbance

### II.1.5 L'Analyse en cluster ou classification hiérarchique ascendante

Le logiciel Opus (Bruker) possède plusieurs outils d'analyse des données spectrales. La méthode statistique utilisée est l'analyse en cluster qui consiste en une classification hiérarchique des spectres en fonction de leur ressemblance. Le logiciel Opus propose un mode de calcul standard des distances basé sur la distance euclidienne  $d$  entre les différents objets  $x$  et  $y$  en fonction de leur intensité  $i$ .

$$d = \sqrt{\sum i(x_i - y_i)^2}$$

Il existe aussi un mode approfondi nommé « normalisation à la première gamme ». Ici, 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 :

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

L'hétérogénéité est obtenue par la relation suivante :

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

Cette méthode regroupe les résultats les plus semblables au sein d'une même branche tandis que ceux présentant les différences les plus importantes sont placés sur des branches éloignées. Le résultat final est présenté sous forme d'un dendrogramme ou d'une arborescence. Il est possible de sélectionner les zones spectrales utilisées pour l'analyse en choisissant les plus discriminantes afin d'optimiser la classification.

### **III) Objectifs de l'analyse structurale de l'aorte humaine ascendante par IRTF**

L'application de la spectroscopie IRTF à l'analyse des tissus aortiques humains est une approche inédite et totalement innovante. La grande force de cette technique est de donner une information corrélée à la composition biochimique de l'échantillon sans nécessiter de fixer ou de colorer le tissu. Notre but premier lors de cette analyse a été de visualiser les modifications de la matrice extracellulaire au cours des dilatations aortiques.

Les objectifs de cette étude sont multiples :

- La caractérisation du tissu aortique par spectroscopie IRTF : lors de cette première approche, nous avons décrit et observé les spectres obtenus afin d'identifier les zones les plus informatives. Nous avons comparé les spectres acquis à partir du tissu à ceux obtenus en utilisant des produits purs. Dans ce cas, nous avons utilisé du collagène et de l'élastine du fait de leur abondance dans la paroi aortique.

- L'application de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à l'étude des tissus aortiques humains a pour but de définir son potentiel dans le diagnostic des pathologies de l'aorte en identifiant des marqueurs spectroscopiques spécifiques. Ils correspondent à une zone plus ou moins large du spectre et peuvent être représentatifs d'un composé unique ou d'un ensemble modifié lors du développement de la pathologie. Dans le cas du tissu aortique, il est probable que les fluctuations observées sur le spectre IR soient corrélées à des processus de dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs. L'identification de tels marqueurs permettra donc de classer des tissus aortiques normaux et pathologiques de manière reproductible.

Le développement de plaques athéromateuses est l'étiologie principale d'évolution d'une aorte de diamètre normal vers un anévrisme. De nombreuses études portent donc logiquement sur ce type de pathologie dont les différents mécanismes sont maintenant clairement décrits (Ross 1976b; Ross 1976a; Reynolds 2001; Schmoker 2007). Pourtant l'utilisation de la spectroscopie infrarouge dans ce type de problématique est originale et novatrice. Des études ont été menées sur le tissu artériel humain (Gentner 1998) sur des aortes de rat (Colley 2004) ou encore de lapin (Wang 2007). Pourtant même dans le cas d'analyse sur le tissu humain, il s'agissait d'artère iliaque ne pouvant pas être réellement comparée avec l'aorte thoracique du

fait de grandes différences de composition entre les aortes de gros calibres et les artères des membres inférieurs. Les autres études chez l'animal se focalisaient essentiellement sur l'analyse de la plaque athéromateuse et non sur le tissu aortique lui-même.

Le caractère innovant de ces travaux réside dans l'application de la spectroscopie infrarouge pour l'étude de la matrice extracellulaire, axée de manière spécifique sur la média de la paroi aortique. La notion de base est simple, deux types d'échantillons sont possibles, certains avec un diamètre normal considérés comme tissu sain et d'autres avec une dilatation anévrysmale (diamètre supérieur à 50 mm) considérés comme pathologique. Aucune restriction n'a été considérée concernant la sélection des échantillons. Ces derniers englobent donc notamment les patients présentant un athérome plus ou moins développé. Bien que les causes d'un anévrisme soient variées, il est probable que l'altération retrouvée au sein des différents tissus anévrysmaux soit globalement identique et peut être assimilée à une dégradation des élastine et collagènes aortiques.

**Article n°1: Analysis of Structural**  
**Changes in Normal and Aneurysmal**  
**Human Aortic Tissues using FT-IR**  
**Microscopy**

# Analysis of Structural Changes in Normal and Aneurismal Human Aortic Tissues Using FTIR Microscopy

S. Rubin,<sup>1,2</sup> F. Bonnier,<sup>1</sup> C. Sandt,<sup>1</sup> L. Ventéo,<sup>3</sup> M. Pluot,<sup>3</sup> B. Baehrel,<sup>2</sup> M. Manfait,<sup>1</sup> G. D. Sockalingum<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France

<sup>2</sup> Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France

<sup>3</sup> Laboratoire Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France

Received 2 July 2007; revised 28 September 2007; accepted 1 November 2007

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bip.20882

## ABSTRACT:

Aortic aneurisms are frequently asymptomatic but can induce dramatic complications. The diagnosis is only based on the aortic diameter and not on a structural and compositional basis. In this preliminary study, we propose infrared microspectroscopy to nondestructively probe normal and aneurismal human aortas. Spectra from 19 human ascending aortic biopsies (10 normal and 9 aneurismal) were acquired using infrared microspectroscopy. A  $1500 \times 150 \mu\text{m}^2$  area of each  $7\text{-}\mu\text{m}$  thick cryosection was investigated using a  $30\text{-}\mu\text{m}$  spatial resolution with a total of about 200 spectra by sample. Spectral differences between normal and aneurismal tissues were mainly located in spectral regions related to proteins, such as elastin and collagen, and proteoglycans ( $1750\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$ ). Tissue heterogeneity and sample classification have been evaluated using hierarchical cluster analysis of individual or mean spectra and their second derivative. Using spectral range related to

proteins, 100% of good classification was obtained whereas the proteoglycan spectral range was less discriminant. This *in vitro* study demonstrates the potential of such technique to differentiate between normal and aneurismal aortas using selected spectral ranges. Future investigations will be focused on these specific spectral regions to determine the role of elastin and collagen in the discrimination of normal and pathological aortas. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 00: 000–000, 2007.

**Keywords:** FTIR microspectroscopy; aortic tissue; aneurysm; elastin; collagen

This article was originally published online as an accepted preprint. The "Published Online" date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at [biopolymers@wiley.com](mailto:biopolymers@wiley.com)

## INTRODUCTION

Cardiovascular diseases remain the main cause of morbidity and mortality worldwide. Aortic aneurysm is one such concern and is defined as a permanent dilatation of more than 150% of the original diameter of the aorta and ectasia as a dilatation under this threshold. Ectasia and aneurysms of the aorta are indeed important, but are underestimated health problems in western

Correspondence to: Ganesh D. Sockalingum; e-mail: [ganesh.sockalingum@univ-reims.fr](mailto:ganesh.sockalingum@univ-reims.fr)



© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

countries because they are frequently asymptomatic for a long time. The reported frequency of the abdominal aortic aneurysm is about 5–8% in American population after the age of 65,<sup>1</sup> and the incidence of the thoracic aortic aneurysm is estimated to 5.9 cases per 100,000 person-years in North America. In addition, related mortality and morbidity rates stay high,<sup>2,3</sup> despite some recent medical improvements essentially based on the development of visceral and neurological protections.<sup>4</sup>

Recent epidemiological observations have reported an increase of the incidence of all aortic aneurysms in the general population probably due to the rapid increase of life expectancy. In France, the actual increase of life expectancy is about 2 months every 2 years. As a consequence, all experts agree with the probable increase of the incidence of the aortic pathology, like aneurysm, in the near future. Indeed, the principal lesion involved in the aneurismal physiopathology is quite similar to the one found during aging of the aortic tissue and arterial hypertension.

To understand tissue alterations accompanying the advent of an aneurysm, it is important to define the normal structure of the aortic wall. The aorta is the largest artery of the human body and its wall is composed of three layers, the intima, the media, and the adventice, from the inner to the most external part, with different roles and compositions: The intima is a monocellular layer of endothelial cells connected to a basal membrane and an extracellular matrix, rich in collagen. It plays an important role in anticoagulation, vasoreactivity,<sup>5,6</sup> thrombosis,<sup>7</sup> inflammation,<sup>8</sup> or atheroma.<sup>9</sup> The media, limited by two vascular elastic laminae, is the most important part of the aortic wall representing more than 75% of the tissue thickness. It is composed of interconnected smooth muscle cells between multiple concentric layers of elastic fibers. The latter are mainly composed of a resistant and elastic network of elastin and collagen fibers associated with some other proteins and proteoglycans,<sup>10</sup> playing a major role but contributing for a minor part in the total weight of the ascending aortic tissue. Biochemical assay reveals that elastin composes more than a third of the dry weight of the ascending aortic tissue whereas the second-third is collagen. This is the principal difference between the ascending and the abdominal aortas, which contain less elastin but higher amounts of collagen and proteoglycans. These compositional differences are directly related to the hemodynamic stress: at the ascending aortic level, the most important aortic wall function is to absorb the systolic peak of blood pressure using the elastance provided by the elastin. At the aortic abdominal level, the resistance is the principal property needed and the elasticity is less important. As a consequence, collagens, mainly involved in the arterial resistance, dominate the composition of the abdominal aortic

media. On the opposite, the proportion of elastin is less as required by the arterial physiology at this level.

Finally, the adventice, the most external aortic layer, is composed of many fibroblasts, some vasa-vasorum (small nutritive vessels for the aortic wall), and an abundant collagen network.<sup>11</sup> This layer plays a very important role in the cellular proliferation and in the extracellular matrix biosynthesis.

Histology describes the aortic lesion that leads to the aortic dilatation as that observed during the normal vascular aging. This fundamental lesion is essentially due to a fragmentation of elastic fibers and a relative increase of “old,” cross-linked and degraded collagens in the media of the aortic tissue.<sup>12,13</sup> In association, the proteoglycan amount increases in the aortic tissue, but to a much lower extent and essentially in the aortic intima and internal media.<sup>14,15</sup> At last, the smooth muscle cell count decreases and can even be null in some aneurysms. Some recent reports have concluded that this major loss of smooth muscle cells is principally located in the media and is due to a massive apoptosis signal coming from the extracellular matrix, especially from some fragmented matrix proteins also named matrikines.<sup>16</sup> All these modifications are directly involved in the decrease of the aortic compliance and elasticity, leading to an aortic dilatation and rupture. If the real mechanism, initiating these lesions, is not actually known, reports have demonstrated the direct involvement of metalloproteases (MMPs) in the elastin and collagen degradations. MMPs 2 and 9 have been described as the most aggressive enzymes involved in the aortic matrix degradation and consequently the appearance of an aneurysm.<sup>17,18</sup>

Despite these interesting findings, the histopathological analysis of the aortic tissue is not useful to establish the diagnosis of aortic aneurysm before surgery. The diagnosis is actually only based on arterial size measurements. Even for the cardiac surgeon, the visual appearance of the aortic tissue during surgery remains an important step but cannot inform on how the artery will evolve in the case of moderate dilatations. No preoperative or peroperative biopsy can be done to evaluate the aortic tissue without a dramatic risk of bleeding, aortic rupture, and death. In fact, the histopathological analysis plays a minor role in the aortic disease management and postoperative investigations are performed for a better understanding, but not to modify the initial medical decision. Finally, to date, no nondestructive test exists to evaluate the quality of the aortic tissue and to diagnose precociously the aortic aneurismal pathology.

Since many decades, vibrational spectroscopic methods, and principally infrared microspectroscopy, has been extensively used in industrial and chemical analyses.<sup>19</sup> This technique is based on the absorption of infrared radiations by the molecular structure of the studied material. The combination

of an FTIR spectrometer with a microscope has brought a new dimension to this type of analysis because it simultaneously gives both the spatial and the biochemical information. As a consequence and for more than 10 years, Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (FTIRM) has been progressively developed and applied for *in vitro* analysis of biological tissues and cells,<sup>20–22</sup> mainly in the field of cancer<sup>23–25</sup> with the final hope to provide rapid and nondestructive *in vitro* or *ex vivo* analysis of cells<sup>22</sup> or tissues.<sup>26–28</sup> To date, this innovating technology has proved to be useful, and we have previously reported its application in different biomedical fields such as cancer, infectious, skin analysis, or cardiovascular diseases.<sup>29,30</sup>

This nondestructive approach has many advantages because it requires minimal preparation, no staining, low-cost consumables, and can offer more insight into the structural and morphological information than classical histopathological methods.<sup>31,32</sup> However, only few vascular studies have used these spectroscopic approaches based on FTIRM, essentially to investigate lipids and calcium contents of the atherosclerotic plaque<sup>26</sup> but studies on aortic aneurysms are scarce.<sup>33</sup>

Because of our interest for the FTIRM and ascending aortic aneurysms, we have designed this preliminary study with the main goal to evaluate the potential of this technique as a nondestructive method of aortic tissue characterization; also, in a second step, to develop an *in vitro* or *ex vivo* diagnostic test to classify aortic tissues from dilated and nondilated ascending aorta. According to previous medical and research reports,<sup>34–36</sup> we have essentially studied modifications related to proteins such as elastin and collagens.

## METHODS

### Aortic Tissue Preparation

Biopsies of aortic tissues were collected from 19 patients, nine from aortic aneurysms and 10 from nondilated aortas. Nondilated ascending aortas were considered as normal aortic tissues. Such aortas were obtained from “normal” explanted hearts during aortic or mitral valve homografts harvesting after cerebral death. Aneurysmal aortas were collected during ascending aortic surgery for aneurysms over 50 mm in diameters with or without aortic valvular disease. However, no collected aneurysmal aorta was associated to Marfan’s syndrome or to bicuspid aortic valve.

All aortic tissues have been conditioned using the same protocol. Fresh biopsies were conditioned in a wet compress with physiological serum and rapidly cut into multiple transversal bands of 20 mm × 8 mm size, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

For infrared microspectroscopy, 7- $\mu\text{m}$  thick cryosections of the complete thickness of the aortic wall (including adventice, media, and intima) were obtained with a microtome (Microm Model HM500, France) and placed on infrared transparent Zinc Selenide windows. This protocol did not require any extra-physiological chemical agent or staining.

### FTIRM

FTIR spectra were acquired using an IRScope II microscope coupled to an Equinox 55 FTIR spectrometer, both from Bruker Optics, Germany. Spectral data were collected using a point-by-point mode at a spatial resolution of 30  $\mu\text{m}$ . Selected areas of each aortic sample after a visual inspection to eliminate evident tissue abnormalities like kinks and holes. The area to be analyzed was selected at high magnification ( $\times 36$ ), and point-by-point spectra were acquired through the whole aortic thickness using an  $\times 15$  infrared objective. Typical areas analyzed were of the order of  $1500 \times 150 \mu\text{m}^2$  in the thickness of aortic wall (from the intima to the adventice). A total of 64 scans were co-added per spectrum at a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . The set-up was interfaced with a computer and spectral data were collected using OPUS 3.02 software from Bruker Optics.

### Spectral Data Preprocessing and Analysis

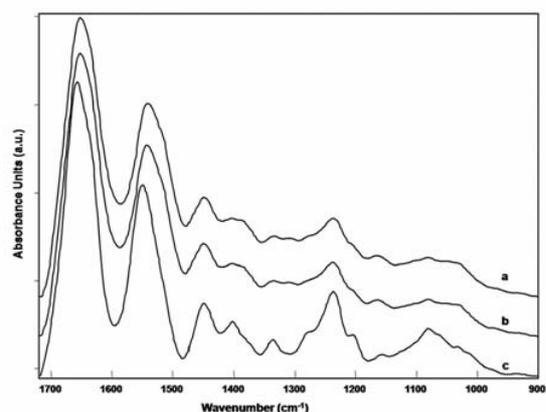
About 4200 FTIRM spectra were collected from 19 aortic samples, in the  $4000\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$  spectral range, pre-processed using the OPUS 3.02 software and classified using the hierarchical cluster analysis (HCA) module. Evident bad spectra, without any spectral signal, were directly eliminated using a visual inspection and the cluster analysis. After microscopic verifications, these spectra correspond to the presence of some holes in the aortic tissue or spectra acquired from sample extremities. The spectral range  $1750\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$  was selected due to the major influence of extracellular matrix components in this spectral region, where elastin and collagen, the principal components of the ascending aorta, absorb. All spectra were subjected to a 5-point elastic correction for baseline drift and vector normalized.<sup>26,31,32</sup> For each tissue, a mean representative spectrum and its second derivative were computed. Mean spectra were used to smooth the intrinsic heterogeneity of the biological tissue. Second derivatives were used to enhance the chemical information present in overlapping infrared absorption bands of spectra and to circumvent contribution of baseline drifts in infrared spectra. Both averaged spectra and second derivative spectra of each sample were analyzed using the HCA (OPUS 3.02 software), and spectral regions of interest selected by the Student’s *t*-test. In addition, to highlight differences between all normal aortas and all aneurysms, we have computed the mean spectrum of each class using all individual spectra from all samples of each class. These two mean spectra and their respective second derivatives have been compared.

Graphic representations of the clustering results are given in the form of a hierarchical tree. This representation is based on the calculated Euclidian distances between all objects, as spectra or selected spectral regions, using the Ward’s algorithm. It uses the level of mean difference to classify, in a same group or cluster, spectra with a low level of mean difference and, in different group, spectra with a high level of mean difference.

## RESULTS

### FTIR Spectral Characteristics of the Ascending Aortic Tissues: Comparison with the Main Fibrous Proteins

Mainly collagens, elastin, and smooth muscle cells compose the media of the ascending aorta. The FTIR spectrum is therefore representative of the superimposition of spectro-



**FIGURE 1** Comparison between FTIR spectra of bovine elastin (a), a normal aortic tissue (b), and of Type I collagen (c) in the 1750–900  $\text{cm}^{-1}$  spectral range.

scopic signatures from these components. In Figure 1 is displayed a typical micro-FTIR mean spectrum representative of normal aortic tissues (mean spectrum of all normal samples; Figure 1b), which is compared with the FTIR spectra of bovine elastin (Figure 1a) and Type I human collagen (Figure 1c). Their respective absorption frequencies, calculated from second derivative spectra, are also compared in Table I and assigned to the main protein bands originating from the peptide bond vibrations: the amide I peak is found respectively for the normal aorta, the Type I collagen, and elastin at 1658, 1662, 1657  $\text{cm}^{-1}$ , the amide II at 1546, 1555, 1547  $\text{cm}^{-1}$ , and amide III at 1234, 1235, and 1234  $\text{cm}^{-1}$ . Weaker signals from protein C–H modes are located in the 1500–1300  $\text{cm}^{-1}$  region. Some peaks are shown in the 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  low-frequency spectral range, but no significant differences were found between normal aortas, collagen, and elastin as depicted in Table I. By comparing normal aortas and elastin second derivatives, more than 95% of their peaks are similar and spectra seems to be identical as shown in Figure 1. Main differences between spectra from the aorta, collagen, and elastin are mainly located in amide bands with a major influence of the elastin signal in the tissue absorption. We have used these results to define spectral ranges used for hierarchical classifications.

### Micro-FTIR Spectral Analysis of Normal Aortic Tissues

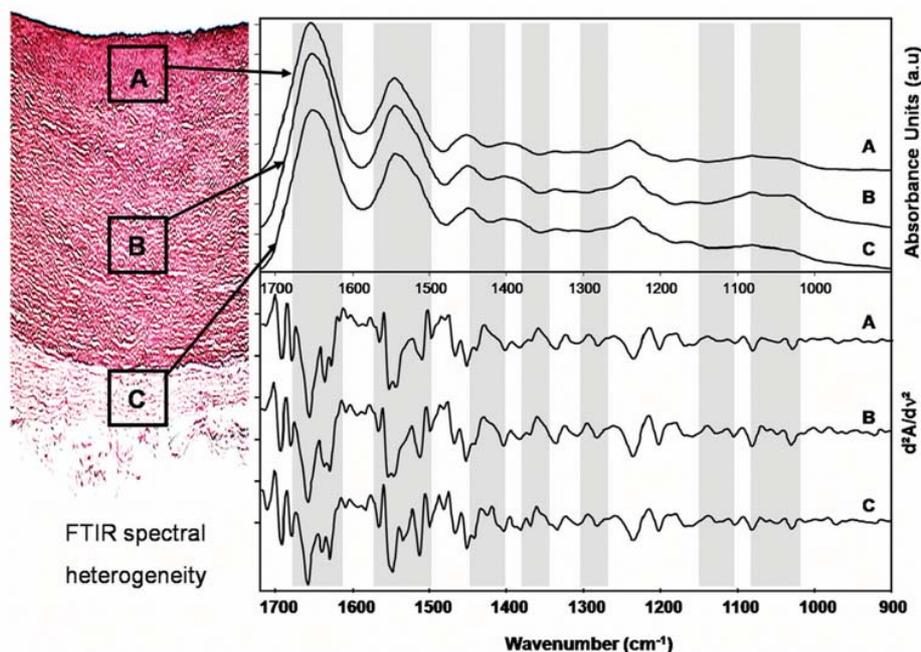
Before analyzing all the tissue samples together, we have evaluated if the intrinsic sample heterogeneity could have an influence on the classification result. First, we have compared the spectral information within the same aortic tissue. Figure 2 shows micro-FTIR spectra and their respective second derivatives obtained from three different regions of a normal aortic tissue going from the intima (Figure 2A), through the

media (Figure 2B), to the adventice (Figure 2C). Spectral differences are more evident in the second derivative spectra and are highlighted in gray. From these three areas of the same aortic sample, differences are more visible in the amide I, II, and III regions. For the amide I, the band shape appears slightly changed, but differences are mainly represented by intensity variations of the three peaks without any apparent shift in the observed frequencies. For the amide II band, both peak shift and intensity variations are found. At last, for the amide III band, as for the amide I, differences are related to variations in the absorption intensity. On the other hand, the spectral 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  region, mainly related to proteoglycans and proteins, as described in Table I, exhibits no significant differences in the thickness of the aortic tissue. In spite of these weak differences, the method is sensitive enough to differentiate spectra from region A (endothelial cells and connective tissue), region B (smooth muscle cells, collagens, and elastin), and region C (collagen networks and fibroblasts). To better appreciate the intra-tissue heterogeneity,

**Table I** FTIR Peaks Comparison Between Collagen (Solid), Bovine Elastin (Solid) and Normal Ascending Aortic Sample Based on the 1700–1000  $\text{cm}^{-1}$  Spectral Range

Principal Spectral Bands	FTIR Peaks of Aortic Tissue ( $\text{cm}^{-1}$ )	FTIR Peaks of Collagen ( $\text{cm}^{-1}$ )	FTIR Peaks of Bovine Elastin ( $\text{cm}^{-1}$ )
Amide I	1694	1695	1693
	1681	1681	1680
	1658	1662	1657
	1638	1634	1638
	1629	—	1630
	1566	1564	1566
Amide II	1553	1555	—
	1546	—	1547
	1512	1514	1513
	1499	1499	1499
	1468	1469	1467
	1453	1454	1452
	1404	1402	1404
	1383	1377	1383
	1369	—	1369
	1336	1337	1334
Amide III	—	1315	—
	1282	1283	1281
	1234	1235	1234
	1202	1202	1202
	1161	1160	1161
	1081	1082	1081
	1061	1060	1061
	1029	1031	1029

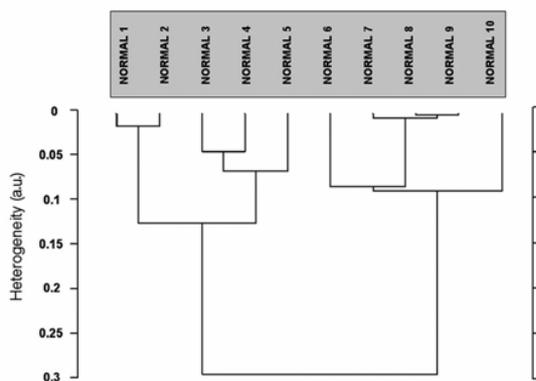
From respective second derivative spectra.



**FIGURE 2** Histological section of a normal aortic tissue showing regions corresponding to the intima (A), media (B), and the adventice (C), and their corresponding FTIR spectra (top) and second derivatives (bottom). Spectral differences observed are highlighted in gray, more pronounced in the amide I, II, and III bands and related to protein composition and structure.

HCA was computed using collected spectra from normal samples. Spectra (75–85%) belonging to the same tissue were correctly classified using the large 1750–700  $\text{cm}^{-1}$  spectral window. By choosing a smaller window (1500–1000  $\text{cm}^{-1}$ ) the classification of spectra from normal tissues could be improved by 80–92%. Other tests such as the Student's  $t$ -test was used to select discriminant spectral regions but without

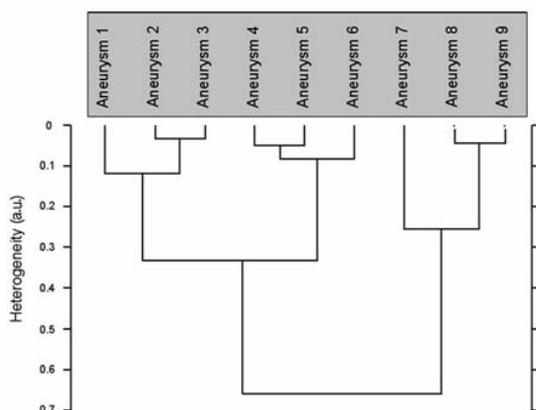
major improvement in the result. Consequently, we have decided to use the mean spectrum from each tissue as a representative spectrum of the whole tissue. This approach allows to smooth the intrinsic heterogeneity of each sample and to simplify the cluster analysis. The HCA result based on these mean spectra from all normal tissues is shown in the Figure 3 and confirms, as expected, a lower heterogeneity level than using individual spectra. The distance comparison over the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  region shows that the normal tissues fall into two classes without any correlation with age, sex, or clinical history (threshold set between 0.1 and 0.15). In fact, these differences reflect the small spectral heterogeneity between normal samples.



**FIGURE 3** HCA of all mean spectra from normal ascending aortic tissues. This classification shows a low heterogeneity level within the samples of normal aortic tissues using the selected spectral range (1500–1000  $\text{cm}^{-1}$ ). Two different groups are observed without any correlation with age, sex, or clinical history.

### Micro-FTIR Spectral Analysis of Aneurismal Aortic Tissues

As with normal aortas, we have also attempted to evaluate the heterogeneity in aneurismal tissues. HCA performed using the 1750–700  $\text{cm}^{-1}$  spectral region of individual spectra collected from aneurismal tissues found 70–80% of good classification. As previously, HCA computed using the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  spectral region, improves the result to 85%. Selection of discriminant regions by Student's  $t$ -test did not significantly improve the classification. In a similar way, as for

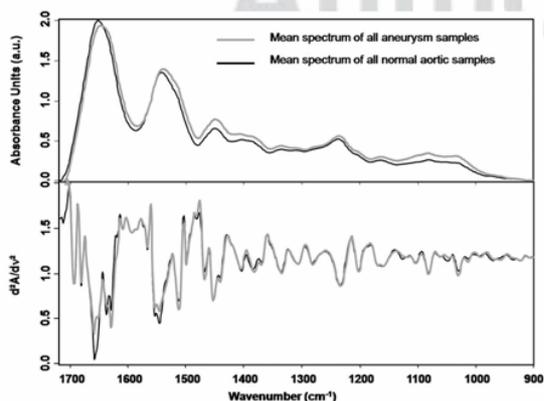


**FIGURE 4** HCA of all mean spectra from aneurismal ascending aortas using the reduced spectral range ( $1500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ). The heterogeneity is higher for aneurismal group than normal group.

normal aorta, we have calculated the mean spectra of all aneurismal samples to reduce the influence of the intrinsic heterogeneity of these altered tissues and these were used as input spectra for the HCA classification. Again, spectral averaging allows to smooth the more important heterogeneity presented in each aortic samples from the aneurismal group. HCA classified nine mean spectra from the nine aneurismal cases, into three classes on the basis of a similar heterogeneity to that found for normal tissues (Figure 4).

### Micro-FTIR Comparison Between Normal and Aneurismal Aortic Tissues

To compare the data between normal and aneurismal tissues, we have computed the mean spectrum of each tissue type,



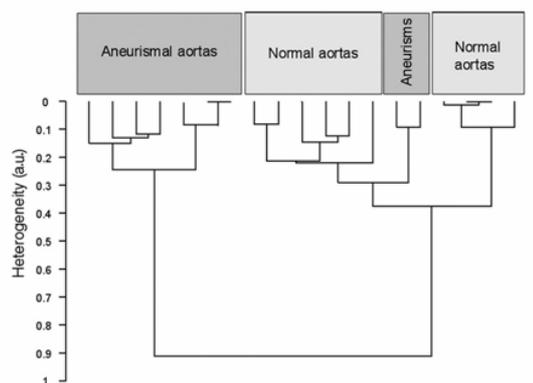
**FIGURE 5** Comparison of the two mean spectra representing all normal and all aneurismal aortic tissues, computed from all normal and all aneurismal individual spectra (top); and their second derivatives (bottom). Important differences between the second derivatives are highlighted in the  $1670\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$  spectral range, mainly dominated by proteins (elastin and collagen). Some other differences can also be shown in the lower part of the mean spectra.

using respectively all individual spectra from all 10 normal and all nine aneurismal aortic samples. Figure 5 displays the two mean spectra. We also present the second derivative spectra to highlight the spectral differences. Comparison of these two mean spectra reveals some interesting differences, mainly located in the amide I and II bands. The amide I band from normal mean spectrum centered at  $1653\text{ cm}^{-1}$  exhibits a higher intensity than that of the aneurismal tissue for which this peak is shifted to  $1648\text{ cm}^{-1}$  and has a broader feature.

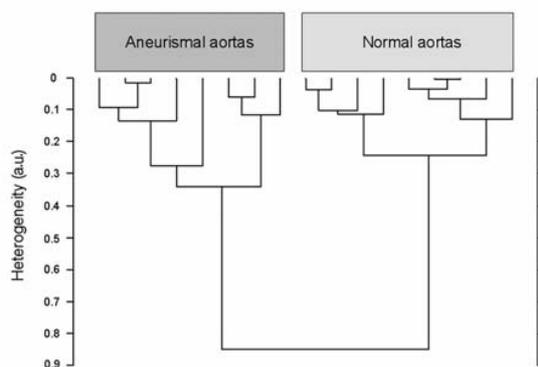
The representative mean spectra from each aortic sample (10 normal and 9 aneurismal) have been assessed with HCA analysis. Using the  $1750\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  region, 85–91% of good classification between normal and aneurismal aortas could be achieved (Figure 6). To optimize the clustering, we have used a Student's *t*-test to highlight discriminating regions. The region  $1500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  came out as a possible solution and gave a 100% good classification (Figure 7). The results were confirmed using HCA and second derivatives of all mean spectra in the same region, showing the importance of this spectral region in the discrimination of normal and aneurismal aortic tissues (Figure 8).

### DISCUSSION

The main advantages of optical spectroscopies are that they are performed without preparation or sample destruction as with many other biochemical analyses.<sup>30</sup> These characteristics allow repeating measurements on the same point of a tissue or an organ without any modification in chemical, structural, or physical properties. FTIR spectroscopy benefits from these advantages because it is based on a nondestructive interaction between macromolecules of the biological material and mid-infrared radiation. Vibrations induced by these



**FIGURE 6** HCA of normal and aneurismal ascending aortas using the  $1750\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  spectral range shows a good discrimination with only two misclassified aneurysm tissue samples.



**FIGURE 7** HCA of normal and aneurismal ascending aortas using the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. Important differences can be noticed between normal and pathological samples. In contrast, a relative low heterogeneity exists within each group despite important individual differences concerning age, sex, or medical history of each patient.

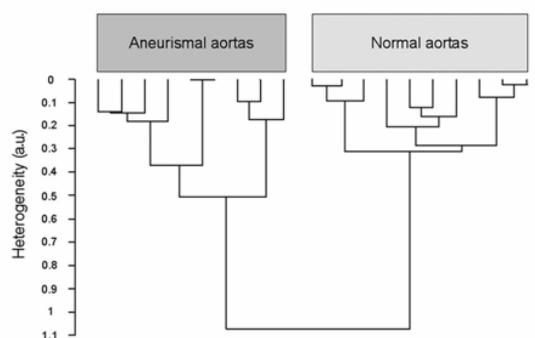
interactions are directly related to the material composition. The spectroscopic signal is not only related to the biochemical composition but also to the structural state of these molecules<sup>37</sup> and their links with other molecules. It has been widely applied in the biomedical field for the analysis of different pathological tissues mainly in the field of cancer, and also for other pathologies related to skin, bone, cartilage.

So far, in the cardiovascular field, spectroscopic studies have been performed in view of characterizing arterial atherosclerosis.<sup>26,28</sup> The rationale for our approach concerning the ascending aortic tissue is that to date conventional histopathology is unable to give a rapid diagnostics on such samples because of molecular variations, undetectable with classical analysis. Many genetic or biochemical aortic tissue studies have been published,<sup>38</sup> frequently with complex and destructive laboratory protocols without hope of real and rapid transfer to the clinics. We have therefore investigated the potentials of FTIR microspectroscopy to discriminate between normal and aneurismal tissues on the basis of the chemical information present in their spectra.

The infrared spectrum of biological tissues like the aorta is mainly dominated by broad features corresponding to the absorption of macromolecules like proteins, lipids, and proteoglycans. Their respective absorption frequencies observed for human aortic tissues are shown in Table I. They can be assigned to the main protein bands originating from the peptide bond vibrations: the amide A band is shown at 3330  $\text{cm}^{-1}$  (N—H stretching mode; not shown), the amide I at 1652  $\text{cm}^{-1}$  (mainly C=O stretching mode) and the amide II at 1552  $\text{cm}^{-1}$  (combination of C—N stretch and N—H bend), and amide III at 1238  $\text{cm}^{-1}$  (combination of C—N stretch, N—H bend, and C—C stretch). Weaker signals from

protein C—H modes are located in the 1500–1300  $\text{cm}^{-1}$  region. The low-frequency bands in the 1200–900  $\text{cm}^{-1}$  range are assigned mainly to C—O—C, C—OH, and C—C ring vibrations. Because the aortic tissue is dominantly composed of elastin and collagen and to a lesser extent of proteoglycans, we have compared its FTIR mean spectrum with those of Type I collagen and bovine elastin (see Figure 1). The amide I and II bands of the tissue spectra appear to be a combination of absorptions from both macromolecules, but between 1500 and 1000  $\text{cm}^{-1}$  the normal tissue spectrum has many similarities with that of elastin. Collagen shows quite minor contributions in this same spectral region. In fact, the mean spectrum contains a high percentage of spectra from the media explaining the similarity with the elastin spectrum, the major component of the media. Thus, the contributions of elastin and collagen alone explain quite well the features observed in the aortic tissue mean spectrum (Figure 1 and Table I). Previous work on human iliac artery tissues<sup>39</sup> has assigned the amide I at 1658  $\text{cm}^{-1}$ , amide II at 1554  $\text{cm}^{-1}$ , amide III at 1240  $\text{cm}^{-1}$ , and more specific peaks at 1205 and 1405  $\text{cm}^{-1}$  to collagen. Indeed, the iliac artery contains predominantly collagen with a lower contribution of elastin in contrast with the ascending aortic tissues, studied here, where the proportion of these proteins are not the same, i.e. a predominance of elastin.<sup>40,41</sup>

Prior to the discrimination between normal and pathological tissues, it is important to know how heterogeneous these samples are. Spectral differences are shown as an up- or down-shift and/or as variations in peak intensities related to qualitative and quantitative modifications of molecular composition and structural conformation. Considering a biological tissue, the molecular information is more difficult to



**FIGURE 8** Hierarchical classification of second derivative of all individual mean spectra using the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. One hundred percent good classification of all ascending aortas can be achieved using this selected spectral window. Like with mean spectra, the heterogeneity is more important in the aneurismal group but a clear discrimination between normal and aneurismal groups can be achieved.

analyze due to the overlapping spectral information from different molecules. To overcome the influence of this overlapping and to select discriminant regions, we have calculated the second derivative spectra.

From a histological point of view, the aortic tissue is described as composed of three layers: the intima, the media, and the adventice. Representative infrared spectra from these regions (see Figure 2) show that the adventice and the intima exhibit spectra that are different from the media and suggesting contribution from collagen. On the other hand, the spectrum in the region of the media reflects more an elastin composition.

HCA, which is based on the calculation of the spectral distances, has been used to evaluate the heterogeneity between the tissue samples. When the individual spectra from normal ascending aortas are computed, the outcome reveals some misclassifications that can be related to the intrinsic heterogeneity of each sample and to a simple fact that intimas from two different aortic tissues exhibit a closer composition than the intima and the media from the same sample. However, more than 87% of the total FTIR spectra recorded for all normal aortic samples could be well classified using the large spectral range 1750–700  $\text{cm}^{-1}$  and this could be improved to 92% by using a more specific region as 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  (see Figure 3). To minimize the influence of the intrinsic heterogeneity, we have calculated the mean spectrum from each sample to eliminate nonessential information and to reinforce constant and discriminative spectral data.

For aneurismal tissues, 70–80% of individual FTIR spectra could be well classified by HCA. This classification is improved to a maximum of 85% by using the selected spectral region above (see Figure 4). Our results show that the heterogeneity between individual spectra of aneurismal aortas was higher than in the normal group and can explain the lower score of the classification. This higher heterogeneity within aneurismal tissues can be due to physiopathological considerations related to different genotypic and phenotypic profiles.

In aneurismal aortas, the extracellular matrix degradation accompanied by the elastic fiber fragmentation, the accumulation of degraded and cross-linked collagen, and the decrease of the smooth muscle cells, induce important physical and structural changes of the aortic tissue.<sup>42</sup> Differences in the clinical history of each patient such as an important atheroma, diabetes or an arterial hypertension, known to induce some histological lesions such as medianecrosis, are in principle other factors that contribute to the higher heterogeneity in pathological tissues. So, to minimize these effects, we have used, as previously described for normal tissues, the mean spectrum of each sample for further analysis.

After a standardized pre-processing of the FTIR data, all aneurismal and normal tissue mean spectra were used as input spectra for the HCA. Prior to the clustering, we have compared the mean spectra of the two groups as well as their second derivative spectra, which are presented to highlight the differences between the two representative mean spectra (see Figure 5). They evidence the main protein modifications in the amide I and II absorbing regions (1670–1530  $\text{cm}^{-1}$ ) as well as in the frequency range below 1500  $\text{cm}^{-1}$ . The second derivative spectra emphasizes the change in the profiles of the underlying bands at 1629 and 1637  $\text{cm}^{-1}$ , associated to  $\beta$ -sheet structures, and 1650 and 1660  $\text{cm}^{-1}$ , associated to both undefined conformations and  $\alpha$ -helical structures. The amide II band also shows some differences which are more difficult to interpret in terms of chemical changes. Further spectral variations can be depicted in the lower part of the spectra of these two tissue types. Cluster analysis performed on all the mean spectra using a large spectral window (1750–700  $\text{cm}^{-1}$ ) gave about 90% of correctly classified spectra (see Figure 6). Thus, by reducing the data set to mean spectra, it is possible to circumvent the intra-sample heterogeneity. The fact that such level of discrimination can be achieved between normal and aneurismal tissues lies in the fact that the dataset of mean spectra still contain sufficient discriminant elements and that the intergroup variability remains higher than that of the intragroup. It was also reasonable to identify a narrower spectral window or a combination of spectral elements so as to improve the discrimination score. The Student's *t*-test performed on all mean spectra as well as on their second derivatives reveals multiple spectral regions between 1700 and 1000  $\text{cm}^{-1}$  that exhibit quite high discriminant elements. However, the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  region was found to have the lowest *P* value ( $P < 0.0001$ ), pinpointing a region with highly discriminant spectral features. We have tested these individual regions separately (data not shown) and found that the protein region between 1700 and 1500  $\text{cm}^{-1}$  gave 93% of correct classification. On the other hand, the sugar region lowered drastically the score to 60%. With the aim to improve the discrimination, we focused our analysis on the 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  with the lowest *P* value. The outcome of the cluster analysis shows this spectral window contains indeed features important for the discrimination between aneurismal and normal aortas because the score could be improved to 100% (see Figure 7). The main aortic tissue components such as the extracellular matrix proteins and proteoglycans contribute to the 1700–1000  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. In aortic tissues, the relative proportion of these components differ from other tissues and exhibit a higher abundance of the fibrous proteins such as elastin and collagen, which confer elasticity and resistance to the tissue. The

cluster analysis based on the sugar region reveals that the latter has the lowest discriminant power. By comparing with literature data,<sup>43–45</sup> the FTIR spectra of proteoglycans seem to differ strongly from our tissue spectra in the sugar absorption region as well as in that of the proteins. On the other hand, the protein absorption region, due to the major contribution of elastin and collagen, contains discriminant features that give a reasonably good classification. Indeed, the tissue signal (see Figure 1) appears intermediate between collagen spectrum (lower frequency) and that of elastin (higher frequency). This region seems to be influenced by both elastin degradation and accumulation of altered collagen. The 1500–1000  $\text{cm}^{-1}$  region indeed gave the best score and we believe this is because this frequency region is conserved and overlaps quite well with the IR spectrum of elastin (see Figure 1). Because elastin degradation is highly implicated in the pathological aspect of an aneurysm, it seems quite reasonable that this specific region comes out as more discriminant. When the second derivative spectra (1500–1000  $\text{cm}^{-1}$ ) were used as input data for the cluster analysis, the score remained 100% (see Figure 8). Second derivative not only resolves overlapping bands but removes some optical effects such as baseline drift. This region of the spectrum seems to be less affected by such effects and the information present in the mean spectra was sufficient for discriminating between the two groups. These results suggest this region as containing spectroscopic markers related to the aneurismal pathology that are useful to discriminate between normal and pathological aortic tissues. This study highlights the potential of FTIR spectroscopy as an *in vitro* method for the diagnosis of aortic dilatations.

To date, in clinical practice, the diagnosis of aortic aneurisms is mainly achieved by measuring the aortic diameter using medical imaging techniques as magnetic resonance imaging, cardio-thoracic tomodensitometry (CT-scan) or echography. When the artery diameter exceeds 150% of the normal size ( $\sim 35$  mm), an aneurysm is diagnosed without any complementary tests. Histopathology may reveal existence of lesions but is unable to attribute them specifically to an aneurism. Other investigative means based on biochemical or immunohistochemical methods are also used for tissue characterization.

Along these time-consuming methods, FTIR holds promise as a rapid and nondestructive *in vitro* method for both characterizing and diagnosing aortic pathologies.

## CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This study on the analysis of normal and aneurismal ascending aortic patient tissues by FTIRM shows that the spectral

information obtained can be used to characterize the tissues on the one hand and to discriminate between the two groups on the other hand. The ascending aortic tissue spectra are mainly elastin dominant with contribution also from collagen. The spectral contributions of other extracellular matrix molecules were minimal. Our data also revealed that spectral heterogeneity exists within tissues but can be minimized by using average spectra, which still carry discriminant features for differentiating between normal and aneurismal tissues. Using a specific spectral region where a strong homology with elastin spectra was observed (1500–1000  $\text{cm}^{-1}$ ), it was possible to achieve a complete discrimination between the two tissue types. These results are encouraging but must be validated with a larger dataset. However, it must be noted that recruitment of normal samples remains problematic. In the future, we foresee that complementary approaches such as Raman spectroscopy, could also give complementary vibrational spectroscopic information on aortic tissue composition. Indeed, this approach would have the advantage that it can be used *in vitro*, *ex vivo*, and probably *in vivo* to find early signs of aneurismal dilatation. This objective analysis of the aortic tissue by optical methods could be very helpful to the cardiac surgeon who is often confronted to the diagnostic dilemma of the risk of evolution of a moderate aortic dilatation into an aneurism.<sup>46,47</sup>

## REFERENCES

1. Thompson, M. M.; Bell, P. R. *BMJ* 2000, 320, 1193–1196.
2. Zehr, K. J.; Orszulak, T. A.; Mullany, C. J.; Matloobi, A.; Daly, R. C.; Dearani, J. A.; Sundt, T. M., III; Puga, F. J.; Danielson, G. K.; Schaff, H. V. *Circulation* 2004, 110, 1364–1371.
3. Fleck, T. M.; Czerny, M.; Hutschala, D.; Koinig, H.; Wolner, E.; Grabenwoger, M. *Ann Thorac Surg* 2003, 76, 1198–1202.
4. Kazui, T.; Kimura, N.; Komatsu, S. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995, 9, 491–495.
5. Faxon, D. P.; Fuster, V.; Libby, P.; Beckman, J. A.; Hiatt, W. R.; Thompson, R. W.; Topper, J. N.; Annex, B. H.; Rundback, J. H.; Fabunmi, R. P.; Robertson, R. M.; Loscalzo, J. *Circulation* 2004, 109, 2617–2625.
6. Nava, P.; Guarner, V.; Posadas, R.; Perez, I.; Banos, G. *Am J Physiol* 1999, 277, H399–H404.
7. Newby, D. E.; McLeod, A. L.; Uren, N. G.; Flint, L.; Ludlam, C. A.; Webb, D. J.; Fox, K. A.; Boon, N. A. *Circulation* 2001, 103, 1936–1941.
8. Clapp, B. R.; Hirschfield, G. M.; Storry, C.; Gallimore, J. R.; Stidwill, R. P.; Singer, M.; Deanfield, J. E.; MacAllister, R. J.; Pepys, M. B.; Vallance, P.; Hingorani, A. D. *Circulation* 2005, 111, 1530–1536.
9. Bugiardini, R.; Manfrini, O.; Pizzi, C.; Fontana, E.; Morgagni, G. *Circulation* 2004, 109, 2518–2523.
10. Shadwick, R. E. *J Exp Biol* 1999, 202, 3305–3313.
11. Rey, F. E.; Pagano, P. J. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22, 1962–1971.

12. Watanabe, M.; Sawai, T.; Nagura, H.; Suyama, K. *Tohoku J Exp Med* 1996, 180, 115–130.
13. Cattell, M. A.; Anderson, J. C.; Hasleton, P. S. *Clin Chim Acta* 1996, 245, 73–84.
14. Wight, T. N.; Merrilees, M. J. *Circ Res* 2004, 94, 1158–1167.
15. Jacob, M. P. *Biomed Pharmacother* 2003, 57, 195–202.
16. Duca, L.; Floquet, N.; Alix, A. J.; Haye, B.; Debelle, L. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, 49, 235–244.
17. Barbour, J. R.; Spinale, F. G.; Ikonomidis, J. S. *J Surg Res* 2007, 139, 292–307.
18. Loftus, I. M.; Thompson, M. M. *Vasc Med* 2002, 7, 117–133.
19. Enlow, E. M.; Kennedy, J. L.; Nieuwland, A. A.; Hendrix, J. E.; Morgan, S. L. *Appl Spectrosc* 2005, 59, 986–992.
20. Kneipp, J.; Miller, L. M.; Joncic, M.; Kittel, M.; Lasch, P.; Beekes, M.; Naumann, D. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1639, 152–158.
21. Krishna, C. M.; Kegelaer, G.; Adt, I.; Rubin, S.; Kartha, V. B.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D. *Biopolymers* 2006, 82, 462–470.
22. Mourant, J. R.; Gibson, R. R.; Johnson, T. M.; Carpenter, S.; Short, K. W.; Yamada, Y. R.; Freyer, J. P. *Phys Med Biol* 2003, 48, 243–257.
23. Miller, S. O.; Ewing, G. P.; Howard, C.; Tachikawa, H.; Bigler, S. A.; Barber, W. H.; Angel, M.; McDaniel, D. O. *Biomed Sci Instrum* 2003, 39, 24–29.
24. Andrus, P. G. *Technol Cancer Res Treat* 2006, 5, 157–167.
25. Yang, Y.; Sule-Suso, J.; Sockalingum, G. D.; Kegelaer, G.; Manfait, M.; El Haj, A. J. *Biopolymers* 2005, 78, 311–317.
26. Moreno, P. R.; Lodder, R. A.; Purushothaman, K. R.; Charash, W. E.; O'Connor, W. N.; Muller, J. E. *Circulation* 2002, 105, 923–927.
27. Romer, T. J.; Brennan, J. F., III; Fitzmaurice, M.; Feldstein, M. L.; Deinum, G.; Myles, J. L.; Kramer, J. R.; Lees, R. S.; Feld, M. S. *Circulation* 1998, 97, 878–885.
28. van de Poll, S. W.; Kastelijn, K.; Bakker Schut, T. C.; Strijder, C.; Pasterkamp, G.; Puppels, G. J.; van der Laarse, A. *Heart* 2003, 89, 1078–1082.
29. Tfayli, A.; Piot, O.; Durlach, A.; Bernard, P.; Manfait, M. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1724, 262–269.
30. Chrit, L.; Hadjur, C.; Morel, S.; Sockalingum, G.; Lebourdon, G.; Leroy, E.; Manfait, M. *J Biomed Opt* 2005, 10, 44007.
31. Malins, D. C.; Johnson, P. M.; Barker, E. A.; Polissar, N. L.; Wheeler, T. M.; Anderson, K. M. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100, 5401–5406.
32. Fernandez, D. C.; Bhargava, R.; Hewitt, S. M.; Levin, I. W. *Nat Biotechnol* 2005, 23, 469–474.
33. Bonnier, E.; Rubin, S.; Venteo, L.; Krishna, C. M.; Pluot, M.; Baehrel, B.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758, 968–973.
34. Plenz, G. A.; Deng, M. C.; Robenek, H.; Volker, W. *Atherosclerosis* 2003, 166, 1–11.
35. Avolio, A.; Jones, D.; Tafazzoli-Shadpour, M. *Hypertension* 1998, 32, 170–175.
36. Silver, F. H.; Horvath, I.; Foran, D. J. *Crit Rev Biomed Eng* 2001, 29, 279–301.
37. Debelle, L.; Alix, A. J.; Jacob, M. P.; Huvenne, J. P.; Berjot, M.; Sombret, B.; Legrand, P. *J Biol Chem* 1995, 270, 26099–26103.
38. Dingemans, K. P.; Teeling, P.; Lagendijk, J. H.; Becker, A. E. *Anat Rec* 2000, 258, 1–14.
39. Gentner, J. M.; Wentrup-Byrne, E.; Walker, P. J.; Walsh, M. D. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998, 44, 251–259.
40. Harkness, M. L.; Harkness, R. D.; Mc, D. D. *J Physiol* 1955, 127, 33–34.
41. Wolinsky, H.; Glagov, S. *Circ Res* 1967, 20, 409–421.
42. Matthias Bechtel, J. F.; Noack, F.; Sayk, F.; Erasmi, A. W.; Bartels, C.; Sievers, H. H. *J Heart Valve Dis* 2003, 12, 54–59; Discussion 59–61.
43. Camacho, N. P.; West, P.; Torzilli, P. A.; Mendelsohn, R. *Biopolymers* 2001, 62, 1–8.
44. David-Vaudey, E.; Burghardt, A.; Keshari, K.; Brouchet, A.; Ries, M.; Majumdar, S. *Eur Cell Mater* 2005, 10, 51–60; Discussion 60.
45. Potter, K.; Kidder, L. H.; Levin, I. W.; Lewis, E. N.; Spencer, R. G. *Arthritis Rheum* 2001, 44, 846–855.
46. Andrus, B. W.; O'Rourke, D. J.; Dacey, L. J.; Palac, R. T. *Circulation* 2003, 108 (Suppl 1), II295–II299.
47. Schmidtke, C.; Bechtel, M.; Hueppe, M.; Sievers, H. H. *Circulation* 2001, 104, I21–I24.

*Reviewing Editor: Laurence Nafie*

#### **IV) Conclusion sur l'analyse structurale de l'aorte humaine ascendante par IRTF**

La spectroscopie infrarouge est une technique sensible donnant accès à des informations spectrales directement en relation avec la composition chimique du tissu analysé. La première étape d'une étude spectroscopique est de caractériser l'échantillon analysé afin de comprendre les résultats obtenus. Grâce à la comparaison du signal mesuré sur la paroi aortique et celui provenant des composés purs, il est possible d'associer les pics observés plus ou moins spécifiquement, à des molécules biologiques présents au sein du tissu. De plus, l'information spectrale est également utilisée afin de discriminer les tissus sains et pathologiques en tenant compte des données de la littérature concernant la physiopathologie des anévrysmes.

Pour bien comprendre, il faut se rappeler que la paroi aortique est composée de trois couches bien distinctes : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et ne représente que quelques micromètres d'épaisseur. La réalisation des cryosections est un processus totalement aléatoire et entraîne vraisemblablement la dégradation d'un grand nombre de cellules endothéliales qui sont coupées et voient leur contenu intracellulaire se vider. Il est alors difficile de déterminer à quel point cette couche interne de la paroi est présente au niveau des coupes analysées. La média représente la plus grosse partie de l'échantillon tissulaire analysé avec une succession de lames élastiques (Voir introduction) (Wolinsky 1967). L'adventice, couche la plus externe de la paroi aortique, est presque entièrement enlevée lors du prélèvement du fait de la quasi-impossibilité de réaliser de coupes fines régulières, non plissées et adhérentes au microtome. Au final, Notre étude s'est donc principalement basée sur la media aortique.

Les principaux composants de la matrice extracellulaire de la paroi aortique sont l'élastine et les collagènes (associés à quelques protéoglycanes et aux cellules musculaires lisses). De nombreuses études portent sur leur implication dans des processus pathologiques de dilatations aortiques, associés ou non à la présence de dépôts athéromateux (Halme 1982; Sauvage 1997; Watanabe 1999; Raspanti 2006). Cependant quelques réserves sont à émettre, car la plupart de ces études s'intéressant à l'aorte abdominale dont la composition est différente de celle de l'aorte ascendante (Lindholt 2001; Carmo 2002). Ceci est essentiellement du aux différences de contraintes hémodynamiques supportées par ces deux segments. La figure 39 présente la comparaison entre une coloration de type trichrome de Masson marquant les fibres de collagène ainsi que les cellules musculaires lisses, à une coloration additionnelle à l'éosine permettant, en plus des précédents marquages, une coloration spécifique des fibres d'élastine. Les fibres d'élastine sont alors colorées en fuchsia

tandis que les fibres de collagène apparaissent en vert. Une comparaison globale des clichés A et B permet de voir que la densité des fibres d'élastine au niveau d'une artère de type élastique (c-à-d l'aorte thoracique) est beaucoup plus importante qu'au sein d'une artère de type musculaire. De grandes variations existent donc au niveau des artères selon leur emplacement dans l'organisme et du rôle qu'elles ont à remplir. Bien que leur structure globale soit identique avec la présence des trois couches successives, le profil spécifique de l'aorte thoracique fait prendre avec prudence les résultats obtenus sur l'aorte abdominale. La forte densité en fibres élastiques au niveau de l'aorte thoracique ne permet pas d'individualiser les fibres élastiques à faible grossissement. La fig C présente l'aspect microscopique de la média du tissu aortique à un plus fort grossissement permettant de bien individualiser les fibres élastiques et de visualiser les fibres de collagène et les cellules musculaires lisses entre les unités lamellaires.

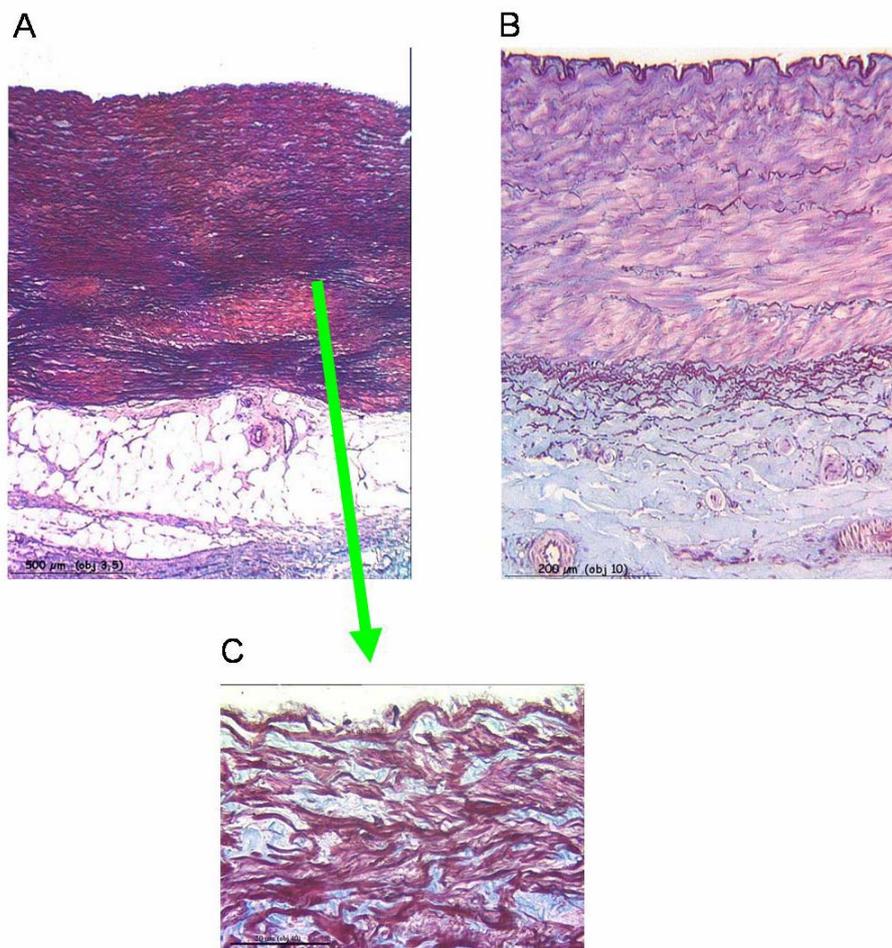


Figure 39: Coloration spécifique des fibres élastiques (orcéine) et collagéniques (trichrome de Masson) au sein des aortes élastiques (A) et musculaires (B)

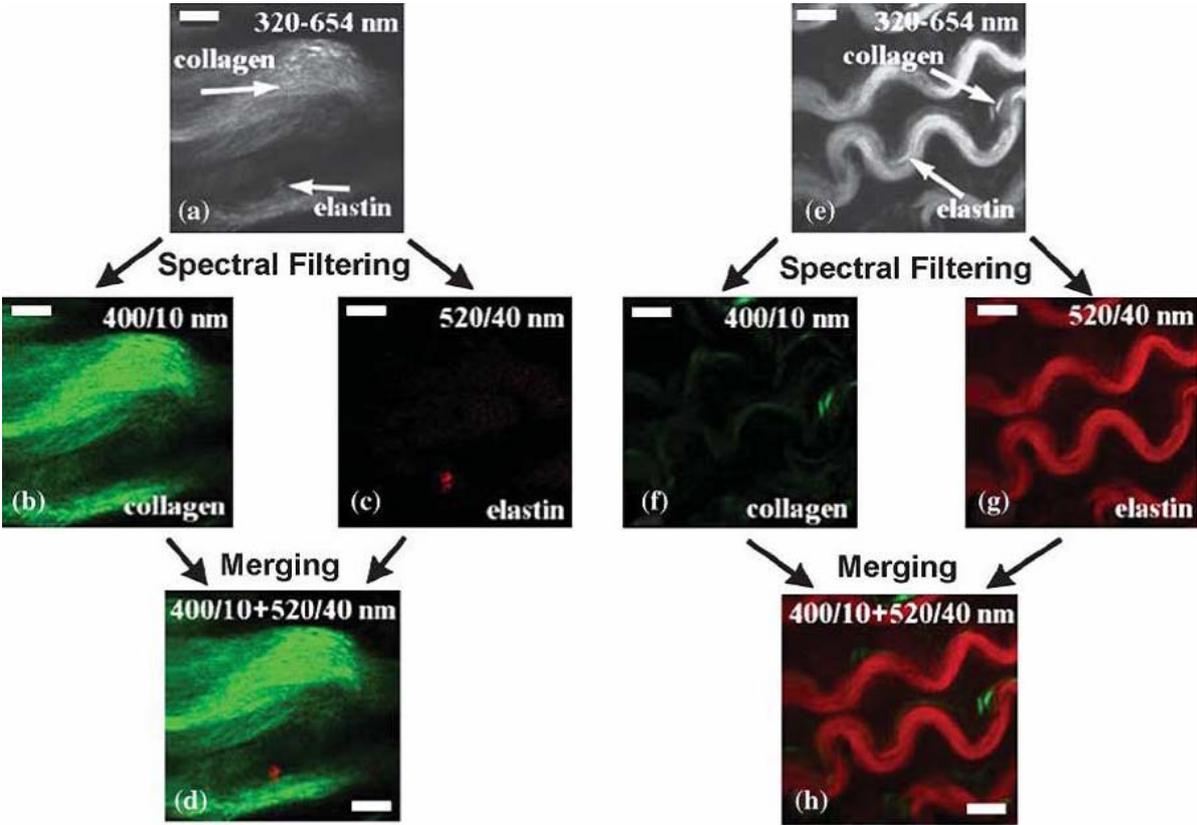
Là encore, ces observations identifient le collagène et l'élastine comme composants principaux de la paroi aortique même s'il est difficile de trouver des publications exposant clairement leurs proportions et quantités relatives dans l'aorte. L'observation de coupes colorées permet de mettre en évidence la présence de ces protéines sans ambiguïté mais n'apporte pas de notions quantitatives entre les différents compartiments de la paroi aortique. Pourtant, Harkness estime dès 1957 les proportions des différents constituants de la paroi aortique à 70% d'eau, 15% de fibre élastiques (FE) et collagéniques (FC) et 15% des cellules et autres molécules de la matrice extracellulaire. Il précise également qu'au niveau de l'aorte thoracique le rapport FE/FC=1,5, confirmant la prédominance des fibres élastiques (Harkness 1955).

Ces informations sont précieuses mais incomplètes puisqu'elles ne précisent pas la répartition de ces différents constituants dans les trois couches de la paroi aortique.

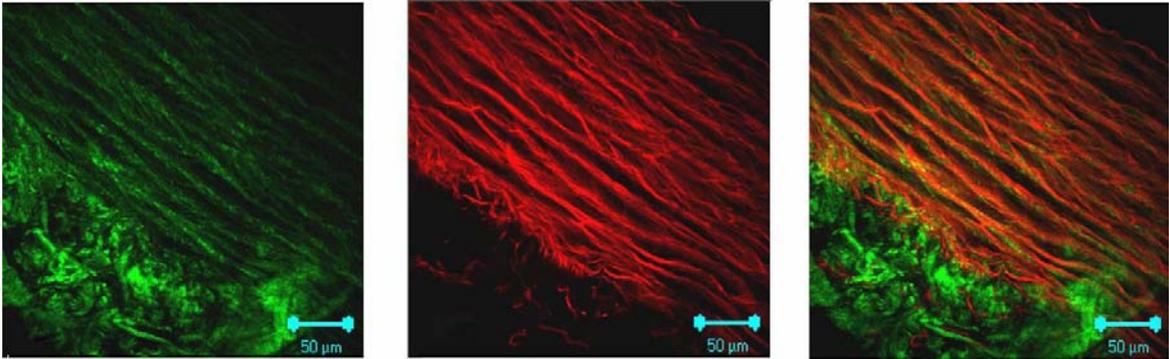
La confrontation des spectres infrarouges de la paroi aortique humaine avec ceux provenant de produits purs (collagène et élastine), on observe une forte homologie entre le spectre de l'élastine pur et celui provenant de la média aortique (Fig.1 article n°1). La gamme spectrale comprise entre 1000-1500  $\text{cm}^{-1}$  est parfaitement superposable entre les deux spectres et quelques légères différences sont observées au niveau des bandes amides I et II. Deux hypothèses sont alors possibles : soit le collagène n'apporte qu'une faible contribution au signal spectral total et ne modifiant que légèrement l'allure des bandes amides principalement influencées par l'élastine ou alors, la conformation de l'élastine dans le tissu aortique est différente de celle observée avec la protéine pure expliquant alors les variations observées sur le spectre entre 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$ .

Des études sur la paroi aortique de rat utilisant la fluorescence bi-photonique permettent d'apporter des éléments de réponse (Zoumi 2004; Chen 2007). L'observation de manière simultanée de la répartition des fibres élastiques et de collagène permet de comprendre la répartition ainsi que d'estimer les proportions de ces composés au sein de la paroi aortique. En 2004, Zoumi publie une étude concernant la paroi aortique de rat et objective la présence majoritaire de collagène au niveau de l'adventice (fig.40A a,b,c et d) et d'élastine au sein de la média aortique (fig.40A d,e,f et g). Par ailleurs, Chen et al ont visualisé simultanément les fibres de collagène et d'élastine chez le même animal (fig.40 B) et mettent en évidence une répartition inégale des deux protéines au sein de la paroi aortique avec une prédominance nette de l'élastine au niveau médial de l'aorte. Bien que ces expériences soient réalisées chez le rat, des similitudes sont observées avec le cas humain et, qui plus est, cette observation correspond avec l'analyse spectrale que nous avons réalisée au niveau de l'aorte humaine.

Cette répartition peut expliquer que le spectre infrarouge de la média aortique est quasi identique à celui de l'élastine. On retrouve pourtant sur la figure 40B la présence d'une trame de collagène qui pourrait être à l'origine des légères modifications visualisées sur les bandes amide I et II du tissu par rapport au spectre de l'élastine pure. Pourtant, en comparant le spectre du tissu avec celui de l'élastine, on peut avancer que le signal est très fortement voire quasi exclusivement influencé par l'élastine. Par conséquent, nous pouvons faire l'hypothèse que nos résultats sont principalement influencés par les modifications de la trame élastique observées lors du développement d'un anévrisme.



A : Zoumi et al 2004 Biophysical journal



B : Chen et al 2007 Optik

Figure 40: Localisation des fibres élastiques et de collagène à l'aide de la microscopie de fluorescence biphotonique

Après traitement des spectres, nous les avons analysé à l'aide de différentes méthodes statistiques. La classification hiérarchique ascendante (HCA) est la méthode la plus habituellement utilisée afin de classer les spectres par groupes, selon leur degré d'homologie. Initialement, nous avons comparé les spectres issus de différentes parties de coupes aortiques. En observant la figure 40, nous comprenons pourquoi les spectres mesurés à proximité de l'intima soient légèrement différents de ceux issus des couches proches de l'adventice (fig.2 article n°1). La densité des fibres élastiques semble être fortement impliquée dans ces variations. Afin d'éviter que ces dernières ne perturbent nos résultats, nous avons utilisé le spectre moyen calculé à partir de l'ensemble des spectres individuels d'un échantillon. Dans un second temps, nous avons comparé des spectres issus de tissus normaux et de tissus anévrismaux afin de déterminer les zones spectrales les plus discriminantes entre tissus sains et pathologiques.

La réalisation du test de Student sur les spectres moyens nous a permis de définir différentes zones spectrales discriminantes entre les deux groupes d'échantillons. Selon les gammes spectrales utilisées, le taux de bonne classification varie avec un maximum de 100% pour la gamme 1000-1500  $\text{cm}^{-1}$  et de 93% pour celle comprise entre 1720-1480  $\text{cm}^{-1}$  correspondante aux bandes amides I et II. Ces deux gammes spectrales couvrent donc une large zone du spectre IR (1720-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) qui semble contenir une information très riche sur la composition de la paroi aortique, fortement corrélée à l'état du tissu analysé et permettant d'orienter la classification. En effet, un taux de 93% de bonne classification est déjà très correct puisque cela ne représente que deux tissus mal classés sur les 19 échantillons de cette étude.

Il est difficile de déterminer pourquoi la gamme 1500-1000  $\text{cm}^{-1}$  permet d'obtenir un taux de 100% alors que la région des bandes amides I et II ne permet qu'un taux de bonne classification de 93%. L'observation des spectres de collagène et d'élastine montre de fortes similitudes réparties sur l'ensemble de la gamme spectrale. L'altération de la matrice extracellulaire des anévrysmes devrait donc avoir un retentissement sur l'ensemble du spectre tissulaire.

Différentes hypothèses peuvent expliquer que les bandes amides I et II ne permettent pas des classifications parfaites :

- Au niveau du spectre infrarouge, la contribution de l'eau se retrouve en partie au niveau des bandes amide I et II. Peut-être une contribution de l'eau anormalement élevée pour ces échantillons est à l'origine de cette mauvaise classification. Cela implique donc que dans les

futures investigations des pathologies aortiques, il sera nécessaire de bien contrôler tous les paramètres avant de réaliser les mesures. En effet, le système n'étant pas purgé, les fluctuations atmosphériques en CO<sub>2</sub> et en particulier en H<sub>2</sub>O peuvent interférer sur des parties très informatives du spectre qui, dans notre cas, se résume aux bandes amides.

- Les bandes amides du tissu aortique présentent un profil spectral différent de celui de l'élastine pure. Après comparaison entre les spectres du tissu aortique, du collagène et de l'élastine, nous avons observé que les bandes amides I et II sont fortement influencées par le collagène alors que la gamme spectrale 1500-1000 cm<sup>-1</sup> l'est par l'élastine. En considérant la physiopathologie des anévrismes, essentiellement en rapport avec une altération de l'élastine on peut faire l'hypothèse que les bandes amides, prises dans leur intégralité, ne permettent pas de discriminer parfaitement différents tissus.

- Ces mauvaises classifications peuvent aussi être expliquées par des facteurs extérieurs, sans rapport avec le caractère sain ou pathologique du tissu, comme l'âge et le sexe ou les antécédents des patients. Aucune corrélation entre l'âge ou le sexe et les classifications n'a été mise en évidence. Cependant, de nombreux autres facteurs comme la tabagisme, un taux de cholestérol anormalement élevé, diabète, hypertension, etc...pourraient être considérés. En effet, il est probable que ces facteurs influencent les lésions retrouvées dans le tissu anévrysmal et donc les classifications. Des études complémentaires seront nécessaires pour définir leurs contributions respectives.

Les résultats obtenus sont très encourageants et mettent en avant le potentiel de la spectroscopie infrarouge dans le diagnostic des dilatations aortiques en apportant des informations biochimiques sur la paroi aortique. Il faut tout de même noter le nombre modeste d'échantillons avant de tirer des conclusions définitives sur le potentiel de discrimination entre tissus anévrysmaux et tissus normaux.

En conclusion, il est clair que le spectre IR contient des informations liées au caractère pathologique de l'aorte. Pourtant il est important de ne pas négliger certains paramètres extérieurs qui pourraient influencer les classifications. La reproductibilité des résultats devra être vérifiée grâce à l'analyse de nouveaux échantillons nécessitant l'élargissement de la banque de tissus.

**CHAPITRE II : ANALYSE *IN-VITRO* DE**  
**L'AORTE ASCENDANTE HUMAINE**  
**NORMALE ET ANÉVRISMALE PAR**  
**MICROSPECTROSCOPIE IRTF**

## D) L'imageur infrarouge Spectrum Spotlight 300 (Perkin Elmer, France)



Figure 41: Vue d'ensemble du dispositif Spotlight 300

L'imageur IR Spotlight 300 est commercialisé par la société Perkin Elmer Life Sciences (Les Ulis, France) (Fig.41). Il est constitué de l'association entre un microscope infrarouge et un spectromètre, le tout connecté à un ordinateur permettant une utilisation relativement intuitive.

La partie spectromètre contient la source de type MIR (lampe de tungstène) qui balaye une gamme de longueur d'onde comprise entre  $7000$  et  $700\text{ cm}^{-1}$  (moyen et proche infrarouge). Le trajet optique du rayonnement infrarouge est confondu avec celui de la lumière visible jusqu'au miroir l'orientant vers le détecteur. Le dispositif permet de travailler en transmission, réflexion ou encore en ATR (pour « Attenuated Total Reflection »).

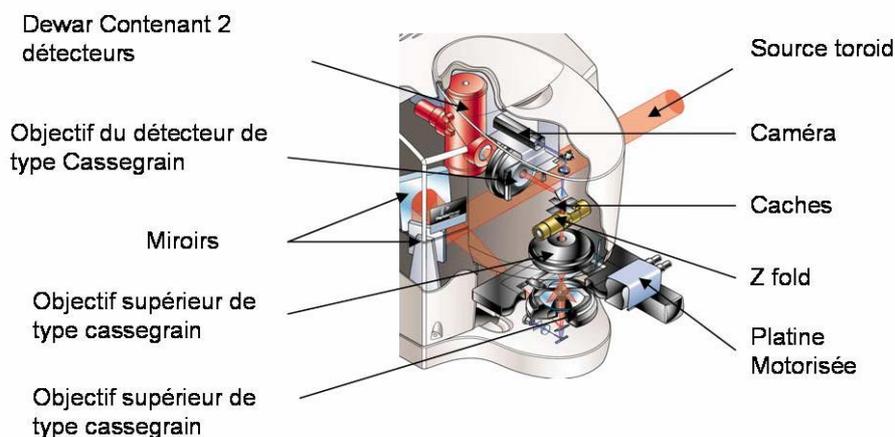


Figure 42: Trajet optique en mode transmission

Le faisceau infrarouge produit par la source arrive au niveau de la base du microscope infrarouge. Un premier jeu de miroir permet de le diriger vers l'objectif inférieur de type cassegrain qui focalise une première fois le faisceau avant d'interagir avec l'échantillon disposé sur la platine motorisée. L'interaction lumière-matière produit une diffraction que refocalise l'objectif supérieur de type cassegrain positionné au-dessus de l'échantillon. Le faisceau traverse ensuite le dispositif appelé « Z-fold » avant qu'un miroir l'oriente vers le détecteur contenu dans le dewar. Un dispositif spécialisé de type cassegrain supplémentaire est positionné juste avant le Dewar pour une ultime focalisation du faisceau (Fig.42).

La caméra numérique permet l'acquisition d'image visible. Le grossissement est fixe mais un processus de juxtaposition des champs de vision permet d'obtenir des images visibles de grande taille. La zone de travail est sélectionnée par l'opérateur aussi bien en mode point qu'en mode image.

Le cassegrain inférieur est mobile et permet donc d'optimiser l'énergie arrivant sur le détecteur en mode transmission. Lorsque le maximum d'énergie sature le détecteur, cela signifie que la focalisation est faite sur la surface de l'échantillon permettant d'optimiser le rapport signal/bruit.

La particularité de l'imageur Spotlight 300 vient sans aucun doute de ces différents modes d'acquisition liés à la présence des deux détecteurs distincts dans le même Dewar (Fig.43). Ces détecteurs nécessitent un refroidissement à l'azote liquide et ont une autonomie de 6 à 7 heures.

- Le premier détecteur, de style MCT, a une taille de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  et permet l'acquisition en mode point par point. Un système de cache rectangulaire permet de régler la taille de la zone d'acquisition.

- Le deuxième détecteur est en forme de barrette et contient 16 éléments de type MCT, chacun d'eux ayant une taille de  $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$ . Il permet de faire des acquisitions en mode image. Les éléments ne sont pas disposés de manière linéaire mais en quinconce sur deux colonnes. En mode image, le « Z-fold » permet de commuter entre les deux résolutions spatiales possibles. Un jeu de miroir permet de faire des acquisitions à des résolutions de  $6,25 \mu\text{m}$  (mode micro) ou  $25 \mu\text{m}$  (mode macro). Lorsque cette dernière est de  $6,25 \mu\text{m}$ , une surface de

6,25 x 6,25  $\mu\text{m}^2$  de l'échantillon est analysée et ramenée à un élément du détecteur (rapport de 1/1). Lorsque la résolution est de 25  $\mu\text{m}$  le jeu de miroir ramène une zone de 25 x 25  $\mu\text{m}^2$  de l'échantillon sur un seul élément du détecteur ce qui se traduit par un nombre de spectre 16 fois moins important que précédemment (résolution 6,25  $\mu\text{m}$ ), pour une même zone. De plus, pour un temps de mesure identique, le choix de la résolution de 25  $\mu\text{m}$  permet de balayer une zone 16 fois plus grande.

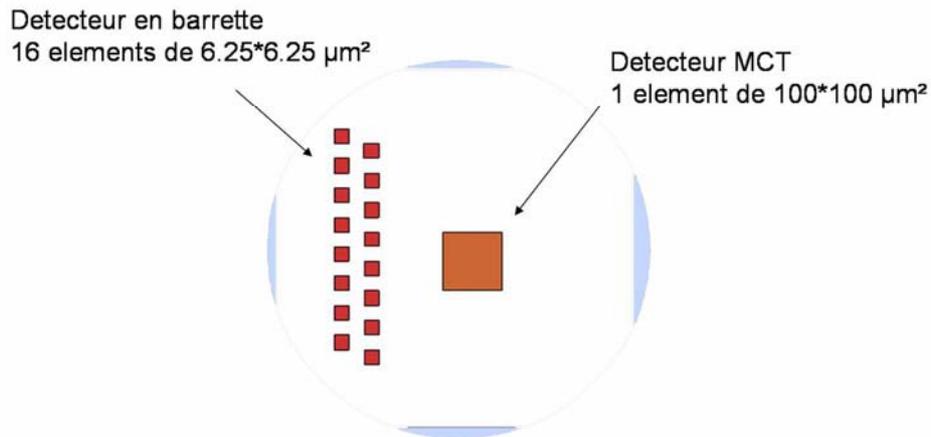


Figure 43: Représentation schématique des deux détecteurs dans le dewar

L'acquisition en mode image se fait en balayant l'échantillon à l'aide des 16 éléments du détecteur avec un pas de 6,25  $\mu\text{m}$ . A chaque cycle d'acquisition, les 16 éléments enregistrent chacun un spectre ce qui permet un gain de temps important par rapport au mode point par point (Fig.44).

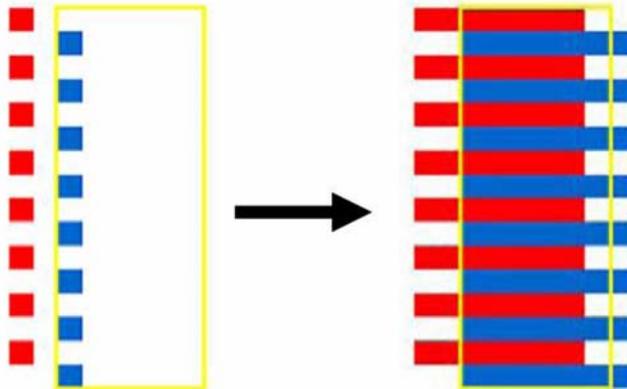


Figure 44: Le balayage du détecteur

## I.1 L'avantage de l'imageur Spotlight 300 face au FPA

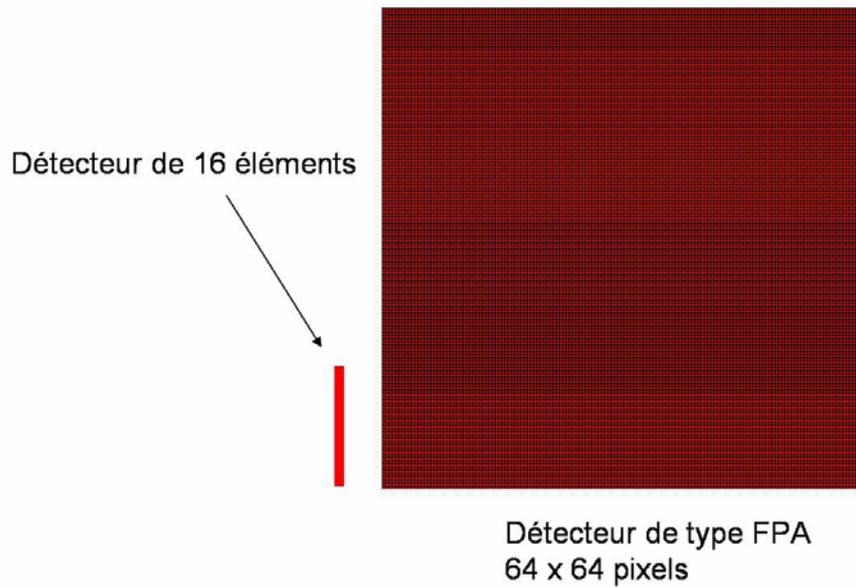


Figure 45: Comparaison des tailles des différents détecteurs

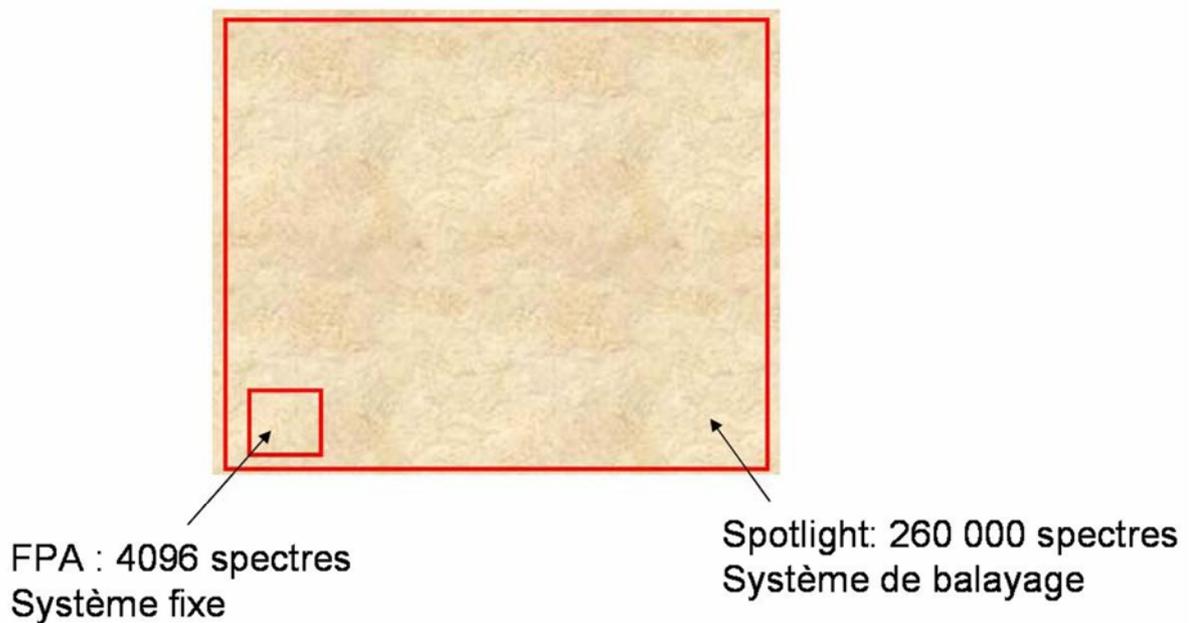


Figure 46: Comparaison des tailles des zones d'acquisition pour chaque détecteur

Les détecteurs de type FPA sont spécialement conçus pour l'imagerie. Si nous comparons la taille du détecteur du spotlight avec celui d'un FPA de 64x64 pixels, il apparaît que la zone

d'acquisition du FPA semble bien plus grande (Fig.45). Cependant de tels dispositifs sont fixes et ne permettent l'acquisition que d'une seule zone. Si on compare le potentiel de chaque dispositif quand à la taille d'acquisition le FPA permet d'obtenir 4096 spectres contre près de 260 000 au maximum pour le Spotlight (Fig.46). De plus, de récentes optimisations techniques donnent au Spotlight une qualité spectrale supérieure à celle des FPA. L'aspect financier est aussi favorable à l'imageur Spotlight.

### I.2 Paramètres d'acquisition retenus

- Taille de la zone d'acquisition : de l'intima à la limite de l'adventice, soit environ 1500\*190  $\mu\text{m}^2$
- Résolution spatiale : 6.25  $\mu\text{m}$
- Accumulation pour la référence : 128 scans (mesurée une seule fois)
- Accumulation sur le tissu: 32 scans
- Résolution : 4  $\text{cm}^{-1}$
- Gamme spectrale : 700-4000  $\text{cm}^{-1}$
- Temps d'acquisition : environ 3 heures (6500 spectres)

### I.3 Observation et analyse des images spectrales

Les données brutes sont obtenues sous la forme d'une image spectrale pour laquelle en chaque point de l'image, il est possible d'extraire le spectre correspondant. Une échelle de couleur arbitraire est établie et traduit l'absorbance moyenne de chaque spectre sur l'ensemble de la gamme spectrale, en chaque point de l'image.

Afin de visualiser la répartition d'un composé chimique au sein de l'échantillon, il est facilement possible de reconstruire des images à partir d'une fréquence unique ou bien sur une gamme plus large correspondante à un groupement chimique ou une zone d'intérêt (chemi-map).

Le logiciel d'acquisition Spotlight présente aussi des fonctions de correction intégrées et applicables à l'ensemble des spectres formant l'image. La correction atmosphérique est appliquée afin de minimiser les effets néfastes liés aux variations atmosphériques pendant l'acquisition. En effet, cet imageur ne présente pas de compartiment purgé au niveau du

microscope alors que la spectroscopie infrarouge est particulièrement sensible aux variations des CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O dans l'air ambiant. Même si cette correction n'est pas paramétrable, l'observation des spectres avant et après correction laisse penser que cette dernière utilise un lissage non uniforme du spectre qui semble plus intense sur les zones fortement influencées par les changements atmosphériques (Fig.47).

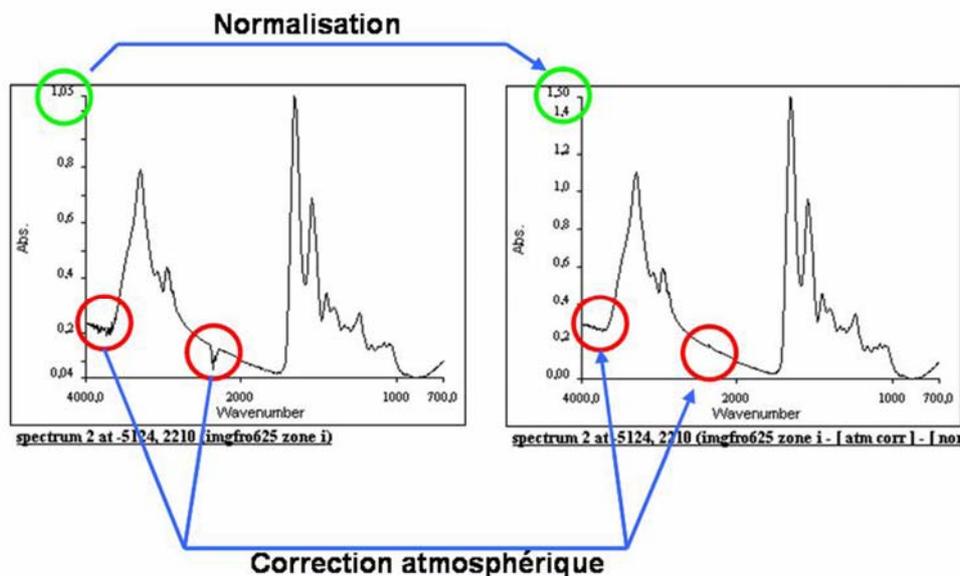


Figure 47: Exemples de prétraitement réalisable avec le logiciel Spotlight

Le logiciel propose également une fonction de lissage de type Savitski-Golay (à différent degré) ainsi qu'une normalisation vectorielle, mais on déplore l'absence de correction de ligne de base. Les calculs de dérivées premières, secondes voir supérieures sont possibles et permettent de compenser l'absence de la correction de la ligne de base.

Après l'application d'un prétraitement adapté, le calcul de moyenne est réalisé par l'application de la fonction « co-add spectra » sur la zone d'intérêt sélectionnée par l'opérateur. Les spectres sont ensuite enregistrés ce qui permet de les traiter dans des logiciels tiers.

D'autre part, nous avons utilisé une méthode de traitement basée sur les rapports de bandes (« band ratio »). Elle consiste à calculer le rapport entre les surfaces sous la courbe des deux bandes distinctes du spectre et d'observer l'évolution de ce ratio en fonction des échantillons. Pour les tissus aortiques, nous avons calculé les dérivées seconde des spectres de chaque

image, réalisé une normalisation avant de déterminer le rapport de bande suivant ( $1667-1643 \text{ cm}^{-1}/1642-1628 \text{ cm}^{-1}$ ). La fonction « cross-section » permet de visualiser les valeurs du rapport de bande sur une ligne traversant l'ensemble de l'image (Fig.48). La courbe des valeurs ainsi obtenues est exportable sous forme de table de valeur dans Excel et permet l'analyse mathématique des résultats.

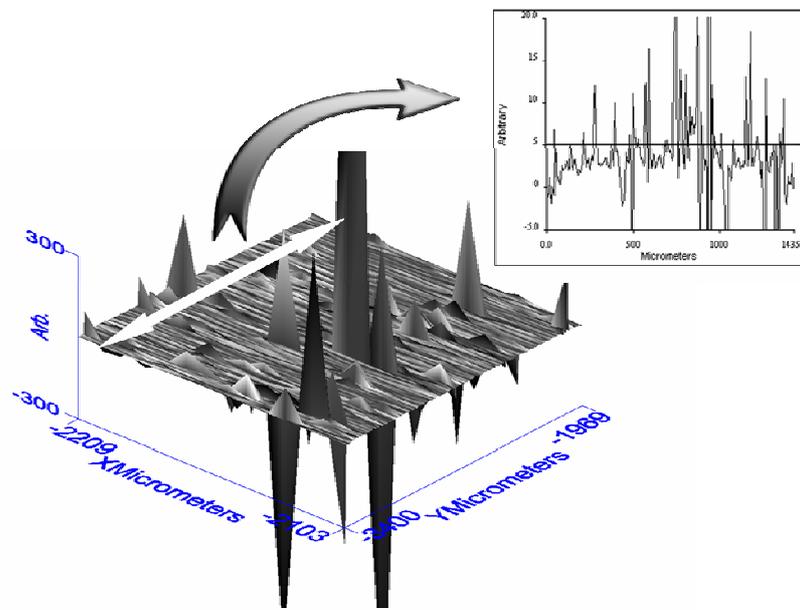


Figure 48: Image spectrale vue en 3D associée à la représentation d'une « cross-section » symbolisée par la flèche blanche

#### I.4 L'analyse en composante principale

Les objectifs d'une analyse en composantes principales (ACP) sont de réduire le nombre de variables et de détecter les relations qui existent entre elles afin de les classer. Les données passent alors d'une forme complexe à une forme simplifiée, comprenant moins de variables, tout en conservant la variance. Cette simplification des données facilite la représentation et l'interprétation des données.

Un ensemble de spectres dans un repère multidimensionnel avec autant de dimensions que de fréquences donne un nuage de point (Fig.49). L'algorithme va procéder à un changement de repère et place l'origine au centre du nuage de points. Le premier axe est celui avec la plus grande variabilité du nuage de points tout en minimisant la variabilité autour de cet axe afin qu'il soit au milieu du nuage de points. Il y aura dans ce repère autant d'axes que de composantes principales trouvées. La première composante principale représente le premier

axe du repère et comporte le maximum de variance. La deuxième composante principale est la deuxième axe, perpendiculaire au premier, avec la deuxième plus grande variance du nuage de points.

Il est possible d'extraire autant de composantes principales que de dimensions donc de fréquences dans le spectre. Pourtant, seules les premières composantes principales contiennent la plus grande part de l'information et les dernières ne représentent généralement que le bruit. L'ACP permet donc de supprimer une certaine redondance de l'information et le bruit contenu dans le signal spectral.

Pour réaliser la représentation graphique, on utilise deux composantes principales permettant de visualiser les spectres sous la forme d'un nuage de points dans un espace bidimensionnel. Les spectres les plus semblables seront donc les plus proches; ceci peut permettre de définir des groupes et de réaliser la discrimination des différentes classes.

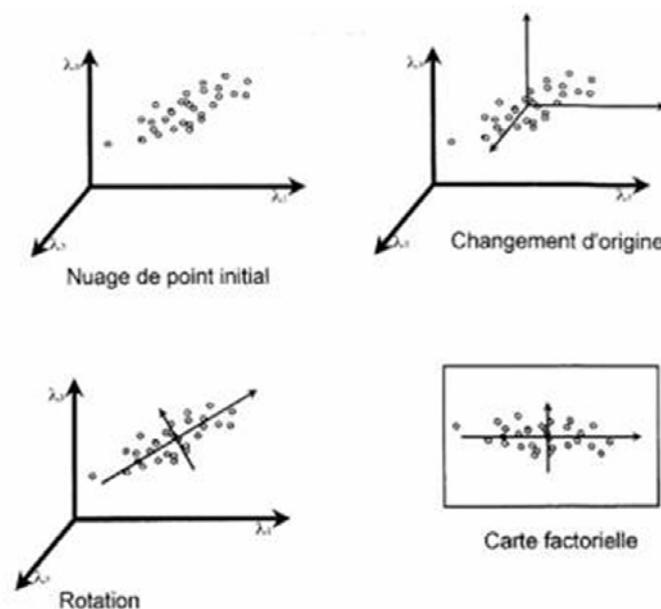


Figure 49: Représentation graphique du principe de l'ACP

## **II) Objectifs de l'analyse *in vitro* de tissus aortiques**

Le plus grand changement sur cette deuxième série de mesure est le passage à l'imagerie infrarouge grâce à l'utilisation de l'imageur Spotlight300 de la société Perkin Elmer Life Sciences au sein de notre laboratoire.

Trois objectifs apparaissent rapidement :

- Le premier est logiquement d'apprendre à tirer tout le potentiel de l'appareil et d'optimiser les conditions de mesure afin d'obtenir des informations spectrales exploitables dans le cadre de notre étude.

- L'impérative nécessité de valider les résultats obtenus précédemment en mode point grâce à un nouvel appareil et une nouvelle série d'échantillons aortiques. L'épaisseur des coupes a cependant été augmentée à 10  $\mu\text{m}$  par souci d'une meilleure conservation des structures tissulaires lors de la réalisation des cryosections afin de déterminer des zones discriminantes et de les comparer avec celles obtenues par les travaux précédents.

- d'augmenter le nombre de spectres obtenus par rapport au mode point par point en réalisant des acquisitions sur des images entières même si cette démarche nous a rapidement posé un problème de capacité de traitement des données spectrales. Les 3000 spectres et plus, contenus dans chaque image ne permettaient plus l'utilisation des techniques et logiciels d'analyse que nous avons précédemment utilisés. Il a donc été nécessaire d'imaginer de nouvelles méthodes d'analyse permettant d'extraire l'information discriminante des images spectrales tout en conservant la notion de localisation spatiale de l'information.

Pour ce faire, le travail fut partagé en deux étapes :

- La première fut l'analyse des images spectrales infrarouges grâce au logiciel Opus par l'utilisation de rapports de bandes sur les spectres et leurs dérivées, ce qui a permis une appréciation visuelle des résultats sans pour autant avoir à observer les spectres. Notre volonté était de rendre l'information accessible à des personnes ne possédant pas forcément de solides connaissances en spectroscopie. Il nous a semblé que l'utilisation de représentations sous forme d'image 3D serait plus facilement et plus intuitivement analysée.

- La deuxième étape fut d'appliquer une nouvelle méthode statistique d'analyse afin de discriminer les tissus aortiques sur de larges gammes spectrales. L'une de nos grandes préoccupations lors de cette étude fut de minimiser l'influence de la qualité des coupes de tissus aortiques sur nos résultats. L'application de méthode statistique telle que l'ACP, nous a permis de conserver l'information contenue dans le spectre dispersées dans les premières composantes et d'éliminer le bruit du spectre contenu dans les composantes suivantes. Ainsi une telle approche associée au prétraitement usuel nous a permis de minimiser l'impact de l'hétérogénéité des coupes sur la classification.

**Article n°2: *In-vitro* analysis of**  
**normal and human ascending aortic**  
**tissues using FT-IR**  
**microspectroscopy**

## In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy

F. Bonnier<sup>a</sup>, S. Rubin<sup>a,b</sup>, L. Ventéo<sup>c</sup>, C.M. Krishna<sup>d</sup>, M. Pluot<sup>c</sup>, B. Baehrel<sup>b</sup>,  
M. Manfait<sup>a,\*</sup>, G.D. Sockalingum<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité MéDIAN, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR 53, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France

<sup>b</sup> Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France

<sup>d</sup> Center for Laser Spectroscopy Manipal Academy of Higher Education, Manipal-576104, India

Received 9 January 2006; received in revised form 19 May 2006; accepted 19 May 2006

Available online 2 June 2006

### Abstract

FTIR microspectroscopy has shown to be a proven tool in the investigation of many tissue types. We have used this spectroscopic approach to analyse structural differences between normal and aneurismal aortic tissues and also aortas from patients with congenital anomalies like aortic bicuspid valves. Spectral analysis showed important variations in amide I and II regions, related to changes in alpha-helix and beta-sheet secondary structure of proteins that seem to be correlated to structural modifications of collagen and elastin. These proteins are the major constituents of the aortic wall associated to smooth muscular cells. The amide regions have thus been identified as a marker of structural modifications related to these proteins whose modifications can be associated to a given aortic pathological situation. Both univariate (total absorbance image and band ratio) and multivariate (principal components analysis) analyses of the spectral information contained in the infrared images have been performed. Differences between tissues have been identified by these two approaches and allowed to separate each group of aortic tissues. However, with univariate band ratio analysis, the pathological group was found to be composed of samples from aneurismal aortas associated or not with an aortic bicuspid valve. In contrast, PCA was able to separate these two types of aortic pathologies. For other groups, PCA and band ratio analysis can differentiate between normal, aneurismal, and none dilated aortas from patients with a bicuspid aortic valve. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** FTIR microspectroscopy; Aortic tissue; Aneurysm; Aortic bicuspid valve; PCA analysis

### 1. Introduction

Human aneurism is a common pathology encountered daily in the cardio-vascular surgery unit. Different pathologies of the aortic wall, such as aortic ectasia, stenosis or aneurysm are known [1]. The most important corresponds to dilations with or without atheroma (accumulation of lipid, calcium, and fibrosis). The exact physiopathology of this aortic dilatation is unknown but implication of Matrix Metalloproteinases or presence of congenital valve malformation is clearly associated with pathology. Macroscopic examination confirms modifications of physical characteristics with dilation, decrease of elastance and aortic wall resistance. The development of aneurysm is

multifactorial [2–6]; the final outcome of the pathology being a rupture of aortic wall, causing the death of patient in the following minutes.

At present, the main dilemma for the surgeon is to take a decision, during a heart-surgical act, whether it is necessary to replace the ascending part of aortas at the same time. To date, there is no tool available that can help the surgeon to take the proper decision. For the patient, a second surgery and replacement of the aorta many years later, increases the risk of complications by a factor of 10 [7,8]. Therefore, development of new methods that can assist the surgeon could be very helpful and beneficial to patients.

Characterisation of the different tissue types is an important issue in view of evaluating the stage of the aortic disease and it could be in the future an important parameter of the surgical decision. Application of spectroscopic methods offers the

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 35 74; fax: +33 3 26 91 35 50.

E-mail address: [michel.manfait@univ-reims.fr](mailto:michel.manfait@univ-reims.fr) (M. Manfait).

possibility to analyse the structural information contained in a larger area of the tissue sample and to combine morphological and chemical information.

In this study, we make a preliminary attempt to use Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy as an *in vitro* analytical tool for discriminating between normal and pathological human aortic tissues on the one hand, and to differentiate between the different pathological tissue types, encountered during surgery, on the other hand.

## 2. Material and methods

### 2.1. Aortic samples

Biopsies of aortic tissues obtained after surgeries were classified following the 4 different groups: normal tissues, tissues from patients with bicuspid valves, aneurismal tissues from patients without bicuspid valves, and aneurismal tissues from patient with bicuspid valves. Bicuspid aortic valve is a congenital disease with only 2 aortic leaflets instead of three normal leaflets.

Bicuspid aortic valves are often associated with moderate dilations of the ascending aorta which are more difficult to assess.

Normal tissues were obtained on heart explants after a cerebral death. The different pathological samples were conserved after surgical replacement acts of pathological aortas.

All samples were first conserved in sterile physiological serum just after surgery. Only tissue stripes of 20 mm × 8 mm size were snap-frozen in liquid nitrogen and conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Infrared imaging was performed on 10  $\mu\text{m}$  thick cryosections placed on infrared transparent ZnSe windows.

### 2.2. Infrared imaging of aortic tissue sections

Spectral images were acquired using the infrared imaging system Spotlight 300 (Perkin Elmer Life Sciences, France). Acquisition areas were disposed in the

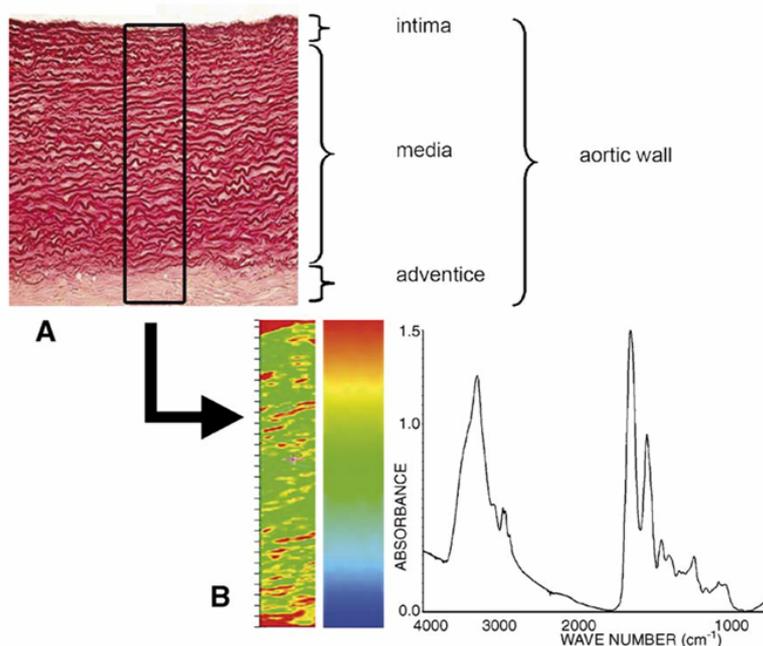


Fig. 1. (A) Histological preparation of aortic tissues. Section of orcein stained tissue showing presence of the three layers (intima, media, and adventice) of the aortic wall. The black striates present in tissue correspond to elastic fibres. (B) Total absorbance FT-IR image obtained after spectral acquisition in the selected area represented by the black triangle. The arbitrary colour scale represents total absorbance of spectra in the frequency range  $4000\text{--}720\text{ cm}^{-1}$ . Each pixel (size:  $6.25\text{ }\mu\text{m}$ ) corresponds to one spectrum (32 scans at  $4\text{ cm}^{-1}$ ) which can be extracted from the image and displayed as shown.

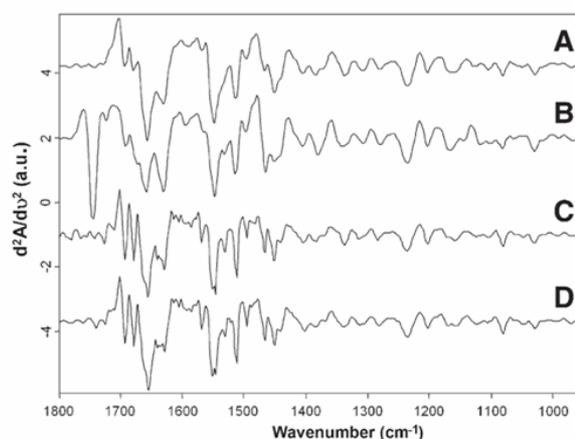


Fig. 2. Normalised second derivative of mean FT-IR spectra of aorta of four different groups of tissues. A, healthy tissue; B, tissue from patient with aortic bicuspid valve; C, aneurismal tissue from patient with normal (tricuspid) valve; and D, aneurismal tissue from patient with aortic bicuspid valve. All other conditions are as in Fig. 1.

thickness of aortas, across the three layers of the aortic wall as this is schematised in the orcein stained section which reveals the lamellar structures (Fig. 1A). IR images were acquired with a liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector composed of 16 pixel elements which can be operated either at  $6.25$  or  $25\text{ }\mu\text{m}/\text{pixel}$  resolution. In our study we used the highest spatial resolution. Spectral resolution was set to  $4\text{ cm}^{-1}$ . Each absorbance spectrum composing the IR images, and resulting of 32 scans, was recorded for each pixel in the transmission mode using the Spotlight software (Perkin-Elmer). An example of an IR image based on the total absorbance and an individual pixel spectrum is shown in Fig. 1B. In these conditions, a typical area of about

1300 × 100 μm<sup>2</sup>, containing about 3000 spectra, required a recording time of about 2 h.

### 2.3. Data pre-processing and analysis

The Spotlight software used for acquisition was also used to pre-process the spectra. IR spectral images were produced by using the absorbance in a given frequency range, in particular here 950–1750 cm<sup>-1</sup>. Spectra contained in the spectral images were in turn analysed using both a univariate approach (band ratio) and a multivariate approach based on Principal Components Analysis (PCA).

The atmospheric correction function was applied to all IR images to compensate for water vapour and contributions present in the spectra. Spectra were also subjected to a Savitzky Golay smoothing procedure (9 points). The second derivative was calculated for all spectra followed by a vector normalisation to compensate for baseline drift and sample thickness respectively (Fig. 2).

For PCA analysis we proceeded as follows: for each spectral image, about 10 zones each containing 25 spectra were selected and averaged. Mean spectra were pre-treated in the same way as explained above and were used for clustering.

Band ratio calculation: 3-D images were produced from the absorption spectra using the ratio of band areas in two regions of interest 1445–1335 and 1700–1485 cm<sup>-1</sup>. Data from spectral images were further assessed by calculating the ratio (R) of band areas from the second derivative spectra of the protein absorption region: 1667–1643 over 1642–1628 cm<sup>-1</sup>.

## 3. Results and discussion

The aortic tissue is composed of three layers (internal to external): the intima, the media and the adventice. The intima, in contact with blood, is a single layer of endothelial cells; the media, which is more implicated in aortic pathologies, is composed of concentric cylinders of smooth muscular cells associated with fibres of collagen and elastin; and the adventice, the most external layer, is composed of connective tissue with small vessels for aortic wall vascularisation. This last layer is elastic but with good resistance properties.

The infrared spectrum represents the global molecular composition of the studied tissue and reflects here the aortic wall composition at a given spatial position (Fig. 1B). The most important constituents are fibrous proteins like elastin and collagen. The 1800–950 cm<sup>-1</sup> frequency range contains the major part of the information coming from these two proteins together with contributions from other cells and tissues molecular components like polysaccharides, nucleic acids, lipids and fats. To highlight the spectral features, Fig. 2 shows second derivative of the mean spectra in the 1800–950 cm<sup>-1</sup> absorption region, corresponding to the normal tissue (Fig. 2A) and three different pathological situations encountered during surgery (2B: tissue from a patient with an aortic bicuspid valve; 2C: aneurismal tissues from patients with a normal (tricuspid) valve; 2D: aneurismal tissues from patients with an aortic bicuspid valve). Specific regions have been identified [9,10] corresponding to Amide I and II bands, respectively, centred near 1650 and 1545 cm<sup>-1</sup>; the regions between 1050 and 1450 cm<sup>-1</sup> also contain additional vibrational information about proteins and significant contributions of collagen appear at 1080, 1205 and 1340 cm<sup>-1</sup>. It can be noted that the spectrum displayed in Fig. 2B, corresponding to a tissue originating from a patient with an aortic bicuspid valve, exhibits an additional

marked peak at 1740 cm<sup>-1</sup>, assigned to an ester carbonyl, which could be from cholesterol esters. This appears quite peculiar because one would expect to see presence of cholesterol esters peak in cases of aneurysm and not in that of bicuspid aortic valve. However, it must be pointed out that this assignment is based on the fact that this particular patient had a very high cholesterol level and that the presence of this peak cannot systematically be assigned to aneurysms and presence of atheroma.

The spectral window contains other interesting features and reveals some marked differences on the structural conformation of proteins [11,12]. The absorption band in the 1667–1643 cm<sup>-1</sup> region represents alpha helical structure whereas the band comprised between 1642 and 1628 cm<sup>-1</sup> can be assigned to beta-sheet secondary structure.

### 3.1. Analysis of the spectral information contained in IR images

One of the advantages of spectral images is that they contain both chemical and spatial information. The rapidity of modern IR imaging makes it possible to generate images from large tissue sizes and the richness of the spectral information contained makes it an interesting *in vitro* method to study the changes between healthy and pathological specimens [13]. However, the generation of an increasing number of spectra (reaching several thousands in some cases) via such approach which needs to be treated, makes the task more and more difficult. In this study we have analysed our data using two different approaches based either on a univariate (band ratio or specific spectral window) or on a multivariate method (principal components analysis, PCA).

From the information observed in the comparison of mean spectra or their second derivatives, IR images have been built using the band area ratio 1445–1335/1700–1485 cm<sup>-1</sup>. In order to compare the tissue types, these images have been scaled to the same intensity. As can be seen in Fig. 3A, the spectral image corresponding to a normal tissue exhibits a very flat and quite homogeneous profile. On the other hand, the diseased tissue carrying an aneurysm shows a very inhomogeneous profile (Fig. 3B). Using this 3D representation of spectral images, new light can be shed on a doubtful case or a surgical dilemma such as that of a patient with a bicuspid aortic valve. This is demonstrated in Fig. 3C, where the profile obtained is intermediate and tends to indicate that this tissue already shows early characteristics of a pathological situation. Recent studies have demonstrated that bicuspid aortic valve is related to genetic matrix and elastin disorders probably also implied in some ascending aortic dilations and aneurysms [3,14,15]. Thus, this type of approach is interesting and can be helpful for diagnostic purposes since it can give complementary information on the nature of the tissue that is difficult to appraise by histopathology.

Another way of exploiting the data contained in a spectral image can be via band ratio analysis. From the derivative spectra, we observed differences in the protein absorbing region in the range 1667–1643 cm<sup>-1</sup> and 1642–1628 cm<sup>-1</sup>

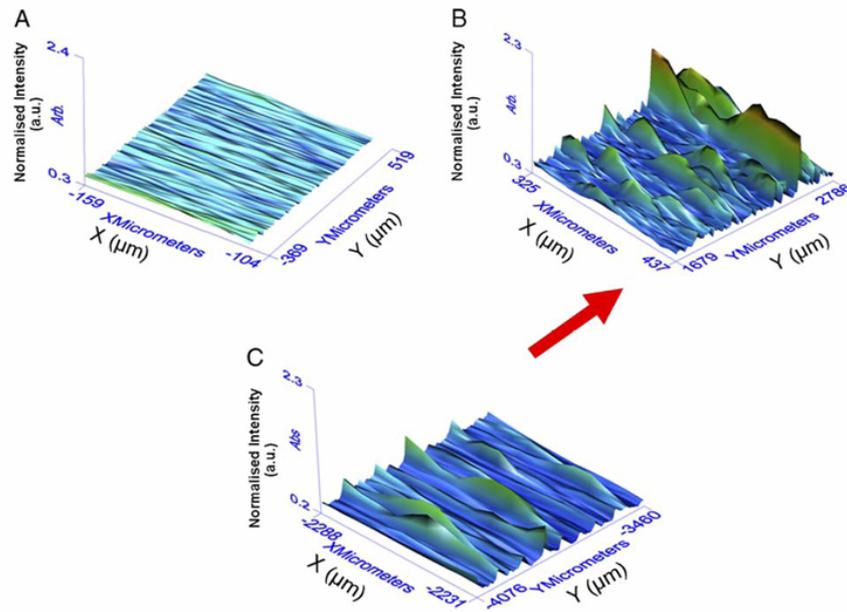


Fig. 3. 3D visualisation showing spectral images built on the band ratio 1445-1335/1700-1485  $\text{cm}^{-1}$  of FT-IR spectra. The first band includes mainly the CH vibrations of proteins while the second region corresponds to their C=O and N-H modes (Amide I and II respectively). For a better comparison, all images have been scaled to the same intensity. The healthy tissue shows a flat and homogeneous profile (A) while the aneurysmal tissue exhibits a more inhomogeneous appearance (B). The tissue corresponding to a bicuspid aortic valve shows a tendency which is intermediate (C) indicating early signs of a pathological situation.

corresponding respectively to alpha-helical and beta-sheet secondary structures. Since tissue modification and consequently the associated aortic pathology is related to the degradation of the fibrous proteins (collagen and elastin) of the different tissues, we have used the ratio of these two bands ( $R = 1667-1643 \text{ cm}^{-1} / 1642-1628 \text{ cm}^{-1}$ ) present in the protein absorption region to monitor the changes within each tissue type. The calculation of this band ratio was carried out for each spectrum across a line following the cross section of the

tissue, from the intima to the adventice, and the average and standard deviation were evaluated. For each tissue type, ten different lines were calculated and the results are presented in the form of histograms in Fig. 4. This allows to compare the evolution of protein structure in relation with tissue type. Three distinguished groups came out of this analysis: tissue from patient with a bicuspid aortic valve is represented by a very low ratio ( $R < 2$ ); those from healthy patients with an average value ( $R \sim 4$ ), and the two groups containing

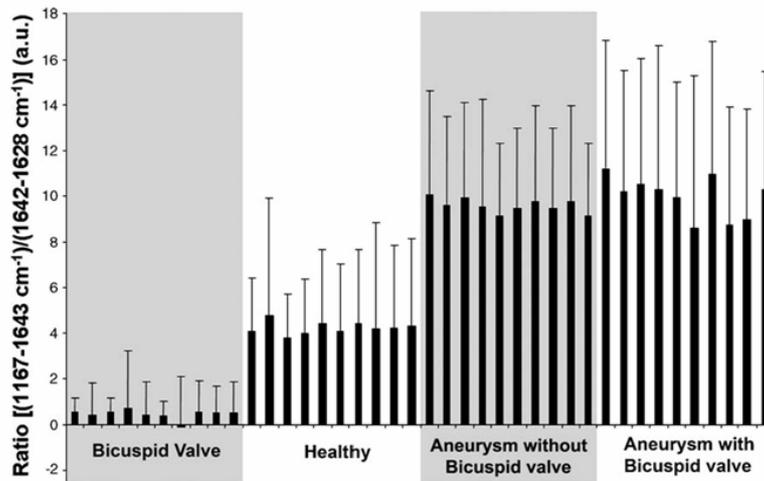


Fig. 4. Histogram of the band area ratio ( $R = 1667-1643 \text{ cm}^{-1} / 1642-1628 \text{ cm}^{-1}$ ) for the four tissue types, calculated from second derivative spectra. Each bar represents the average value of R calculated for each spectrum along a line through the tissue cross section from the intima to the adventice. For each tissue type, 10 cross sections were calculated. We note that due to sample preparation, holes and kinks can appear in the tissues and consequently some points can give aberrant values of R. These have been omitted in this calculation.

aneurismal patients with and without a bicuspid valve exhibiting higher values of this ratio ( $R \sim 10$ ). We point out that due to sample preparation, holes and kinks can appear in the tissues and consequently some points can give aberrant values of  $R$ . These have been omitted from this calculation and not presented. This analysis shows that healthy aorta presents a value near 4 and can be considered as a reference for comparison with different pathological tissues. Other tissue types fall either below or above this reference value.

Collagen and elastin fibrous proteins constitute the most important components of the aortic wall. Collagen is composed principally of alpha helix while elastin is made essentially of beta sheets secondary structures [16–18]. Consequently, a variation in collagen or elastin content (or both) can be directly associated with modifications in the spectral profile of bands representative of alpha and beta structures. Bicuspid aortic valve is a congenital malformation which can be associated with a particular structure of the aortic wall. By inspecting the second derivative spectra of this tissue (data not shown), we noticed that the band corresponding to beta structures ( $1642\text{--}1628\text{ cm}^{-1}$ ) remained constant while that of alpha helical structure ( $1667\text{--}1643\text{ cm}^{-1}$ ) decreased. In the case of patient with aortic bicuspid valves, the decrease of the band assigned to alpha structure can be associated to a collagen depletion in the aortic wall.

Compared to healthy tissues, aneurismal tissues (with or without bicuspid valves) present similar band intensities for alpha helix type structure. So, collagen structure seems to be equally present. The difference appears in bands in the  $1642\text{--}1628\text{ cm}^{-1}$  region. The decrease in beta structures in such tissues indicates elastin depletion or simply a modification of elastin structure in relation with the aneurysm development [19,20], which causes a loss of parallelism in this artery wall making it less elastic and more fragile.

Comparison of tissue specimens from aortic bicuspid valves and aneurysm with aortic bicuspid valves shows a strong increase in alpha structure between these two types of pathologies. A plausible explanation could be a reaction of the body against the development of a pathological situation in the form of a synthesis of collagen to consolidate the aortic wall.

### 3.2. Multivariate analysis of spectral information using PCA

Principal components analysis (PCA) is a powerful and objective tool that has been successfully used as an effective approach to visualise and to mine information from data tables with a large number of variables such as those contained in FTIR spectra. The discriminant information can then be helpful to differentiate various pathological situations in cell and tissue investigations [21,22]. The advantage of PCA over univariate methods is that it can look for the maximum variance in a large data set by comparing all the absorption wavelengths. In order to optimise the discrimination between the different tissue types, we used second derivative spectra as input for the PCA. The frequency range between  $950\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ , containing not only collagen and elastin main absorption peaks the principal proteins that constitute the arteries wall, but also

other macromolecules, was used for the chemometric evaluation. Six tissue specimens were analysed and characterised as follows: 1 healthy tissue, tissue of 1 patient with aortic bicuspid valve, aneurismal tissues from 2 patients without aortic bicuspid valve, and aneurismal tissues from 2 patients with aortic bicuspid valve. Our first goal was to evaluate the possibility of discriminating tissues of healthy patient from those with different pathologies by using the PCA approach. The 2D-scatter plot displayed in Fig. 5 shows that by using the two first principal components, three distinct clusters could be obtained. The first cluster is composed of mean derivative spectra from the healthy tissue, the second cluster groups those obtained from a patient with bicuspid aortic valve, and the last cluster contained those from the remaining 4 cases corresponding to aneurismal tissues from patients with or without aortic bicuspid valves. The first loading vector or PC1 accounts for 33% of the explained variance and permits to discriminate healthy from pathological tissues. PC2 accounts for 28% of the explained variance and allows separating tissues with aortic bicuspid valves. As can be seen, the plot of PC1 versus PC2 offers a good discrimination of spectra of the different tissue types without any outliers. Modification in aortic structure due to genetics pattern or modification of blood pressure could explain the structural differences observed in the tissues. From a spectroscopic point of view, tissues of patients with aortic bicuspid valves seem to be not normal although their aortic diameter is normal. Patients with aortic bicuspid valves present aortic structural modifications associated with valve malformation. However, this aortic wall modification is not considered as pathological because of the absence of aortic dilation but rather as a predisposition to future aneurysm development. This is an

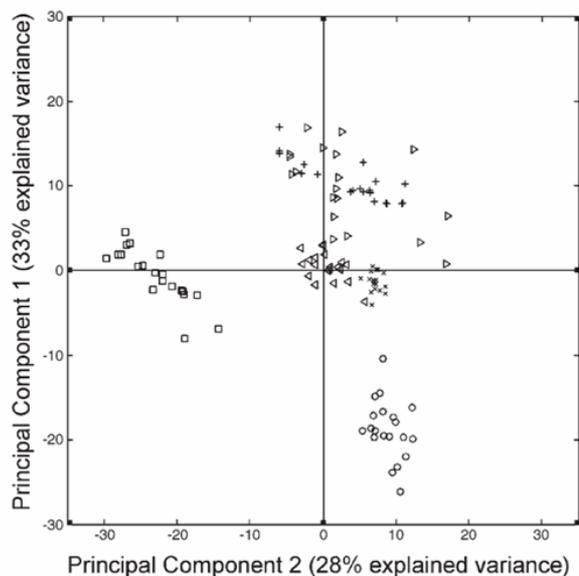


Fig. 5. Discrimination of six different aorta tissues by Principal Component Analysis method. Components 1 and 2 of second derivative of infrared spectra over the range  $950\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$  were used to define 2D space representations.  $\circ$ : healthy,  $\square$ : aortic bicuspid valves,  $\triangleright$  and  $\triangleleft$ : aneurysms without bicuspid valve,  $+$  and  $\times$  aneurysms associated to aortic bicuspid valve.

interesting aspect because the spectroscopic method shows the potential to reveal biochemical alterations in tissues even before diagnosis of the disease, which is here based on the molecular and morphological changes of the main constituents of the aortic tissue. The second objective was to differentiate between aneurysms with or without bicuspid valves. This was more difficult as was also the case using band ratio analysis. Therefore, results on band ratio and PCA analyses confirm this observation. An important observation in this study is that FTIR spectroscopic data give 2 distinct groups of non dilated tissues (healthy and patient with aortic bicuspid valve) which seem to form a single group with the advent of an aneurysm.

#### 4. Conclusion

Over the last few years, FTIR microspectroscopy and imaging has improved in both rapidity and performance as an analytical tool. It is suitable for in vitro investigation of healthy and pathological tissues since it combines both spatial and chemical information. In this study we have shown that the spectral images can be interpreted using different approaches based on either univariate or multivariate methods. Three-dimensional representation using absorbance values, after pre-processing of data, could be one way of visualising spectral images in view of recognising healthy from aneurysmal tissues and can also show the trend of suspected tissues. Using simple band ratio such as alpha-helical to beta-sheet content and multivariate analysis like PCA, the spectral information contained in the IR images can be used to characterise tissues with aortic diseases like aneurysmal dilations. Moreover, this approach highlights tissue composition differences between non dilated aortic tissues from patients with tricuspid or bicuspid aortic valves. Spectral modifications seem to be strongly correlated to collagen and elastin conformational modifications. However, the importance of the contribution of these proteins in each tissue category needs to be clearly established. This preliminary study based on a limited number of samples will be completed by increasing the recruitment of biopsies for each tissue type.

#### References

- [1] E. Arteaga-Solis, B. Gayraud, F. Ramirez, Elastic and collagenous networks in vascular diseases, *Cell Struct. Funct.* 25 (2000) 69–72.
- [2] H. Nagase, J.F. Woessner Jr., Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21491–21494.
- [3] C.M. Dollery, J.R. McEwan, A.M. Henney, Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease, *Circ. Res.* 77 (1995) 863–868.
- [4] T. Taketani, Y. Imai, T. Morota, K. Maemura, H. Morita, D. Hayashi, T. Yamazaki, R. Nagai, S. Takamoto, Altered patterns of gene expression specific to thoracic aortic aneurysms: microarray analysis of surgically resected specimens, *Int. Heart J.* 46 (2005) 265–277.
- [5] D. Bonderman, E. Gharehbaghi-Schnell, G. Wollenek, G. Maurer, H. Baumgartner, I.M. Lang, Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation, *Circulation* 99 (1999) 2138–2143.
- [6] D.M. Milewicz, K. Michael, N. Fisher, J.S. Coselli, T. Markello, A. Biddinger, Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms, *Circulation* 94 (1996) 2708–2711.
- [7] G.B. Luciani, G. Casali, G. Faggian, A. Mazzucco, Predicting outcome after reoperative procedures on the aortic root and ascending aorta, *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.* 17 (2000) 602–607.
- [8] A. Avolio, D. Jones, M. Tafazzoli-Shadpour, Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media, *Hypertension* 32 (1998) 170–175.
- [9] J.M. Gentner, E. Wentrup-Byrne, P.J. Walker, M.D. Walsh, Comparison of fresh and post-mortem human arterial tissue: an analysis using FT-IR microspectroscopy and chemometrics, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 44 (1998) 251–259.
- [10] C.S. Colley, S.G. Kazarian, P.D. Weinberg, M.J. Lever, Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques, *Biopolymers* 74 (2004) 328–335.
- [11] C.C. Orfanidou, S.J. Hamodrakas, G.D. Chryssikos, E.I. Kamitsos, S.E. Wellman, S.T. Case, Spectroscopic studies of *Manduca sexta* and *Sesamia nonagrioides* chorion protein structure, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 (1995) 93–98.
- [12] L. Debelle, A.J. Alix, M.P. Jacob, J.P. Huvenne, M. Berjot, B. Sombret, P. Legrand, Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26099–26103.
- [13] L. Debelle, A.J. Alix, The structures of elastins and their function, *Biochimie* 81 (1999) 981–994.
- [14] P.W. Fedak, M.P. de Sa, S. Verma, N. Nili, P. Kazemian, J. Butany, B.H. Strauss, R.D. Weisel, T.E. David, Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126 (2003) 797–806.
- [15] D. Pacini, L. Di Marco, A. Loforte, E. Angeli, A. Dell'amore, M. Bergonzini, R. Di Bartolomeo, Reoperations on the ascending aorta and aortic root. Early and late results? *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 46 (2005) 491–498.
- [16] A. Tfayli, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard, M. Manfait, Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1724 (2005) 262–269.
- [17] K.F. Smith, P.I. Haris, D. Chapman, K.B. Reid, S.J. Perkins, Beta-sheet secondary structure of the trimeric globular domain of C1q of complement and collagen types VIII and X by Fourier-transform infrared spectroscopy and averaged structure predictions, *Biochem. J.* 301 (Pt. 1) (1994) 249–256.
- [18] D. Wetzel, G. Post, R. Lodder, Synchrotron infrared microscopic analysis of collagens I, III and elastin on the shoulders of human thin-cap fibroatheromas, *Vib. Spectrosc.* 38 (2005) 53–59.
- [19] F.H. Silver, I. Horvath, D.J. Foran, Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 29 (2001) 279–301.
- [20] T. Savunen, H.J. Aho, Annulo-aortic ectasia. Light and electron microscopic changes in aortic media, *Virchows Arch. A: Pathol. Anat. Histopathol.* 407 (1985) 279–288.
- [21] C. Murali Krishna, G. Kegelaer, I. Adt, S. Rubin, V.B. Kartha, M. Manfait, G.D. Sockalingum, Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1726 (2005) 160–167.
- [22] A.M. Nilsson, D. Heinrich, J. Olajos, S. Andersson-Engels, Near infrared diffuse reflection and laser-induced fluorescence spectroscopy for myocardial tissue characterisation, *Spectrochim. Acta, A Mol. Biomol. Spectrosc.* 53A (1997) 1901–1912.

### **III) Approche complémentaire par analyse multivariée des données infrarouge**

L'arrivée de nouvelles technologies telles que le Spotlight 300 au sein de notre laboratoire a donc permis d'augmenter le pool de données obtenues lors de chaque acquisition. Cependant, face à cette augmentation considérable du nombre de spectres, il fut nécessaire d'adapter les modes d'analyse. Il est donc très rapidement apparu nécessaire de coupler les acquisitions faites au laboratoire avec une approche statistique nouvelle permettant de prendre en compte l'ensemble des spectres des images. Dans le cadre d'une approche préliminaire, il s'agit donc ici d'évaluer la faisabilité d'étudier l'ensemble de nos images spectrales à l'aide d'un modèle statistique novateur et performant.

#### **II.1 Le logiciel Matlab (MathWorks\*)**

Le logiciel MATLAB pour MATrix LABoratory est basé sur le calcul matriciel. Il permet de résoudre de manière rapide des problèmes numériques complexes par l'utilisation de fonctions intégrées et à plusieurs programmes outils regroupés sous la forme de boîte à outils (Toolbox). Les lignes de commandes peuvent être tapées une à une dans la fenêtre des commandes ou sous la forme d'un script dans un éditeur. L'exécution des scripts correspond à l'application des commandes introduites une à une. Le traitement des spectres a été rendu possible par la transcription des différentes fonctions nécessaires aux traitements des spectres sous forme de ligne de commande MATLAB.

#### **II.2 L'analyse factorielle discriminante**

Il s'agit d'une méthode descriptive et explicative, apparentée à l'analyse en composante principale (ACP). Elle s'applique à des données quantitatives sur lesquelles est déjà définie une typologie. Dans le cas de l'étude des tissus aortiques normaux ou anévrismaux, comme pour l'ACP classique, le but est de réduire le nombre de dimensions des données en recherchant celles permettant de discriminer les différentes classes de tissus. La représentation visuelle des résultats se fait sous forme de graphiques factoriels plans qui permettent de visualiser l'information spectrale discriminante pour chaque observation ou individu.

### III.3 Analyse multivariée des données spectrales infrarouge

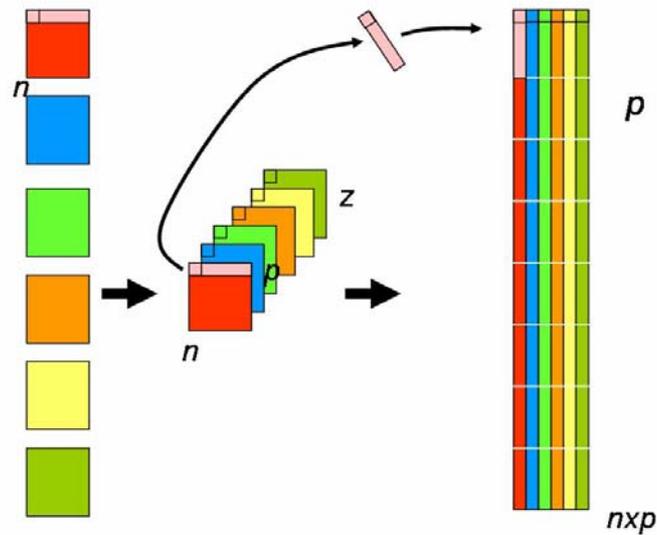


Figure 50: Représentation graphique de la méthode de dépliage des images spectrales

Les images spectrales se présentent sous forme d'un cube de données avec les coordonnées x/y (représentées par les variables  $n$  et  $p$ ) et un plan  $z$  qui représente chaque longueur d'onde des spectres. Par conséquent, la projection spatiale des images spectrales est un cube en trois dimensions qu'il est possible de ramener à une matrice à deux dimensions plus facilement analysable dans les logiciels adaptés. Cette étape de dépliage (« unfolding ») consiste à mettre bout à bout les lignes correspondantes aux positions  $y$  et cela pour chaque fréquence du spectre, ce qui au final nous permet d'éliminer le plan  $Z$ , sans pour autant perdre d'information (Fig.50).

Dans un premier temps, 47 images spectrales provenant de 8 échantillons différents ont été utilisées. L'ensemble des images spectrales donne un total de 170 000 spectres, chacun enregistré sur la gamme spectrale  $4000-700\text{ cm}^{-1}$  présentant 1650 nombres d'ondes. Au final 280 millions de valeurs numériques ont été générées. Malgré les évolutions importantes de l'informatique, il est impossible de traiter cette masse de données avec les logiciels dont nous disposons. Il a donc fallu trouver un moyen de réduire cette masse de variables afin de ressortir l'information utile présente mais non facilement individualisable sans la mise au point d'une analyse poussée (Fig.51).

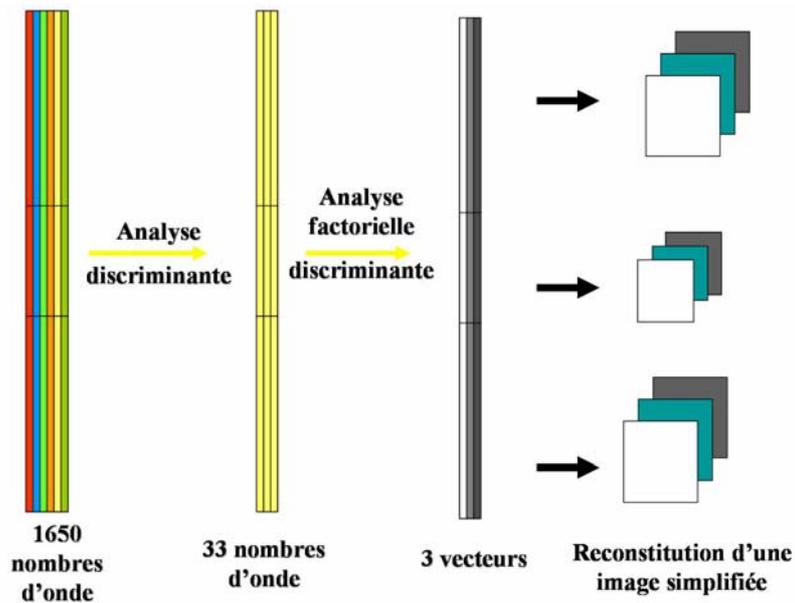


Figure 51: Les différentes étapes de l'analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse discriminante permet de sélectionner les nombres d'ondes les plus discriminants. Ainsi 1 ligne sur 50 est prise en considération permettant alors de réduire la matrice à 3400 lignes et 1650 colonnes. Basé sur un modèle d'analyse discriminante ascendante, les spectres sont ensuite classés suivant 4 groupes préalablement définis (correspondantes aux différents groupes tissulaires). Pour ce faire, les données relatives aux différents nombres d'ondes discriminants sont successivement testées par ordre de pouvoir discriminant décroissant en partant d'une analyse à un seul nombre d'onde jusqu'à l'utilisation des 33 fréquences les plus discriminantes. Dans notre cas, au-delà de ces 33 nombres d'onde, aucune amélioration de la discrimination n'est visible.

Dans un deuxième temps, l'ensemble des lignes (170 000) et des 33 colonnes correspondantes aux 33 nombres d'ondes discriminants est pris en compte pour créer une matrice aisément analysable par l'informatique. Cette analyse factorielle discriminante permet alors de définir trois vecteurs pour chaque observation. Il est donc possible d'appliquer l'analyse factorielle discriminante à cette matrice et ainsi d'obtenir, par projection de ces vecteurs, une représentation intuitive et graphique (nuage de point 2D) de la discrimination des spectres (Figure.52).

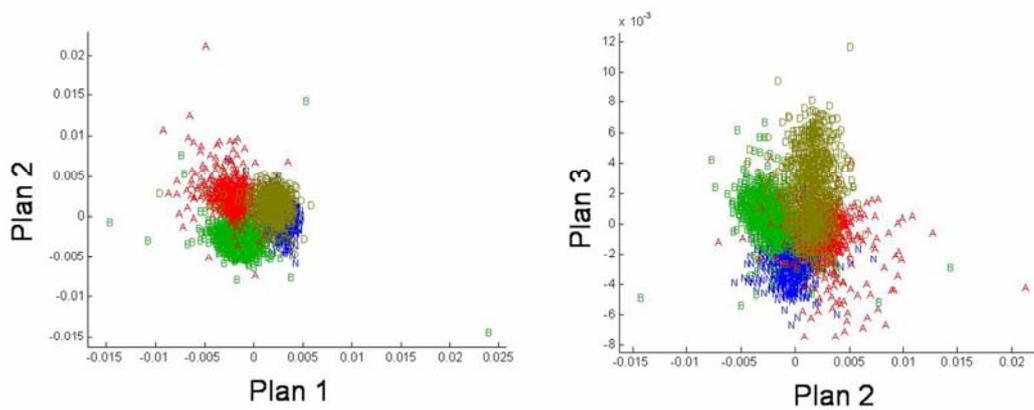


Figure 52: Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante

Il est également possible de définir la proportion des spectres bien classés et de présenter les résultats sous forme d'une matrice de confusion (tableau.5). Les lignes indiquent l'appartenance clinique de chaque échantillon tandis que les colonnes sont les résultats obtenus sur la classification prédictive. Ces résultats obtenus sont encourageants puisque les taux de bonne classification sont élevés. Pourtant, on observe que pour le groupe D, un taux assez élevé de spectres se classent dans les tissus normaux. Ceci peut s'expliquer par la nature assez variée des tissus inclus dans ce groupe et/ou par le caractère focal des lésions rencontrées dans les parois aortiques provenant de patients porteurs de bicuspidie aortique.

Tableau 5: Matrice de confusion suite à l'analyse multivariée

		Classification suite à l'analyse			
		N	B	A	D
Observation clinique	N	<b>94,7</b>	1,1	1,3	2,9
	B	1,5	<b>93,6</b>	3,7	1,2
	A	1,3	3,1	<b>93,2</b>	2,4
	D	16,6	1,1	2,6	<b>79,8</b>

*N : tissus normaux sans dilatation*

*B : anévrisme avec bicuspidie*

*A : Anévrisme athéromateux et anévrisme débutant*

*D : bicuspidie sans dilatation et bicuspidie avec un début de dilatation*

Suite à ces classifications prédictives, il est possible d'associer un groupe pour chaque spectre de chaque image. La construction graphique se fait par l'attribution d'un code couleur pour chacun des spectres en fonction de sa classification au sein des 4 groupes tissulaires. Par la suite, connaissant la position de chaque spectre, il est possible de reformer les images spectrales en utilisant une fonction de repliage de ces dernières (folding). Ainsi, il est directement possible de visualiser et d'apprécier la proportion de bonne appartenance à un groupe pathologique ou non des spectres d'une image (Fig.53).

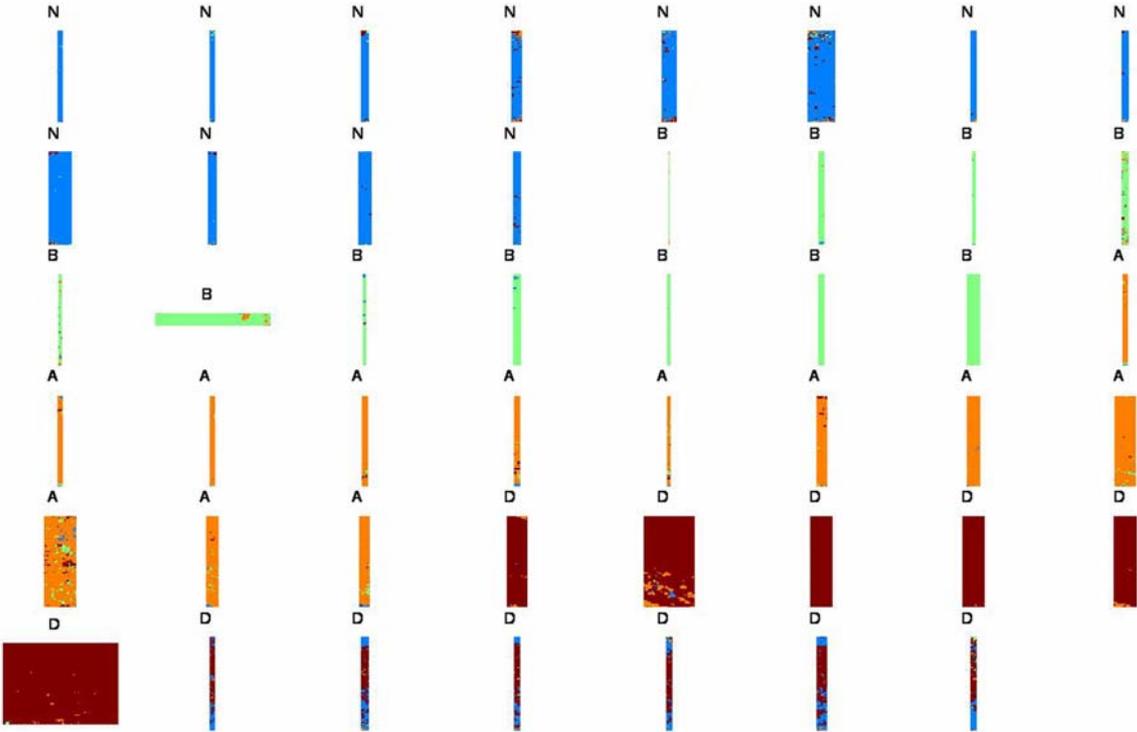


Figure 53: Images spectrales repliées où les spectres sont colorés en fonction de leur appartenance à un groupe tissulaire.

#### **IV) Conclusion sur l'analyse IFTR *in vitro* de l'aorte ascendante humaine**

Cette série de tissus aortiques analysée de manière indépendante permet de confirmer et renforcer nos précédents résultats sur le potentiel de la spectroscopie infrarouge dans la discrimination des tissus aortiques en fonction de leur caractère sain ou anévrismal.

L'ACP permet une approche différente de celle des classifications basées sur les dendrogrammes et permet de bien discriminer les tissus sains et pathologiques sur la gamme spectrale 950-1750  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci démontre que cette partie du spectre infrarouge contient une information fortement corrélée à la présence ou non d'un anévrisme.

Par ailleurs, le calcul des rapports de bande apporte une information supplémentaire en permettant une évaluation quantitative relative de bandes par rapport à d'autres. La reconstruction des images spectrale en 3D basée sur le rapport de bandes (1445-1335  $\text{cm}^{-1}$ /1700-1485  $\text{cm}^{-1}$ ) permet de mettre en évidence des modifications notables dans la structure des tissus aortiques en fonction de leur classe.

Du point de vue physiologique, collagène et élastine sont les deux protéines les plus abondantes du tissu aortique. Elles sont aussi fortement impliquées dans les mécanismes conduisant à la survenue d'un anévrysme. Or, la bande amide I est fortement influencée par la structure secondaire des protéines présentes dans le tissu aortique. L'analyse du rapport de bande (1667-1643  $\text{cm}^{-1}$ /1642-1628  $\text{cm}^{-1}$ ) sur la dérivée seconde normalisée permet de visualiser des variations de conformation secondaire de ces protéines en fonction des différents états du tissu aortique (normal, normal avec une bicuspidie ou anévrismal).

Bien que le nombre de spectres contenus dans les images spectrales ne permette pas une analyse conventionnelle, l'utilisation d'autres méthodes statistiques (analyse factorielle discriminante) et mathématiques (dépliage-repliage d'image) de traitement du signal ont permis d'utiliser l'ensemble des spectres de chaque image spectrale et donc de s'affranchir des effets de l'emploi des moyennes spectrales utilisées précédemment. Finalement, les résultats sont encourageants avec des taux supérieurs à 90% de bonne classification des spectres pour chaque catégorie.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent bien que la gamme spectrale 1750-950  $\text{cm}^{-1}$  est fortement influencée par la pathologie anévrysmale et contient les informations nécessaires à la discrimination des différents tissus. Cependant le nombre d'échantillons reste trop faible pour vraiment conclure sur la reproductibilité des résultats. Il est donc nécessaire d'élargir la banque des tissus utilisés pour l'analyse spectroscopique.

En faisant preuve d'imagination, de nombreuses approches sont à notre disposition pour mettre en évidence les différences spectrales observées entre tissus sains et pathologiques. Ceci renforce notre conviction selon laquelle le développement d'outils statistiques adaptés permettant de traiter simultanément des lots importants de données spectrales est indispensable à l'analyse des images spectrales.

**CHAPITRE III : ANALYSE DE LA**  
**STRUCTURE SECONDAIRE DES**  
**PROTÉINES DE L'ARTÈRE ASCENDANTE**  
**HUMAINE PAR MICROSCOPIC**  
**IRTF**

## **D) La microscopie confocale à épifluorescence dans l'analyse des coupes aortiques**

Le microscope MRC-1024 (BioRad, Hemel hemsyead, Royaume-Uni) est utilisé pour l'acquisition d'images dans l'épaisseur de l'échantillon en suivant l'axe Z (Fig.54). La définition optique des coupes est bien meilleure que celle obtenue avec un microscope conventionnel et permet alors d'éliminer la quasi-totalité du fond de fluorescence perturbant les images contenues. Les coupes obtenues en Z permettent de reconstruire des images tridimensionnelles. L'avantage principal de cette technique est qu'elle n'altère en rien l'intégrité de l'échantillon contrairement aux techniques nécessitant la réalisation de coupes physiques (microscopie photonique par exemple).

### **I.1 La source laser**

L'échantillon est illuminé par une source monochromatique fortement convergente permettant donc une bonne focalisation et une forte irradiation. L'utilisation d'un laser Argon ionisé d'une puissance totale de 100 mW permet de générer une raie à 488 nm (36,6 mW). Le faisceau laser focalisé dans le plan de mise au point forme alors un point d'environ 0.3  $\mu\text{m}$  (suivant l'objectif).

### **I.2 Le balayage du faisceau laser**

Le balayage de la zone d'acquisition est réalisé grâce à deux miroirs galvanométriques disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Le faisceau laser balaye donc l'échantillon suivant une ligne X puis par un décalage en Y réalise successivement les lignes suivantes. Dans le cas de l'étude des tissus aortiques, les images sont constituées de 512 lignes et 512 colonnes, la juxtaposition des valeurs numériques de chaque pixel permet de reconstituer l'image. Ces images seront gérées par le logiciel Lasersharp version 2.1T (Biorad software, UK) puis traitées par le logiciel Confocal assistant.

### **I.3 La détection**

Le détecteur est composé de 3 photomultiplicateurs (PMT). Chaque PMT transforme le flux de photons en courant électrique avec un voltage proportionnel au flux lumineux. La valeur est numérisée et classée suivant l'un des 256 niveaux de gris que peut présenter l'image. Pour

collecter le signal obtenu sur le tissu aortique, seul le PMT 1 fut utilisé. Les filtres d'émission ne permettant pas de séparer l'ensemble des fluorescences, chaque PMT possède son propre jeu de filtres. Le filtre passe haut utilisé pour l'étude des coupes aortiques est de type 525 EFLP et présente une bande passante comprise entre 525 et 640 nm.

#### I.4 L'iris

L'iris est un diaphragme disposé devant le photomultiplicateur dont le diamètre est ajustable. Il permet de régler la profondeur de champ (de 0.7  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de 3 mm à 0.3  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de 0.6 mm). L'iris influence également l'intensité du signal arrivant sur le détecteur puisque plus son diamètre est petit, plus il bloquera le signal. Concernant le rapport signal/bruit, ceci joue également un rôle important puisque le bruit de fond associé à la diffusion de la lumière diminue au fur et à mesure que le diaphragme est fermé.

#### I.5 Observation des coupes de tissus aortique

Des coupes de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont utilisées pour l'analyse par microscopie confocale. Les échantillons sont déposés sur des lames en verre et un montage entre lame et lamelle est effectué avec du Cityfluor<sup>®</sup>. Aucune préparation préalable des coupes n'est réalisée et la fluorescence observée est directement liée aux propriétés intrinsèques du tissu aortique.

Le système permet d'obtenir des images suivant l'axe Z. Le pas réglé à 0.3  $\mu\text{m}$  permet d'obtenir environ 70 sections par échantillon. Chaque image composée de 512 X 512 pixels de 0,344  $\mu\text{m}^2$  permet l'observation d'une zone de 176.3 x 176.3  $\mu\text{m}^2$ . Chaque image est acquise selon un filtrage de type Kalman afin de réduire le bruit de fond (3 accumulations). Le logiciel Confocal Assistant permet de projeter l'ensemble des sections obtenues sur les différents plans Z pour former une seule image. Cela permet de visualiser l'ensemble des constituants sur les différents plans avec une meilleure définition que celle obtenue avec la vidéomicroscopie.

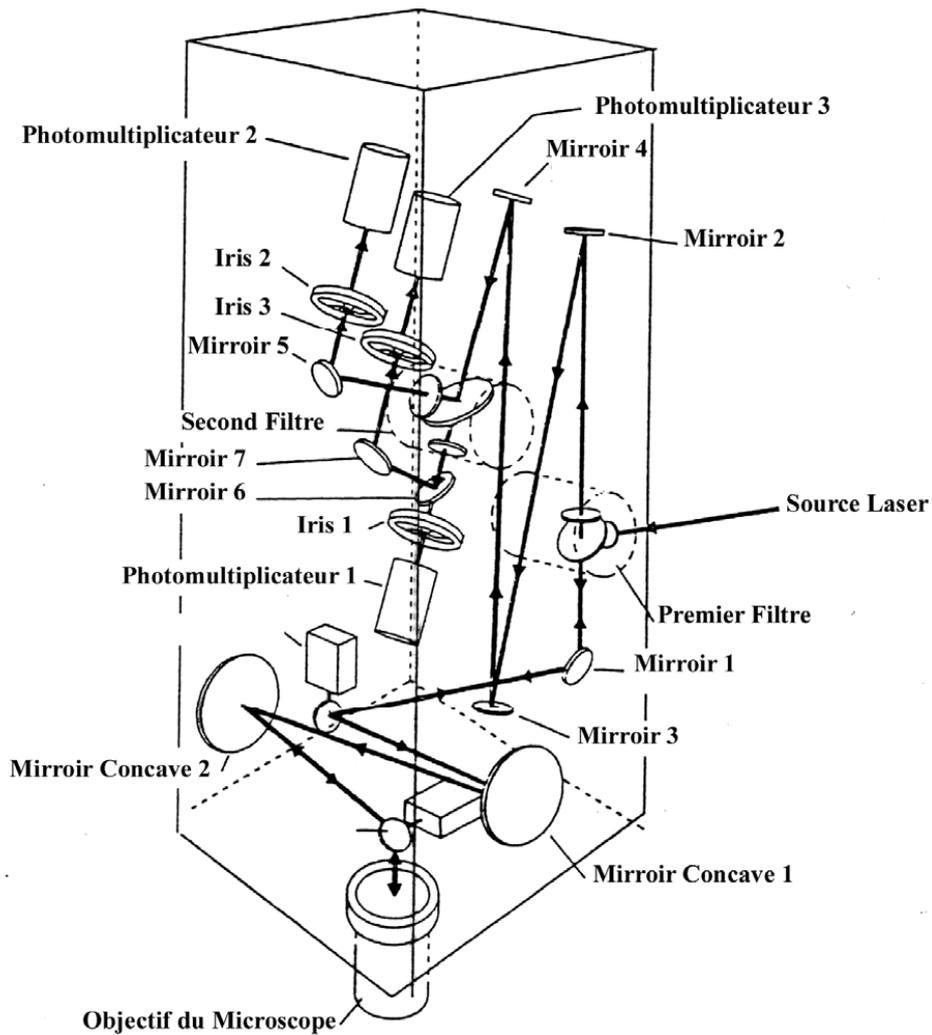


Figure 54: Détails du trajet optique au sein du microscope MRC-1024

## **II) La vidéomicroscopie pour l'observation des coupes aortiques**

Le vidéomicroscope Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Germany) est utilisé pour une visualisation rapide des échantillons à faible grossissement (objectif X10). Les échantillons sont ensuite soumis à une source laser de longueur d'onde 488 nm et émettent une fluorescence naturelle. Nous ne détaillerons pas cette technique qui est en tout point semblable aux acquisitions faites en microscopie confocale.

### **III) Objectifs de l'étude des structures secondaires de protéines du tissu aortique par microspectroscopie IRTF**

Les résultats obtenus en imagerie infrarouge démontrent qu'il est possible de discriminer les tissus aortiques en fonction de leur appartenance au groupe normal ou anévrisimal. Les bandes amide I et II du spectre infrarouge semblent avoir un pouvoir discriminant notable et sont influencées par la présence ou non d'un anévrisme. Dans un premier temps, l'observation détaillée de la dérivée seconde des spectres aortiques a permis de mettre en évidence des variations spectrales connues pour être liées aux structures secondaires des protéines présentes dans le tissu.

D'autre part, le développement de l'anévrisme est caractérisé par une perte de l'élasticité de la paroi aortique en rapport avec l'altération des principaux constituants de cette dernière. C'est en particulier le cas de l'élastine et des collagènes qui sont dégradés par diverses MMPs activées pendant le processus pathologique (Barbour 2007; Raffetto 2007).

En toute logique, les bandes amide I et II, très informatives sur le contenu protéique du tissu, sont modifiées en raison des altérations du collagène et de l'élastine, principaux constituants de ce tissu. Une étude focalisée exclusivement sur ces bandes était donc nécessaire afin de savoir si ces techniques d'analyse permettaient d'identifier des modifications dans l'organisation des structures secondaires des protéines présentes dans le tissu aortique.

Dans cette étude, la méthodologie utilisée afin d'obtenir les données spectrales est identique à celle utilisée pour l'imagerie infrarouge (Spotlight 300) et nous permis d'obtenir des données de bonne qualité. L'épaisseur des coupes fut cependant portée à 20  $\mu\text{m}$  pour éviter que des artefacts de coupe puissent influencer les données (déchirures de certains tissus aortiques fragiles pendant la réalisation des cryosections).

Le couplage du calcul des dérivées seconde et de l'application de la déconvolution des bandes amide I et II a permis d'estimer la proportion de chaque structure secondaire protéique au sein des tissus normaux et pathologiques (Haris 1995; Kong 2007).

**Article n°3: FTIR protein secondary  
structure analysis of human  
ascending aortic tissues**

## FTIR protein secondary structure analysis of human ascending aortic tissues

F. Bonnier<sup>1</sup>, S. Rubin<sup>1, 2</sup>, L. Debelle<sup>3</sup>, L. Ventéo<sup>4</sup>, M. Pluot<sup>4</sup>, B. Baehrel<sup>2</sup>, M. Manfait<sup>1</sup>, G. D. Sockalingum<sup>1\*</sup>

(Submitted in Journal of Biophotonics)

<sup>1</sup> Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France.

<sup>2</sup> Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6198, UFR Sciences, Moulin de la Housse, 51687 Reims cedex, France.

<sup>4</sup> Laboratoire Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

### Abstract

The advent of moderate dilatations in ascending aortas is often accompanied by structural modifications of the main components of the aortic tissue, elastin and collagen. In this study, we have undertaken an approach based on FTIR microscopy coupled to a curve-fitting procedure to analyse secondary structure modifications in these proteins in human normal and pathological aortic tissues. We found that the outcome of the aortic pathology is strongly influenced by these proteins, abundant in the media of the aortic wall, and that the advent of an aortic dilation is generally accompanied by a decrease of parallel  $\beta$ -sheet structures. Elastin, essentially composed of  $\beta$ -sheet structures, seem to be directly related to these changes and therefore indicative of the elastic alteration of the aortic wall. Conventional microscopy and confocal fluorescence microscopy were used to compare FTIR microscopy results with the organisation of the elastic fibres present in the tissues. This *in-vitro* study on 6 patients (three normal and three pathologic), suggest that such spectroscopic marker, specific to aneurismal tissue characterization, could be an important information to surgeons who face the dilemma of moderate aortic tissue dilatation of the ascending aortas.

**Keywords:** FTIR microspectroscopy, aortic tissue, aneurysm, curve fitting, protein secondary structure, elastin, collagen, confocal fluorescence microscopy.

## Introduction

The aorta is the most important artery of the human body, extending from the left heart and the aortic valve to the iliac bifurcation in the lower abdomen. The aortic tissue is constituted of three layers (internal to external): the intima, the media, and the adventice. The intima, in contact with the blood, is essentially composed of a single layer of endothelial cells; the media, which is more implicated in aortic pathologies, is composed of concentric cylinders of smooth muscular cells associated with collagen and elastin fibre networks; and the adventice, the most external layer, is composed by a connective tissue associated with many small vessels useful for aortic wall vascularization.

One of the most dramatic pathology associated with the aorta is the aneurysm. It is defined as a permanent increase of the aortic diameter associated with a thinning and loss of parallelism of the aortic wall. The morphological modifications are known to be related to alterations of elastin and collagen, the major proteins present in the aortic wall (Harkness 1955; Harkness 1957).

During cardiovascular surgery, surgeons are confronted to the ambiguous situation where a moderate dilated ascending aorta is discovered and in this case they have to make a decision of whether or not to perform an associated replacement of the aortic segment. However, all moderate aortic dilatations may not turn into an aneurysm and the additional risk of this surgical procedure is not null. Due to this risk, the systematic aortic replacement does not seem to be the best option. The absence of specific tools useful for the structural evaluation of the aortic wall is problematic. Therefore, it appears necessary to develop specific tools useful for surgery guidance. Such tools should be capable to diagnose the “structural status” of the aorta and give an indication whether its replacement is imminent. Raman microscopy has been used to analyse atheroma (Baraga 1992; Buschman 2001) but no extensive study on the composition of the three layers of the tissue has been carried out. Studies concerning FTIR microscopy are even scarcer. Recently, the use of the infrared microspectroscopy to discriminate patients with normal and aneurismal aortas has been clearly demonstrated using multivariate statistical analysis (Bonnier 2006). For instance, the  $1000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  spectral region, associated with contributions from cells, tissue molecular components like polysaccharides, nucleic acids, lipids, fat, and spectral features in relation with collagen, elastin and proteoglycans (Gentner 1998; Colley 2004), is highly tissue-specific and was used for classification purposes. The characterisation of different tissue types is an important issue

in view of evaluating the stage of the aortic disease as it could in the future be an important parameter of the surgical decision.

As previously stated, aneurysm is related to some alterations in elastin and collagen, the major protein of this tissue. Each protein has a specific organisation according to its tissue function. While collagen is responsible for the mechanical resistance, elastin ensures the elasticity of the vessel.

FTIR is a technique that is sensitive to changes in protein secondary structure and conformation (Susi 1983; Wong 1988; Surewicz 1993). This study aims at applying this method to assess the protein secondary structure changes that occur between normal and moderately dilated aortic tissues. This situation is quite a dilemma to the surgeon. To do so, we have used a mathematical approach based on a curve-fitting procedure to analyse the underlying bands in the protein absorption region and to evaluate the secondary structure variations and attempt to associate them to tissue compositional changes. This approach may help to gain insight into the understanding why the aortic wall loses its elastic property in pathological situations like aneurysms. Fluorescence techniques are used in parallel to visualise elastin fibres organisation in the aortic wall.

## **Materials and methods**

### *2.1 Aortic tissue samples*

Biopsies of human aortic tissues used in this study were classified into 2 groups:

- 1) A first group of normal tissues, without visible dilatation, obtained during cardiac explantations from patients in state of cerebral death (n=3).
- 2) A second group of pathological tissues obtained after surgical replacement of pathological aortas (n=3).

Samples were conserved after surgical acts by preserving in a sterile compress with a few millilitres of physiological serum. The aortic tissue was cut into stripes of 20 mm X 8 mm, snap-frozen in liquid nitrogen, and preserved at -80°C. Infrared imaging was performed on 20µm thick cryosections placed on infrared transparent ZnSe windows.

Fluorescence microscopies were performed on 20 µm cryosections placed on a glass slide support mounted in antifadind solution AF1 (Cityfluor Ltd., UK).

Patient information like sex, age and presence or not of pathology are summarised in Table 1.

*Table 1: Summary of clinical data concerning the six patients materials used in this study*

Patient	Sex	Age	Tissue type
A	Male	20	Normal
B	Female	23	Normal
C	Female	52	Normal
D	Female	37	Aneurysm
E	Male	38	Aneurysm
F	Female	49	Aneurysm

### *2.2 Infrared imaging of aortic tissue sections*

FT-IR spectral images were acquired using the infrared imaging system, Spotlight 300 coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer Life Sciences, France). Spectral acquisition was performed in transmission mode, across the three layers (intima, media and adventice) of the aortic wall. IR images were acquired with a liquid nitrogen-cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector composed of 16 pixel elements which can be operated at a spatial resolution of either 6.25 or 25 microns/pixel. In our study, we used the highest spatial resolution and the spectral resolution was set to 4 cm<sup>-1</sup>. Each absorbance spectrum (pixel spectrum) composing the IR images, was averaged over 32 scans and was recorded using the Spotlight software (Perkin-Elmer). In these conditions, two hours were necessary to acquire the whole infrared image containing more than 3000 spectra and corresponding to a typical area of 1300x100 μm<sup>2</sup>.

### *2.3 Data pre-processing and analysis*

Because of the high number of spectra and because it is known that the region of the media is the most affected after advent of the pathology, we decided to focus our analysis on spectral information originating from that region only. Calculations were performed on mean spectra from that region. The region of the media was divided into 3 parts and the mean spectrum is used as representative of each part. The curve fitting procedure was repeated for each of the 3 parts.

All spectra were subjected twice to a Savitzky-Golay smoothing (5 convolution points) to eliminate the noise, corrected for baseline, and normalised in the amide I and II region (1475-1720  $\text{cm}^{-1}$ ). This spectral region was used to analyse and quantify conformational modifications of proteins present in the aortic wall. The position of the absorption peaks contained in the Amide I and II regions were localised by performing the second derivative of the mean spectra. The comparison between these results and the curve fitting analysis performed on the tropoelastin by Debelle (Debelle 1995b) allowed to confirm all band positions. These frequencies observed on the second derivative spectra were saved and reported on mean spectra to perform curve-fitting. The procedure used was based on a least square method using a combination of Gaussian and Lorentzian bands that were used to fit the experimental spectrum with fixed peak positions (Labspec 4, Jobin-Yvon, Horiba, France). When the fit spectrum matched with the experimental one, i.e., the  $\chi^2$  value obtained was of the order of  $10^{-5}$ , the fitting procedure was considered to be good and the process stopped.

#### *2.4 Fluorescence videomicroscopy of collagen gels*

Acid-extracted, non-pepsinized collagen I from rat tail tendons was prepared as described (Garnotel 2000). Lyophilized collagen I was dissolved in sterile 0.1% acetic acid (3 mg/mL). A solution containing 400  $\mu\text{L}$  MEM 10X, 400  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  0.26 M, 440  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 360  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  0.1 M and 2000  $\mu\text{L}$  collagen 3mg/mL was prepared. This solution was placed in a glass bottom dish (Iwaki, Japan) and after gelling at 37°C for 10 min was covered by 1 mL MEM 10%. Collagen gels obtained were finally about 500  $\mu\text{m}$  thick. Detection of fluorescence was performed with an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a X10 magnification objective. Fluorescence emission was performed with a 488 nm illumination source and collection at 585 nm. Normal and pathological aortic sections were placed on glass slides and were observed in the same conditions.

#### *2.5 Confocal fluorescence microscopy*

Fluorescence microscopy was performed using an MRC-1024 confocal system (Bio-Rad, Microscience, Hemel Hempsted, UK). The scanning confocal system was coupled with an optiphot epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan), equipped with a 60X magnification oil immersion objective of numerical aperture  $\text{NA} = 1.4$ . Images were recorded with LaserSharp Version 2.1T (Bio-Rad software) and were calculated with Confocal

Assistant (BioRad software). Each image was represented with 512 X 512 pixels of about 0.1 X 0.1  $\mu\text{m}$  each, and recorded with a Kalman filter to reduce background noise (average on 3 scanning images). Localization experiments of elastic fibers emission were performed with an Argon laser (488 nm) and were collected through a 585 nm band-pass filter. A section was recorded every 0.3  $\mu\text{m}$  in the axial direction, permitting to recorded about 70 sections for each sample.

## Results and discussion

The aortic wall can be considered as a three layer structure. First the intima, in direct contact with blood, the media, and the most external layer is the adventice. The media is the principal region of the aortic wall that is most affected by the advent of the aneurismal pathology. So, in this study, we have used FT-IR spectra originating from this layer to assess the structural and conformational modifications of the fibrous proteins composing it. Smooth muscle cells and a rich extracellular matrix, principally composed of collagen and elastin fibres are the most important components of this layer. These proteins are directly implicated in the aneurismal development and are modified, structurally and quantitatively, during the advent of this aortic pathology (Klima 1983; Cattell 1993; Silver 2001).

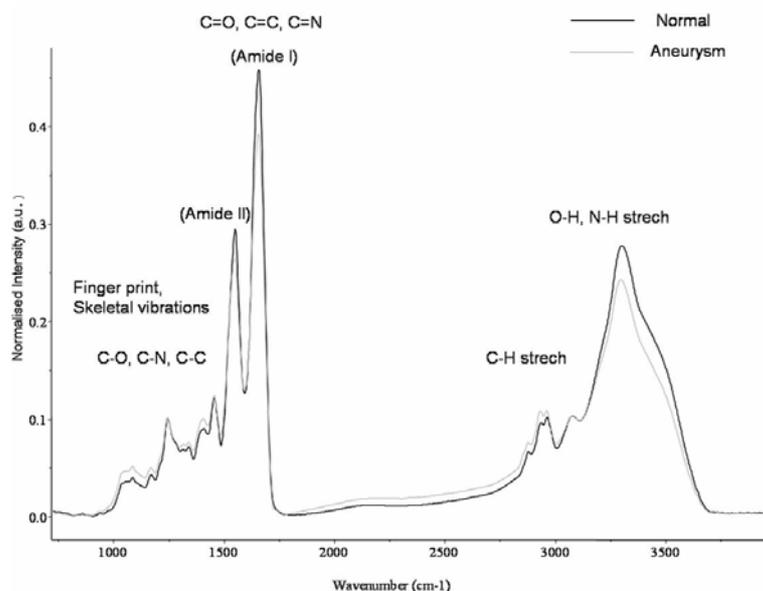
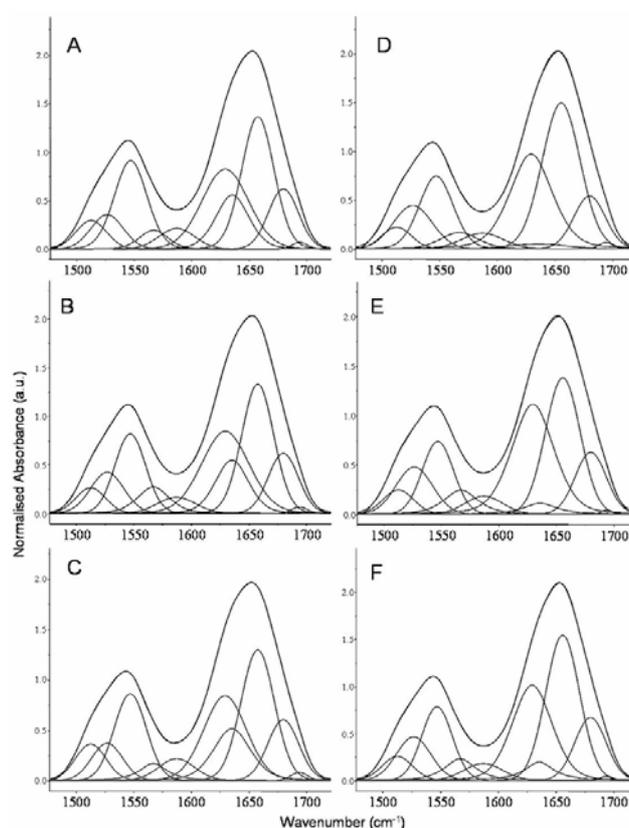


Fig. 1: Representative mean spectra of a normal and aneurysmal tissue shown in the range 700-4000  $\text{cm}^{-1}$  after baseline correction and normalisation. Spectral modifications can be observed in spectral window 1000-1750  $\text{cm}^{-1}$ . Pathological aortas exhibit less intense amide I and II bands than normal ones.

Examples of mean spectra obtained from normal and pathological aortic tissues are shown in figure 1. They exhibit quite similar profiles but minor modifications in the Amide I and II regions can be detected depending on the tissue type. The curve-fitting procedure applied on the protein bands allows to study conformational changes. Secondary structure analysis based on the decomposition of the amide I and II bands has been extensively reported. Some specific frequencies contained in the amide bands are related to the underlying secondary structure such as helical structure, beta sheet and other conformations. The exact position of these bands depends on the type of sample analysed. They have been principally studied using protein solutions but rarely on tissues.



*Fig. 2: Curve fitting of amide I and II bands of the six mean FTIR spectra. A, B and C: normal tissues; D, E and F: pathological tissues. Each spectrum is normalised before calculation. The contribution of each band is represented for each spectrum. The  $\chi^2$  value is about  $10^{-5}$ . The fit spectra are represented but not visible because of their complete superposition with the experimental spectra.*

The aortic tissue spectra exhibit the amide I and II bands respectively at 1651 and 1642  $\text{cm}^{-1}$ . It is known that these bands represent a superimposition of conformational structures which can be revealed by band resolving methods such as deconvolution or “curve fitting”. In our case, the curve fitting revealed five (1629, 1635, 1658, 1680 and 1694  $\text{cm}^{-1}$ ) and four (1512,

1526, 1546 and 1566  $\text{cm}^{-1}$ ) underlying components respectively in the amide I and amide II regions. The spectral decomposition in the amide I and II regions is shown in figure 2. The left column correspond to normal tissues and the right column to pathological ones. The number of bands is unchanged but modifications in bands areas are present between the two different tissue types. The constant band near 1655  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to alpha helix coupled to random coil. The peak related to the beta sheet conformation was always located between 1610 and 1635  $\text{cm}^{-1}$  (Sun 1997; Kreplak 2004; Lin 2005; Toyran 2006). The infrared spectral decomposition of amide bands of elastin has been previously reported using vibrational spectroscopy (Debelle 1995a). The quantification of different secondary structures present in elastin allowed to confirm the presence of beta sheet, alpha helix, random coil and turns at defined spectral frequencies. For the amide I band, the five peaks mentioned above were clearly identified as constant in aortic tissue spectra and not considered as artefacts. The number and frequency position of these peaks seem to match with the secondary structure components observed in previous studies based on pure elastin. The study based on tropoelastin (Debelle 1995a) was used to assign the second derivative peaks and bands positions for the curve fitting procedure. A high homology in the decomposition of FTIR spectra from aortic tissues and elastin is observed, probably because the media contains a high proportion of elastin. The results of the curve-fitting analysis based of the amide I band is summarised in Table 2. It shows the average area under each band from normal and pathological groups.

*Table 2: Curve-fitting results of the amide I band from normal and pathological tissues showing the five bands, their assignments, and their contribution in terms of band areas*

Amide I band						
Normal aortic tissues			Pathological aortic tissues			Attribution
Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band area	Standard deviation	Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band area	Standard deviation	
1629	21.0	1.3	1629	24.7	2.2	Beta sheets
1635	10.7	0.4	1635	2.7	1.3	Beta sheets
1658	23.8	0.4	1655	28.4	2.5	Alpha helix and random coil
1680	10.1	0.0	1679	10.4	1.1	Turns
1694	0.6	0.1	1693	0.4	0.1	Anti-parallel Beta sheets and turns

These data allow to estimate the proportion of each secondary structure present in normal and aneurismal tissues. The comparison between normal tissues and elastin shows a similar profile in the peak positions of the amide band. However, some quantitative differences can be highlighted and associated with the collagen contribution in the spectral feature. The spectral band at  $1658\text{ cm}^{-1}$ , attributed to alpha helix and random coil structures is particularly representative of the exclusive alpha helix structure of collagen.

Two types of spectra were analysed by curve fitting procedure: the normal and aneurismal tissues. Peaks identified on the second derivative spectra were similar between the two types of tissues. A small down shift is visible at  $1658\text{ cm}^{-1}$ . The amide I band decomposition exhibits some modifications according to the tissue type. It has been previously reported that two different types of beta sheets structure are present at  $1629\text{ cm}^{-1}$  and  $1635\text{ cm}^{-1}$  in tropoelastin (Debelle 1995a). For aneurismal tissues, the most important modification observed is a decrease of beta sheets structures present at  $1635\text{ cm}^{-1}$ . At the same time, the content in alpha helix and the second beta structure at  $1629\text{ cm}^{-1}$  increased. This result is illustrated in the histograms shown in figure 3A.

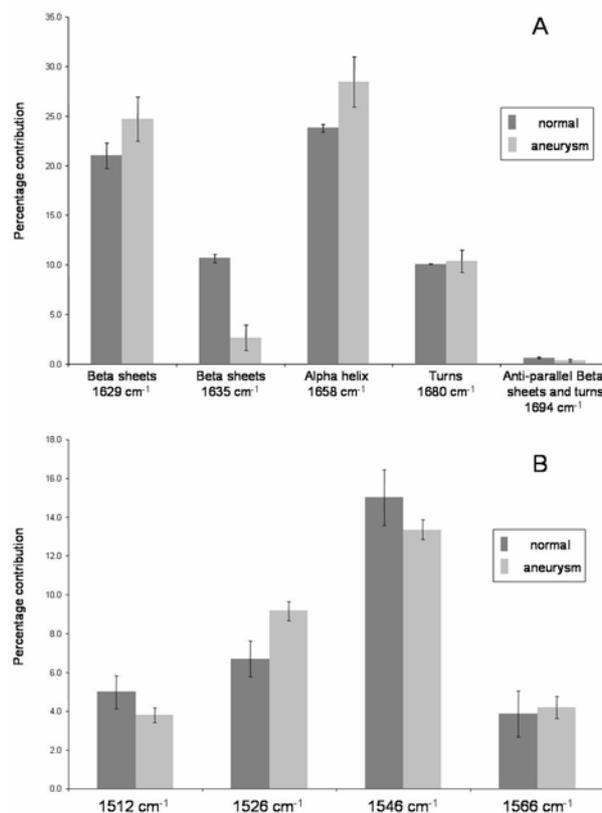


Fig. 3: Histogram illustrating the curve-fitting results. (A: amide I band, B: amide II band) Each secondary structure of normal and aneurismal tissues is compared.

All secondary structures from normal and aneurismal tissues were compared two by two. An inversion in the beta sheet ratio is observed between normal and aneurismal tissues. The ratio between all beta structures and alpha helix is  $R= 1.3$  for normal patients and  $R= 1$  for aneurismal patients. Finally, these data reveal a global decrease of beta structures in the aneurismal aortic tissue. However, some medical studies have reported a decrease of both collagen and elastin proteins during the aneurismal pathology (Arteaga-Solis 2000). Despite similar degradation processes of these proteins based on metalloproteinases (Dollery 1995; Nagase 1999), speeds of degradation are different. Elastin decreases more rapidly than collagen. The secondary structure of the elastin is essentially composed of a repetition of beta domains. Moreover, elastin is a major component of the aortic wall. Due to these considerations it seems that changes of beta structure are directly related to the elastin conformation. In addition, the curve fitting results showed an increase of the presence of alpha structure. This is due to the slower degradation of collagen, compared to elastin. The alpha structure decreases slower than beta structure in this particular tissue and finally the percentage of alpha helix appears slightly higher. Metalloproteinases are known to be implicated in the outcome of an aneurysm. So, degradation of proteins present in the tissue is clear. Two types of beta sheet structure are present in proteins and it seems that only one type ( $1635\text{ cm}^{-1}$ , parallel beta sheet) is affected by the degradation process during the aneurismal pathology. These results could be explained by the existence of specific action sites for some proteolytic enzymes in the beta sheets structure, absent in the anti-parallel beta sheets secondary structure.

The amide II band decomposition exhibits also some modifications. Table 3 shows the respective contribution of the four component bands. The  $1566\text{ cm}^{-1}$  band is slightly modified. Modifications are principally observed for the bands at  $1512$ ,  $1526$  and  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Figure 3B compares the percentage of each peak for normal and aneurismal tissues. Once again, using the frequency at  $1526\text{ cm}^{-1}$ , an inversion of the ratio between normal and aneurismal tissues is visible. The interpretation of the underlying bands of the amide II in terms of secondary structure is less straight forward than that of the amide I band.

Table 3: Curve-fitting results of the amide II band from normal and pathological tissues showing the four bands, and their contribution in terms of band areas

Amide II Band					
Normal aortic tissues			Pathological aortic tissues		
Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band area	Standard deviation	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band area	Standard deviation
1512	5.0	0.9	1512	3.8	0.4
1526	6.7	0.9	1526	9.2	0.5
1546	15.0	1.4	1546	13.4	0.5
1566	3.9	1.2	1566	4.2	0.6

Elastin has a very particular structure with conformational change depending on the entropy of the molecule (Debelle 1999). The presence of two beta sheets modes in the elastin spectra is associated to this special structural behaviour of the elastic network. The band at 1629 cm<sup>-1</sup> is thought to represent regular sheets whereas the second at 1635 cm<sup>-1</sup> could be representative of irregular sheet structure but also of an unordered structure (Sun 1997; Debelle 1999; Nicolini 2004). There is a similarity between spectra of pure elastin extracted from human aortas and spectra that we collected *in-situ* from human aortic tissues. The fact that collagen is essentially composed of alpha structure indicates that the beta structure identified in aortic spectra is representative of elastin.

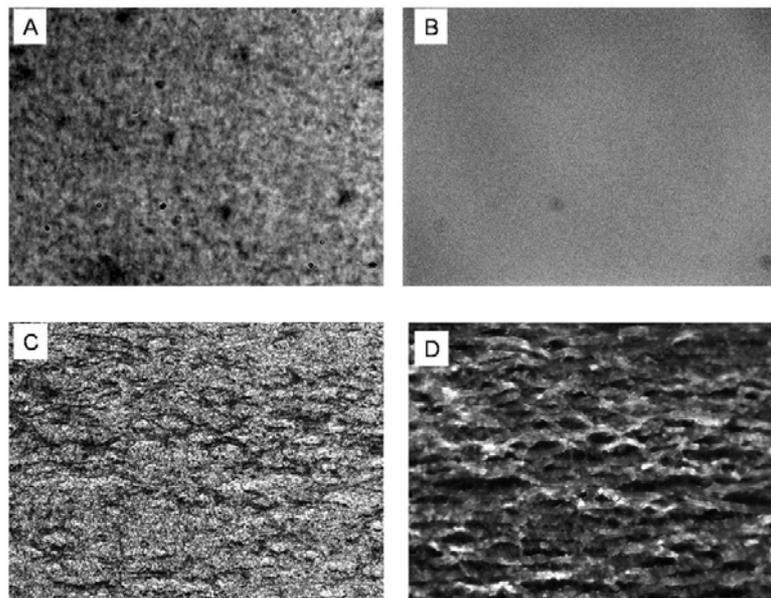
#### *Fluorescence microscopies results*

After observation of curve fitting results it was important to bring complementary information concerning organisation of fibrillar protein of the aortic wall. The strong decrease of beta structures was related to elastic fibres degradation during aneurysm outcome, but nevertheless it was necessary to highlight modification of this protein in pathological sample. Collagen gels were an easy way to obtain *in vitro* polymerised fibres which was considered as a model of fibrillar organisation of collagen in tissue sections.

Videomicroscopy has permitted to obtain a large visualisation of samples and collect images very quickly. The first observation was the absence of fluorescence from collagen fibres with the 488 nm illumination source (fig.4). The observation of aortic section highlights the presence of fluorescence in the same conditions. This natural fluorescence represented in fig.4D exhibit a lamellar organisation related to natural organisation of elastic fibres in tissues (Wolinsky 1967; Clark 1985). The comparison of collagen gels (fig 4B) and tissue sections (fig 4D) permits to conclude that collagen do not have natural fluorescence with 488 nm illumination source contrary to elastic fibres.

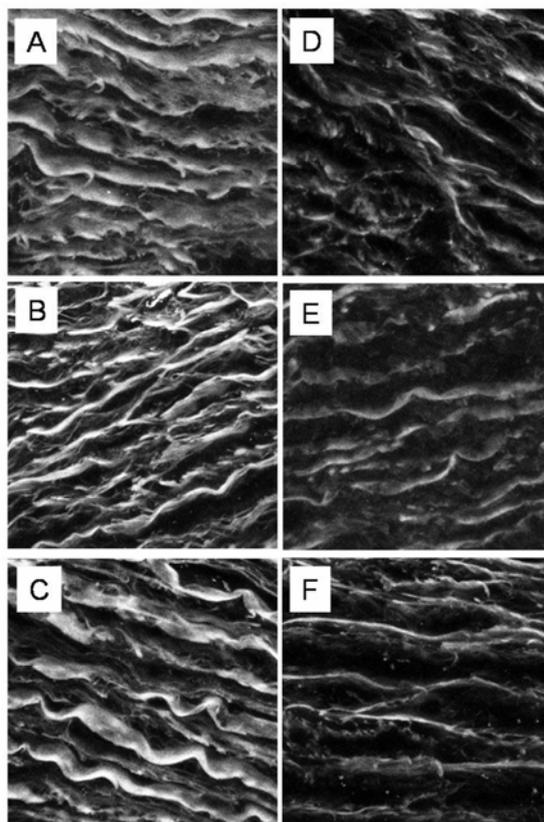
Videomicroscopy allows a global observation of samples but in order to have more detailed informations the use of confocal fluorescence microscopy was necessary.

Figure 5 depicts the projection of all sections collected for each sample in a same plane. Comparison of normal (left column) and aneurismal tissues (right column) shows a strong alteration of elastic fibres in case of pathological samples. The normal tissue sections exhibit a succession of lamellar structures formed by elastic fibres. This organisation is different in pathological samples with the presence of elastic fibres but with loss of the lamellar units, characterised by thin and individualised fibres.



*Fig.4: Comparaison between microscopy images of collagen gel and tissue section. A and C: visible images obtained with X10 magnification objective on collagen gel and aortic tissue section respectively. B and D: fluorescence images recorded on collagen gel and tissue section respectively using a 488 nm illumination source with X10 magnification objective.*

This approach permits observation of elastic fibres present in the aortic wall, confirming the data obtained by infrared imaging and supporting the observation that degradation of elastic fibres is the main mechanism implied during aneurysm development. This confirms the association between the important decrease of beta structures and the modification of elastic fibers. These lamellar units observed in normal tissues contained about 90% of elastin, so modification of infrared spectra seems to be in strong relation with elastin degradation (Jacob 1993; Rosenbloom 1993).



*Fig.5: Confocal fluorescence microscopy of thin sections of aortic tissues. A, B, C: normal tissues; D, E and F: pathological samples. Each image was obtained by projection of all sections recorded in the same plane. Excitation was performed at 488 nm with X60 objective.*

## **Conclusion**

The curve fitting procedure applied on the amide I and II bands of the FT-IR spectra of the normal and pathological aortic tissues reveals variations in the proportion of the secondary structure components related to the presence of pathology like aneurysm. This study permits clearly to identify beta structure directly implicated in the aneurismal outcome. Loss of elasticity of aortic wall during pathology, associated to high presence of beta sheet in elastin, suggest a strong relation between elastin modification and aneurysm. The presence of conformational changes in pathological tissues, visible by infrared imaging, is an important step in the search of specific markers of aneurismal outcome. It is now clear that FTIR spectroscopy is able to discriminate between non dilated aortas and pathological ones. Our work is ongoing to verify these findings to a larger number of samples and to test the potential of FTIR spectroscopy to the diagnostics of ascending aortic aneurysms at a larger scale.

**Acknowledgement:** The authors thank the clinical research program (PHRC 2003-2006) for financial support to this project. FB acknowledges MENRT for his PhD funding.

Arteaga-Solis, E., B. Gayraud and F. Ramirez  
"Elastic and collagenous networks in vascular diseases."  
Cell Struct Funct (2000); **25**(2): 69-72.

Baraga, J. J., M. S. Feld and R. P. Rava  
"In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy."  
Proc Natl Acad Sci U S A (1992); **89**(8): 3473-7.

Bonnier, F., S. Rubin, L. Venteo, C. M. Krishna, M. Pluot, B. Baehrel, et al.  
"In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy."  
Biochim Biophys Acta (2006); **1758**(7): 968-73.

Buschman, H. P., G. Deinum, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, A. van der Laarse, et al.  
"Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ."  
Cardiovasc Pathol (2001); **10**(2): 69-82.

Cattell, M. A., P. S. Hasleton and J. C. Anderson  
"Increased elastin content and decreased elastin concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms of human thoracic aorta."  
Cardiovasc Res (1993); **27**(2): 176-81.

Clark, J. M. and S. Glagov  
"Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited."  
Arteriosclerosis (1985); **5**(1): 19-34.

Colley, C. S., S. G. Kazarian, P. D. Weinberg and M. J. Lever  
"Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques."  
Biopolymers (2004); **74**(4): 328-35.

Debelle, L. and A. J. Alix  
"The structures of elastins and their function."  
Biochimie (1999); **81**(10): 981-94.

Debelle, L., A. J. Alix, M. P. Jacob, J. P. Huvenne, M. Berjot, B. Sombret, et al.  
"Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies."  
J Biol Chem (1995a); **270**(44): 26099-103.

Debelle, L. and A. J. P. Alix  
"Optical spectroscopic determination of bovine tropoelastin molecular model."  
Journal of Molecular Structure (1995b); **348**: 321-324.

Dollery, C. M., J. R. McEwan and A. M. Henney  
"Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease."  
Circ Res (1995); **77**(5): 863-8.

- Garnotel, R., L. Rittie, S. Poitevin, J. C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, et al.  
"Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95)."  
J Immunol (2000); **164**(11): 5928-34.
- Gentner, J. M., E. Wentrup-Byrne, P. J. Walker and M. D. Walsh  
"Comparison of fresh and post-mortem human arterial tissue: an analysis using FT-IR microspectroscopy and chemometrics."  
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) (1998); **44**(1): 251-9.
- Harkness, M. L., R. D. Harkness and D. D. Mc  
"The collagen and elastin content of the arterial wall."  
J Physiol (1955); **127**(2): 33-4P.
- Harkness, M. L., R. D. Harkness and D. A. McDonald  
"The collagen and elastin content of the arterial wall in the dog."  
Proc R Soc Lond B Biol Sci (1957); **146**(925): 541-51.
- Jacob, M. P.  
"[Elastin: preparation, characterization, structure, biosynthesis and catabolism]."  
C R Seances Soc Biol Fil (1993); **187**(2): 166-80.
- Klima, T., H. J. Spjut, A. Coelho, A. G. Gray, D. C. Wukasz, G. J. Reul, Jr., et al.  
"The morphology of ascending aortic aneurysms."  
Hum Pathol (1983); **14**(9): 810-7.
- Kreplak, L., J. Doucet, P. Dumas and F. Briki  
"New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers."  
Biophys J (2004); **87**(1): 640-7.
- Lin, S. Y., T. F. Hsieh and Y. S. Wei  
"pH- and thermal-dependent conformational transition of PGAIPG, a repeated hexapeptide sequence from tropoelastin."  
Peptides (2005); **26**(4): 543-9.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr.  
"Matrix metalloproteinases."  
J Biol Chem (1999); **274**(31): 21491-4.
- Nicolini, C., R. Ravindra, B. Ludolph and R. Winter  
"Characterization of the temperature- and pressure-induced inverse and reentrant transition of the minimum elastin-like polypeptide GVG(VPGVG) by DSC, PPC, CD, and FT-IR spectroscopy."  
Biophys J (2004); **86**(3): 1385-92.
- Rosenbloom, J., W. R. Abrams and R. Mecham  
"Extracellular matrix 4: the elastic fiber."  
Faseb J (1993); **7**(13): 1208-18.
- Silver, F. H., I. Horvath and D. J. Foran

"Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers."  
Crit Rev Biomed Eng (2001); **29**(3): 279-301.

Sun, W. Y., J. L. Fang, M. Cheng, P. Y. Xia and W. X. Tang  
"Secondary structure dependent on metal ions of copper,zinc superoxide dismutase investigated by Fourier transform IR spectroscopy."  
Biopolymers (1997); **42**(3): 297-303.

Surewicz, W. K., H. H. Mantsch and D. Chapman  
"Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment."  
Biochemistry (1993); **32**(2): 389-94.

Susi, H. and D. M. Byler  
"Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra."  
Biochem Biophys Res Commun (1983); **115**(1): 391-7.

Toyran, N., P. Lasch, D. Naumann, B. Turan and F. Severcan  
"Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study."  
Biochem J (2006); **397**(3): 427-36.

Wolinsky, H. and S. Glagov  
"A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals."  
Circ Res (1967); **20**(1): 99-111.

Wong, P. T. and K. Heremans  
"Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen: a Fourier transform infrared spectroscopic study."  
Biochim Biophys Acta (1988); **956**(1): 1-9.

#### **IV) Conclusion sur l'analyse des structures secondaires des protéines de la paroi aortique**

Cette analyse focalisée sur la région spectrale des bandes amide I et II du spectre infrarouge a permis une quantification précise de la proportion de chaque type de structure secondaire au sein du tissu aortique.

L'observation des spectres IR retrouve une forte similitude entre la média et celui de l'élastine. Bien que les collagènes et l'élastine soient les composants principaux de l'aorte thoracique, il est clair qu'au sein de la média une très forte dominance de fibres élastiques est présente. Cette notion confirmée en fluorescence bi-photonique (Zoumi 2004; Chen 2007) est fortement corrélée aux profils spectraux obtenus sur nos échantillons. Afin de trouver une correspondance entre les spectres mesurés et la structure de la paroi aortique, nous nous sommes aidés de la microscopie confocale. Au sein des tissus normaux, l'observation des lamelles élastiques caractéristiques de la paroi aortique (Clark 1985) est réalisable grâce à l'autofluorescence des fibres élastiques. Ces observations concordent avec celles réalisées par Raspanti en 2006 à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) (Raspanti 2006).

Le spectre infrarouge étant directement lié avec la composition qualitative et quantitative de la paroi aortique, il est donc naturellement dominé, au niveau de la média, par le signal des fibres élastiques. La décomposition de la bande amide I montre que les différentes structures secondaires présentes subissent d'importantes modifications lors de la survenue d'un anévrisme. La différence la plus marquée est la forte diminution de la structure en feuillet  $\beta$  localisée à  $1635 \text{ cm}^{-1}$ .

Bien que fortement similaire, au niveau des bandes amide I et II, les spectres de l'élastine et de la média aortique présentent des profils légèrement différents. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées mais nous avons retenu celle selon laquelle ces fluctuations sont directement liées à la contribution des collagènes présents en plus faible quantité. Pourtant, il est difficile de rattacher ces modifications, visualisables sur le « curve-fitting » à une seule protéine. Cependant de part leur nature biochimique, l'élastine et les collagènes présentent des structures secondaires très différentes. Les structures en feuillet  $\beta$  sont préférentiellement retrouvées dans l'élastine tandis que le collagène voit sa structure secondaire dominée par des motifs de type hélicoïdal (Hélice  $\alpha$ ).

Par ailleurs, du point de vue fluorescence, le collagène ne présente pas d'autofluorescence naturelle (fig.5 article n°3) à la différence de l'élastine. La microscopie confocale apporte donc de très importants renseignements puisque qu'elle nous permet de visualiser de manière quasi spécifique les fibres élastiques présentes dans le tissu aortique. L'analyse des images réalisées à l'aide du dispositif confocal permet de visualiser une réorganisation des fibres élastiques des tissus aortiques entre tissus sains et anévrismaux.

Cette observation est très importante et permet de valider notre hypothèse selon laquelle les modifications spectrales observées dans la média sont principalement le fait de la dégradation des fibres élastiques, base physiopathologique du processus anévrysmal.

**CHAPITRE IV : DÉTECTION DES TISSUS**  
**AORTIQUES PATHOLOGIQUES PAR**  
**IMAGERIE MULTISPECTRALE ET**  
**ANALYSES CHEMOMÉTRIQUES**

Ce quatrième chapitre est exclusivement consacré à une approche statistique de l'analyse des données infrarouge. L'acquisition des images IR est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Afin d'aider à la compréhension des différentes étapes de l'analyse, le principe du Kmeans sera détaillé. Tous les autres éléments nécessaires sont présents dans l'article n°4.

#### **D) Le Kmeans**

Il s'agit d'un algorithme qui vise à regrouper les pixels en k régions, k étant fixé par l'utilisateur.

Les images infrarouges peuvent s'apparenter à un cube de données en trois dimensions. Les axes x et y représentent les coordonnées géographiques des spectres et z est l'axe regroupant l'ensemble des fréquences des spectres (Fig.55 A). En projetant les spectres dans un nouveau repère avec autant de dimensions que de fréquences, ils apparaissent alors sous la forme d'un point. L'ensemble des spectres présents dans chaque image forme donc un nuage de points.

Dans un premier temps, des centres de gravité de chaque groupe sont créés de manière aléatoire (Fig.55.B). Chaque pixel est alors affecté arbitrairement à un groupe (Fig.55 C). A chaque itération, la position du centre de gravité des différents groupes est recalculée et chaque pixel est alors affecté à un groupe en fonction du centre de gravité le plus proche (Fig.55 D). Le centre de gravité est calculé par moyennage de l'ensemble des points du groupe. Un spectre  $x_i$  se voit affecté au groupe j si :

$$\|x_i - y_j\| = \min_u \|x_i - y_u\|$$

La convergence est atteinte lorsque les centres de gravités sont fixes, ils correspondent alors aux barycentres de chaque groupe.

L'image spectrale contenant z plans associés aux fréquences des spectres est alors convertie en une image unique sur laquelle chaque couleur est associée à un groupe formé lors du Kmeans. Cette méthode permet une représentation graphique des différents éléments qui constituent les images spectrales infrarouges. Dans le cas de la comparaison de différents tissus cela permet de rechercher la présence de spectres communs entre les différents types d'échantillons testés et de mettre en évidence la présence de spectres caractéristiques de la

pathologie qui formeraient alors un groupe bien distinct. Pour faciliter la visualisation, les groupes sont associés à des couleurs qui seront appliquées sur les images reconstruites. Cette représentation graphique permet de différencier les points des différents groupes et comme nous le pensons a priori d'identifier un nouveau groupe composé de spectres spécifiques de la pathologie.

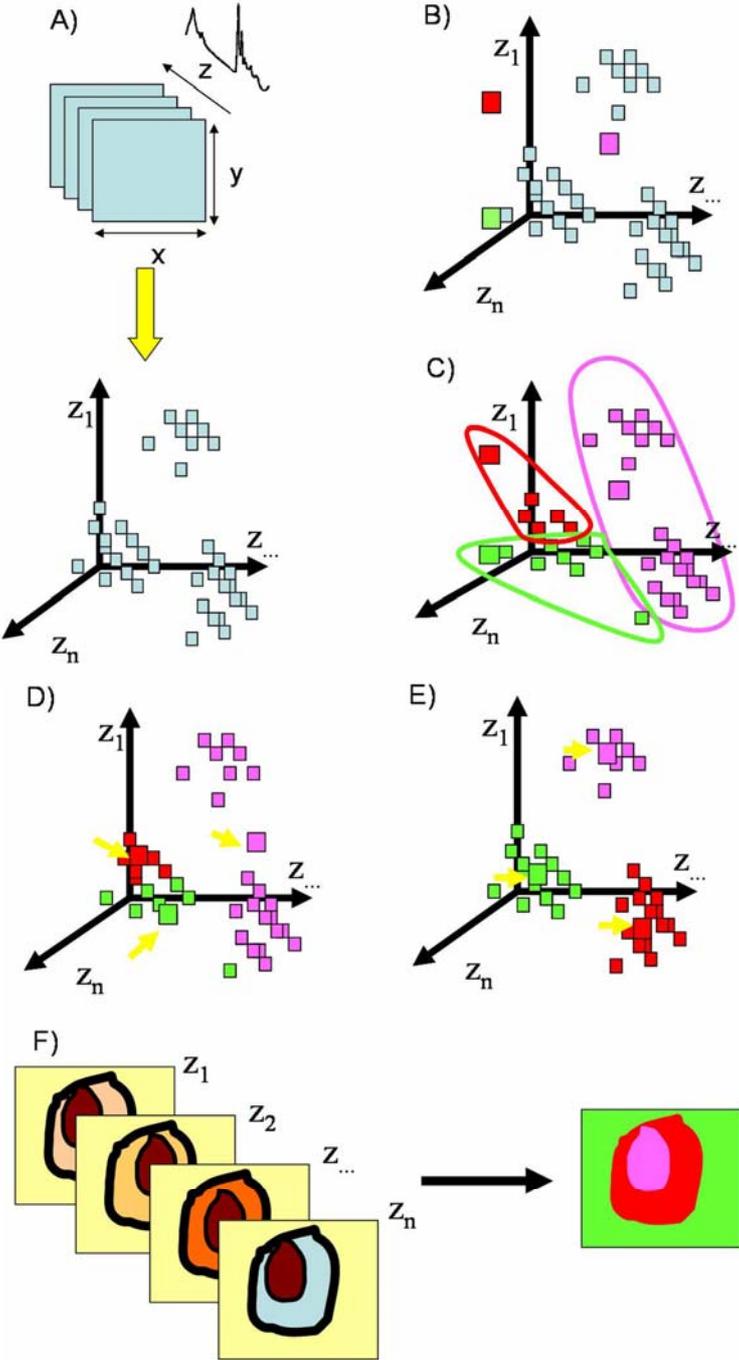


Figure 55: Principe du K-means

## **II) Objectifs de l'analyse multispectrale et chémométrique des tissus aortiques**

L'analyse des images spectrales infrarouges nous a permis d'obtenir des résultats encourageants quant à la possibilité de discriminer les tissus sains et pathologiques par l'application *in vitro* de la spectroscopie IRTF.

L'emploi de techniques statistiques sophistiquées semble impératif afin de pouvoir prendre en compte un maximum des spectres dans l'analyse. Cependant, la limitation à l'extension de ces analyses reste aujourd'hui la puissance des ordinateurs et leur capacité à prendre en compte la totalité des spectres. Ces limites nous empêchent actuellement de réaliser nos analyses sur l'ensemble des données spectrales présentes au sein des images infrarouges. Ces résultats obtenus par cette approche statistique sur un petit lot d'images spectrales infrarouges nous encouragent à perfectionner nos analyses des données à l'aide du logiciel Matlab.

Lors de cette étude, notre premier objectif était d'augmenter de manière conséquente le nombre de patients inclus. Les premières images obtenues à partir de 8 patients ne représentant pas un groupe assez important pour mettre en évidence des différences suffisantes à l'établissement de classification fiable. Pour cette raison, Le nombre de patients inclus dans cette nouvelle approche par analyse multispectrale a été porté à 15.

Pour chaque patient, il est également important de connaître quelques informations importantes, tels que l'âge et le sexe, afin de bien s'assurer que la classification finale n'est pas basée sur l'un des nombreux paramètres extérieurs, indépendant de l'état normal ou pathologique du tissu. L'âge des patients est un paramètre très important à inclure dans l'étude puisque on sait que l'aorte subit des modifications en relation avec le vieillissement physiologique. La gamme des âges s'étend de 23 à 62 ans pour les tissus normaux et de 37 à 80 ans pour les tissus pathologiques. Des tissus provenant de patients relativement jeunes nous ont été nécessaires afin de définir une sorte de spectre de référence pour le tissu normal. Il est intéressant de voir comment se positionnent les tissus de patients plus âgés face à ces tissus « témoins ».

Dans un premier temps, il nous a semblé important de mettre en place une méthode de discrimination reproductible entre les deux groupes les plus distants avant d'introduire des cas plus litigieux présentant des dilatations modérées. Les tissus présentant un début de dilatation

ont donc été exclus. Le but de cette approche était de mettre en évidence un marqueur spectroscopique spécifique de la pathologie sur ces deux groupes avant de le tester sur le groupe des dilatations modérées de l'aorte. Le groupe des pathologiques englobe les anévrismes de patients avec et sans bicuspidie. Les résultats précédents montrent que les tissus pathologiques semblent présenter des anomalies structurales très semblables lorsque l'anévrisme est constitué. Concernant les bicuspidie non associées à une dilatation, la rareté des échantillons de ce type font qu'il est pour le moment difficile de les inclure dans nos analyses statistiques. En effet, la présence d'un seul échantillon ne permettra pas de valider les résultats obtenus avec ce type d'échantillon.

Pour chaque tissu, plusieurs zones d'acquisition furent sélectionnées sur des endroits bien distincts du tissu afin de vérifier la reproductibilité de notre méthode et de savoir si le caractère pathologique du tissu se trouve en différentes positions de l'échantillon ou s'il est présent de manière inhomogène au sein du tissu.

Nos précédentes études portaient sur des tissus normaux et anévrysmaux bien identifiés pour réaliser des classifications à partir d'acquisitions en microspectroscopie infrarouge. L'approche consistait à recueillir des informations sous forme de spectres IRTF pour chaque échantillon et de confronter les spectres de chaque groupe entre eux afin de mettre en évidence des différences liées à l'état normal ou anévrysmal. Le but de l'analyse était donc de trouver la ou les zones spectrales qui donnaient les meilleurs résultats. La répétition des études sur différentes séries montre que les bandes amide I et II ainsi que la gamme 1500-1000  $\text{cm}^{-1}$  contiennent des informations discriminantes permettant une discrimination reproductible des tissus.

Malgré l'augmentation du nombre de patients utilisés dans cette l'étude (22), nos méthodes statistiques permettent encore de définir des zones spectrales discriminantes apportant les résultats attendus. Il nous est pourtant apparu qu'une nouvelle approche était nécessaire afin d'innover et de confirmer nos précédents résultats. Pour ne pas influencer la discrimination, toutes les images ont été considérées comme appartenant à un seul groupe, ainsi aucune précision sur l'état de la coupe n'a été apportée avant l'analyse. La donnée connue est la nécessité de séparer les échantillons en deux groupes : aortes normales et anévrysmales.

Les résultats finaux permettront de savoir si une plus grande quantité d'informations spectrales peut être utile pour discriminer les tissus en fonction de leur état et si elle peut être influencée par d'autres paramètres.

**Article n°4: Detection of pathological**  
**aortic tissues by infrared**  
**multispectral imaging and**  
**chemometrics**

## Detection of pathological aortic tissues by infrared multispectral imaging and chemometrics

F. Bonnier<sup>1</sup>, D. Bertrand<sup>2</sup>, S. Rubin<sup>1, 3</sup>, L. Ventéo<sup>4</sup>, M. Pluot<sup>4</sup>, B. Baehrel<sup>3</sup>, M. Manfait<sup>1</sup>, G. D. Sockalingum<sup>1\*</sup>

(Submitted in The Analyst)

<sup>1</sup> Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France.

<sup>2</sup> Unité de Sensométrie et Chimiométrie, ENITIAA-INRA, rue de la Géraudière, 44332 Nantes CEDEX, France

<sup>3</sup> Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

<sup>4</sup> Laboratoire Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

### Abstract

Processing of multispectral images is becoming an important issue especially in terms of data mining and disease knowledge. We report here on an image analysis procedure developed to compare 42 infrared multispectral images measured on human ascending aortic healthy and pathological tissues. Each spectral image contained about 2500 each containing 1641 variables. Because processing this large data set is quite problematic, we restricted the spectral window to 1800 and 950  $\text{cm}^{-1}$  and selected 100 spectra from the media which is the most altered part of the aortic tissue in the advent of an aneurysm. Prior to this selection, a spectral quality test was performed to eliminate bad spectra.

Our data set was first subjected to a discriminant analysis which allowed separation of the aortic tissues into two groups corresponding to normal and pathological states respectively. K-means analysis based on 20 groups gave IR images reconstructed on false-color and discrimination of pathological tissues from the healthy was readily achieved. These results demonstrate the usefulness of such data processing methods for knowledge based can be a valuable *in-vitro* method for the analysis of aortic tissues.

## **Introduction**

The aorta is the most important artery of the human body extending from the left heart aortic valve in the thorax to the iliac bifurcation in the lower abdomen. All important collateral arteries begin from the aorta. Coronary arteries (left and right) begin from the ascending aorta, cerebral arteries from horizontal aorta, and visceral arteries from abdominal descending aorta. The aortic tissue is structurally composed of three layers (internal to external): the intima, the media and the adventice. The intima, in contact with blood, is a single layer of endothelial cells; the media, which is more implicated in aortic pathologies, is composed of concentric cylinders of smooth muscular cells associated with fibers of collagen and elastin; and the adventice, the most external layer, is composed of connective tissue with small vessels for aortic wall vascularisation. This last layer is elastic but with good resistance properties. An aneurysm corresponds to an alteration of aortic wall due to modifications of the structural proteins that constitute the tissue. The media, containing principally collagen and elastin seems to be clearly affected by the pathological outcome which is visually manifested by an increase in the artery diameter (Avolio 1998; Arteaga-Solis 2000). Eventually, the ascending aorta may lose its elastic property until the critical state of rupture (Koullias 2005). Surgeons are frequently confronted to dilated aortas. Some are easily identified as aneurismal case where as for others decisions-making is more difficult. It appears therefore necessary to develop a new tool than can aid in diagnosing abnormal aortas and in orienting their decision to practice a replacement or not of the dilated portion. This decision is even more problematic when only a moderate dilatation of aorta is observed. Indeed, only a part of these dilated aortas will actually become aneurysm.

Fourrier Transform Infrared Imaging (FT-IR) imaging allows spectral acquisition of large areas of tissues and gives detailed spectral information related to the molecular structures present in the studied samples. Each pixel of the image corresponds to one spectrum and thus contains both morphological and chemical information. It can be thus analysed independently from one another. In the biomedical field, IR imaging is has proved to be a powerful tool for characterising or discriminating of pathological samples in many fields of cancer as brain tumors (Amharref 2006; Krafft 2006), colon cancer (Lasch 2004), skin cancer (Tfayli 2005). Recent works on arteries wall characterisation or atherosclerotic plaques analysis have been reported (Li 2003; Colley 2004). Infrared spectroscopy has proven to be very sensitive and allows to identify specific components in these different studies. Nevertheless atherosclerosis

is only one factor of aneurysm outcome and is much restrictive. In fact, surgeons don't find it problematic to detect such presence in aortic tissues. We therefore focused our study on the structural composition of the aortic wall and try to highlight spectroscopic markers related to structural reorganisation associated with the dilation of aorta, the common effect of the aneurismal pathology. Such information would be indeed useful to the surgeon who does not have any feedback except the artery diameter.

A previous in vitro study based on a small collection of samples has shown that spectral imaging of aortic section made it possible to extract relevant information for discriminating normal and pathological samples (Bonnier 2006). The spectra were studied in the range 1000-1800  $\text{cm}^{-1}$  coupled and processed by principal component analysis (ACP). Most reports on IR tissue imaging include a chemometrics approach for image analysis with a restriction on the number of samples due to the large amount of data to be processed. Therefore, it is important to improve the method for analysing important collections of data. In the present study, we propose a multivariate analytical approach that can be applied for the comparison of a larger number of IR images in order to develop a standardised tool for discriminating normal and pathological human aortic tissues. In a first step, the spectral information was exploited in order to discriminate between the two populations and, in a second step, an image labelling procedure was applied to emphasize the spatial information contained in the IR images. These labelled images could be directly used for diagnostic purposes. An important aspect of this image analysis approach is that it can be used to compare several images at the same time and not one by one as it is currently the case.

## **Materials and methods**

### *2.1 Sample collection*

Aorta tissues were obtained from 15 patients, and classified into 2 groups:

- 1) A first group included normal tissues, without visible dilatation, recruited from organ donors in state of cerebral death. (n=8)
- 2) A second group was formed of pathological tissues obtained after surgical replacement of pathological aortas. (n=7)

All information about patients (age, sex, and presence or not of a pathology) are summarised in Table 1.

These tissues were collected after surgical acts and first preserved in sterile compress with a few milliliter of physiological serum. Then they were cut in stripes of 20 mm x 8 mm, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C. These were then sectioned prior to the infrared analysis.

*Table.1 Description of the normal and pathological aortic samples used in this study. Sex, age, and tissue types are noted. Eight tissues come from patients with normal aortas and seven from patients with an aneurysm (with and without bicuspid aortic valves).*

<b>Sample number</b>	<b>Sex</b>	<b>Age</b>	<b>Class</b>
1	male	45	Normal
2	male	35	Normal
3	male	20	Normal
4	female	23	Normal
5	female	27	Normal
6	female	52	Normal
7	male	49	Normal
8	male	62	Normal
9	female	37	Aneurysm
10	male	38	Aneurysm (with bicuspid aortic valves)
11	male	49	Aneurysm
12	male	80	Aneurysm
13	female	65	Aneurysm
14	female	49	Aneurysm
15	female	74	Aneurysm (with bicuspid aortic valves)

## *2.2 Infrared imaging of aortic tissue sections*

Infrared imaging was performed on 10 µm thick cryosections placed on infrared transparent ZnSe windows. Spectral images were acquired using the infrared imaging system Spotlight 300 coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer Life Sciences, France). Spectral acquisition was performed across the aortic tissues, in order to probe the three layers of the aortic wall, the adventice, the media, and the intima (fig.1A). IR images were acquired with a liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector composed of 16 pixel elements which can be operated at a spatial resolution of either 6.25 or 25 microns/pixel. In our study, we used the highest spatial resolution and the spectral resolution was set to 4 cm<sup>-1</sup>. Absorbance spectra composing the IR images, averaged over 32 scans, were recorded for each pixel in the transmission mode using the Spotlight software (Perkin-Elmer). In these conditions, two hours were necessary to acquire of the whole infrared image containing over 3000 spectra and corresponding to a typical area of 1300 x



## Data pre-processing and analysis of multispectral images

Several steps, detailed below, were used before extracting information from the collection of images. The goal of the study was to propose an approach that can take into account all the spectral images simultaneously. Then the method was tested for the discrimination of pathological from healthy tissues. In our procedure, the method does not take into account the spatial information, but this can be recovered after reconstruction of the images with emphasis on the healthy or pathological nature of the tissue.

All the data processing was carried out using the MATLAB environment (The Mathworks, USA).

### 3.1 Spectral study

#### Random sampling

As mentioned earlier, each image was made of thousand of spectra with each spectrum containing 1641 variables. Due to the very large number of pixel spectra in the whole collection of images, it was impossible to carry out the spectral study on the whole data set. It was therefore necessary to reduce the amount of data to be processed. For this purpose, the central area of each image was first isolated and 100 pixel-spectra were randomly picked from this area (fig.1B). The rationale of exploiting the central area lies on physiopathological considerations where it is known that this region of interest in the aorta section corresponds to the media, the most affected part of the tissue with the advent of the aortic pathology. The central area included all the pixels averring the full width of the media in the studied zone. So, the selected zone around the central position of the image covered a width of  $\pm 5$  pixels, corresponding to  $\pm 31.25$  micrometers.

The spectra were eventually gathered in a single data matrix, with 4200 rows (42 images and 100 spectra per image) and 1641 data points. The spectra were expressed in log 1/R units.

#### Spectral pre-processing

The collection of sampled spectra was first reduced to the wavenumber ranging from 1800 to 950  $\text{cm}^{-1}$  (Amide bands and fingerprint region), giving 426 data points. This spectral region typically contains the absorption bands from the major macromolecules present in the tissue composition. The spectra were then corrected from baseline and scattering effects variations using an Extended Multiplicative Signal Correction of spectra (EMSC) (Martens 1991;

Kohler 2005). In this method, the spectra are corrected from scattering towards the mean of the whole spectral using a polynomial background approximation. In the present work, the order of the polynomial was set to 6.

#### Elimination of spectral outliers

It was found necessary to remove the outlier spectra. Such outliers were due to unavoidable irrelevant acquisition of some pixel spectra. This can be due to holes or kinks in the tissue. For identifying these outliers, the average spectrum of the whole sample collection of spectra was taken as a reference. For each spectrum, the correlation coefficient of its absorbances and the absorbance of the reference spectrum was calculated. It was assumed that an outlier spectrum might have a lower correlation coefficient than a relevant spectrum. Figure 1C shows the distribution of these correlation coefficients. The lowest observed values were around 0.8. It was decided to consider as outliers all spectra with correlation coefficients lower than 0.99. Such a choice led to the elimination of about 3 per cent of the spectra.

#### Discriminant analysis

Due to the number of variables (426 data points) in the spectral range  $1800\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ , and the limited number of images, it was found irrelevant to directly apply a discriminant analysis for discriminating the spectra according to the « healthy » or « pathological » nature of the tissues. It was indeed very likely that each image was composed of two « spectral signatures » which were respectively related to both tissue and experimental conditions. Because the chemical and physical information are confounded, we used factorial discriminant analysis (FDA) for discriminating IR images based on the chemical information rather than the physical one. From the sample collection of corrected and selected spectra, we have carried out FDA taking the 42 images as qualitative groups. It was expected that the spectra can be then gathered according to the healthy/pathological groups, *without injecting* this information in the FDA model. The spectral collection was randomly divided into a calibration set including half of the spectra, and a validation set, with the other half.

#### Spectral clustering

It was very likely that each multispectral image of pathological tissues contained both pixel-spectra related to aneurysm and to normal tissue. We could assume that the proportion of different kinds of spectra in the images brought some useful information.

In order to study this aspect, we have attempted to apply unsupervised clustering methods on the corrected and clean spectral collection. The spectral set was clustered using a K-nearest neighbors clustering method (“K-means” function from MATLAB) as previously described (Lasch 2004; Steinley 2006), with an arbitrary choice of 20 different groups. In fact, the number of groups was not very determinant and was chosen according to the expected spectral variability in each IR image. In a further step of reconstructing the image as a false color map, we have gathered the groups in order to emphasize the «healthy/pathological nature» of the pixel-spectra (see next paragraph). In the following, the groups found from this clustering were referred to “unsupervised groups”.

#### Study of the proportion of image pixels in each cluster

After the groups have been found from the K-means methods, it is easy to calculate the proportion of each kind of spectra in each image. The K-means method makes it possible to compute the average observation (the average spectrum in the present study) associated to each unsupervised group. This average observation is called the “barycenter” of the corresponding unsupervised group. As 20 groups were formed, the same number of barycenters was obtained. The set of barycenters could be gathered in a matrix with 20 rows (unsupervised groups) and 426 columns (wavenumbers). Each pixel-spectrum of each multivariate image was then classified in one of the 20 groups. For this purpose, the usual Euclidian distance of each pixel to each barycenter was computed. The studied pixel was then classified in the group for which the distance was the smallest. It was expected that healthy or pathological tissues have different spectral fingerprints, emphasized by the clustering. If this hypothesis was true, the proportion of pixels in the different groups may vary from “pathological” to “healthy” images. For testing this hypothesis, we have first computed the proportion of pixels belonging to each unsupervised group in each of the 42 images. The results could be gathered in a matrix  $\mathbf{P}$  dimensioned 42x20. An element  $p_{ij}$  gave the percentage of pixels in image  $i$  classified in the group  $j$ .

The matrix  $\mathbf{P}$  was then processed by two statistical methods, in order to emphasize the nature of the information brought by the proportions, namely correspondence analysis (CA) and Analysis of variance (ANOVA).

Correspondence analysis is an unsupervised factorial method adapted to the data processing of matrices whose elements are frequencies or proportions, which is the case of the matrix  $\mathbf{P}$ . This method makes it possible to obtain both a representation of the observations (here each of the images summarized by the proportions of unsupervised groups) and the variables (here

the 20 groups). If two observations are closed in these representations, they present a high degree of similarity. The same is true for the variables.

One-way ANOVAs was applied independently on each column of the matrix  $P$  taking the healthy/pathological nature as the studied factor (with two modalities). From the ANOVA, it was possible to determine if the abundance of a given unsupervised group in an image was significantly related to the healthy status of the studied aorta.

### ***3.2 Image labeling***

From the previous analysis of variance it was possible to cluster the unsupervised groups into three categories: those which are not related to the aneurysm (called « neutral » in the following), those which are abundant in healthy tissues (« healthy group »), those which are abundant in pathological tissues (« pathological group »). We have chosen to consider as neutral the unsupervised groups for which the probability of the null hypothesis of ANOVA was greater than 0.05. This gives the rationale for image labeling. In the previous step, all the pixel spectra of each image were attributed to one of the 20 unsupervised groups. The pixels were in the end colored according to their belonging to the « neutral », « pathological » or « healthy » groups. In the present work, neutral was represented in green color, healthy in blue, and pathological in red. A further refinement of the image was to use a hue of red or blue colors in order to visually emphasize the significance of the pixel spectra. To this end, the hue of red and blue were defined according to the intensity of the computed level of the « healthy » or « pathological » group in the previous ANOVA analysis. This means that an unsupervised group which was highly represented in healthy tissue will have a deeper blue color than one which was only weakly (but significantly) represented. The same principle applies for the red color, with pathological groups.

## **Results and discussion**

Aneurysm of the human ascending aorta manifests by a dilatation and subsequent loss of the aortic wall parallelism associated with thinning of the tissue. The pathological development such as an aneurysm is accompanied by a degradation of the principal constituent of the artery wall together with a structural reorganisation. The collagen and elastin are the two most important proteins constituting the aorta and are modified qualitatively and quantitatively with the advent of an aneurysm (Silver 2001; Klein 2005). IR spectra reflect the global tissue composition with specific absorption bands that can be assigned to proteins, lipids,

proteoglycans. The spectral range 1800 to 1000  $\text{cm}^{-1}$  contains the amide I and II bands (centred at 1658 and 1554  $\text{cm}^{-1}$  respectively) and the finger print region. Many contributions can be visualised and correlated to presence of specific components of the aortic wall like C-H deformation at 1456  $\text{cm}^{-1}$ , C-H stretch of proteins at 1403  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2$  wagging at 1340  $\text{cm}^{-1}$ , C-O stretch at 1163  $\text{cm}^{-1}$ , C-O stretch at 1080 and 1030  $\text{cm}^{-1}$  (Gentner 1998). These vibrations originate from the fibrous proteins, collagen and elastin. These proteins have been studied by FTIR spectroscopy and specific peaks have been characterized (Debelle 1995; Petibois 2006). The amide I and II bands are known to contain information on secondary structure of proteins (Debelle 1998; Chen 2001) and could be modified following morphological alterations of protein content in tissues and could be useful to assess the protein modifications in relation to a pathological situation.

Previous work was based on a small collection of data spectra from each IR image was treated separately. Due to the large number of spectra, it was necessary to perform the analysis on mean spectra (Bonnier 2006). It seems therefore important to develop an image analysis procedure based on multivariate statistical approach that can take into consideration a large number of spectra of each image and that can be able to process and analyse all the FT-IR images at a time and not one at the time, as it has been done so far.

#### *FDA Analysis*

The FDA model was established on the calibration set and tested on the validation one. In the validation set, about 63% of the spectra were correctly attributed to their image group. For the sake of clarity, rather than plotting each of the observations (more than 2200 points) we have used a representation based on confidence ellipse. In such a representation, it is considered that each group has a Gaussian 2-dimensional probability density. From this approximation, it is possible to build up confidence ellipses at a certain probability level. In the present case, the level  $P > 0.95$  has been chosen, which means that on average, 95% of the data points of a given group are inside the area of the associated ellipse.

The first step was to validate the use of the spectral window between 900-1800  $\text{cm}^{-1}$  as discriminating between normal and aneurismal tissues. Figure 2A shows the variance analysis between the two tissue types. Regions with high level of variance between normal and pathological tissues were identified as the most discriminant. The amide I and II absorption region associated with two spectral windows localized in the fingerprint region have an

important contribution in the discriminant process. This highlights the presence of discriminating regions in IR spectra useful for identifying aneurismal samples.

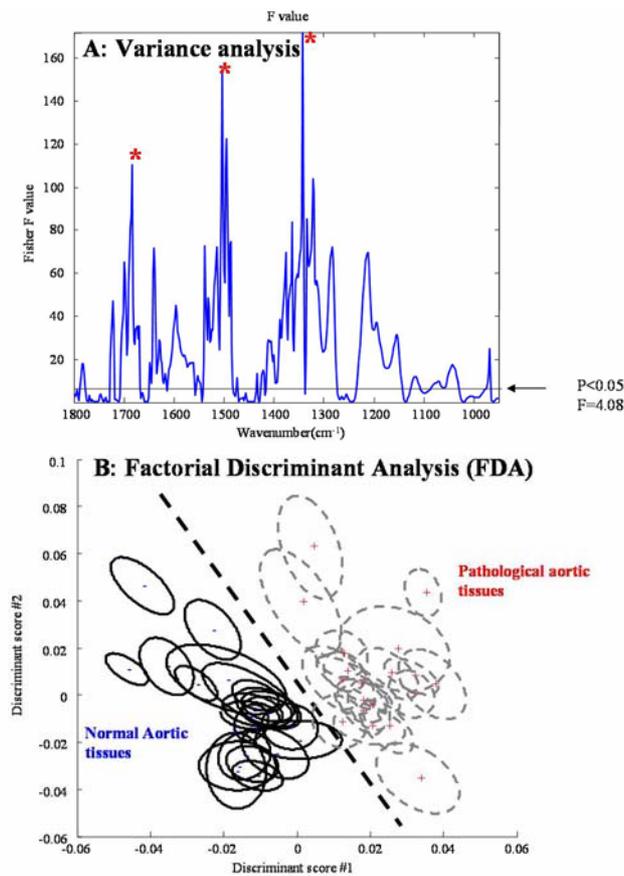


Fig.2 **A)** A mean spectrum was calculated for each IR image. Each average spectrum could be attributed either to the healthy or pathological group. Plot of the F Fisher values as a function of wavenumbers shows a strongest effect at 1342, 1504 and 1684  $\text{cm}^{-1}$  (marked with asterix). **B)** A Factorial Discriminant Analysis (FDA) taking the 47 images as qualitative groups was performed. Plot of discriminant score 2 versus discriminant score 1 reveal a good separation between the normal and pathological tissues. Each ellipse groups spectra from a different tissue and a confidence interval of 95% was applied.

The second step was to apply a non oriented method of image discrimination and determine if the strongest variability present in it aortic tissues was associated to a pathological state. The application of the FDA procedure allows to use the discriminant information present in each sample without including normal or pathological character in analysis. Finally, we can observe how the samples are positioned with intrinsic information. Figure 2B shows the first factorial plane of FDA obtained on the validation set, by considering the nature of the images as qualitative groups (42 groups). When two ellipses do not overlap, it can be concluded that the spectra of these images are different. The ellipses are differentiated according to the

healthy and pathological nature of the tissues. A very good separation between these two groups could be observed. In case of normal aortas, the ellipses formed by different measurement repetitions of the same tissue often overlap or are close to each other. On other side, the aneurismal tissues exhibit higher variation in the repetition position. For each pathological aorta, the positions of the ellipses associated to the repetitions often do not overlap, showing that the spectral acquisitions are dependent on the sections used. Nevertheless, the positive observation is the grouping of all aneurismal samples in the same part of plot. The samples included in this study take into account different patient sex and age and finally the discrimination is clear between normal and aneurismal tissues. The most discriminant spectral information present in aortic sections is related to the pathological state and can be useful for orienting the classification without interference with other parameters such as sex or age of patients.

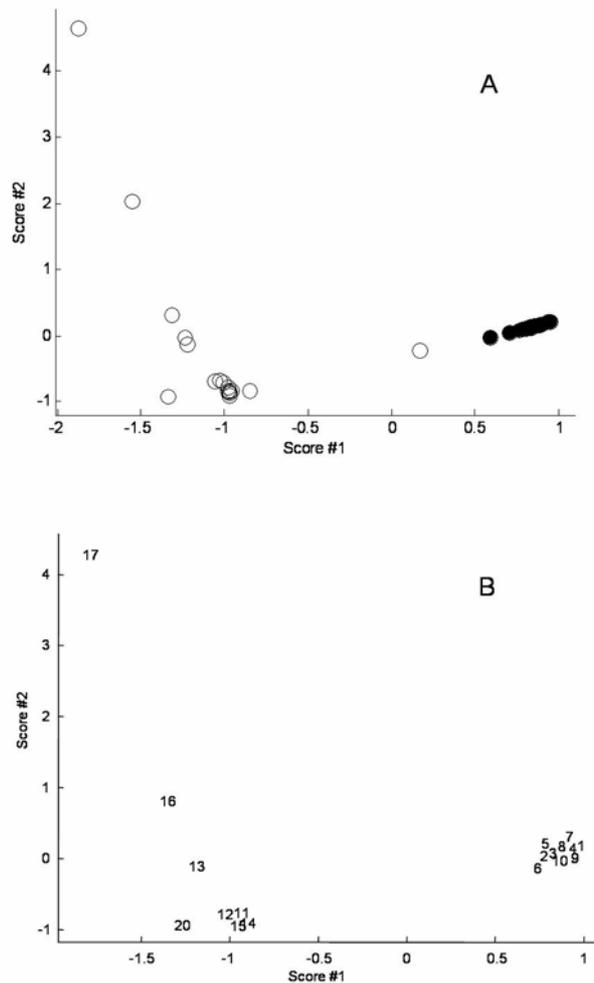
### *K-means*

The K-means was applied on aortic tissue sections to highlight the presence or not of a common spectra pool between normal and pathological tissues, related to constant components of the extracellular matrix present in these two tissue types.

We can see that the proportions vary highly from one image to another (data not shown). Moreover, some unsupervised groups are abundant in “healthy” images (unsupervised groups 1 to 10) whereas some others seem mainly present in “diseased” images (unsupervised groups 11 to 20).

Only one image corresponding to a pathological tissue exhibits an important proportion of spectra classified in unsupervised groups more representative of normal aortas. Each image contains spectra dispatched between many unsupervised groups, but groups formed by healthy spectra did not overlap with those formed by pathological samples. The variability of spectra within an image is associated with different spectral information originating from the aortic wall structure and composition. Figure 3A shows the position of the 42 images according to the proportion of spectra in each unsupervised group. The images from normal aortas are very close to each other and localized in the same part of the plot (on the right). In contrast, the aneurismal tissues exhibit higher spatial variation. A majority of the 19 images were located in the same part of the plot with three samples very divergent from the others. The representation allows to clearly identify two types of populations and discriminate healthy from pathological samples. It was possible to make the same observation but by considering the unsupervised groups (figure 3B). Unsupervised groups from 1 to 10,

representative of normal tissues, were very close to one another whereas those from 11 to 20, representative of aneurismal tissues, were more dispatched.



*Fig.3 Results of Kmeans clustering, using 20 groups. Correspondence analysis has been directly applied on percentage of unsupervised groups in each image. (A) Plot of score 2 against score 1, with the representation of the images, labelled according to healthy/disease nature. The two groups are unambiguously separated. (B) Plot of the unsupervised groups, with on the left of the plot the pathological tissues.*

### *Image labeling*

A one-way analysis of variance has been applied of the proportion of unsupervised groups in each image, taking the tissue nature “healthy/pathological” as the factor. Table 2 gives the Fisher F value (1/40 degrees of freedom) and the probability of the null hypothesis. It

appeared that 15 proportions among 20 were significantly different according to the healthy/pathological nature of the tissues. Moreover, by considering the two effects, it is also possible to know if the proportion of the unsupervised group increased or decreased according to these « healthy » or « pathological » states. This knowledge will be used for relevantly labeling the images.

*Table.2 F value and corresponding probability of the null hypothesis for each of the 20 unsupervised groups.*

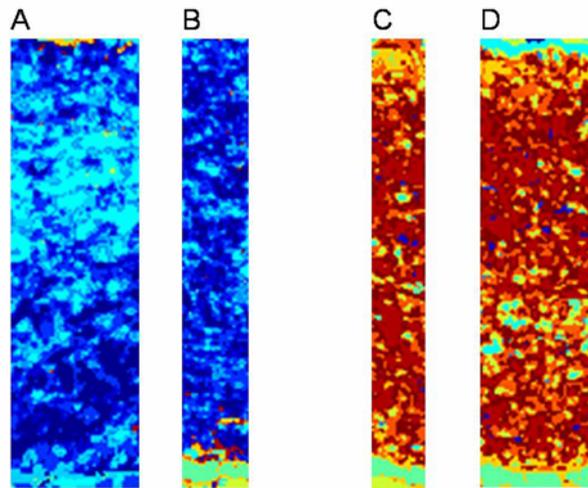
<b>unsupervised group</b>	<b>F value</b>	<b>Probability value</b>
1	4.8	0.0339
2	12.9	0.0009
3	8.9	0.0049
4	5.5	0.0246
5	16.8	0.0002
6	14.4	0.0005
7	17.5	0.0002
8	18.5	0.0001
9	3.6	0.0665
10	5.3	0.0273
11	13	0.0009
12	17.6	0.0001
13	10.5	0.0024
14	18.5	0.0001
15	15.3	0.0003
16	5.5	0.0244
17	2.1	0.159
18	1.2	0.2766
19	1.2	0.2766
20	2	0.1665

From the previous analysis of variance it is possible to cluster the unsupervised groups into a third category, called « neutral » in the following and not related to normal or aneurysmal tissues. We have chosen to consider as neutral the unsupervised groups for which the probability of the null hypothesis is greater than 0.05, those which are abundant in healthy tissues (« healthy group ») and in pathological tissues (« pathological group »).

It must be noticed that each group is represented by a centroid (average spectrum of the group). In the clustering, a given spectrum is attributed to the group with which it has the smallest distance. This gives the rationale for image labeling. All the pixel spectra of each image are attributed to one of the 20 unsupervised groups. The pixel spectrum is eventually colored according to their belonging to a « neutral », « pathological » or « healthy » group. In

the present work, « neutral » is represented as « green », « healthy » as blue and « pathological » as red.

As previously described, a further refinement is to use hue of red or blue color in order to visually emphasize the representativeness of the pixel spectra. The 42 available images were labeled in this way (figures 4). The computing time for labeling one image, in the Matlab environment, was less than 20 seconds including the loading of the multispectral image from the hard disk of the computer.



*Fig.4 By using the Fisher F value, only 15 proportions among 20 were significantly different. Unsupervised groups were clustered into 3 groups: neutral, healthy and disease. Pixel spectra were coloured according to group membership before image reconstruction. False color maps showing dominance of blue in healthy tissues (A,B) and strong dominance of red in pathological tissues (C,D).*

Our analysis gave a good agreement between the color labels and the « healthy/pathological » status. Only one image from patient 12 (pathological sample) contained a small proportion of significant spectra related to the normal group. This false color representation of IR images allowed a rapid identification of normal and pathological samples.

Initially twenty unsupervised groups were selected to represent the numerous components forming the extracellular matrix of the aortic wall. By using k-means, it was expected to visualise common spectral features between the two tissue types with the presence of highly specific spectra related to normal and pathological states. However, it appears that all spectra from healthy tissues were significantly different from aneurismal ones. Finally, images from the normal tissues exhibit a completely blue color while pathological tissues were in red. By observing the reconstructed images, the neutral group represented by green pixels could be associated to the substrate contribution (here ZnSe window) as they are essentially localised at the extremities of the tissue sections.

## **Conclusion**

In this study we propose a new statistical method to discriminate between normal and pathological aortic tissues. This unsupervised approach based on FDA analysis and K-means allows to analyse and compare the whole collection of IR images simultaneously instead of one by one. This image classification based on the most discriminating information shows a direct correlation with healthy or aneurismal nature of the tissues and not influenced by experimental conditions or patient clinical history.

With regards to the aortic pathology, reconstruction of false color images based this multivariate image analysis can allow a rapid and easy interpretation of the infrared data. This final visualisation of results is encouraging and can be complementary to histopathology where tissue diagnostics is more problematic. These results are in favor of the development of spectroscopic imaging for laboratory and clinical practice.

- Amharref, N., A. Beljebbar, S. Dukic, L. Venteo, L. Schneider, M. Pluot, et al.  
"Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model."  
Biochim Biophys Acta (2006); **1758**(7): 892-9.
- Arteaga-Solis, E., B. Gayraud and F. Ramirez  
"Elastic and collagenous networks in vascular diseases."  
Cell Struct Funct (2000); **25**(2): 69-72.
- Avolio, A., D. Jones and M. Tafazzoli-Shadpour  
"Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media."  
Hypertension (1998); **32**(1): 170-5.
- Bonnier, F., S. Rubin, L. Venteo, C. M. Krishna, M. Pluot, B. Baehrel, et al.  
"In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy."  
Biochim Biophys Acta (2006); **1758**(7): 968-73.
- Chen, Y. J., Y. W. Hsieh, Y. D. Cheng and C. C. Liao  
"Study on the secondary structure of protein in amide I band from human colon cancer tissue by Fourier-transform infrared spectroscopy."  
Chang Gung Med J (2001); **24**(9): 541-6.
- Colley, C. S., S. G. Kazarian, P. D. Weinberg and M. J. Lever  
"Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques."  
Biopolymers (2004); **74**(4): 328-35.
- Debelle, L., A. J. Alix, M. P. Jacob, J. P. Huvenne, M. Berjot, B. Sombret, et al.  
"Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies."  
J Biol Chem (1995); **270**(44): 26099-103.
- Debelle, L., A. J. Alix, S. M. Wei, M. P. Jacob, J. P. Huvenne, M. Berjot, et al.  
"The secondary structure and architecture of human elastin."  
Eur J Biochem (1998); **258**(2): 533-9.
- Gentner, J. M., E. Wentrup-Byrne, P. J. Walker and M. D. Walsh  
"Comparison of fresh and post-mortem human arterial tissue: an analysis using FT-IR microspectroscopy and chemometrics."  
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) (1998); **44**(1): 251-9.
- Klein, D. G.  
"Thoracic aortic aneurysms."  
J Cardiovasc Nurs (2005); **20**(4): 245-50.
- Kohler, A., C. Kirschner, A. Oust and H. Martens  
"Extended multiplicative signal correction as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier transform infrared microscopy images of cryo-sections of beef loin."  
Appl Spectrosc (2005); **59**(6): 707-16.

Koullias, G., R. Modak, M. Tranquilli, D. P. Korkolis, P. Barash and J. A. Elefteriades  
"Mechanical deterioration underlies malignant behavior of aneurysmal human ascending aorta."

J Thorac Cardiovasc Surg (2005); **130**(3): 677-83.

Krafft, C., L. Shapoval, S. B. Sobottka, G. Schackert and R. Salzer  
"Identification of primary tumors of brain metastases by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis."

Technol Cancer Res Treat (2006); **5**(3): 291-8.

Lasch, P., W. Haensch, D. Naumann and M. Diem  
"Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis."

Biochim Biophys Acta (2004); **1688**(2): 176-86.

Li, C., D. Ebenstein, C. Xu, J. Chapman, D. Saloner, J. Rapp, et al.  
"Biochemical characterization of atherosclerotic plaque constituents using FTIR spectroscopy and histology."

J Biomed Mater Res A (2003); **64**(2): 197-206.

Martens, H. and E. Stark

"Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy."

J Pharm Biomed Anal (1991); **9**(8): 625-35.

Petibois, C., G. Gouspillou, K. Wehbe, J. P. Delage and G. Deleris  
"Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue."

Anal Bioanal Chem (2006); **386**(7-8): 1961-6.

Silver, F. H., I. Horvath and D. J. Foran

"Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers."

Crit Rev Biomed Eng (2001); **29**(3): 279-301.

Steinley, D.

"K-means clustering: a half-century synthesis."

Br J Math Stat Psychol (2006); **59**(Pt 1): 1-34.

Tfayli, A., O. Piot, A. Durlach, P. Bernard and M. Manfait

"Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy."

Biochim Biophys Acta (2005); **1724**(3): 262-9.

### **III) Conclusion sur l'analyse multispectrale et chémométrie des tissus aortiques**

Point final (actuel) dans l'étude du tissu aortique par microspectroscopie infrarouge, cette approche basée sur 42 images spectrales présente des résultats tout à fait intéressants.

Deux points sont à mettre en avant :

- Tout d'abord la validation de nos résultats précédents qu'apporte cette étude. L'application de méthodes discriminantes non supervisées a permis de mettre en évidence la tendance naturelle qu'ont les spectres à se classer en fonction de l'état normal du tissu aortique ou bien de la présence d'altérations liées à un anévrisme.

- Le deuxième aspect très intéressant de cette étude réside dans la possibilité de reconstruire des images colorées en fausses couleurs suite à l'analyse statistique. En effet, dans le cas du tissu aortique, le caractère pathologique se retrouve dans l'ensemble des spectres constituant l'image. Au final, les images associées aux tissus normaux sont à forte dominance de bleus tandis que celles associées aux tissus pathologiques sont principalement rouges. Cette observation présente un intérêt particulier dans le cas de l'analyse des données spectrales par une personne ne possédant pas une solide formation en spectroscopie. Le code couleur simple permet facilement d'identifier les tissus pathologiques. Nous présentons donc dans cette étude une approche automatisable du traitement des données qui entre parfaitement dans l'exportation de la technique spectroscopique en milieu hospitalier.

**CHAPITRE V : ANALYSE DES**  
**FRAGMENTS D'AORTE PAR**  
**MICROSPECTROSCOPIES IRTF ET**  
**RAMAN : DE L'*IN-VITRO* À L'*EX-VIVO***

## D) Le microspectromètre Raman, Labram (Jobin Ivan, Horiba, Lille, France)



Figure 56: Vue d'ensemble du Labram

Ce dispositif est composé d'un système optique complexe et d'un système de détection, le tout couplé à un microscope (Fig.56).

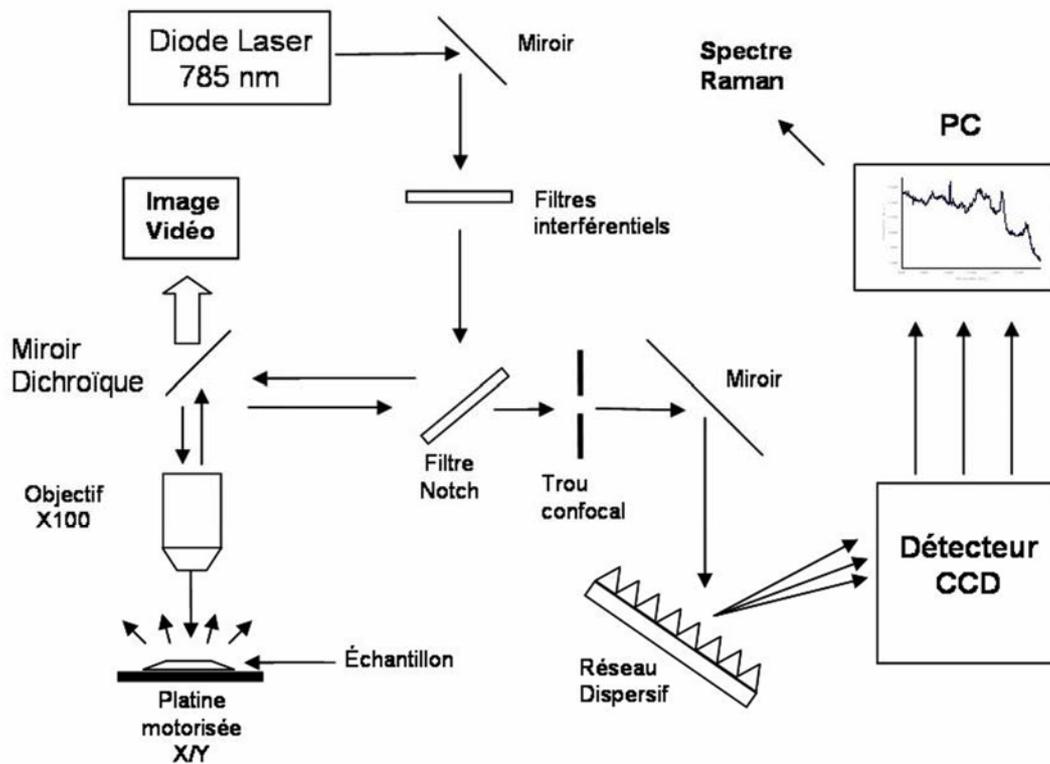


Figure 57: Schéma optique du Labram

La source utilisée est une diode laser de 300 milliwatts (Topica photonics, Germany) qui nous permet d'exciter l'échantillon à une longueur d'onde de 785 nm. Au niveau de l'échantillon, la puissance du laser est d'environ 160 mW.

Le laser est acheminé par un jeu de miroirs jusqu'à l'objectif du microscope. Après interaction avec l'échantillon, une partie de la lumière est diffusée et revient alors vers l'objectif. La lumière diffusée chemine jusqu'à un réseau dispersif avant d'être mesurée par le détecteur CCD. Le trajet optique est détaillé sur la figure 57. Les différents éléments sur ce trajet sont :

- Plusieurs filtres de différentes intensités, disposés sur une roue actionnable via le logiciel d'acquisition et pouvant être ajoutés sur le trajet afin de diminuer l'intensité du signal en cas de saturation du détecteur ou encore de dégradation de l'échantillon par l'intensité de l'illumination laser.

- Le filtre Notch qui, dans un premier temps, joue le rôle de miroir réfléchissant la totalité du rayonnement puis qui, dans un second temps, atténue le signal Rayleigh d'un facteur  $10^6$  en laissant passer la totalité des diffusions Stokes. En effet, lors de l'interaction du laser avec l'échantillon, une faible partie du rayonnement est diffusée, formant les raies Raman stokes et anti-stokes alors qu'une grande partie subit une diffusion élastique à l'origine de la raie Rayleigh.

- Le trou confocal permet de régler la résolution axiale (en Z) et de réaliser des acquisitions à différentes profondeurs dans l'échantillon.

- Le réseau dispersif holographique de 950 traits/mm est chargé de séparer les différentes longueurs d'onde du rayonnement diffusé sur le détecteur CCD.

- Le détecteur CCD (Coupled Charge Device) composé de 1024 x 256 pixels permet la mesure simultanée d'une gamme spectrale donnée. Le système dispersif permet d'envoyer chaque longueur d'onde sur un pixel du détecteur. Le nombre de pixels étant de 1024, la largeur maximale de la gamme spectrale mesurable en une seule fois sera limitée. Dans le cas d'une gamme spectrale plus grande que la capacité du détecteur, le réseau dispersif se repositionnera pour compléter les mesures dans un deuxième temps. Cela n'a aucune

répercussion sur la qualité des données mais seulement sur le temps d'acquisition qui est alors multiplié par deux. Il est à noter que la gamme spectrale utilisée dans le cas de l'étude du tissu aortique est au maximum comprise entre 600 et 1770  $\text{cm}^{-1}$  et est donc mesurable en une seule acquisition. Les spectres sont affichés sous la forme d'intensités en fonction de longueurs d'onde (Shift Raman) en  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution spectrale de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

- La platine motorisée en X/Y permet la gestion du positionnement des points de mesure lors de la réalisation de cartographie des échantillons avec une précision du pas de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ .

- L'objectif X100 Leica (Germany) possède une ouverture numérique de 0.75 ce qui donne une distance focale d'environ 4,7 mm. Cette distance, relativement importante, est importante dans notre étude afin de ne pas avoir de problème lié au contact avec le tissu. Un tel objectif permet de réaliser des acquisitions sur un spot d'environ 3-4  $\mu\text{m}$  de diamètre.

- Une caméra visible est associée à un moniteur qui nous permet la visualisation de l'échantillon en temps réel. Un objectif X10, seulement utilisé dans le cadre de l'obtention des images visibles, permet d'avoir un champ suffisamment grand pour repérer les zones d'intérêt sur le tissu.

La caméra apporte également une aide précieuse lors de la focalisation du laser à la surface de l'échantillon. En observant l'échantillon frappé par le laser, il est possible d'ajuster la hauteur de la platine afin d'obtenir le point de focalisation. Cette étape est très importante pour l'optimisation du signal arrivant sur le détecteur et favorise l'obtention de spectres contenant un maximum d'information.

- Le logiciel Labspec (Horiba Jobin Yvon S.A.S. France) permet de régler les différents paramètres d'acquisition. Grâce au couplage de la caméra visible au dispositif d'acquisition, il est possible de se positionner sur un point de mesure donné et d'y réaliser une acquisition unique. Ce mode de mesure est équivalent au mode point de la spectroscopie infrarouge.

L'interfaçage entre le logiciel et la caméra rend possible la capture d'images visibles de l'échantillon avec les objectifs X10 ou X100 et de définir la zone d'acquisition de taille variable afin de réaliser une cartographie (Fig.58). Dans ce cas, il est possible de définir soit le nombre de spectres sur une zone donnée ou bien de régler le pas séparant deux mesures. Au final, la cartographie obtenue contient pour chaque pixel le spectre Raman correspondant qu'il

est possible d'extraire afin de réaliser le traitement des données spectrales. Il est également possible de faire des moyennes de spectres sur des zones sélectionnées par l'opérateur. Afin d'assurer la bonne focalisation du laser, un système autofocalisation est présent et rétablit la focalisation initiale entre chaque point de mesure.

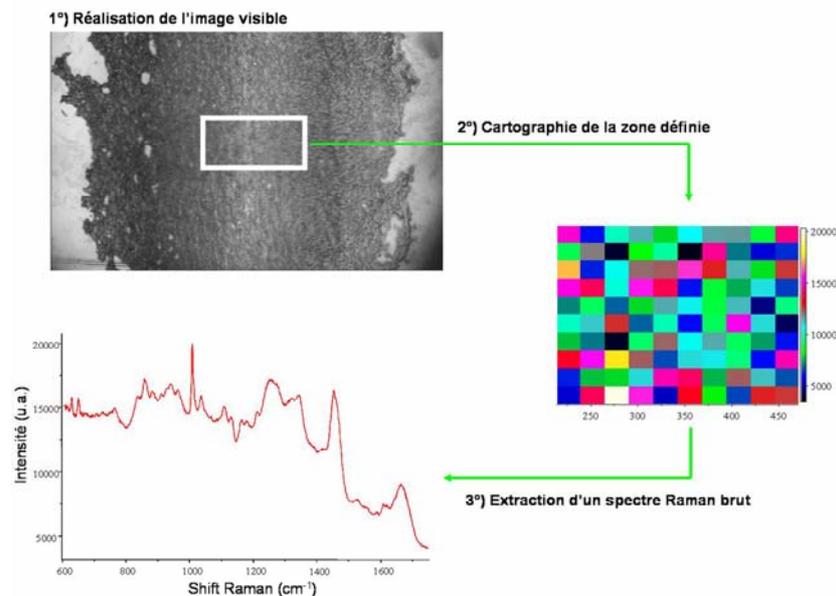


Figure 58: Réalisation d'une cartographie Raman

## **II) Application de la microspectroscopie Raman à l'étude du tissu aortique**

Deux types d'approches furent mises au point, la première purement *in vitro* avec l'étude de cryosections et la deuxième, *ex vivo*, réalisée sur des tissus aortiques à l'état brut, sans réalisation de coupes, permettant la conservation de l'intégrité de la paroi aortique. La spectroscopie Raman présente l'avantage de ne pas être limitée par l'épaisseur des coupes, ce qui permet de réduire au maximum l'influence de la qualité de la coupe sur les résultats grâce à l'utilisation de cryosections de 20  $\mu\text{m}$ . Ces dernières étaient déposées sur des supports de ZnSe tandis que les fragments d'aorte l'étaient sur des lames en verre (Fig.59).

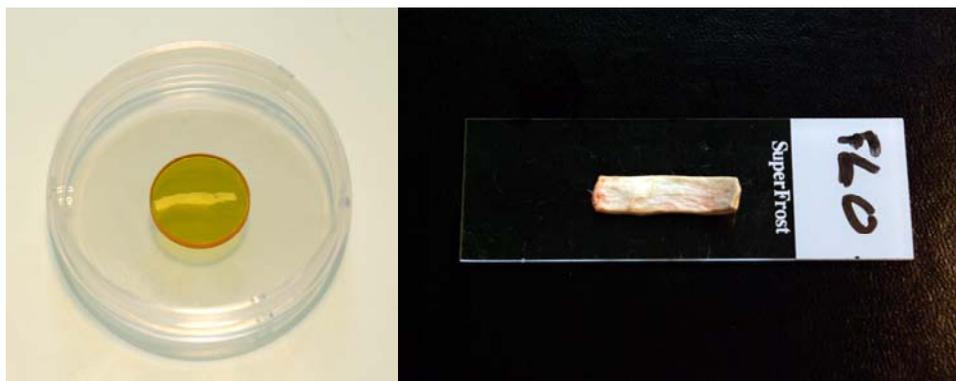


Figure 59: Comparaison des deux types d'échantillons pour l'analyse Raman (coupe de 20  $\mu\text{m}$  sur support de ZnSe à gauche ; fragùent d'aorte sur lame de verre à droite)

## II.1 Calibration du système

Avant de commencer les mesures à l'aide du spectromètre Labram, il est nécessaire de réaliser quelques vérifications concernant la calibration du système. Il est possible que le système subisse un décalage entre deux manipulations du à la source laser qui peut légèrement fluctuer en fonction de la température de la pièce mais également en raison d'un mauvais positionnement du réseau dispersif. Pour la phase de calibration une lame de silicium est utilisée.

Deux types de mesures sont réalisées :

- L'ordre zéro : il s'agit du signal mesuré sur le détecteur sans solliciter le système dispersif. Tout le rayonnement arrive sur la position zéro du détecteur, ce qui permet de vérifier que l'excitatrice donne bien un pic à  $0\text{ cm}^{-1}$ . Cette mesure correspond à l'étalonnage du système et permet d'ajuster la lecture des fréquences en cas de décalage.
- L'excitatrice : Le réseau positionné sur sa position zéro disperse le rayonnement sur le détecteur. Dans le cas du silicium, trois pics sont observables : l'excitatrice ( $0\text{ cm}^{-1}$ ) et les diffusions Raman stokes et anti-stokes ( $520$  et  $-520\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig.60). L'ordre zéro et le zéro de l'excitatrice doivent correspondre et indiquent un positionnement correct du réseau par rapport au détecteur. Le pic du silicium à  $520\text{ cm}^{-1}$  permet d'avoir un deuxième pic de contrôle pour le calibrage des fréquences du spectre.

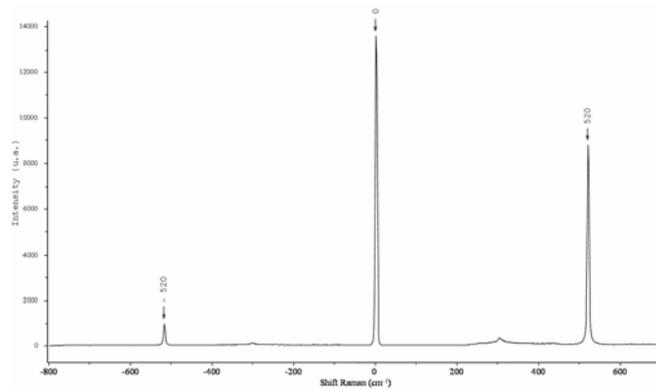


Figure 60: Spectre du silicium

Le silicium utilisé pour le positionnement du zéro ne permet pas de visualiser la linéarité du spectre au-delà de  $520\text{ cm}^{-1}$ . Pour affiner la calibration, deux produits de références sont utilisés, le 1,4-bis-(2-méthylstyril)-benzène et le naphthalène. Ils sont stockés sous forme solide dans des cuves en quartz. Dans la gamme spectrale utilisée pour l'étude des tissus aortiques, ces deux produits purs présentent de nombreux pics fins qui permettent de vérifier que la calibration des fréquences est correcte et que la linéarité du spectre est conservée (Fig.61). Ces produits sont passés de manière systématique avant les mesures réalisées sur les tissus. La parfaite superposition des spectres issus de chaque série d'expériences prouve la bonne calibration du spectromètre Labram.

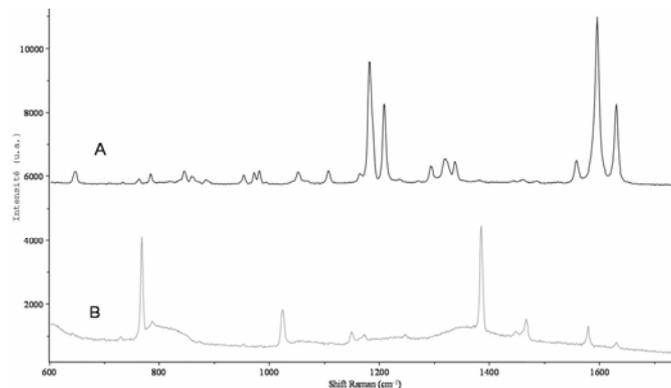


Figure 61: Spectres des produits de référence

A : 1,4-bis-(2-méthylstyril)-benzène ; B : naphthalène

### Paramètres d'acquisitions retenus

Pour l'étude des cryosections à  $20\text{ }\mu\text{m}$  :

- Nombre d'accumulation : 3
- Temps d'acquisition : 30s
- Gamme spectrale : 600-1750  $\text{cm}^{-1}$
- Intervalle entre chaque spectre : 10  $\mu\text{m}$
- Nombres de spectres obtenus : 100 par échantillons (10\*10)

#### Pour l'étude des fragments d'aorte :

- Nombre d'accumulation : 2
- Temps d'acquisition : 20s
- Gamme spectrale : 600-1770  $\text{cm}^{-1}$
- Nombre de points mesurés par échantillon: 12

Concernant les cryosections, quatre moyennes ont été calculées puis utilisées pour l'analyse. La répétition de 3 accumulations permet de réduire le bruit présent dans les spectres. D'autre part, le temps d'acquisition de 30 secondes permet d'obtenir une intense illumination du détecteur qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et de bien définir les pics et bandes du spectre.

Concernant les fragments d'aortes, il n'a pas été possible de refaire les mêmes acquisitions, dans les mêmes conditions. En effet, le fragment réagit à la température ambiante de la salle, ce qui rend assez difficile la focalisation sur la surface de l'échantillon pendant 90 secondes. Nous avons donc préféré réduire le temps d'acquisition pour conserver un signal assez fort et au final calculer une moyenne globale des 12 spectres mesurés pour l'échantillon. Le passage par une moyenne permet de réduire le bruit présent dans le spectre et de s'affranchir, dans une certaine mesure, des variations des conditions de mesure.

#### II.2 Correction des spectres

Cette étape est apparue très importante dans notre étude et précède la phase de traitement des spectres. Trois étapes de correction préalable du spectre permettent de corriger les déviations dues au spectromètre (Fig.62 A,B et C).

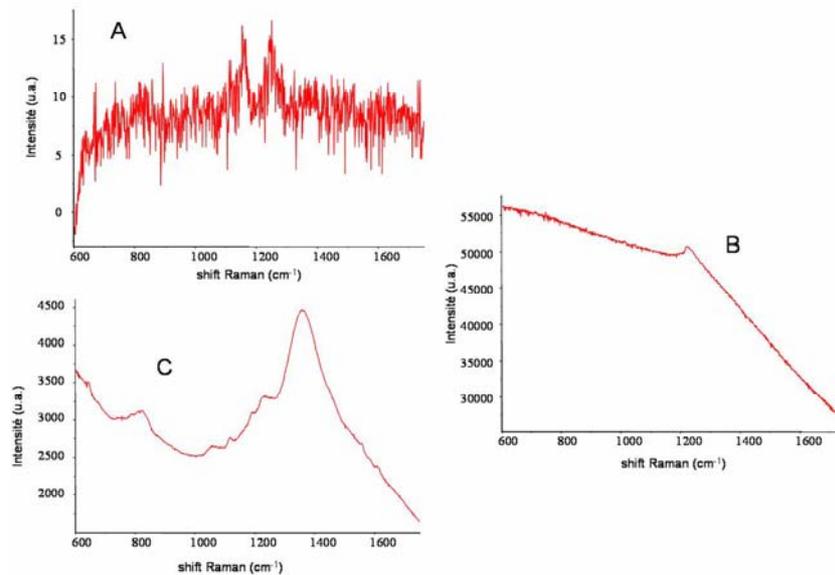


Figure 62: Les différents signaux utilisés pour la correction du spectre Raman

A : courant noir ; B : lumière blanche ; C : signal du support

La soustraction du courant noir permet d'éliminer la partie du signal correspond au bruit de fond présent au niveau du détecteur (A). Ce signal est mesuré dans le noir total et le laser éteint.

La division par le signal de la lumière blanche permet de corriger la réponse du détecteur. Tous les pixels du détecteur n'ont pas la même sensibilité face au signal ce qui crée une déviation traduite par l'inclinaison du spectre (B). Dans le cas d'une réponse linéaire, le signal de la lumière blanche obtenue grâce à une lampe halogène devrait être une droite parfaite. En divisant le spectre par le signal de la lumière, la non linéarité de la réponse du détecteur est corrigée ce qui ramène la contribution de chaque longueur d'onde du spectre à la même valeur. Ceci a toute son importance dans l'observation de rapport de bande entre différentes bandes.

La soustraction du signal des optiques et du support correspond à la soustraction du spectre de référence en spectroscopie infrarouge. En effet en spectroscopie Raman l'objectif à un signal qui lui est propre mais également le support de ZnSe (C). Deux cas se présentent :

- Dans l'analyse des cryosections, le signal correspond à celui de l'objectif associé à celui du support. Dans ce cas une mesure est réalisée en focalisant le laser sur une zone dégagée de la pastille et le spectre mesuré est la somme des deux contributions.

- Dans le cas de l'analyse de fragments d'aorte *ex vivo*, l'épaisseur du tissu est trop importante pour avoir le signal du support. Dans ce cas seulement, le spectre de l'objectif sera mesuré et soustrait des spectres mesurés sur le tissu.

### II.3 Importance du support

Il est nécessaire de souligner l'importance de la contribution du support. Les résultats Raman ont longtemps été difficiles à interpréter et ce, du fait de la contribution des fenêtres de ZnSe qui n'était pas identique pour chaque tissu. Bien que soustrait pendant la phase de correction des spectres, un même tissu disposé sur deux pastilles, présentant des signaux différents, ne donnent pas le même spectre final. Pour éliminer cette source de déviation, il a été nécessaire des tester toutes les pastilles utilisées et, par un roulement, de n'utiliser que les pastilles présentant exactement le même signal. Cela a permis d'obtenir une meilleure reproductibilité des mesures effectuées sur les différents échantillons.

### II.4 Traitement

Les traitements des données Raman peuvent se faire sur des spectres isolés ou bien sur l'ensemble des spectres présents dans la cartographie. Le logiciel Labspec permet de réaliser tous les traitements nécessaires à l'utilisation des spectres. Les mêmes fonctions que celles employées pour les spectres infrarouges ont été appliquées. Dans un premier temps, un lissage de type Savitsky-Golay est appliqué, suivi d'une correction de la ligne de base et d'une normalisation vectorielle.

Par la suite, la conversion des spectres Raman en tables de valeurs permet de les charger dans le logiciel Opus afin de réaliser les analyses discriminantes de type Classification Hiérarchique Ascendante (HCA).

### **III) Objectifs de l'analyse *ex-vivo* des fragments aortiques**

Jusqu'à présent, les résultats obtenus objectivent une bonne discrimination des spectres infrarouges en fonction de l'état normal ou pathologique du tissu et ce, de façon reproductible. L'analyse statistique basée sur un grand nombre de données renforce la validité d'appliquer la spectroscopie infrarouge pour l'analyse *in vitro* des tissus aortiques.

Pourtant, notre principal objectif en débutant cette étude des tissus aortiques humains par spectroscopies vibrationnelles était de fournir un nouvel outil diagnostique applicable en routine par le chirurgien lors d'interventions chirurgicales ; dans cette optique, la spectroscopie infrarouge atteint ses limites même si cette approche a été fondamentale et nous a permis de développer des méthodes d'analyse utilisables en Raman.

Les principaux avantages de la spectroscopie infrarouge sont la rapidité d'obtention des données spectrales et un rapport signal/bruit de meilleure qualité qu'en spectroscopie Raman. De plus, l'utilisation de l'imageur Spotlight nous a permis de balayer de grandes zones dans des temps relativement courts. Il est clair que, concernant la cartographie Raman, il sera difficile d'obtenir une masse de données aussi importante pour des durées d'acquisition identiques.

L'application de la microspectroscopie Raman nous a demandé plus de temps du fait du temps passé pour maîtriser la technique afin d'obtenir des résultats reproductibles et exploitables. Les considérations techniques telles que, l'influence du support, la correction du spectre, la bonne calibration du système sont des notions que nous avons acquises, à nos dépens, tout au long de ce travail de thèse.

Pourtant, la microspectroscopie Raman, une fois maîtrisée, nous a permis de nous orienter d'avantage vers le domaine médical en raison de ses capacités lui permettant de s'adapter au domaine de l'analyse *in vivo*. Le développement actuel de sonde Raman miniaturisée, facilement transportable au bloc opératoire est actuellement l'une de nos priorités en dépit de certains obstacles.

Deux objectifs sont à atteindre :

- L'application de la microspectroscopie infrarouge nous a permis de discriminer les tissus sains et pathologiques. Les bandes amides I et II semblent très sensibles aux modifications structurales qui accompagnent l'anévrisme. Le premier objectif est de transposer ces résultats obtenus en infrarouge sur une série identique d'échantillons afin de montrer la reproductibilité de l'approche spectroscopique.

- Le développement de la sonde *in vivo* étant en cours, le deuxième objectif fut de se rapprocher au maximum des conditions de mesure telles qu'elles seraient pendant une intervention chirurgicale. L'objectif est de mesurer un spectre sur la paroi aortique non préparée afin de déterminer si des altérations pathologiques sont présentes, ce qui pourrait indiquer la nécessité de remplacer une aorte ascendante légèrement dilatée. Afin de simuler cette approche au sein du laboratoire, nous avons décidé de ne plus procéder à des cryosections mais de réaliser les mesures directement sur des blocs entiers d'aorte, permettant ainsi de conserver l'intégrité de la paroi aortique ainsi que l'organisation de ses différents constituants.

Comme précédemment décrit, la spectroscopie Raman se base sur un phénomène de diffusion et rend donc les mesures possibles sur des échantillons beaucoup plus épais qu'en infrarouge puisqu'il n'est pas nécessaire de traverser le tissu pour obtenir du signal. Cela permet de travailler dans un premier temps sur des cryosections de 20  $\mu\text{m}$  sans problème de saturation du signal mais également d'obtenir des spectres de bonne qualité sur la surface des blocs d'aortes.

**Article n°5: Normal and Aneurismal**  
**Human Ascending Aortas analysis**  
**using FTIR and Raman**  
**Microspectroscopies from *in-vitro* to**  
***ex-vivo***

## Analysis of Normal and Aneurismal Human Ascending Aortic Tissues from *in-vitro* to *ex-vivo* approach using FTIR and Raman Microspectroscopies

F. Bonnier<sup>1</sup>, S. Rubin<sup>1, 2</sup>, A. Tfaily<sup>1</sup>, N. Amhareff<sup>1</sup>, L. Ventéo<sup>3</sup>, M. Pluot<sup>3</sup>, B. Baehrel<sup>2</sup>, M. Manfait<sup>1</sup>, G. D. Sockalingum<sup>1\*</sup>

(Submitted in Cardiovascular research)

<sup>1</sup> Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France.

<sup>2</sup> Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

<sup>4</sup> Laboratoire Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Reims, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 Reims cedex, France.

### Abstract

**Aims:** To date discovering the ambiguous situation of a moderate dilation of the ascending aorta during AVR is frequent. Surgeons have to take a decision to associate the AVR to the ascending aortic replacement. The aim of this study is to propose novel optical approaches which could be further developed as tools to help surgeon in their decision. This primary study was conducted on 22 cases. **Methods:** We evaluated two microspectroscopic methods based on infrared absorption and Raman scattering to perform both *in-vitro* and *ex-vivo* studies of human ascending aortas. Firstly, cryosections were assessed by both methods to analyse the structural changes localised in the media and the spectral information was usefully exploited to discriminate between normal and aneurismal tissues. Secondly, aortic tissue blocks were investigated *ex-vivo* by Raman microspectroscopy study to reproduce the surgical act conditions so as to practice simulation of the possible *in-vivo* Raman application. **Results:** Modifications of the aortic wall components were visible in the spectral data, mainly in the amide bands regions, representative of the protein content. Study on 22 patient (11 normals, 11 aneurysms) based on cryosections allowed to discriminate clearly aneurismal and normal aortas with a good reproductibility of both methods. Application of Raman spectroscopy on *ex-vivo* blocks equally allowed to achieved the same differentiation. **Conclusion:** This study highlights the potentials of vibrationnal spectroscopies in the diagnosis of aneurisms. Because of the molecular information content in the spectra, the *ex-vivo* Raman results are very promising for *in-vivo* approaches. To date, fiber optic *in-vivo* Raman probes are being tested and we believe that they would be, in the near future, a promising diagnostic tool for per-operative decision making.

## Introduction

Vibrational spectroscopy whether it is based on infrared absorption or Raman scattering spectroscopies, gives sensitive information related to biochemical composition of the studied sample and have been applied to cells and tissues analysis in order to characterise and/or discriminate pathological samples (Gaigneaux 2002; Lasch 2004; Tfayli 2005; Amharref 2006). The method is fast, require minimal sample preparation, and no staining or fixation. While infrared spectroscopy is mainly developed for *in vitro* measurement, Raman spectroscopy, due to its high molecular specificity, is amenable to *ex vivo*, and *in vivo* medical diagnostics (Choo-Smith 2002). This technique was successfully applied in the diagnostics of different cancers like skin, breast, oesophagus, colorectal or urogenital (Krishna 2004). The greatest advantage of Raman spectroscopy is its potential use for *in-vivo* tissue investigations via the use of optical fibers (Motz 2005; Chrit 2006; Haka 2006; Chrit 2007).

The aorta is the most important artery of the human body, from the left heart aortic valve in the thorax to the iliac bifurcation in the lower abdomen. All important collateral arteries begin from the aorta. The thoracic ascending aorta is subjected to the important blood pressure during heart cycles and undergoes a natural increase of its diameter with time. Nevertheless, many factors can influence the structure of the aortic wall and contribute to abnormal reorganisation of the components present associated with an advent of aortic to pathology with the consequence of an increase of diameter and thinning of the aortic wall. Implication of metalloproteinases or presence of congenital valve malformation are clearly associated with the pathology and the aneurysm outcome is multifactorial (Dollery 1995; Milewicz 1996; Bonderman 1999; Nagase 1999; Taketani 2005). When the diameter is higher than 50 mm presence of an aneurysm is observed, associated with modifications in physical characteristics such as decrease of elastance coupled to increase of resistance of the aortic wall. This pathology, localised on the thoracic aorta is critical and the final outcome is the rupture with patient death in the following minutes. Discovery of a dilated thoracic aorta by surgeon is often fortuitous during surgical interventions like aortic valve replacement (AVR). Face to the increased risk during surgical procedure, the systematic replacement of the ascending aorta seems not to be the better solution for the patient, also considering the uncertain increase of the diameter following AVR. Only few studies were addressed to the natural aortic dilation following AVG (Nancarrow 1984; Natsuaki 1998). Recent studies based on numerous patients exhibit variable results according to population and presence or not of aggravating factors (abnormal valves, connective tissue disease, endocarditis) (Hahn 1992; Crawford

2001). Predictive percentages were calculated, but today no approach with a 100% reliability could be established. Presently, the aortic diameter coupled with the surgeon experience remain the most reliable way to decide whether replacement is necessary. All studies highlight that nowadays surgeons require new rapid readily applicable, non invasive and non perturbative tools for characterising tissue nature. To this end, we report in this study the application of Fourier-transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopies to analyse normal and aneurismal aortic tissues. Preliminary work in FTIR imaging gave promising results in the identification of aneurismal aortic tissues (Bonnier 2006). This previous study is now conformed by a larger number of patient samples. The aim of the study is on the one hand to compare spectroscopic data from both IR and Raman, and to assess the potential of the latter as an *ex vivo* tool for analysis whole tissue blocks as a step before developing the method as an *in vivo* approach.

## Methods

### 2.1 Aortic tissue samples

Biopsies of human aortic tissues used in this study were classified into 2 groups:

- 1) A first group of normal tissues, without visible dilatation, obtained during cardiac explantations from patients in state of cerebral death. (n=13)
- 2) A second group of pathological tissues obtained after surgical replacement of pathological aortas. (n=15) All these samples were assigned to aneurismal group due to aortic diameter bigger than 50 mm.

Samples were conserved after surgical acts by preserving in a sterile compress with a few millilitres of physiological serum. The aortic tissue was cut into stripes of 20 mm X 8 mm, snap-frozen in liquid nitrogen, and preserved at -80°C. Measurements were performed on ZnSe windows for cryosections studies or directly on aortic sample for *ex-vivo* analysis by Raman spectroscopy. Patient informations like sex, age and presence or not of pathology are summarised in table 1, it's also note type of analysis for each sample.

Tableau 1: Summary of clinical data concerning the 27 patients materials used in this study

Sample number	Sex	Age	class	Type of analysis*
1	male	45	Normal	<i>In-Vitro</i>
2	male	35	Normal	<i>In-Vitro</i>
3	male	20	Normal	<i>In-Vitro</i>
4	female	23	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
5	female	27	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
6	female	52	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
7	female	39	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
8	male	38	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
9	male	45	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
10	male	49	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
11	male	62	Normal	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
12	Male	53	Normal	<i>Ex-vivo</i>
12	male	59	Normal	<i>Ex-vivo</i>
13	female	37	Aneurysm	<i>In-Vitro</i>
14	male	38	Aneurysm	<i>In-Vitro</i>
15	male	49	Aneurysm	<i>In-Vitro</i>
16	male	80	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
17	female	65	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
18	female	49	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
19	male	41	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
20	female	54	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
21	female	77	Aneurysm	<i>In-Vitro</i>
22	male	72	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
23	female	74	Aneurysm	<i>In-Vitro ex-vivo</i>
24	male	69	Aneurysm	<i>Ex-vivo</i>
25	female	82	Aneurysm	<i>Ex-vivo</i>
26	male	74	Aneurysm	<i>Ex-vivo</i>
27	male	45	Aneurysm	<i>Ex-vivo</i>

\* Type of analysis: *In-vitro* corresponds to both FT-IR and Raman microspectroscopies on tissues sections and *Ex-vivo* indicates measurements on tissue blocks

## 2.2 Infrared imaging of aortic tissue sections

Spectral images were acquired using the infrared imaging system Spotlight 300 coupled to a Spectrum One FTIR spectrometer (both from Perkin Elmer Life Sciences, France). Cryosections of 10  $\mu\text{m}$  were placed on transparent infrared ZnSe windows. Spectral acquisition was performed through the thickness of the aortas, across the three layers of the aortic wall. IR images were acquired with a liquid nitrogen cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) line detector composed of 16 pixel elements which can be operated at a spatial resolution of either 6.25 or 25 microns/pixel. In our study, we used the highest spatial resolution and the spectral resolution was set to 4  $\text{cm}^{-1}$ . Each absorbance spectrum composing the IR images, and averaged over 32 scans, was recorded for each pixel in the transmission

mode using the Spotlight software (Perkin-Elmer). In these conditions, two hours were necessary to acquire the whole infrared image containing more than 3000 spectra and corresponding to a typical area of  $1300 \times 100 \mu\text{m}^2$ . The atmospheric correction function was applied on all IR images compensate for water vapour and contribution present in the spectra. For each sample, 5 means spectra were calculated and subjected to a Savitzky Golay smoothing procedure (5 pts), a baseline correction and a vector normalisation (to compensate for baseline drift and sample thickness respectively) before analysis.

### *2.3 Raman mapping of aortic tissues sections*

Raman spectra of tissue sections were recorded with a near infrared confocal Raman microspectrometer (Labram, Horiba Jobin Yvon S.A.S., France). The setup consisted of a microscope (Olympus, HB40, France) coupled to the Labram spectrometer. The microscope was equipped with a xy-motorized (Marzhauser, Germany), computer-controlled sample stage, which enabled automatic scanning of the sample with a resolution of  $1 \mu\text{m}$ . The excitation source (785 nm) was provided by a 300-watt diode laser (Toptica Photonics, Germany). The laser power on the sample was around 160 mW. This laser light was focused on the sample with a 100X objective (Leica, Germany). The numerical aperture of this objective was 0.75 and had a working distance about 4.7 mm, which was very useful for focusing on *ex-vivo* samples without being in contact with the tissues. This objective collected light that was scattered by the sample, which was then analysed by the spectrometer equipped with a Pelletier-cooled CCD detector. The Raman signal was collected in the  $600\text{--}1750 \text{ cm}^{-1}$  spectral region with a spectral resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ . For our measurements, the objective was used in the autofocus mode. This system allowed focusing the laser light on each point of the tissue section before acquiring each spectrum. Two types of sample were used; unstained cryosections of  $20 \mu\text{m}$  or entire aortic bloc were placed on the microscope. A screen image recorder camera attached to the microscope enabled the acquisition of the white light multi-image of the area under investigation. Raman maps were recorded by defining a scanning xy-step size of  $50 \mu\text{m}$  as controlled by the LabSpec software (Horiba Jobin Yvon S.A.S. France). The 100X objective collected light on a  $3\text{--}4 \mu\text{m}$  spot.

- Raman microspectroscopy on  $20 \mu\text{m}$  cryosections: An area of about  $250 \times 250 \mu\text{m}^2$  is selected on the sample and 100 spectra were obtained with a step of  $25 \mu\text{m}$ . Each spectrum

was collected using 3x30s of signal collection time. Four mean spectra were calculated, each being an average of 25 spectra (Fig 1A).

- Raman microspectroscopy on *ex-vivo* samples: 12 spectra were obtained in different parts of the aortic tissues with a collection time of 2x20s spectrum. It was impossible to increase the acquisition time due to the defocusing of the biological sample to ambient atmosphere. Finally, a representative spectrum was obtained by averaging the 12 spectra for each sample (Fig 1B).

Raman spectra have to be corrected for instrument response. First, the black current was subtracted to eliminate the dark noise of the detector. Second, the spectra were divided by white light to correct the non linear sensitivity of the detector on all pixels. Finally, the signal of the ZnSe window was subtracted after correction by the dark current and white light. In case of *ex-vivo* tissular analysis the sample was more than 1 mm and no signal from the substrate was obtained. So only the signal of the objective was subtracted.

The spectra were also submitted to a Savitzky Golay smoothing procedure (2x5 pts), a baseline correction and a vector normalisation.

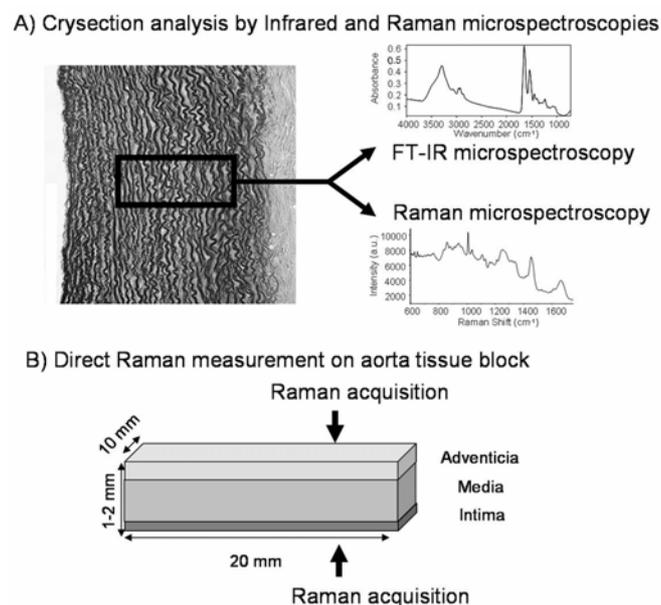


Fig.1: (A) Section of orcein stained tissue showing presence of elastic fibers (black striates) in tissue section of human ascending aorta. The black rectangle represents the working area, centred on the media, for FT-IR and Raman microspectroscopies. (B) Schematic representation of an aortic blocks used for Raman study. Measurements were possible from the two sides of the tissue, the intima and the adventice.

This investigation based on Human aortic samples conforms with the principles outlined in the declaration of Helsinki (*Cardiovascular Research* 1997; 35:2-4).

## **Results**

Vibrational spectra give very sensitive information of molecular component present in a sample. The application of FTIR and Raman microspectroscopies on aortic samples permit to study modification of aortic wall composition related to pathological development. The infrared imaging was first applied because of the rapidity of the technique to obtain large amount of data in a relatively short time. The aortic tissue is composed of three successive layers (going from internal to external): the intima, the media and the adventice. The intima, in contact with blood flow, is a single layer of endothelial cells; the media is composed of concentric cylinders of smooth muscular cells associated with of collagen and elastin fibres and is more implicated in aortic pathologies; and the adventice, the most external layer, is composed of connective tissue with small vessels for aortic wall vascularisation. This last layer is elastic but with good resistance properties. The media containing principally collagen and elastin seems to be clearly affected by pathological outcome (Arteaga-Solis 2000). The IR images were obtained through the three layers of the aortic wall but the average spectra were essentially calculated in the media in order to observe the structural and chemical modifications of this important part of the tissue. The amide I and II bands region is very representative of protein content of biological tissues and were used for sample discrimination between normal and pathological by Hierarchical Clustering Analysis (HCA analysis) in OPUS 3.02 software. Graphic representations of the clustering results are given in the form of a hierarchical tree. This representation is based on calculated Euclidian distances between all objects, as spectra or selected spectral regions, using the Ward's algorithm. It uses the level of mean difference to classify, in a same group or cluster, spectra with a low level of mean difference and, in different group, spectra with a high level of mean difference.

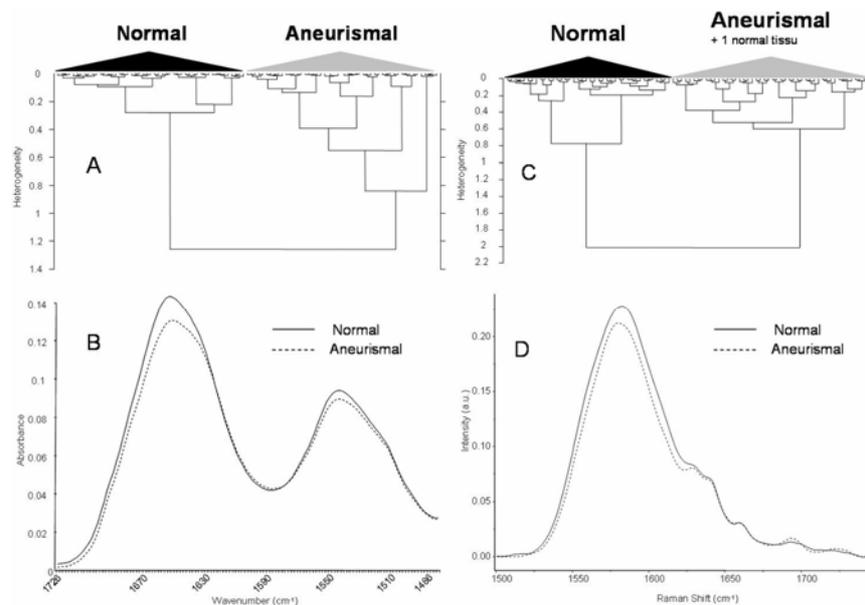


Fig.2: (A) Hierarchical classification of mean infrared spectra from 10  $\mu\text{m}$  cryosections of normal and aneurismal ascending aortas using the 1475-1720  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. (B) Representative mean infrared spectra of normal and aneurismal tissue focused on the spectral window 1475-1720  $\text{cm}^{-1}$ . (C) Hierarchical classification of mean Raman spectra from 20  $\mu\text{m}$  cryosections of normal and aneurismal ascending aortas using the 1500-1750  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. (D) Representative mean Raman spectra of normal and aneurismal tissues focused on the spectral window 1500-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

The dendrogram obtained is shown in Fig 2A. Two distinct groups appear in the dendrogram, one for the healthy samples and the other for the aneurismal tissues. All 22 patient samples were correctly classified using the spectral windows between 1720 and 1475  $\text{cm}^{-1}$  (Fig 2B) suggesting that submitted it undergoes some modifications related to presence of pathology and is clearly implicated in a reproducible discrimination of aneurismal samples.

The scale gives a representation of the heterogeneity between the different spectra. It was observed that the aneurismal tissues were more heterogeneous than the normals. The aneurismal samples were more altered due to their pathological nature. The patient materials included used in this study were both from male and female origins but also cover a large panel of ages. It is important to note that some pathological samples were from patients who were younger than those with normal tissues. It was important to include these samples in the study to highlight that the classification is not influenced by patient sex or age. Finally the classification obtained is related to the structural organisation of protein components and the outcome of the discrimination is mainly due to aortic tissue alterations.

The Raman study on aortic tissues was first performed on 20  $\mu\text{m}$  cryosections placed on ZnSe substrate. This thickness minimised the signal from the substrate itself. Also, using thicker samples allowed to increase the quality of the tissue sections since they presented less kinks and holes. Moreover, for Raman approach it was important to use the same pool of patients as with FTIR but not the same section thickness in order to exclude such artefacts. This step was also aimed at reproducing infrared results obtained previously.

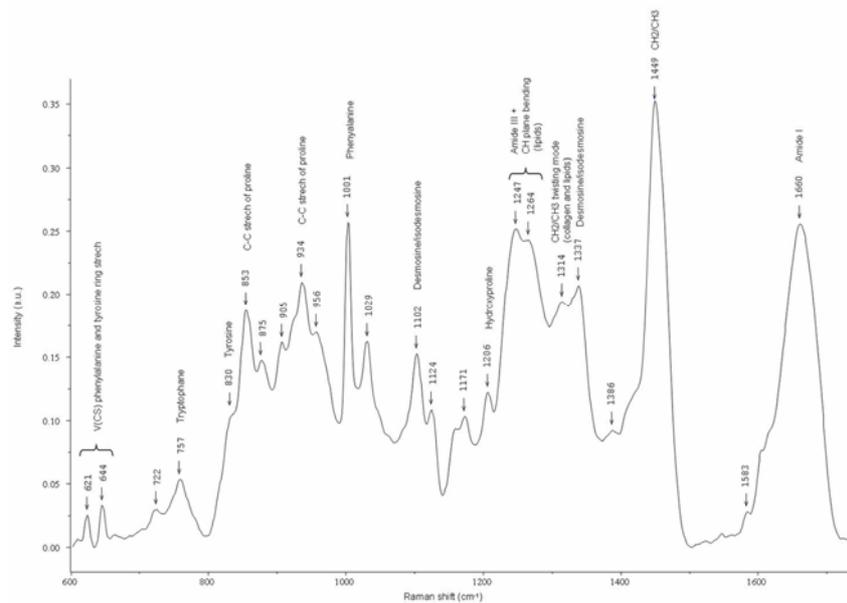


Fig.3: A Typical Raman mean spectrum obtained on normal aortic tissue on the range 600-1750  $\text{cm}^{-1}$ . Presence of common components of biological sample can be identified at specific frequencies.

After signal correction and spectral pre-treatment a representative aortic spectrum was obtained (fig.3). Some specific vibrations can be identified in the Raman signal like amide I band (1660  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  bending (1449  $\text{cm}^{-1}$ ), phenylalanine contribution (1001  $\text{cm}^{-1}$ ), tryptophane (757  $\text{cm}^{-1}$ ) or C-S vibration from phenylalanine and tyrosine (621 and 644  $\text{cm}^{-1}$ ). Some specific peaks like C-C stretching of proline (855 and 933  $\text{cm}^{-1}$ ) and desmosine/isodesmosine presence (1102 and 1337  $\text{cm}^{-1}$ ) seems to indicate respectively presence of collagen and elastin in the tissues (Frushour 1975; Baraga 1992; Buschman 2001).

The spectra obtained on aortic sections were analysed using HCA in order to visualise Raman spectroscopic markers for the discrimination of aneurismal tissues from normal ones. Previous results using infrared spectroscopy showed a strong influence of amide I and II bands from fibrous proteins in identification of pathological tissues. The spectral window 1500-1750  $\text{cm}^{-1}$  (corresponding to amide I band) was used to analyse of the 22 same patients. The results presented in fig.2C exhibit a good classification between the two types of tissues.

Only tissues from one patient assigned as a “normal” aorta was missclassified in the pathological group. After referring to the patient to this tissue was from a 62 years old male person and it seems plausible that this aorta may exhibit modifications close to a pathological one due to his age. In this type of situation, it is clearly necessary to obtain more detailed information about the patient to interpret the results obtained. The numerous factors implied in aneurysm outcome are known (alimentation, tobacco, hypertension,...). These results are encouraging and in accordance with those obtained by infrared spectroscopy. The amide I band is a very sensitive marker of pathological modification of aorta. It's clear that alterations of collagen and elastin have repercussions on spectral information and can be very useful for the discrimination.

Amide I band from Raman spectra represented in fig 2D exhibits modifications between spectra from normal and aneurismal tissues. To explain this evolution of the amide band profile it was possible to apply a deconvolution method to obtain the proportion of each secondary structure present in sample. Previous study on aortic section by infrared spectroscopy permits to highlight modifications in global protein secondary structure (Bonnier 2006). Elastin is abundant in aortic wall and previous secondary structure analysis by FTIR spectroscopy indicates an abundance of beta structure face to alpha helix (Debelle 1995). This information is also accessible by Raman spectra analysis (Debelle 1998). The curve fitting procedure was applied on mean spectra obtain on aortic sections. The fig.4 shows the band deconvolution obtain (fig 4A: normal aortic tissue; fig 4B: pathological aortic tissue) and table 2 summarized the principal bands area and assignments. The beta structures were identified at 1678 and 1687  $\text{cm}^{-1}$  with a moderate global decrease in pathological tissues (about 2%). However, by separate analysing of the two identified beta structure bands area it was observed modifications in their proportion. In term of bands area the first beta structure localised at 1678  $\text{cm}^{-1}$  represent about 15% of the global secondary structures present in normal aortic tissues. In case of aneurysm, this band area decreases and represents only 8%. In contrary, the second beta structure identified at 1687  $\text{cm}^{-1}$  is about 8% for normal tissues and 13% for aneurysms. These results based on the inversion of the ratio between these two structural organisations in the amide I band were related to some modifications of the proteins present in aortic tissues. As previously described elastin is the most abundant protein in the media of the ascending aorta and represents the major part of the beta sheet structures.

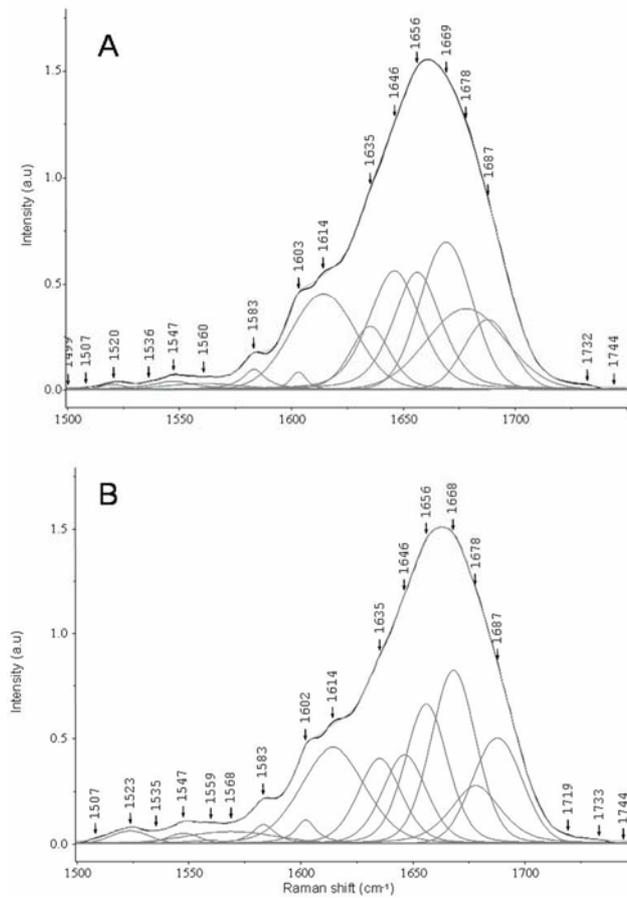


Fig.4: Curve fitting of amide I band on the mean Raman spectra. A: normal tissues; B: pathological tissues. Each spectrum is normalised before calculation. The contribution of each band is represented for each spectrum. The  $\chi^2$  value is about  $10^{-6}$ . The theoretical spectrum is represented but not visible because of the superposition with the experimental spectra.

Tableau 2: Curve-fitting results of the amide I band of Raman spectra from normal and pathological tissues showing the six principals bands, and their contribution in term of band areas

Amide I band				
Normal		Aneurysmal		Attribution
Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band Area	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band Area	
1635	7	1635	10	Hydration water
1646	16	1646	10	Alpha helix
1656	15	1656	15	Undefined
1669	19	1668	20	Undefined
1678	15	1678	8	Beta sheet
1687	8	1687	13	Beta sheet

In order to be the nearest possible of *in-vivo* condition we decide to analyse fragment of aortic wall without proceed to crysections. In this case the integrity of aorta is conserved and no artefact cause by crysections occurs. All structural organisations of protein and extracellular matrix were kept as *in-vivo*. The measurements were directly applied on the two different face of aorta. First spectra were taken on the intima side and two types of spectra were obtained as present in the fig.5. Previous work of characterization of aortic wall by Raman spectroscopy exists and permits us to associate the different spectra to specific component (Buschman 2001). The spectrum A is representative of signal obtain in necrotic core present in atherosclerotic plaque, with bands at 702, 878, 923, and 957  $\text{cm}^{-1}$  assigned to steroid nucleus of both unesterified (free) cholesterol and cholesterol esters. The bands at 1735 and 1026  $\text{cm}^{-1}$  are specific to cholesterol esters. The second spectrum obtain on intimal side (spectrum B) is associated to internal elastic lamina. The bands at 1664 and 1264  $\text{cm}^{-1}$  can be assigned to amide I and II bands, the strong band at 1449  $\text{cm}^{-1}$  to  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  bending mode of protein. The bands at 1336 and 1104  $\text{cm}^{-1}$  are attribute to desmosine/isodesmosine and are specific to elastin, whereas the bands at 933 and 855  $\text{cm}^{-1}$  can be assigned to C-C stretching mode of proline and are present in collagen. These attributions show that in intimal elastic lamina both collagen and elastin are present.

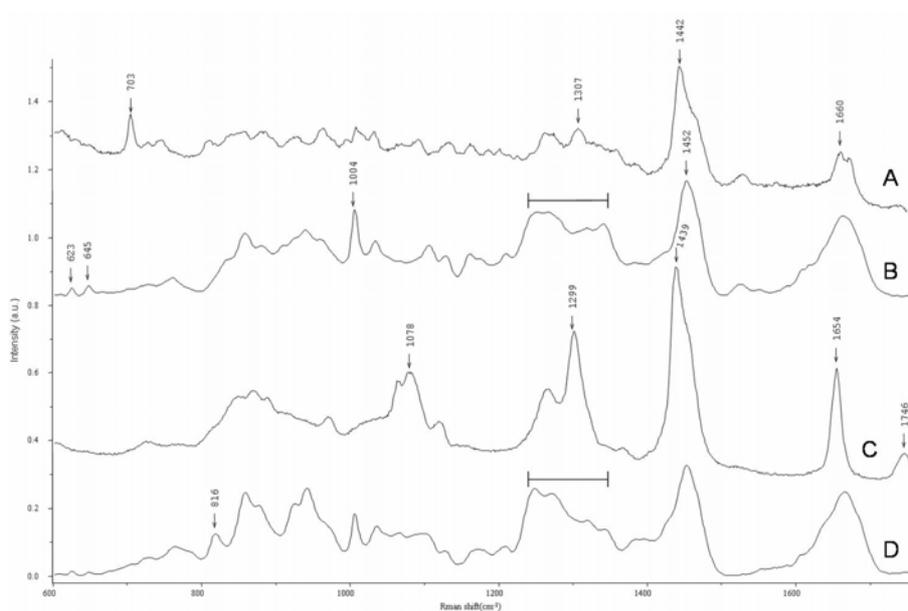


Fig.5: The four different spectra obtain on aortic block. Two spectra were obtained on the intimal side, (A) representative of atherosclérose and (B) specific of the internal elastic lamina. The two others spectra were obtained on external side, (C) for contribution of adipocytes from the tunica adventicia and (D) for spectra collected on the external elastic lamina.

Two specific spectra can be identified on the external side of aorta. The spectrum C is very specific to the adventitia component with a strong band at  $1747\text{ cm}^{-1}$  (ester band), an unsaturated C=C band at  $1654\text{ cm}^{-1}$  and a CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> bands ( $1440$  and  $1301\text{ cm}^{-1}$ ) which in combination indicates triglycerides. During the surgical act the adventitia is systematically removed so the spectrum C is really obtained rarely, but the presence of this signal was a good indicator of the face study and confirm the obtaining of spectra from the external side. For the study of the discrimination between normal and aneurismal sample by Raman spectroscopy the spectrum D was used. It was obtained on the external elastic lamina. The comparison between the spectra of intimal and external elastic lamina exhibit differences but have both presence of specific bands representative of elastin (desmosine/isodesmosine at  $1104$  and  $1336\text{ cm}^{-1}$ ) and collagen ( $855$  and  $933\text{ cm}^{-1}$ ). The difference between the two spectra can be explained by different proportion of each protein in the two different faces of aorta or presence of other component, for example the spectrum from the intimal side is taken across the intima, composed of endothelial cells which can influence the signal.

The study used the spectra D for the discrimination by HCA. The aim was to reproduce the analysis condition as they will be with an *in-vivo* miniaturised Raman probe during surgical act. Finally 12 spectra were obtained for each of the 21 patients, 11 normal and 10 aneurismal. A representative mean spectrum was calculated for each sample. The patients used for this study were not the same as those on cryosections because of the size of aortic sample. Many samples were used in many tests and were too small to be used in this *ex-vivo* approach. The HCA was performed on the amide I band ( $1500$ - $1750\text{ cm}^{-1}$ ). The results obtained are present in fig.6. Two groups were obtained and 100% of good classification was obtained. The penetration of the laser in the external layer of the aorta permits to obtain structural information of protein related to the pathological development and useful for the discrimination between a normal and aneurismal aortic tissue.

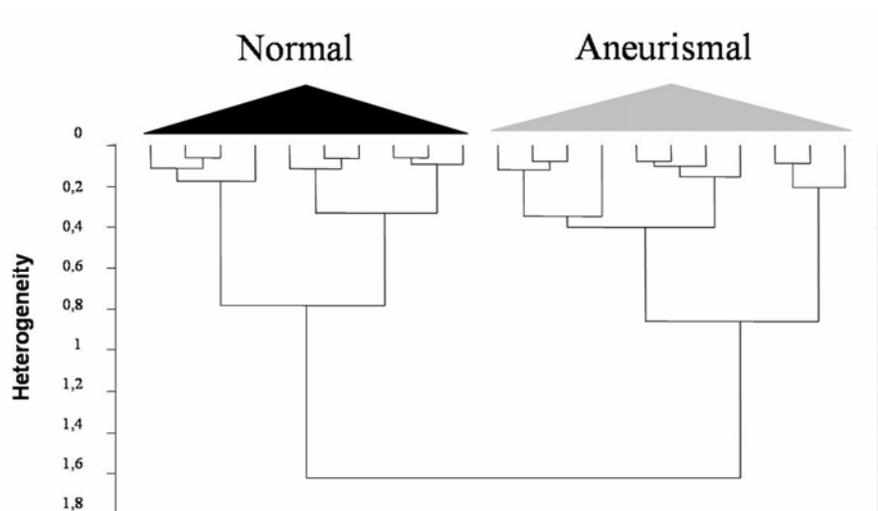


Fig.6: Hierarchical classification of mean Raman spectra. The means were calculated from spectra collected on the external elastic lamina of aortic blocks from normal and aneurismal ascending aortas using the 1500-1750  $\text{cm}^{-1}$  spectral range.

## Discussion

In the present study, we highlight the potential of Infrared and Raman microspectroscopies in biological applications like diagnostic of the aneurismal ascending aortic tissues. The *in vitro* study was necessary to test the feasibility of the techniques on protein modifications related to pathological states. It was detailed that the media presents many rearrangements during the aneurismal development associated to collagen and elastin alterations (Halme 1982; Cattell 1993; Silver 2001). These proteins represent the major part of aortic wall components and have for each a specific organisation according to their functions in the aortic wall. The healthy tissue present collagen and elastin in normal quantity and secondary structure conformation but during aneurism outcome these proteins are degraded due to the action of some MMPs (Tamarina 1997; Jacob 2003). The activation of MMPs induces degradation of the extracellular matrix, essentially represents by collagen and elastin in aortic tissues. One spectral window sensitive to these modifications are the amide bands present in infrared spectra (Amide I and II bands) and in Raman spectra (Amide I bands). Many studies based on amide bands deconvolution have reported the link between the secondary structure of proteins and the evolution of amide bands profiles (Shi 2002; Ngarize 2004; Petibois 2006).

Although the Infrared and Raman spectroscopies are very sensitive tools to evaluate the biochemical composition of biological samples, we have included a large panel of aortic samples to test their potential in the diagnosis of aneurismal tissues based on amide bands

modifications. Aortas from 22 patients were studied in order to have homogeneous groups and to increase the statistical power of the discriminating test. The results show a strong correlation between the amide bands evolution and the presence or not of the aneurysmal pathology. The Vibrational spectroscopies were clearly sensitive to aortic wall alterations and can be useful for the diagnostic of pathological samples.

Moreover, the use of the deconvolution method has allowed to estimate the global secondary structure of proteins present in the aortic wall. Variations of beta structures observed on the deconvoluted spectra induce modification in the amide I band profile useful for the discrimination between normal and aneurysmal tissues. These modifications observed are probably associated to the elastin degradation by MMPs, however supplementary studies will be necessary to characterise the molecular mechanism originally implied in this beta sheet structure band ratio inversion. Despite spectral features are not clearly understood and assigned to specific molecular modifications, this inversion of the band ratio in amide I band from Raman spectra could be a specific spectroscopic marker of the aneurysmal evolution of the aortic tissues.

Even if the infrared spectroscopy brings important informations on the aortic wall composition during aneurysm, its principal limit is to need thick section and to be restricted to *in vitro* application. By consequence, we have used the Raman spectroscopy and adapted the *in vitro* methodology to the *ex vivo* approach based on the analysis of aortic blocks.

During cardiovascular intervention like AVR the surgeon could be confront to moderate ascending aorta and have to take decision to replace it or not. At this time the patient is already anaesthetized and the aortic section is accessible to an *in vivo* investigation. To reproduce this situation we have used aortic blocks to perform *ex vivo* analyses and simulated measurement at the surface of the aorta like during surgery. The results obtain were really encouraging and in accordance with thus obtained on cryosections. Atherosclerotic plaques were identified as prevalent factor for aneurysm outcome and many works were based on molecular characterisation of these (Colley 2004; Komachi 2006). We proposed here an original and new approach to access directly to the molecular constitution of the arterial wall and visualised alterations of the ascending aorta. The knowledge of these lesions could be useful to prevent excessive dilation leading to aneurysms.

To conclude, these results are very important, considering the technological evolution of the Raman spectroscopy these last years. Actually the potential of this technique in medical field

is real and the development of Raman miniaturised fiber-optic probes will permit *in vivo* investigations. With development of a optimised Raman microprobe for *in vivo* investigation and taking in consideration the results obtain in this study on *ex vivo* blocks it appears that we can propose very soon a powerful tool to assist the surgeon when he have to take the decision to associate an ascending aortic replacement during, for example, an AVR.

- Amharref, N., A. Beljebbar, S. Dukic, L. Venteo, L. Schneider, M. Pluot, et al.  
"Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model."  
Biochim Biophys Acta (2006); **1758**(7): 892-9.
- Arteaga-Solis, E., B. Gayraud and F. Ramirez  
"Elastic and collagenous networks in vascular diseases."  
Cell Struct Funct (2000); **25**(2): 69-72.
- Baraga, J. J., M. S. Feld and R. P. Rava  
"In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy."  
Proc Natl Acad Sci U S A (1992); **89**(8): 3473-7.
- Bonderman, D., E. Gharehbaghi-Schnell, G. Wollenek, G. Maurer, H. Baumgartner and I. M. Lang  
"Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation."  
Circulation (1999); **99**(16): 2138-43.
- Bonnier, F., S. Rubin, L. Venteo, C. M. Krishna, M. Pluot, B. Baehrel, et al.  
"In-vitro analysis of normal and aneurismal human ascending aortic tissues using FT-IR microspectroscopy."  
Biochim Biophys Acta (2006); **1758**(7): 968-73.
- Buschman, H. P., G. Deinum, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, A. van der Laarse, et al.  
"Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ."  
Cardiovasc Pathol (2001); **10**(2): 69-82.
- Cattell, M. A., P. S. Hasleton and J. C. Anderson  
"Increased elastin content and decreased elastin concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms of human thoracic aorta."  
Cardiovasc Res (1993); **27**(2): 176-81.
- Choo-Smith, L. P., H. G. Edwards, H. P. Endtz, J. M. Kros, F. Heule, H. Barr, et al.  
"Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation."  
Biopolymers (2002); **67**(1): 1-9.
- Chrit, L., P. Bastien, B. Biatry, J. T. Simonnet, A. Potter, A. M. Minondo, et al.  
"In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC."  
Biopolymers (2007); **85**(4): 359-69.
- Chrit, L., P. Bastien, G. D. Sockalingum, D. Batisse, F. Leroy, M. Manfait, et al.  
"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**(4): 207-15.
- Colley, C. S., S. G. Kazarian, P. D. Weinberg and M. J. Lever

"Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques."  
Biopolymers (2004); **74**(4): 328-35.

Crawford, M. H. and C. A. Roldan  
"Prevalence of aortic root dilatation and small aortic roots in valvular aortic stenosis."  
Am J Cardiol (2001); **87**(11): 1311-3.

Debelle, L., A. J. Alix, S. M. Wei, M. P. Jacob, J. P. Huvenne, M. Berjot, et al.  
"The secondary structure and architecture of human elastin."  
Eur J Biochem (1998); **258**(2): 533-9.

Debelle, L. and A. J. P. Alix  
"Optical spectroscopic determination of bovine tropoelastin molecular model."  
Journal of Molecular Structure (1995); **348**: 321-324.

Dollery, C. M., J. R. McEwan and A. M. Henney  
"Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease."  
Circ Res (1995); **77**(5): 863-8.

Frushour, B. G. and J. L. Koenig  
"Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin."  
Biopolymers (1975); **14**(2): 379-91.

Gaigneaux, A., J. M. Ruyschaert and E. Goormaghtigh  
"Infrared spectroscopy as a tool for discrimination between sensitive and multiresistant K562 cells."  
Eur J Biochem (2002); **269**(7): 1968-73.  
Hahn, R. T., M. J. Roman, A. H. Mogtader and R. B. Devereux  
"Association of aortic dilation with regurgitant, stenotic and functionally normal bicuspid aortic valves."  
J Am Coll Cardiol (1992); **19**(2): 283-8.

Haka, A. S., Z. Volynskaya, J. A. Gardecki, J. Nazemi, J. Lyons, D. Hicks, et al.  
"In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using raman spectroscopy."  
Cancer Res (2006); **66**(6): 3317-22.

Halme, T., T. Vihersaari, T. Savunen, J. Niinikoski, M. Inberg and R. Penttinen  
"Desmosines in aneurysms of the ascending aorta (annulo-aortic ectasia)."  
Biochim Biophys Acta (1982); **717**(1): 105-10.

Jacob, M. P.  
"Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions."  
Biomed Pharmacother (2003); **57**(5-6): 195-202.

Komachi, Y., H. Sato and H. Tashiro  
"Intravascular Raman spectroscopic catheter for molecular diagnosis of atherosclerotic coronary disease."  
Appl Opt (2006); **45**(30): 7938-43.

- Krishna, C. M., G. D. Sockalingum, J. Kurien, L. Rao, L. Venteo, M. Pluot, et al.  
"Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma."  
Appl Spectrosc (2004); **58**(9): 1128-35.
- Lasch, P., W. Haensch, D. Naumann and M. Diem  
"Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis."  
Biochim Biophys Acta (2004); **1688**(2): 176-86.
- Milewicz, D. M., K. Michael, N. Fisher, J. S. Coselli, T. Markello and A. Biddinger  
"Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms."  
Circulation (1996); **94**(11): 2708-11.
- Motz, J. T., S. J. Gandhi, O. R. Scepanovic, A. S. Haka, J. R. Kramer, R. R. Dasari, et al.  
"Real-time Raman system for in vivo disease diagnosis."  
J Biomed Opt (2005); **10**(3): 031113.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr.  
"Matrix metalloproteinases."  
J Biol Chem (1999); **274**(31): 21491-4.
- Nancarrow, P. A. and C. B. Higgins  
"Progressive thoracic aortic dilatation after aortic valve replacement."  
AJR Am J Roentgenol (1984); **142**(4): 669-72.
- Natsuaki, M., T. Itoh, K. Rikitake, Y. Okazaki and K. Naitoh  
"Aortic complications after aortic valve replacement in patients with dilated ascending aorta and aortic regurgitation."  
J Heart Valve Dis (1998); **7**(5): 504-9.
- Ngarize, S., H. Herman, A. Adams and N. Howell  
"Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated beta-lactoglobulin and ovalbumin proteins using fourier transform raman spectroscopy and self-deconvolution."  
J Agric Food Chem (2004); **52**(21): 6470-7.
- Petibois, C., G. Gouspillou, K. Wehbe, J. P. Delage and G. Deleris  
"Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue."  
Anal Bioanal Chem (2006); **386**(7-8): 1961-6.
- Shi, Y. B., J. L. Fang, X. Y. Liu, L. Du and W. X. Tang  
"Fourier transform IR and Fourier transform Raman spectroscopy studies of metallothionein-III: amide I band assignments and secondary structural comparison with metallothioneins-I and -II."  
Biopolymers (2002); **65**(2): 81-8.
- Silver, F. H., I. Horvath and D. J. Foran  
"Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers."  
Crit Rev Biomed Eng (2001); **29**(3): 279-301.

Taketani, T., Y. Imai, T. Morota, K. Maemura, H. Morita, D. Hayashi, et al.  
"Altered patterns of gene expression specific to thoracic aortic aneurysms: microarray analysis of surgically resected specimens."  
Int Heart J (2005); **46**(2): 265-77.

Tamarina, N. A., W. D. McMillan, V. P. Shively and W. H. Pearce  
"Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta."  
Surgery (1997); **122**(2): 264-71; discussion 271-2.

Tfayli, A., O. Piot, A. Durlach, P. Bernard and M. Manfait  
"Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy."  
Biochim Biophys Acta (2005); **1724**(3): 262-9.

#### **IV) Résultats complémentaires en microspectroscopie Raman**

Jusqu'à maintenant, notre approche consistait à identifier des modifications spectrales au sein des tissus pathologiques traduisant les altérations des constituants de la matrice extracellulaire de la paroi aortique. Il est clair que les spectres obtenus sont le signal global de l'ensemble des différentes molécules présentes dans le tissu biologique, représentant la somme des différentes vibrations. Cependant, il est important lors de l'application de telles études de compléter les observations faites par l'analyse de produits purs permettant de caractériser au mieux l'échantillon analysé.

L'élastine étant une protéine insoluble, il était difficile de mesurer des spectres par la spectroscopie infrarouge, chose facilement réalisable par le biais de la spectroscopie Raman qui, par son principe de diffusion, permet l'analyse de produit pur sous forme solide et ce, même s'il présente une forte densité. Comme les deux principales protéines formant la paroi aortique sont l'élastine et les collagènes, il nous est apparu important d'obtenir les spectres caractéristiques de ces deux composés en priorité.

Il est à noter qu'avant toute analyse ou comparaison les spectres subissent tous les corrections déjà évoquées auparavant (courant noir, lumière blanche, objectif ou support) et sont sujet à un lissage, une correction de la ligne de base ainsi qu'une normalisation.

##### **IV.1 Caractérisation du tissu aortique, analyse des coupes fines**

###### **IV.1.1 Observation des spectres du collagène de type I et de l'élastine bovine purs**

Les deux spectres obtenus sont bien caractéristiques de chaque composé, présentant des différences notables sur de nombreux points du spectre. La zone comprise entre 800 et 1150  $\text{cm}^{-1}$  présente de grandes variations et permet d'identifier de manière rapide la présence soit du collagène ou d'élastine (Fig.63). Une étude de Frushour en 1975 nous a permis de caractériser les spectres que nous avons obtenus sur l'élastine et le collagène purs (Frushour 1975).

Concernant le collagène, un pic spécifique est présent à 816  $\text{cm}^{-1}$ , attribué à la vibration du squelette C-C de la protéine.

Pour l'élastine, trois pics caractéristiques sont identifiables dans cette gamme spectrale :

- à  $905\text{ cm}^{-1}$ , attribué à la vibration C-C-N

- à  $958$  et  $1104\text{ cm}^{-1}$ , attribués à la présence de résidus desmosine et isodesmosine.

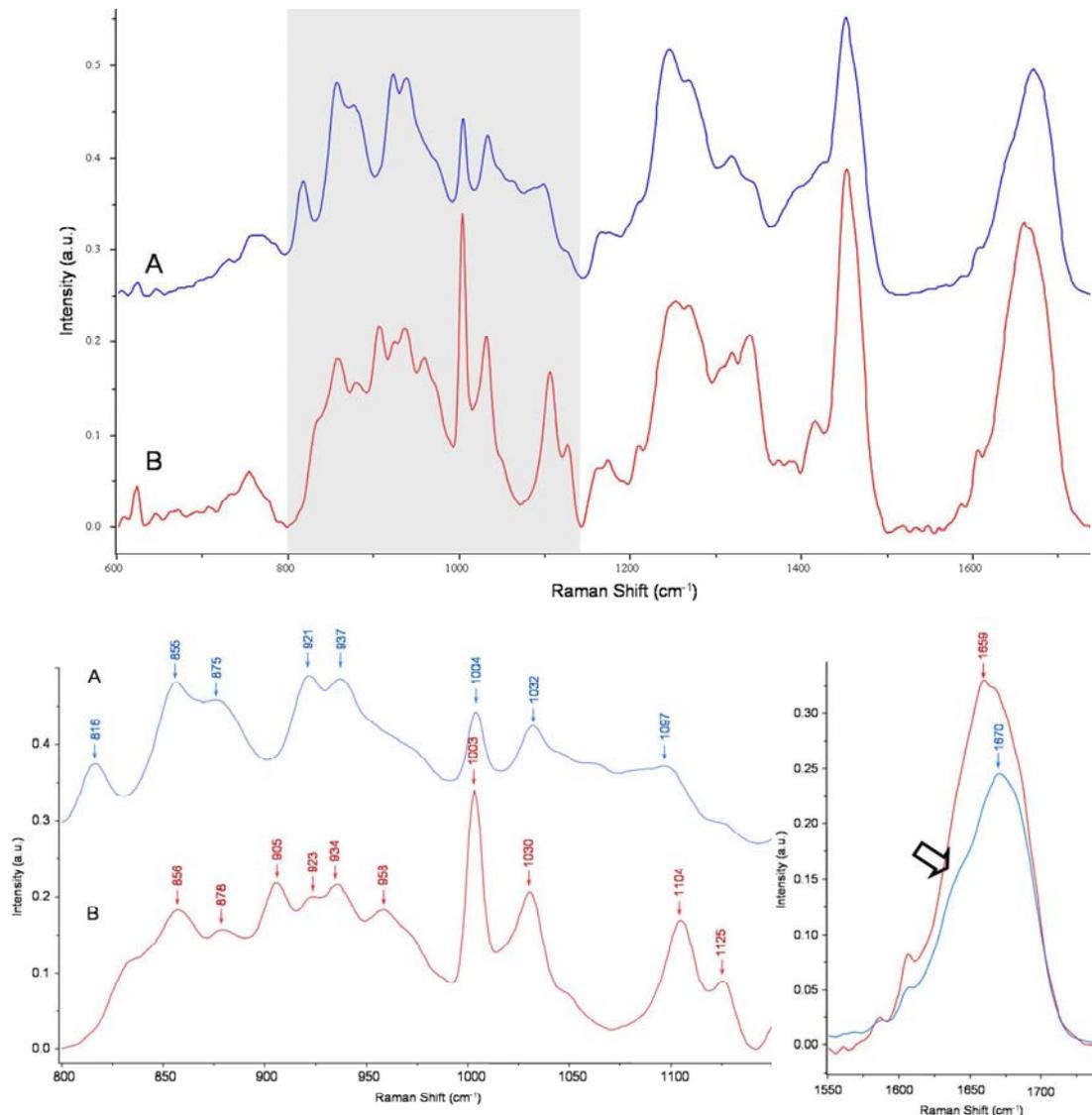


Figure 63: Analyse comparative des spectres du collagène (bleu) et de l'élastine (rouge)

- L'observation des spectres montre également des modifications en intensité, notamment au niveau du pic de la phénylalanine à  $1004\text{ cm}^{-1}$  qui semble beaucoup plus intense dans le cas de l'élastine. Les différentes attributions possibles sont présentées dans le tableau.6.

La bande amide I subit également des modifications typiques et présente un pic à  $1659\text{ cm}^{-1}$  pour l'élastine et à  $1670\text{ cm}^{-1}$  pour le collagène. Entre les deux composés, la forme des spectres varie également puisqu'il apparaît clairement un épaulement sur le spectre du collagène (représenté par la flèche fig.63) qui n'est pas présent sur le spectre de l'élastine.

Le pic à  $1336\text{ cm}^{-1}$  est attribué aux vibrations des CH mais dans certains cas, il est assigné à la présence de desmosine et d'isodesmosine alors spécifiques de l'élastine. L'observation de cette région montre que, dans le cas de l'élastine, l'intensité de ce pic est beaucoup plus élevée que pour le collagène.

Tableau 6: Attribution des pics sur la gamme  $800\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  des spectres de collagène et d'élastine

Fréquences ( $\text{cm}^{-1}$ )	Collagène	Fréquences ( $\text{cm}^{-1}$ )	Elastine
816	Squelette C-C de la protéine		
855	résidu proline	856	résidu tyrosine
875	résidu hydroxyproline	878	
		905	C-C-N
921	résidu proline	923	
937	Squelette C-C de la protéine	934	résidu proline
		958	Desmosine/isodesmosine
1004	Phénylalanine	1005	Phénylalanine
1032	résidu proline	1030	Phénylalanine
1097	C-N	1104	Desmosine/isodesmosine
		1125	C-N

#### IV.1.2 Analyse des spectres caractéristiques du tissu aortique en microspectroscopie Raman

L'analyse de coupes fines de tissu aortiques a permis également d'isoler des spectres significativement différents. Comme déjà décrit, l'épaisseur de l'échantillon n'est pas un problème et la spectroscopie Raman peut utiliser des coupes de l'ordre de  $40\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ceci permet une parfaite conservation des structures aortiques qui facilite alors l'identification des différentes couches formant la paroi aortique, notion très utile pour l'orientation de la coupe. Ainsi les spectres enregistrés sont attribués de façon certaine aux différentes structures de l'aorte : intima, média ou adventice. L'observation des cartographies Raman effectuées de manière transversale sur les coupes aortiques (de l'intima jusque l'adventice) a permis d'identifier deux spectres, retrouvés de manière systématique, au sein de la structure aortique. (Fig.64). Bien que le pas entre chaque mesure soit réglé à  $5\text{ }\mu\text{m}$ , un seul type de spectre semble présent au niveau de la média (spectre A). De la même manière, le deuxième spectre, localisé au niveau de l'adventice, a été enregistré et retrouvé en différentes positions de mesure (spectre B).

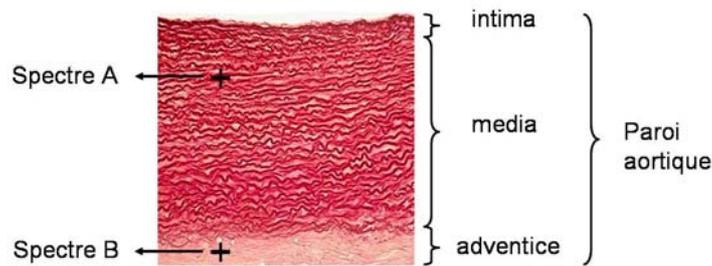


Figure 64: Localisation des deux spectres typiques enregistrés sur l'aorte

L'observation des deux spectres permet rapidement de visualiser des différences importantes sur l'ensemble de la gamme spectrale ( $600-1750\text{ cm}^{-1}$ ). En se focalisant sur la zone  $800-1050\text{ cm}^{-1}$ , la forte ressemblance avec les spectres du collagène et de l'élastine est évidente (Fig.65). Il est ainsi possible de retrouver les principales différences qui permettraient de différencier les deux produits purs. Le spectre mesuré sur la média est donc très proche de celui de l'élastine tandis que celui mesuré sur l'adventice correspond au spectre du collagène. Les bandes amide I présentent également des profils en relation avec ceux trouvés sur les produits purs. En effet, bien que le décalage entre les deux spectres mesurés sur le tissu, au niveau de la bande amide, ne soit pas aussi important que celui observé entre le collagène et l'élastine, l'épaule caractéristique mis en évidence sur le spectre du collagène est retrouvé ici sur le spectre de l'adventice. Le pic à  $1336\text{ cm}^{-1}$  présente également la même évolution et présente une forte diminution d'intensité dans le cas du collagène.

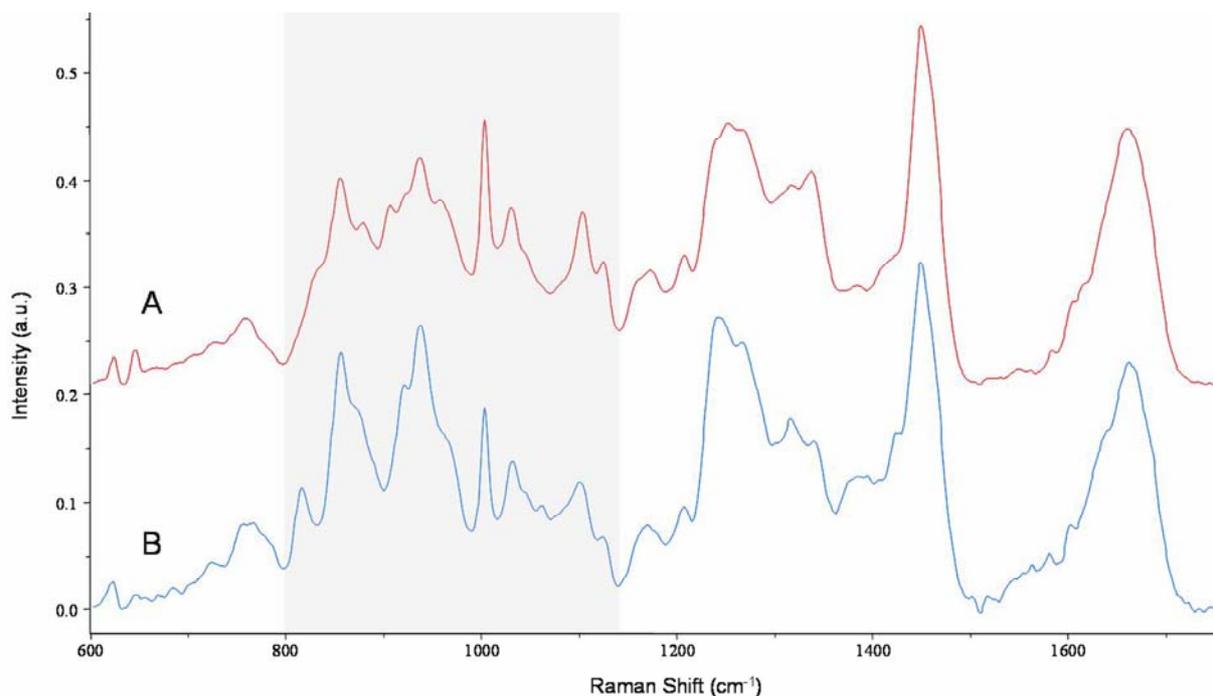


Figure 65: Analyse comparative des spectres issus de la média (A) et l'adventice (B)

La média est composée d'une grande quantité d'élastine et, dans une proportion moindre, de collagène. Cependant le spectre représentatif du tissu est très semblable à celui de l'élastine, aussi bien dans la position des pics que dans les rapports de quantités. Il semble que lors de la mesure du signal Raman, la faible contribution du collagène ne soit pas perceptible au point de modifier de façon importante le spectre. D'ailleurs, la gamme spectrale 800-1150  $\text{cm}^{-1}$  est identique en tout point à celle de l'élastine. Il semble donc que l'analyse des spectres Raman effectuée au niveau de la média permette d'avoir une information spectrale fortement corrélée à l'état de l'élastine dans le tissu aortique.

#### IV.1.3 Signal Raman des lattis de collagène

Le gel de collagène est préparé dans une boîte de Pétri présentant un fond en verre (fig.66). L'utilisation de ce type de support a été motivée par le couplage de différentes techniques de microscopie telle que la microscopie confocale à épifluorescence. Afin d'avoir un lattis d'épaisseur suffisante et donc de ne pas être gêné par le signal du verre pendant la mesure, 4 ml de la solution étaient déposés dans la boîte de Pétri. Le gel à température ambiante se polymérise et passe en phase semi-solide en quelques instants. A ce moment, le collagène forme des fibres assimilables à une matrice collagénique *in vitro*. Du milieu de culture de type DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium ») est déposé au dessus du gel afin d'empêcher le dessèchement de la préparation. La concentration finale du gel en collagène est de 1,5 mg/mL.

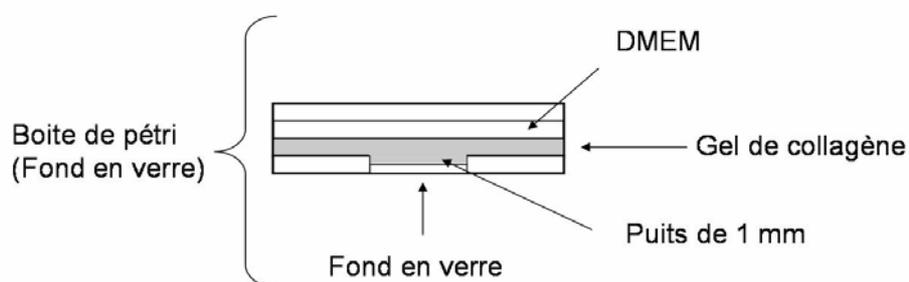


Figure 66: Représentation schématique de la préparation du lattis de collagène

Dans un premier temps, la mesure fut réalisée sur le gel de collagène à l'aide d'un objectif à immersion permettant de réaliser la mesure dans le DMEM présent au-dessus du gel. La figure 67B présente le spectre brut, obtenu après une accumulation de 30 secondes qui ne

contient qu'un bruit de fond sans information exploitable. Pour vérifier que les résultats n'étaient pas rattachés à l'utilisation d'un objectif à immersion, la même mesure fut également réalisée à l'aide de l'objectif x100 utilisé pour l'analyse des coupes tissulaires après avoir retiré le DMEM. Le même type de signal fut obtenu, permettant de confirmer qu'il ne s'agit pas d'un problème d'objectif mais que le signal mesuré est bien en relation avec la nature de l'échantillon.

La figure 67A présente le spectre mesuré avec une accumulation de 30 secondes mais après avoir desséché le gel en le plaçant dans une étuve à 37°C. En éliminant toute la partie aqueuse du gel, le collagène forme une couche au fond de la boîte de Pétri et a permis de réaliser la mesure d'un signal d'intensité beaucoup plus élevée permettant d'obtenir un spectre composé de nombreux pics identifiables. Le spectre, après correction et traitement, est semblable en de nombreux points à celui du collagène déjà observé précédemment avec une zone 800-1150  $\text{cm}^{-1}$  typiquement retrouvé avec cette protéine.

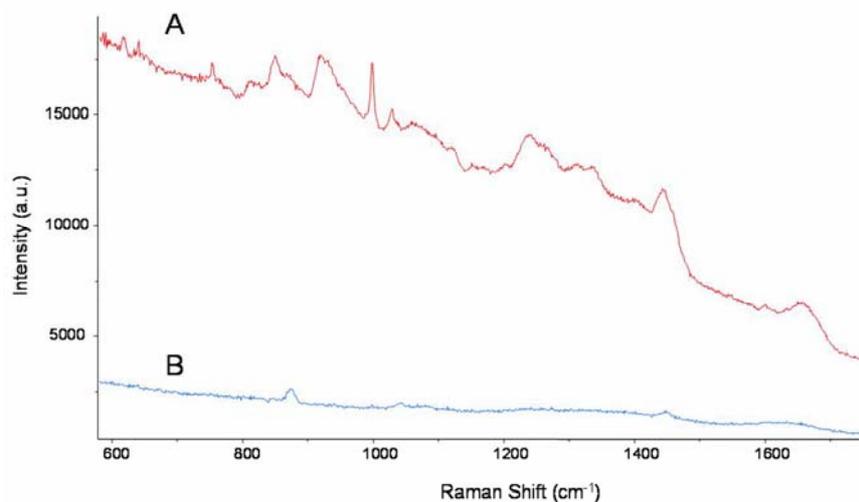


Figure 67: Comparaison des spectres obtenus sur le lattis de collagène : sur le gel (B), et sur le gel après séchage (A)

Ces résultats montrent que la spectroscopie Raman présente un seuil de détection en-dessous duquel l'obtention du signal du composé analysé est difficile à obtenir. Le gel de collagène présente vraisemblablement une densité trop faible pour obtenir le signal des fibres de collagène. Après séchage, les fibres sont toutes déposées dans le fond de la boîte de Pétri et forment un film suffisamment dense pour permettre la mesure du signal du collagène.

Cette expérience permet de mieux comprendre pourquoi le spectre de l'élastine est très proche de celui de la média du tissu aortique. Le collagène et l'élastine sont les deux protéines majeures de la paroi aortique cependant leur distribution n'est pas égale. Il est clair que l'adventice présente majoritairement du collagène ce qui se traduit par un spectre typique du collagène. Le spectre de la média est similaire à celui de l'élastine, mais l'observation de coupes colorées montre que du collagène est présent au sein de la matrice extracellulaire. Il semble que, comme dans le cas du gel de collagène, la densité des fibres de collagène soit trop faible pour influencer le signal mesuré au sein de la média et se traduit par l'obtention d'un spectre typique l'élastine.

#### IV.2 Caractérisation du tissu aortique, analyse des aortes *ex-vivo*

En 1992, Baraga publiait une étude de caractérisation du tissu aortique par microspectroscopie Raman, travaux largement approfondis en 2001 par Buschman (Baraga 1992; Buschman 2001). Ces caractérisations biochimiques des aortes humaines forment une base solide pour notre étude et permettent d'identifier de manière rapide les composés biologiques présents au sein de nos échantillons.

Les analyses du tissu aortique furent également réalisées sur des fragments d'aorte sans réalisation de coupes fines afin de conserver l'intégrité du tissu. Comme présenté précédemment, différents spectres ont été obtenus en fonction de l'orientation des fragments tissulaires pendant l'expérimentation. Quatre spectres ont principalement été obtenus, deux sur la face correspondant à l'intima, rattachés à la présence de cellules spumeuses et à la limitante élastique interne, et deux sur la face correspondant à l'adventice, influencés par les adipocytes et la limitante élastique externe.

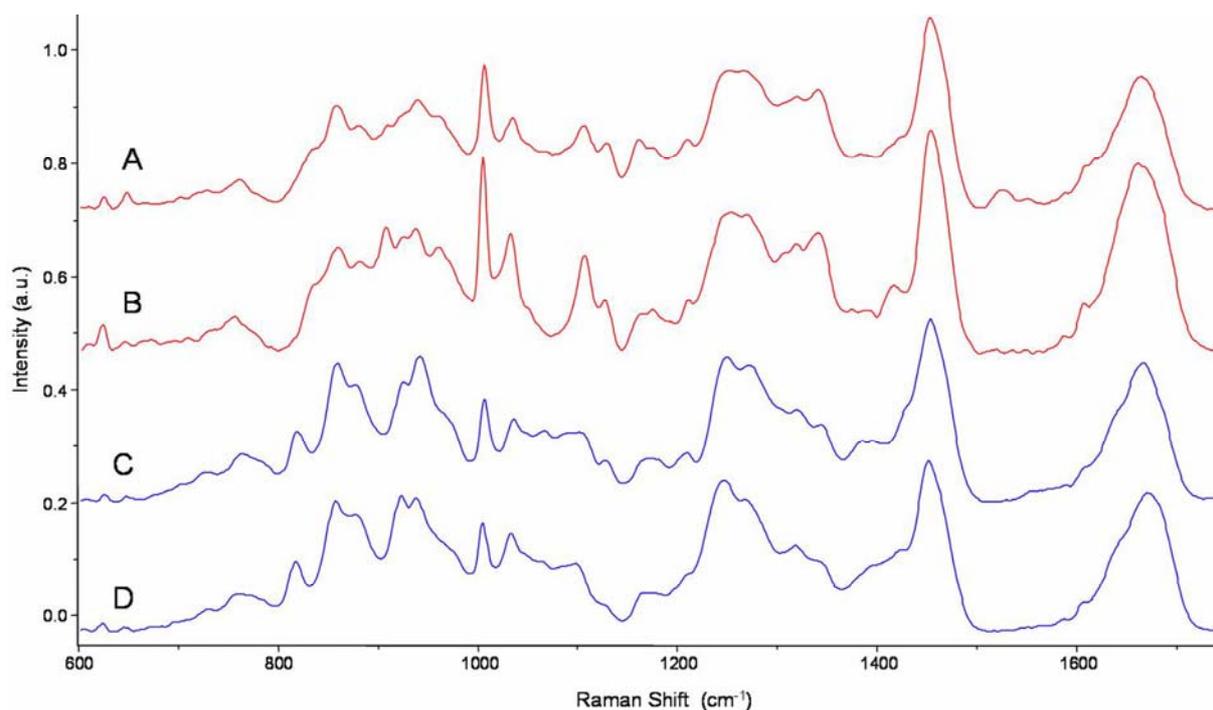


Figure 68: Analyse comparative entre des spectres enregistrés sur les fragments ex vivo (A) et (C) et les spectres de l'élastine et du collagène (B) et (D)

La comparaison avec les spectres de produits purs permet d'identifier clairement les composés présents dans le tissu (Fig.68). Ainsi le spectre de la limitante élastique interne (A) semble fortement corrélé à celui de l'élastine (B) tandis que le spectre de la limitante externe (C) comporte de fortes ressemblances avec celui du collagène (D). Il semble que bien qu'ayant été partiellement retirés, des résidus d'adventice présentant une forte proportion de collagène restent présents et donne un signal très proche du collagène pur.

La diversité des échantillons à disposition a permis d'identifier un tissu provenant d'un patient avec une plaque d'athérome associée à une calcification avancée au niveau de l'intima de l'aorte ascendante. Grâce à un scalpel, la calcification fut extraite du tissu et un spectre fut collecté sur la matière solide ainsi isolée (Fig.69). La calcification est facilement identifiable par sa consistance très solide, résistant à la lame du scalpel.

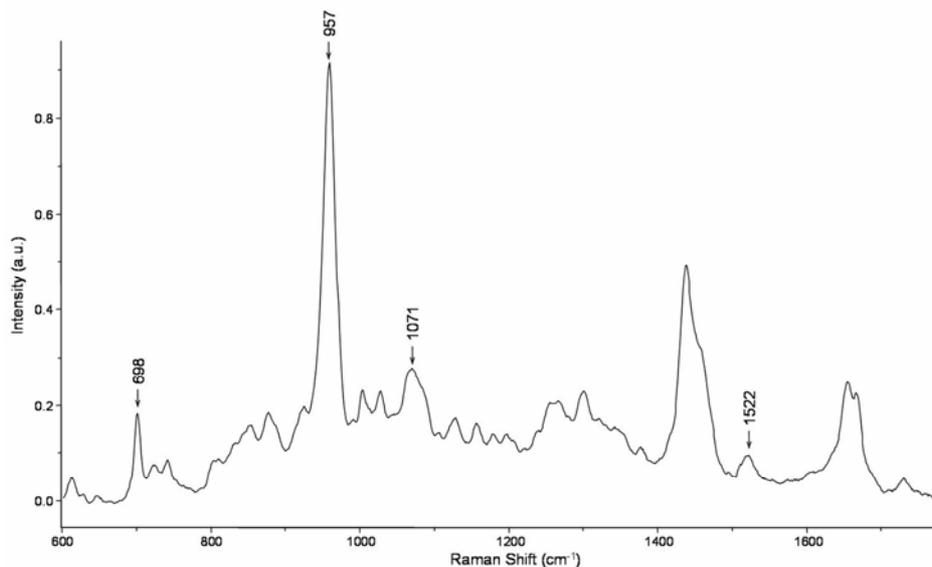


Figure 69: Spectre enregistré sur une calcification de la plaque d'athérome au niveau de l'intima

L'allure générale du spectre est très différente de ceux enregistrés sur les tissus aortiques. Certains pics caractéristiques sont identifiés, notamment un pic à 1522 cm<sup>-1</sup> associé aux vibrations d'élongation des C=C des  $\beta$ -carotènes, un pic à 698 cm<sup>-1</sup> attribué à la fois aux cholestérols estérifiés et non estérifiés mais également deux pics caractéristiques de la calcification à 957 et 1071 cm<sup>-1</sup> attribués aux élongations des groupements CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (symétrique) et PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (asymétrique) qui indiquent la présence de carbonate de calcium et d'hydroxyapatite. Ces composés atypiques des échantillons biologiques présentent des modes de vibrations caractéristiques et sont donc facilement identifiables.

En ce qui concerne les mesures réalisées au niveau de l'adventice, deux types de spectres sont obtenus (fig.5 article n°5) mais le spectre retrouvé de manière ponctuelle, attribué à la présence d'adipocytes est facilement identifiable, sans aucune ambiguïté, grâce à la présence de pics caractéristiques (fig.70). Tout d'abord le pic présent à 1655 cm<sup>-1</sup>, attribué à la liaison carbone/carbone (C=C) insaturée, est beaucoup plus fin que la bande amide I retrouvée classiquement sur les protéines de type collagène et élastine. Il est possible également d'identifier un pic à 1747 cm<sup>-1</sup> associé à la présence d'ester. Le massif composé des deux pics accolés à 1266 et 1301 cm<sup>-1</sup> est également révélateur, le dernier étant classiquement attribué aux triglycérides.

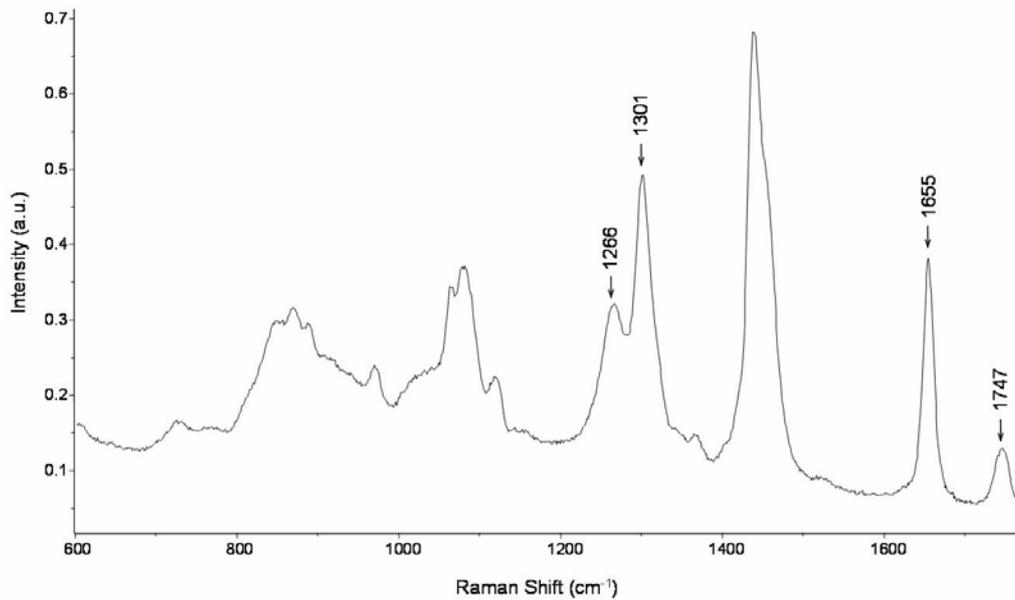


Figure 70: Spectre caractéristique d'un adipocyte

L'allure de ces spectres, dans le cas de l'étude de la paroi aortique, permet d'identifier sans difficulté les composés de la paroi aortique étudiée. De plus, il faut prendre en considération que les spectres restent spécifiques soit à l'intima, soit à l'adventice ce qui permet de caractériser spécifiquement chaque face de l'aorte.

L'application de la microspectroscopie Raman *in-vitro* et *in-vivo* a permis de réaliser de nombreuses avancées dans l'étude du tissu aortique. L'axe principal de l'étude est de mettre en évidence le potentiel de cette technique pour une future application *in-vivo* au diagnostic des dilatations aortiques. Cependant, de nombreuses connaissances sur la composition de la paroi aortique furent assimilées et de nouvelles perspectives apparaissent. L'exploitation des possibilités offertes par la spectroscopie Raman se poursuit à la fois dans le développement de la technologie nécessaire à accéder à une information *in-vivo* mais également dans la compréhension de la pathologie.

**CHAPITRE VI : UNE NOUVELLE VOIE À**  
**EXPLORER, RÉSULTATS**  
**PRÉLIMINAIRES EN**  
**MICROSPECTROSCOPIE RAMAN**

## D) Un marqueur spécifique de l'anévrisme thoracique

### I.1 Un pic atypique

Sur l'ensemble des acquisitions réalisées sur des coupes fines de tissu aortique, un spectre particulier fut fréquemment enregistré. Présent au sein de la média il présente un profil caractéristique qui permet de l'identifier aisément parmi l'ensemble des spectres obtenus sur les zones d'acquisitions sélectionnées sur les échantillons. La figure 71 compare le spectre de la média classiquement obtenu (en rouge) avec le spectre retrouvé de manière plus ponctuelle (en vert).

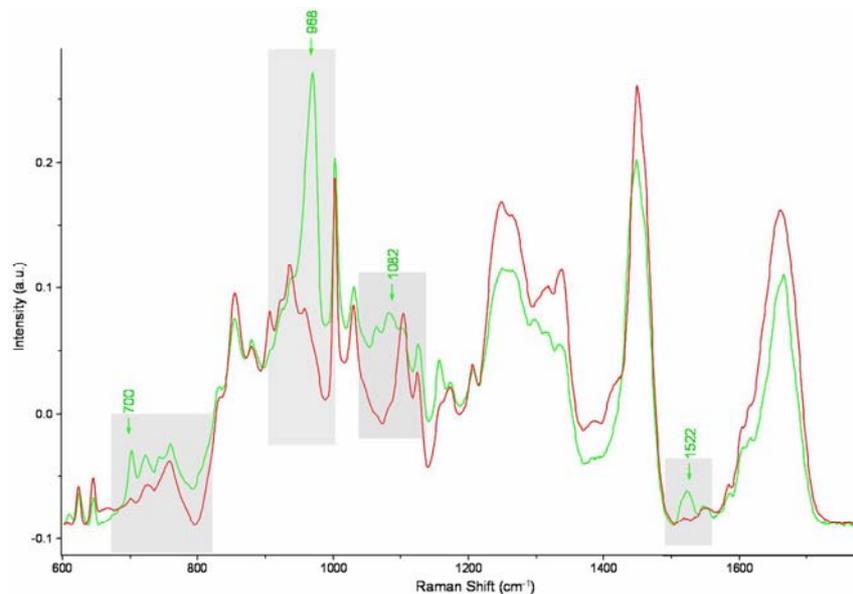


Figure 71: Observation du spectre particulier enregistré (vert) comparé au spectre typique de la média (rouge)

### I.2 Marqueur spectroscopique ou artefact ?

Ce spectre particulier fut d'abord considéré comme un artefact de mesure. En effet, différents facteurs peuvent être à l'origine de ce type de signal tels que des défauts dans le support, un problème de préparation des échantillons (contaminations extérieures). L'apparition de ce spectre qualifié d'atypique ne semble pas répondre à une logique évidente telle que tissus sains et pathologiques. Avec le temps et la maîtrise de nombreux paramètres extérieurs, tels que la vérification des supports avant chaque réalisation de coupe tissulaire jamais un tel signal n'avait été enregistré. L'amélioration du savoir faire des techniciennes réalisant les

coupes a aussi nettement augmenté et une attention particulière a été attachée à la notion de contamination extérieure. Ainsi l'ordre de réalisation des coupes fut noté et chaque échantillon fut coupé à diverses reprises pour juger de la reproductibilité de la préparation des échantillons. Lors de l'acquisition, les coupes provenant d'un même patient présentaient bien ce spectre si particulier alors que des aortes de deux patients différents coupées successivement ne présentent pas forcément ce dernier.

Au final, le bilan est clair, certaines aortes possèdent dans leur paroi un composé responsable de cette signature spectrale particulière.

Le passage à l'analyse de blocs d'aorte *ex vivo* a permis une nette avancée dans l'identification de ce spectre atypique. En effet grâce à ce type d'analyse, il fut possible de caractériser les différentes parties du tissu aortique, notamment les dépôts athéromateux présents au niveau intimal et les adipocyte de l'adventice (spectre déjà présenté auparavant). L'obtention des différents signaux sur la paroi aortique a confirmé que ce signal n'était pas un artefact mais bien rattaché à des modes de vibrations identifiables au sein d'une molécule chimique.

Les quatre zones grisées sur la figure 71 présentent une signature spécifique qui nous a permis de caractériser le spectre atypique mesuré. Deux types de composés sont à l'origine de ce signal. Le pic présent à  $1522\text{ cm}^{-1}$  est attribué aux  $\beta$ -carotènes qui associé à la présence d'un pic à  $722\text{ cm}^{-1}$ , lui même rattaché au cholestérol non estérifié et aux esters de cholestérol, permet d'identifier la présence de cellules spumeuses. Ce type de cellule est normalement localisé au niveau de l'intima dans le cas de formation de plaques athéromateuses. Par contre, les pics localisées à  $968$  et  $1082\text{ cm}^{-1}$  sont attribués aux modes d'élongations des  $\text{CO}_3^{2-}$  (symétrique)/ $\text{PO}_4^{3-}$  (asymétrique) et  $\text{PO}_4^{3-}$  (symétrique). D'ailleurs, le pic intense retrouvé à  $968\text{ cm}^{-1}$  est typique des plaques athéromateuses calcifiées.

Le spectre atypique retrouvé au sein de la média peut donc être rattaché à la présence de calcifications. La formation de plaques athéromateuses associée à une calcification est un phénomène expansif au niveau intimal. Cependant, la présence de tels spectres au sein de la média est surprenante et inattendue, surtout lorsqu'aucune plaque athéromateuse ni calcification n'étaient visibles sur la face interne de la paroi lors de la réalisation des coupes.

L'observation d'aortes calcifiées au sein du laboratoire laisse penser que la présence d'une telle altération ne peut passer inaperçue lors de la réalisation des cryosections.

### I.3 Apport de l'analyse *ex-vivo*

Une des hypothèses considérées fut que lors de réalisation des coupes fines, la lame du microtome frotte sur le bloc aortique et entraîne en même temps des particules calcifiées à l'origine de la contamination de l'échantillon de manière ponctuelle. Bien qu'aucune plaque calcifiée ne soit visible au niveau de la face interne de la paroi, la mesure de spectre Raman sur les bloc *ex vivo* à permis de réfuter cette hypothèse. En effet comme présenté sur la figure.72, il fut possible de dissocier la couche la plus externe de l'aorte correspondant à l'adventice et de réaliser une mesure directement sur la média. Après réalisation de nombreuses mesures en différents points, le spectre atypique fut retrouvé au sein des tissus pathologiques. Il est important de préciser que l'observation minutieuse du fragment ne permet pas de visualiser la moindre trace de dépôt athéromateux ni de plaque calcifiée sur la face intimale des blocs. De plus, avec ce protocole de mesure, qui ne nécessite aucune coupe fine, le processus de contamination est impossible.

La présence d'un spectre atypique au sein de certains tissus aortiques est maintenant confirmée.

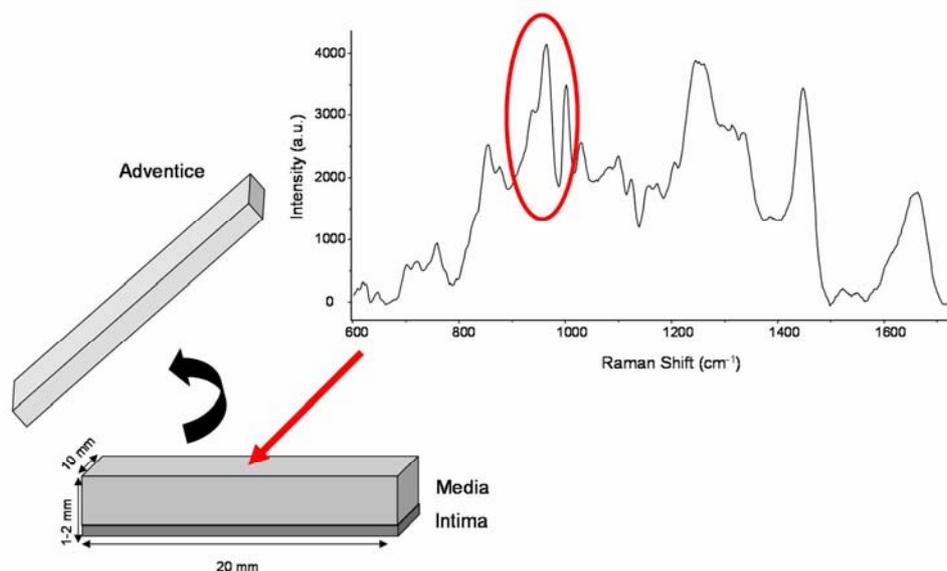


Figure 72: Observation des spectres mesurés sur la média des fragments *ex vivo* d'aorte après désolidarisation de l'adventice

Suite à l'observation des cartographies Raman réalisées, la répartition de ces spectres apparaît ponctuelle et en général chacun d'eux est entouré par des spectres typiques de l'élastine. Vue de la résolution spatiale du Raman, de l'ordre de 5  $\mu\text{M}$ , ce phénomène semble donc être un processus de « micro calcifications ».

#### I.4 Analyse *in-vitro* d'un composé dense : l'apatite

Le spectre mesuré sur la calcification donne un pic localisé à 957  $\text{cm}^{-1}$  tandis que sur le tissu aortique il fut observé à 968  $\text{cm}^{-1}$ . Le décalage entre les deux valeurs est très important mais en vue de l'apparence du spectre et de la composition de la paroi, aucune autre vibration ne peut apparaître à cette fréquence et à une telle intensité. L'observation de ce pic sur différents échantillons montre qu'il peut être retrouvé entre 961 et 968  $\text{cm}^{-1}$ . Une grande variabilité existe donc sur la localisation de ce pic qui, d'un tissu à un autre présente un décalage allant jusque 7  $\text{cm}^{-1}$ .

Une récente étude de Antonakos et al, présente une étude sur les différents types d'apatites nous permet de confirmer l'attribution de ce pic atypique observé sur les tissus aortiques (Antonakos 2007). Elle rapporte que l'analyse par spectroscopie Raman permet d'étudier des formes synthétiques et naturelles d'apatites et permet de visualiser des différences spectrales, notamment sur la position des pics rattachés à un même mode de vibration. L'observation des pics retrouvés sur ces composés leur a permis de visualiser les modes de vibration à 963 et 1070  $\text{cm}^{-1}$ , attribués au groupement  $\text{PO}_4$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  qui sont également présent sur notre spectre atypique. Bien que les groupements impliqués soient les mêmes, les fréquences de vibrations observées sont différentes de celles observées sur la calcification. Au cours de cette analyse de l'apatite, une forme dite naturelle a été testée et présentait un pic à 965  $\text{cm}^{-1}$ .

Cette étude permet donc de mettre en évidence la relation entre la fréquence des modes de vibration et l'organisation de la matière observée. Ainsi le décalage du pic de 957  $\text{cm}^{-1}$  sur la calcification à 968  $\text{cm}^{-1}$  sur la paroi aortique pourrait s'expliquer par une différence de densité de la matière observée. En effet, la calcification observée au niveau intimal est sous forme solide et abondante tandis qu'au niveau de la média l'observation au microscope optique ne permet pas de visualiser la présence de tels composés et sous cette forme au niveau des fibres élastiques. Par conséquent, les différentes interactions moléculaires mises en jeu dans ces

deux cas ne sont pas identiques et influencent vraisemblablement les modes de vibrations observées sur les spectres.

## **II) Rétrospective sur l'analyse *in-vitro* des coupes fines aortiques**

L'étude menée sur les coupes fines par microspectroscopie Raman a permis de discriminer les tissus normaux des tissus pathologiques avec une grande sensibilité. La bande amide I qui voit son profil évoluer en fonction des structures secondaires protéiques présentes dans le tissu, donne donc des informations précieuses pour l'étude des échantillons tissulaires. La découverte de spectres particuliers rattachés à des calcifications dans la média sur les coupes de 40  $\mu\text{m}$  a motivé la reprise de l'analyse des coupes fines présentées précédemment.

Afin d'analyser les tissus en microspectroscopie Raman et face au nombre important de spectres enregistrés sur chaque coupe tissulaire, des moyennes ont été calculées avant la réalisation des classifications. Le pic à  $968\text{ cm}^{-1}$  est présent sur certains échantillons, de façon ponctuelle et il est probable que l'utilisation de moyennes des spectres l'ait masqué. Dans un premier temps, nous avons ré-observé toutes les cartographies Raman sans utiliser les moyennes spectrales afin de mettre en évidence la présence de ce spectre particulier.

Après analyse, il apparaît que toutes les acquisitions réalisées sur les tissus pathologiques présentent des spectres avec un pic de forte intensité localisée à  $968\text{ cm}^{-1}$ . Concernant les tissus normaux, seulement certains échantillons présentent ce type de spectre. Il semble également que tous les tissus normaux ne possèdent pas un pic de même intensité. La fig.73 présente différents spectres provenant de trois tissus différents. Le spectre A est celui d'un tissu anévrysmal et présente des pics intenses aux alentours des  $968$  et  $1080\text{ cm}^{-1}$ , attribués aux calcifications de la média. Ce type de spectre est retrouvé de façon récurrente sur les tissus anévrysmaux, avec environ 10 à 15 spectres sur chacune des zones d'acquisition en contenant 100. Le spectre C est un spectre provenant d'un tissu normal qui présente ce même pic à  $968\text{ cm}^{-1}$ . A la différence du tissu anévrysmal, dans ce type de tissu, l'intensité du pic autour de  $968\text{ cm}^{-1}$  est beaucoup plus faible et le pic à  $1080\text{ cm}^{-1}$  semble totalement absent. Ce genre de spectre est retrouvé de façon très ponctuelle sur environ 1 à 2 spectres des 100 de chaque zone d'acquisition.

Le spectre B est issu d'une aorte normale d'un homme de 62 ans. La particularité de cet échantillon est qu'il est le seul à se classer dans les tissus pathologiques par l'analyse de la

bande amide I sur des coupes fines. L'observation de ce spectre montre que l'intensité du pic aux environs de  $968\text{ cm}^{-1}$  se rapproche de celle des tissus pathologiques avec une contribution visible à  $1080\text{ cm}^{-1}$ . Ce tissu aortique présente donc de forte homologie avec un tissu anévrismale.

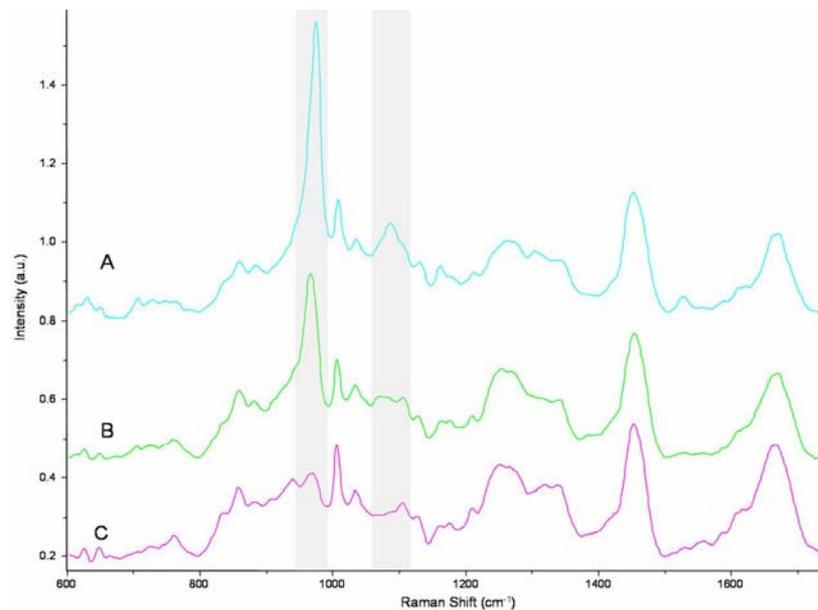


Figure 73: Comparaison des spectres associés à la calcification de la média chez différents patients. (A) : Aorte anévrismale, (B) : Aorte normale mal classée lors des études précédentes, (C) : Aorte normale bien classée lors des études précédentes

### **III) La calcification de la média : un nouvelle voie ?**

Aux vues de ces résultats, nous avons réalisé des recherches bibliographiques supplémentaires. En fait, d'un point de vue histologique, deux types de calcifications sont identifiables. Le premier s'associe à la maladie athéromateuse typique touchant les vaisseaux de gros calibres ainsi que les artères coronaires. La lésion athéromateuse associe une hyperplasie intimale et la présence de macrophages contenant des inclusions lipidiques ainsi que l'apparition tardives de calcifications (classification de Stary (Stary 2000)). L'autre type de calcifications, nommée calcification de Mönkeberg est décrite depuis longtemps et est principalement localisé dans la média des artères. Pourtant, ce type de lésion est préférentiellement retrouvé au niveau des vaisseaux distaux et a été particulièrement étudiée chez les diabétiques ou insuffisants rénaux (Shanahan 1999). Le mécanisme pathologique décrit met en avant une stimulation des cellules musculaires lisses par les toxines urémiques

(Chen 2002), notamment les phosphates et les LDL oxydés (Jono 2000a; Jono 2000b; Parhami 2000), qui favoriseraient leur passage vers un phénotype ostéoblastique engendrant la synthèse de protéines osseuses matricielles comme la collagène de type I et des protéines « non collagène » aboutissant finalement à la minéralisation de cette matrice extracellulaire artérielle.

Cependant ce phénomène s'accompagne d'altérations massives de la paroi aortique avec d'importantes calcifications ne correspondant pas à nos observations car aucune calcification n'est observée. Pourtant, la présence de cellules musculaires lisses au sein de la paroi aortique rend possible la survenue des mécanismes pathologiques comparables.

Les résultats obtenus jusqu'aujourd'hui ne permettent pas de conclure formellement sur le type de mécanisme mis en jeu, ni de comprendre ce phénomène très diffus dans le tissu aortique. De plus, très peu de références bibliographiques sont disponibles sur la calcification de Mönkeberg qui reste principalement étudiée dans le cadre des diabètes et de l'insuffisance rénale qui exacerbent fortement les lésions. Aucune référence ne pointe la présence particulière de « microcalcifications » de la matrice extracellulaire au sein de la média. Pourtant, la microspectroscopie Raman détecte ce type d'altération dans la paroi aortique chez des patients indemnes de diabète ou insuffisance rénale. Quelles en sont les causes exactes et la signification ? Il est impossible de conclure pour le moment mais ceci nous impose de poursuivre nos études dans cette voie.

## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## **D) Une approche originale**

Cette étude, menée sur l'analyse des tissus aortiques humains, ouvre une nouvelle approche diagnostique des anévrismes de l'aorte ascendante humaine par les techniques de spectroscopies optiques vibrationnelles IRTF et Raman.

En effet, cette pathologie est très souvent associée à l'athérome qui représente la cause majeure de dégénérescence de la paroi aortique menant à l'anévrisme. La formation d'athérome se définit par un dépôt local, au niveau de l'intima, de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires conduisant à la plaque d'athérome calcifiée. L'observation de tels dépôts au niveau de l'aorte ascendante nous a initialement étonné car il est surprenant de trouver de tels dépôts solides au sein d'une paroi aortique dite élastique. L'évolution athéromateuse s'accompagne donc de modifications physiques liées à l'apparition de ces dépôts fibro-athéromateux et calcifiés.

Du fait de l'importance de ce processus dans l'apparition de pathologies cardiovasculaires et de leurs complications, de nombreuses études spectroscopiques se limitent à identifier et caractériser la plaque d'athérome sans réellement s'intéresser au tissu aortique lui-même. De façon générale, la plaque d'athérome est facilement identifiable et présente des spectres suffisamment caractéristiques pour permettre un diagnostic fiable. Par conséquent, après l'analyse de la plaque athéromateuse en spectroscopie infrarouge, l'évolution logique des techniques de diagnostic vers l'*in vivo* a amené de nombreuses équipes à transposer leurs études en spectroscopie Raman.

L'originalité de notre approche dans le diagnostic des dilatations aortiques consiste à ne pas se focaliser sur la plaque d'athérome aortique mais bien sur l'analyse du tissu aortique ne présentant pas de lésion surajoutée. Malgré tout, il existe des liens entre athérome et anévrysme même si l'athérome ne touche pas l'intégralité de la paroi aortique alors que les lésions décrites en spectroscopie touchent l'ensemble de cette dernière comme le suggèrent pourtant nos résultats.

Le but de cette étude, focalisée sur la média, est de mettre en évidence une lésion ou un marqueur spécifique dans cette portion de la paroi aortique lors du processus anévrysmal. Pour ce faire, il nous faut prendre en compte l'ensemble des facteurs favorisant de dilatation aortique tels que l'athérome ou certaines prédispositions génétiques, par exemple.

Il est pourtant à noter qu'en vue d'une approche *in vivo*, l'analyse des plaques athéromateuses suppose la mise au point de moyens de diagnostics intravasculaires afin d'avoir accès aux dépôts athéromateux intimaux. Par contre, notre approche, basée sur l'analyse directe du tissu permet d'envisager une étude à la surface externe de l'aorte ascendante, facilement accessible lors d'un geste chirurgical.

## **II) Une information biochimique pour le diagnostic**

L'IRM et le scanner sont actuellement les deux techniques d'imagerie médicale utilisées pour le diagnostic des dilatations de l'aorte et reposent toutes deux sur les mensurations du diamètre aortique. En effet, les colorations des fibres élastiques et collagènes sur coupes histologiques ne peuvent apporter qu'une information parcellaire et post opératoire sur la fragmentation de l'élastine mais ne peuvent pas guider le geste chirurgical. .

La spectroscopie apporte donc une information supplémentaire, corrélée à la composition du tissu aortique, qui se révèle très utile dans le cas d'aortes modérément dilatées qui ne peuvent pas être classées comme saines ou pathologiques par les techniques conventionnelles. Le potentiel de la spectroscopie Raman dans l'analyse *in vivo* est très net, notamment du fait de la possibilité de réaliser des mesures à la surface des échantillons et de sa sensibilité dans la détection des différents composés présents dans le tissu. Les attributions des pics des spectres ont pu être réalisées grâce à l'analyse de produits purs de référence nous permettant d'identifier des fréquences spécifiques à chacun des constituants de la matrice extracellulaire aortique.

D'ailleurs, cette étude sur le tissu aortique humain a retrouvé de fortes homologues entre les spectres du collagène et de l'élastine; constituants majeurs de la paroi aortique. Des modifications au sein de ces deux protéines sont visualisables sur les spectres infrarouge et Raman et nous ont permis de discriminer nos tissus aortiques entre normaux et anévrysmaux.

## **III) Une forte orientation médicale**

Dès le début, nos travaux ont été très clairement orientés pour avoir des débouchés médicaux, cependant les échanges entre la recherche et le monde médical doivent être plus forts et ne pas

se limiter à un simple apport technologique. En effet après de nombreuses investigations en spectroscopie, il apparaît clair que de nombreux paramètres extérieurs pourraient influencer l'analyse des tissus aortiques. Le sexe et l'âge des patients furent rapidement intégrés à notre analyse et ont permis de vérifier que ces paramètres ne perturbaient pas la discrimination des tissus aortiques.

Actuellement, le seul critère diagnostique d'anévrisme est le diamètre aortique (50 mm) ; il nous a d'ailleurs permis de former nos deux groupes de patients, normaux et anévrismaux. Pourtant, il faut considérer que tous les individus n'ont pas une aorte de même diamètre. Ce dernier variant avec différents paramètres comme le sexe, l'âge, la taille ou encore le poids. Par exemple, un homme aura un cœur plus volumineux et une aorte de plus grand diamètre que ceux d'une femme, de même les personnes corpulentes ont statistiquement un diamètre aortique initial plus élevé que celles de corpulence normale.

D'autres facteurs génétiques peuvent aussi avoir une influence, il n'est en effet pas rare d'observer des cas familiaux de dilations aortiques ou d'anévrysmes. Enfin certaines informations complémentaires sur les patients tels qu'une hypertension, un tabagisme, un taux de cholestérol élevé ou l'activité sportive devront être étudiées pour vérifier qu'elles n'interviennent pas dans nos classifications.

Il est donc indispensable d'intégrer ces différentes notions dans nos futures études sur l'aorte en corrélant le diamètre aortique avec la taille et le poids du patient considéré en utilisant par exemple l'indice de masse corporelle.

Il faut cependant préciser que tous ces travaux sont préliminaires et que le but final de l'étude est d'apporter un outil de diagnostic prédictif de futures dilations anévrismales de l'aorte ascendante. Pour cela, il nous faut décrire précisément ce qu'est une dilatation modérée de l'aorte et mettre en évidence des marqueurs spécifiques sous forme de signatures spectrales pouvant déterminer si le tissu est plus proche d'une aorte normale ou d'une aorte pathologique.

L'accès à ces données nécessite une forte collaboration entre les différents établissements avec en particulier la mise en place d'accès et d'autorisation permettant de connaître l'intégralité des fiches patients.

#### IV) Localisation des prélèvements

Autre point pouvant être discuté, la localisation exacte des prélèvements des fragments aortiques n'est pas connue avec précision. Lors du prélèvement des tissus aortiques aussi bien normaux que pathologiques, une bande circulaire est désolidarisée du reste de l'aorte et des bandelettes sont réalisées afin de les placer dans des tubes pour la cryocongélation. A partir de ce moment nous perdons toute information quant à la localisation géographique du prélèvement ; il est impossible de savoir si le fragment utilisé par la suite pour la réalisation des coupes fines provient de la face antérieure ou postérieure de l'aorte.

Jusqu'à maintenant, nous avons fait l'approximation selon laquelle la média subissait un processus de réorganisation-dégradation lié au développement de la pathologie retrouvée de façon quasi homogène sur l'ensemble du tissu aortique quelque soit la localisation considérée. Pourtant, c'est négliger l'asymétrie des contraintes hémodynamiques appliquées à l'aorte ascendante. En effet, le flux sanguin sortant du cœur est naturellement orienté sur la face antéro-externe de l'aorte ascendante (Fig.74). Même si l'élasticité de la paroi aortique a pour rôle d'absorber le « choc systolique », les différentes « faces » de l'aorte ne sont pas sollicitées avec la même intensité. Afin d'éliminer l'effet de cette localisation variable des échantillons, il nous apparaît nécessaire de repérer chaque fragment et de faire des analyses comparatives sur différents échantillons provenant d'un même patient.

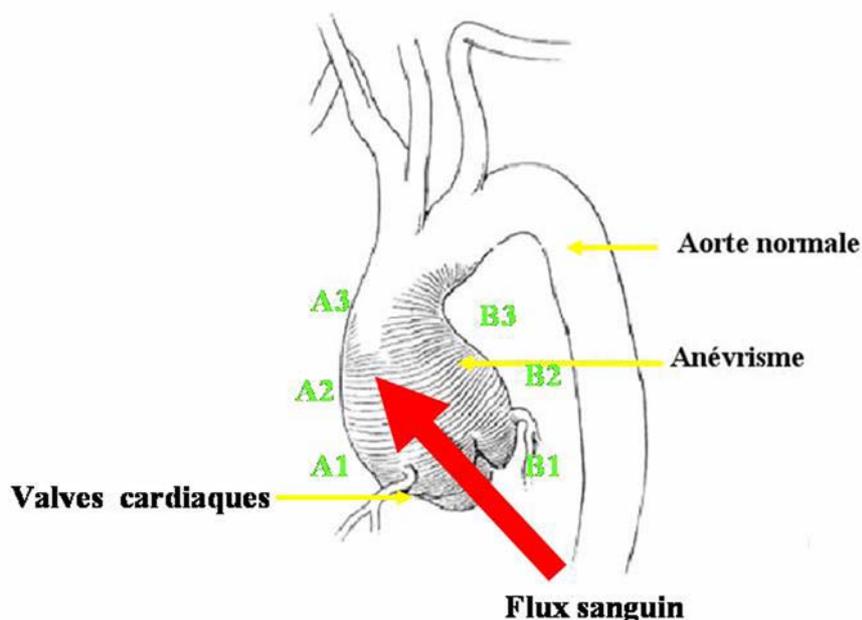


Figure 74: Les différents sites de prélèvement possibles

## **V) Le pronostic de l'anévrisme de l'aorte ascendante**

Un des objectifs principaux est donc d'offrir une technique capable de pronostiquer la survenue d'un anévrisme de l'aorte en fonction de la structure du tissu. Le caractère prédictif des spectroscopies se définit par la capacité à identifier un marqueur aortique précoce révélant le potentiel de dilatation d'une aorte avant le stade de l'anévrisme. En couplant l'information biochimique contenue au sein des spectres avec les données médicales, il sera possible de réaliser une large banque spectrale où les spectres seront associés à l'état de l'aorte et aux différents paramètres médicaux déjà cités. Ainsi, devant une dilatation modérée, il sera possible de déterminer si des modifications structurales des protéines, se rapprochent de celles observées dans des tissus pathologiques. Les aortes présentant un tel profil spectroscopique pourront alors être considérées comme à risque de développer un anévrisme.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le bilan de ces trois années de thèse, passées à travailler sur la discrimination des tissus aortiques sains et anévrismaux, est positif. En effet, après avoir mis en œuvre les techniques spectroscopiques IRTF et Raman sur de nombreuses séries de patients, la conclusion est sans ambiguïté : il existe des marqueurs spectroscopiques identifiables de la pathologie anévrysmale sur les spectres infrarouge et Raman. Par ailleurs, la fluorescence nous a permis de mettre en évidence les lésions et réorganisations des fibres élastiques au sein des tissus anévrismaux qui se répercutent sur nos données spectrales. La grande sensibilité des spectroscopies vibrationnelles permet d'établir de solides corrélations entre la composition du tissu et les signaux enregistrés sur des produits purs.

Logiquement, suite à la mise en évidence de ce pouvoir discriminant des spectroscopies de nombreuses questions concernant « le pourquoi » de ces résultats sont rapidement apparues.

Malheureusement, la bibliographie concernant la paroi aortique de **l'aorte ascendante** reste pauvre, contrairement à celle portant sur l'aorte abdominale. Bien que notre ambition ne soit pas de révolutionner les connaissances médicales acquises, le bilan à la fin des ces travaux montre que de nombreuses notions restent à préciser. La forte similitude entre le spectre de la média et de l'élastine montrent bien que la répartition des composants sur la paroi aortique n'est pas homogène mais est fortement différente entre les faces intimale et adventitielle de l'aorte. Ceci n'est qu'un exemple, mais jusqu'à maintenant l'élastine et le collagène sont décrits comme acteurs à part égale dans la constitution de la paroi aortique, du point de vue biochimique. Au vu des spectres mesurés il semblerait qu'au niveau de l'aorte ascendante thoracique, la media soit constituée presque exclusivement d'élastine tandis que l'adventice exhibe une forte proportion de collagène. Jusqu'à présent l'étude de coupes colorées par des techniques spécifiques de l'élastine et du collagène démontrait la présence des ces deux protéines au sein de la média mais très peu d'études rapportent la répartition quantitative liée à ces observations. D'autres travaux sont encore à mener dans cette voie afin notamment de bien caractériser la dégradation de l'élastine au sein du tissu aortique par exemple en utilisant des technique biochimiques couplées aux signaux spectroscopies.

En fait, de nombreuses connaissances véhiculées par voie orale restent difficiles à confirmer par des publications récentes ; et parfois même, il apparaît que des notions acceptées s'appuient sur des travaux datant de plus de 40 ans. Dans cette optique les spectroscopies peuvent permettre de mieux comprendre le tissu, les différentes lésions et les états pathologiques de l'aorte, ce qui sera utile à la mise au point d'une méthode diagnostique fiable et reproductible permettant les discriminations.

En fait, l'axe principal de notre travail a toujours été de développer une méthode permettant d'appliquer les spectroscopies au diagnostic des dilatations de l'aorte ascendante humaine. Bien que, dans un premier temps, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge de manière intensive, pour autant la spectroscopie Raman ne fut pas mise de côté, vu son fort potentiel dans le domaine de l'*in vivo*. L'analyse *ex vivo* fut pour nous le meilleur moyen de s'approcher des conditions d'acquisitions existantes au bloc opératoire. Les résultats obtenus sont très encourageants et montrent qu'une discrimination efficace des différents tissus est possible sur de grands fragments d'aortes non préparées.

Afin de visualiser le potentiel de la spectroscopie Raman sur l'analyse de tissus frais, un cœur rat fraîchement explanté (fig.75) possédant encore l'ensemble de son aorte ascendante été utilisé afin de réaliser des mesures dans les minutes suivant le prélèvement. Cette manipulation nous a permis de réaliser des mesures sur le tissu aortique avant toute étape de congélation.

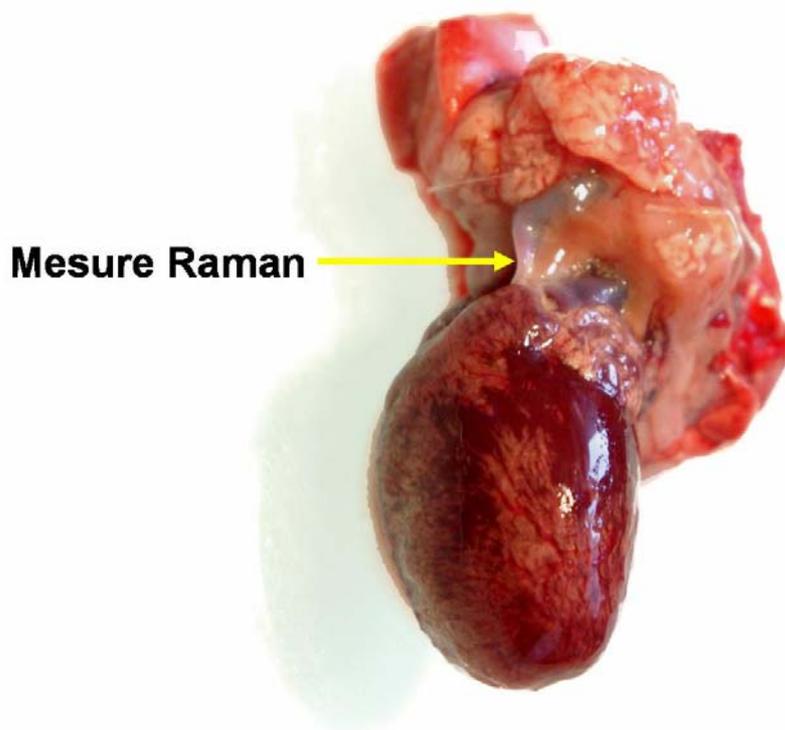


Figure 75: Mesure Raman sur un cœur de rat fraîchement explanté

Afin d'obtenir des spectres comparables avec ceux mesurés sur les fragments *ex vivo* d'aorte humaine, le même protocole a été appliqué soit l'acquisition de 15 spectres et la réalisation

d'un moyenne afin d'améliorer le rapport S/B. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 76 et deux commentaires sont alors possibles :

- La réalisation d'un spectre Raman sur une aorte fraîchement explantée, encore gonflée par du sang est possible et ce avec une bonne qualité de spectre. Ce point était très important à vérifier dans l'optique du développement d'une approche *in-vivo*.

- Les spectres issus de la paroi aortique humaine et de rat présentent de fortes homologues. Il est en effet possible de retrouver l'ensemble des pics présents sur les fragments d'aorte humaine. Cette intéressante observation nous indique que, d'un point de vue spectroscopique, le modèle animal est très proche de ce que l'on peut observer chez l'homme et peut donc représenter un très bon modèle pour débiter nos premières analyses *in-vivo*.

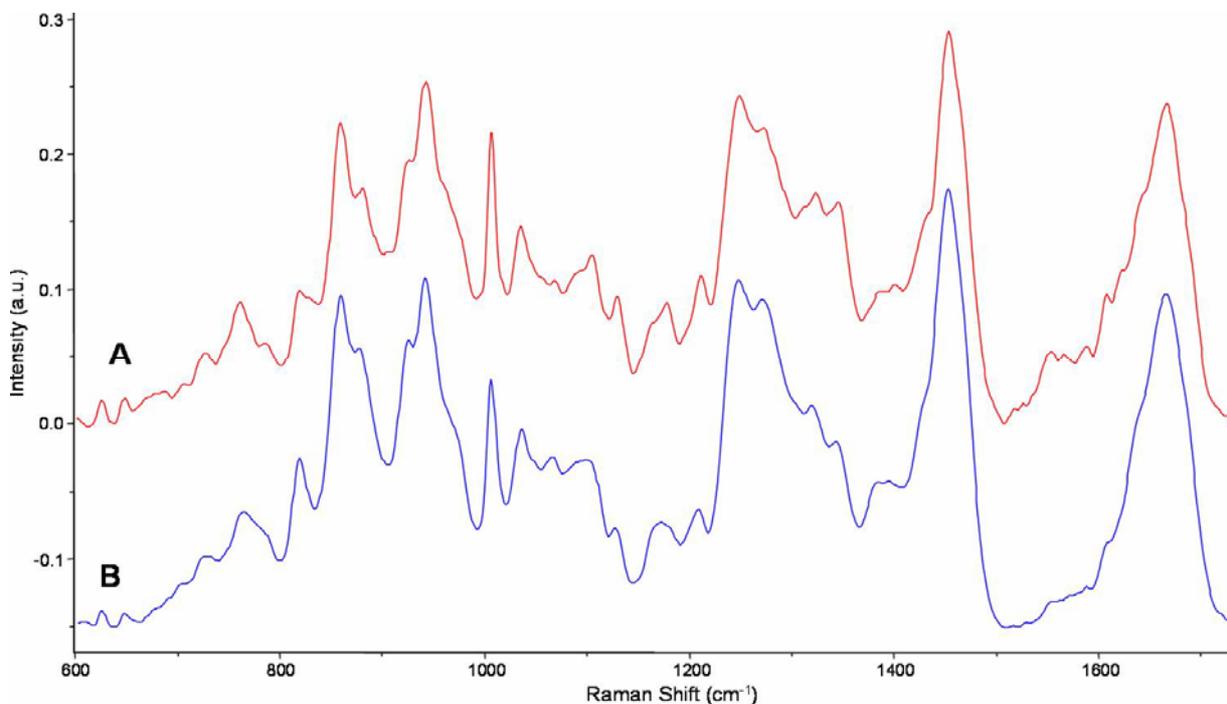


Figure 76: Comparaison des spectres obtenus sur l'aorte humaine (bleu) et celle du rat (rouge)

En conclusion, la spectroscopie Raman possède un fort potentiel concernant le diagnostic *in vivo* des dilatations aortiques humaines. Le couplage avec la spectroscopie IRTF nous a permis de mieux comprendre ce qu'est l'aorte ascendante, notion « simple » mais pourtant fondamentale pour la mise au point d'une méthodologie adaptée. Aujourd'hui la principale motivation à poursuivre ces travaux est la transposition des ces résultats à une approche *in vivo*. L'unité MÉDIAN travaille actuellement à la mise au point d'une sonde Raman miniaturisée en vue d'une future application en milieu hospitalier (fig.77). Compte tenu de

ces résultats, il est actuellement envisageable d'entreprendre la mise au point d'un système rapidement utilisable en salle d'opération qui donnera au chirurgien des renseignements inédits sur l'aorte ascendante.



Figure 77: Exemple de sonde Raman utilisable *in-vivo*

Bien que la mise au point de cette nouveauté technologique se poursuive actuellement, des essais récents à l'aide d'un dispositif muni d'une sonde *in-vivo* (fig.78) ont permis d'obtenir des résultats très prometteurs.

La figure 78 présente des spectres enregistrés sur du collagène pur (en noir) et un fragment d'aorte (en bleu). Bien que les spectres présentent un bruit de fond relativement important, il est possible d'identifier des pics caractéristiques comme la bande amide I, la contribution des  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  et le pic de la phénylalanine (entourés en rouge). Ces résultats préliminaires furent réalisés avec un dispositif de mesure n'étant pas dans sa phase optimale de fonctionnement. Cependant la possibilité de collecter un signal spectral sur une aorte est clairement démontrée. L'avancée technologique faite ces dernières années dans le développement de sonde Raman miniaturisée pour l'application *in-vivo* permet d'espérer très prochainement la mise à disposition d'un dispositif optimisé pour le diagnostic des dilatations aortiques.

Toutes les futures investigations du tissu aortique par spectroscopie Raman auront pour but le perfectionnement de ce dispositif afin de valider les résultats obtenus jusque maintenant.

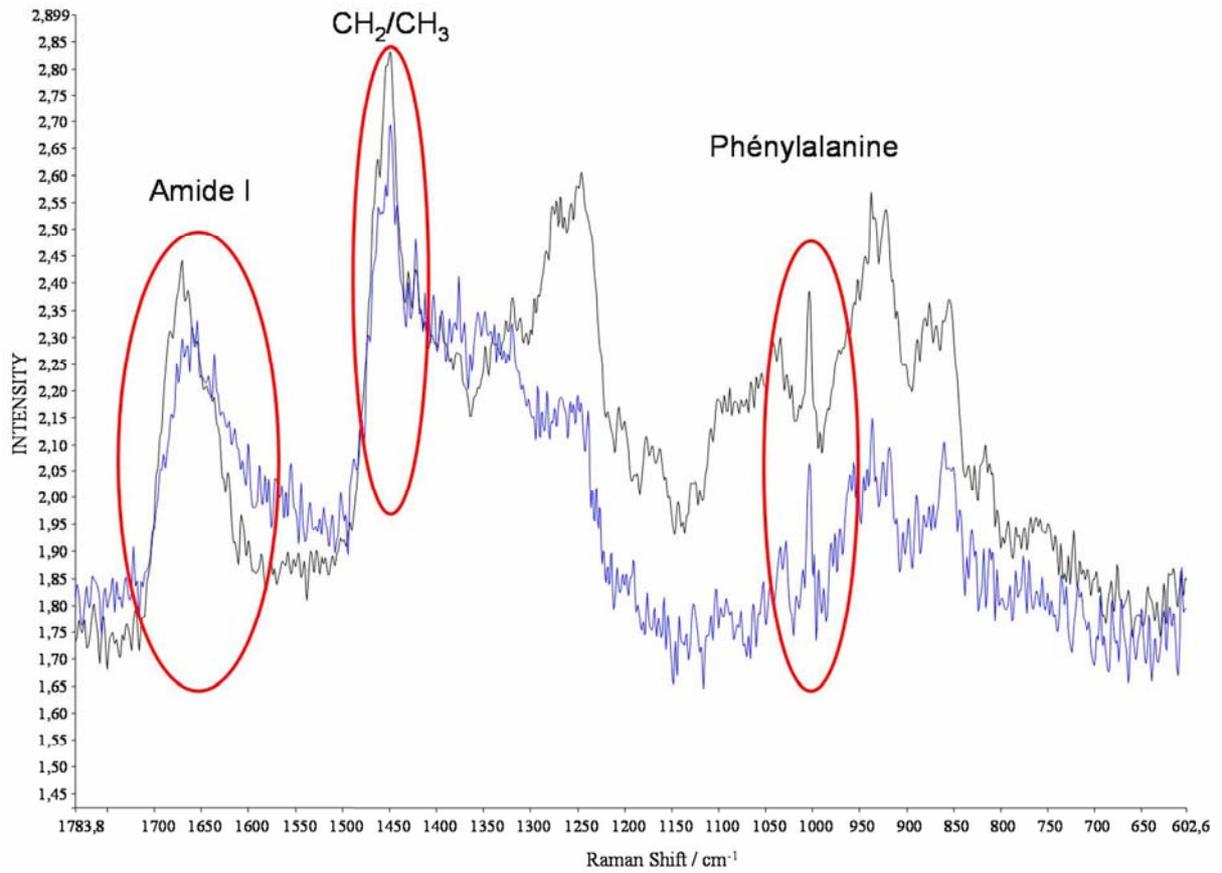


Figure 78: Spectres du collagène (noir) et de l'aorte (bleu) mesurés grâce à une sonde Raman miniaturisée

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Amharref, N., A. Beljebbar, S. Dukic, L. Venteo, L. Schneider, M. Pluot, et al.  
Brain tissue characterisation by infrared imaging in a rat glioma model.  
Biochim Biophys Acta\_2006; **1758**(7): 892-9.
- Andrus, B. W., D. J. O'Rourke, L. J. Dacey and R. T. Palac  
Stability of ascending aortic dilatation following aortic valve replacement.  
Circulation\_2003; **108 (Suppl 1)**: II295-9.
- Antonakos, A., E. Liarokapis and T. Leventouri  
Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites.  
Biomaterials\_2007; **28**(19): 3043-54.
- Bailey, A. J.  
Molecular mechanisms of ageing in connective tissues.  
Mech Ageing Dev\_2001; **122**(7): 735-55.
- Baraga, J. J., M. S. Feld and R. P. Rava  
In situ optical histochemistry of human artery using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy.  
Proc Natl Acad Sci U S A\_1992; **89**(8): 3473-7.
- Barbour, J. R., F. G. Spinale and J. S. Ikonomidis  
Proteinase systems and thoracic aortic aneurysm progression.  
J Surg Res\_2007; **139**(2): 292-307.
- Bouvrain, Y. and B. Levy  
["Windkessel" and coronary debit].  
Arch Mal Coeur Vaiss\_1981; **74**(6): 635-9.
- Braverman, A. C., H. Guven, M. A. Beardslee, M. Makan, A. M. Kates and M. R. Moon  
The bicuspid aortic valve.  
Curr Probl Cardiol\_2005; **30**(9): 470-522.
- Bressan, G. M., P. Argos and K. K. Stanley  
Repeating structure of chick tropoelastin revealed by complementary DNA cloning.  
Biochemistry\_1987; **26**(6): 1497-503.
- Buschman, H. P., G. Deinum, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, A. van der Laarse, et al.  
Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ.  
Cardiovasc Pathol\_2001; **10**(2): 69-82.
- Capps, S. B., R. C. Elkins and D. M. Fronk  
Body surface area as a predictor of aortic and pulmonary valve diameter.  
J Thorac Cardiovasc Surg\_2000; **119**(5): 975-82.

- Carmo, M., L. Colombo, A. Bruno, F. R. Corsi, L. Roncoroni, M. S. Cuttin, et al.  
Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms.  
*Eur J Vasc Endovasc Surg*\_2002; **23**(6): 543-9.
- Chamley-Campbell, J. H., G. R. Campbell and R. Ross  
Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens.  
*J Cell Biol*\_1981; **89**(2): 379-83.
- Chen, J.  
Simultaneous observation of collagen and elastin based on the combined nonlinear optical imaging technique coupled with two-channel synchronized detection.  
*Opt. Int. J. Light Electron. Opt.*\_2007; **article in press**.
- Chen, N. X., K. D. O'Neill, D. Duan and S. M. Moe  
Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells.  
*Kidney Int*\_2002; **62**(5): 1724-31.
- Chrit, L., P. Bastien, B. Biatry, J. T. Simonnet, A. Potter, A. M. Minondo, et al.  
In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC.  
*Biopolymers*\_2007; **85**(4): 359-69.
- Clark, J. M. and S. Glagov  
Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited.  
*Arteriosclerosis*\_1985; **5**(1): 19-34.
- Colley, C. S., S. G. Kazarian, P. D. Weinberg and M. J. Lever  
Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques.  
*Biopolymers*\_2004; **74**(4): 328-35.
- Cotrufo, M., A. Della Corte, L. S. De Santo, C. Quarto, M. De Feo, G. Romano, et al.  
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**(2): 504-11.
- Crawford, M. H. and C. A. Roldan  
Prevalence of aortic root dilatation and small aortic roots in valvular aortic stenosis.  
*Am J Cardiol*\_2001; **87**(11): 1311-3.
- David, T. E., C. M. Feindel, G. D. Webb, J. M. Colman, S. Armstrong and M. Maganti  
Long-term results of aortic valve-sparing operations for aortic root aneurysm.  
*J Thorac Cardiovasc Surg*\_2006; **132**(2): 347-54.
- Davies, R. R., L. J. Goldstein, M. A. Coady, S. L. Tittle, J. A. Rizzo, G. S. Kopf, et al.  
Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size.  
*Ann Thorac Surg*\_2002; **73**(1): 17-27; discussion 27-8.

Debelle, L. and A. J. Alix  
The structures of elastins and their function.  
Biochimie\_1999a; **81**(10): 981-94.

Debelle, L., A. J. Alix, M. P. Jacob, J. P. Huvenne, M. Berjot, B. Sombret, et al.  
Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies.  
J Biol Chem\_1995; **270**(44): 26099-103.

Debelle, L. and A. M. Tamburro  
Elastin: molecular description and function.  
Int J Biochem Cell Biol\_1999b; **31**(2): 261-72.

Dingemans, K. P., P. Teeling, J. H. Lagendijk and A. E. Becker  
Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media.  
Anat Rec\_2000; **258**(1): 1-14.

Doliana, R., S. Bot, G. Mungiguerra, A. Canton, S. P. Cilli and A. Colombatti  
Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily.  
J Biol Chem\_2001; **276**(15): 12003-11.

Doliana, R., M. Mongiat, F. Bucciotti, E. Giacomello, R. Deutzmann, D. Volpin, et al.  
EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins.  
J Biol Chem\_1999; **274**(24): 16773-81.

DuBois D, D. E.  
A formula to estimate the approximative surface area if height and weight be known.  
Arch Int Med\_1916; **17**: 863-71.

Ehrlich, M. P., W. C. Fang, M. Grabenwoger, A. Kocher, J. Ankersmit, G. Laufer, et al.  
Impact of retrograde cerebral perfusion on aortic arch aneurysm repair.  
J Thorac Cardiovasc Surg\_1999; **118**(6): 1026-32.

Erbel, R.  
Diseases of the thoracic aorta.  
Heart\_2001; **86**(2): 227-34.

Esposito, C., H. Gerlach, J. Brett, D. Stern and H. Vlassara  
Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties.  
J Exp Med\_1989; **170**(4): 1387-407.

Fedak, P. W., M. P. de Sa, S. Verma, N. Nili, P. Kazemian, J. Butany, et al.  
Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation.  
J Thorac Cardiovasc Surg\_2003; **126**(3): 797-806.

- Frushour, B. G. and J. L. Koenig  
Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin.  
*Biopolymers*\_1975; **14**(2): 379-91.
- Garcier, J. M., V. Petitcolin, M. Filaire, R. Mofid, K. Azarnouch, A. Ravel, et al.  
Normal diameter of the thoracic aorta in adults: a magnetic resonance imaging study.  
*Surg Radiol Anat*\_2003; **25**(3-4): 322-9.
- Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner  
Collagens--structure, function, and biosynthesis.  
*Adv Drug Deliv Rev*\_2003; **55**(12): 1531-46.
- Gentner, J. M., E. Wentrup-Byrne, P. J. Walker and M. D. Walsh  
Comparison of fresh and post-mortem human arterial tissue: an analysis using FT-IR  
microspectroscopy and chemometrics.  
*Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*\_1998; **44**(1): 251-9.
- Gosline, J. M.  
Hydrophobic interaction and a model for the elasticity of elastin.  
*Biopolymers*\_1978; **17**(3): 677-95.
- Gray, W. R., L. B. Sandberg and J. A. Foster  
Molecular model for elastin structure and function.  
*Nature*\_1973; **246**(5434): 461-6.
- Hager, A., H. Kaemmerer, U. Rapp-Bernhardt, S. Blucher, K. Rapp, T. M. Bernhardt, et al.  
Diameters of the thoracic aorta throughout life as measured with helical computed  
tomography.  
*J Thorac Cardiovasc Surg*\_2002; **123**(6): 1060-6.
- Hagl, C., M. A. Ergin, J. D. Galla, S. L. Lansman, J. N. McCullough, D. Spielvogel, et al.  
Neurologic outcome after ascending aorta-aortic arch operations: effect of brain protection  
technique in high-risk patients.  
*J Thorac Cardiovasc Surg*\_2001; **121**(6): 1107-21.
- Hahn, R. T., M. J. Roman, A. H. Mogtader and R. B. Devereux  
Association of aortic dilation with regurgitant, stenotic and functionally normal bicuspid  
aortic valves.  
*J Am Coll Cardiol*\_1992; **19**(2): 283-8.
- Halme, T., T. Vihersaari, T. Savunen, J. Niinikoski, M. Inberg and R. Penttinen  
Desmosines in aneurysms of the ascending aorta (annulo-aortic ectasia).  
*Biochim Biophys Acta*\_1982; **717**(1): 105-10.
- Hariri, R. J., D. R. Alonso, D. P. Hajjar, D. Coletti and M. E. Weksler  
Aging and arteriosclerosis. I. Development of myointimal hyperplasia after endothelial injury.  
*J Exp Med*\_1986; **164**(4): 1171-8.

- Haris, P. I. and D. Chapman  
The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy.  
Biopolymers\_1995; **37**(4): 251-63.
- Harkness, M. L., R. D. Harkness and D. D. Mc  
The collagen and elastin content of the arterial wall.  
J Physiol\_1955; **127**(2): 33-4P.
- Hata, T. R., T. A. Scholz, I. V. Ermakov, R. W. McClane, F. Khachik, W. Gellermann, et al.  
Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin.  
J Invest Dermatol\_2000; **115**(3): 441-8.
- Hinek, A., F. W. Keeley and J. Callahan  
Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for  
secretion of tropoelastin.  
Exp Cell Res\_1995; **220**(2): 312-24.
- Holifield, B., T. Helgason, S. Jemelka, A. Taylor, S. Navran, J. Allen, et al.  
Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation?  
J Clin Invest\_1996; **97**(3): 814-25.
- Huang, Z., A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam and H. Zeng  
Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer.  
Int J Cancer\_2003; **107**(6): 1047-52.
- Ishihata, A., Y. Katano, S. Morinobu and M. Endoh  
Influence of aging on the contractile response to endothelin of rat thoracic aorta.  
Eur J Pharmacol\_1991; **200**(1): 199-201.
- Jacob, M. P.  
[Elastin: preparation, characterization, structure, biosynthesis and catabolism].  
C R Seances Soc Biol Fil\_1993; **187**(2): 166-80.
- Jacob, M. P., C. Badier-Commander, V. Fontaine, Y. Benazzoug, L. Feldman and J. B.  
Michel  
Extracellular matrix remodeling in the vascular wall.  
Pathol Biol (Paris)\_2001; **49**(4): 326-32.
- Jono, S., M. D. McKee, C. E. Murry, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, et al.  
Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.  
Circ Res\_2000a; **87**(7): E10-7.
- Jono, S., C. Peinado and C. M. Giachelli  
Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell  
calcification.  
J Biol Chem\_2000b; **275**(26): 20197-203.

Kallenbach, K., M. Karck, D. Pak, R. Salcher, N. Khaladj, R. Leyh, et al.  
Decade of aortic valve sparing reimplantation: are we pushing the limits too far?  
*Circulation*\_2005; **112**(9 Suppl): I253-9.

Kong, J. and S. Yu  
Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures.  
*Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*\_2007; **39**(8): 549-59.

Krishna, C. M., G. Kegelaer, I. Adt, S. Rubin, V. B. Kartha, M. Manfait, et al.  
Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines.  
*Biopolymers*\_2006; **82**(5): 462-70.

Lesauskaite, V., L. Ivanoviene and A. Valanciute  
[Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects].  
*Medicina (Kaunas)*\_2003; **39**(6): 529-34.

Lesauskaite, V., P. Tanganelli, C. Sassi, E. Neri, F. Diciolla, L. Ivanoviene, et al.  
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**(9): 1003-11.

Lewis, E. N., P. J. Treado, R. C. Reeder, G. M. Story, A. E. Dowrey, C. Marcott, et al.  
Fourier transform spectroscopic imaging using an infrared focal-plane array detector.  
*Anal Chem*\_1995; **67**(19): 3377-81.

Lindholt, J. S., L. Heickendorff, S. Vammen, H. Fasting and E. W. Henneberg  
Five-year results of elastin and collagen markers as predictive tools in the management of small abdominal aortic aneurysms.  
*Eur J Vasc Endovasc Surg*\_2001; **21**(3): 235-40.

Masuda, Y., K. Takanashi, J. Takasu, N. Morooka and Y. Inagaki  
Expansion rate of thoracic aortic aneurysms and influencing factors.  
*Chest*\_1992; **102**(2): 461-6.

McCaffrey, T. A., A. C. Nicholson, P. E. Szabo, M. E. Weksler and B. B. Weksler  
Aging and arteriosclerosis. The increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity.  
*J Exp Med*\_1988; **167**(1): 163-74.

McNamara, J. J. and V. M. Pressler  
Natural history of arteriosclerotic thoracic aortic aneurysms.  
*Ann Thorac Surg*\_1978; **26**(5): 468-73.

Munsch, B., G. Lizard, S. Gueldry and P. Gambert  
[Agents inducing cell death of the vascular wall].  
*Ann Biol Clin (Paris)*\_1995; **53**(9): 473-80.

- Nancarrow, P. A. and C. B. Higgins  
Progressive thoracic aortic dilatation after aortic valve replacement.  
AJR Am J Roentgenol\_1984; **142**(4): 669-72.
- Natsuaki, M., T. Itoh, K. Rikitake, Y. Okazaki and K. Naitoh  
Aortic complications after aortic valve replacement in patients with dilated ascending aorta and aortic regurgitation.  
J Heart Valve Dis\_1998; **7**(5): 504-9.
- Parhami, F., A. Garfinkel and L. L. Demer  
Role of lipids in osteoporosis.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol\_2000; **20**(11): 2346-8.
- Partridge, S. M., H. F. Davis and G. S. Adair  
The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin.  
Biochem J\_1955; **61**(1): 11-21.
- Partridge, S. M., D. F. Elsdon, J. Thomas, A. Dorfman, A. Telser and P. L. Ho  
Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin.  
Biochem J\_1964; **93**(3): 30C-33C.
- Pasquali-Ronchetti, I. and M. Baccarani-Contri  
Elastic fiber during development and aging.  
Microsc Res Tech\_1997; **38**(4): 428-35.
- Plenz, G. A., M. C. Deng, H. Robenek and W. Volker  
Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis.  
Atherosclerosis\_2003; **166**(1): 1-11.
- Raffetto, J. D. and R. A. Khalil  
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease.  
Biochem Pharmacol\_2007; **75**(2): 346-59.
- Raspanti, M., M. Protasoni, A. Manelli, S. Guizzardi, V. Mantovani and A. Sala  
The extracellular matrix of the human aortic wall: ultrastructural observations by FEG-SEM and by tapping-mode AFM.  
Micron\_2006; **37**(1): 81-6.
- Reynolds, H. R., P. A. Tunick, S. Kort, B. P. Rosenzweig, R. S. Freedberg, E. S. Katz, et al.  
Abdominal aortic aneurysms and thoracic aortic atheromas.  
J Am Soc Echocardiogr\_2001; **14**(11): 1127-31.
- Robb, B. W., H. Wachi, T. Schaub, R. P. Mecham and E. C. Davis  
Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly.  
Mol Biol Cell\_1999; **10**(11): 3595-605.

Rosenbloom, J., W. R. Abrams and R. Mecham  
Extracellular matrix 4: the elastic fiber.  
Faseb J\_1993; **7**(13): 1208-18.

Ross, R. and J. A. Glomset  
The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts).  
N Engl J Med\_1976a; **295**(7): 369-77.

Ross, R. and J. A. Glomset  
The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts).  
N Engl J Med\_1976b; **295**(8): 420-5.

Sanders, M.  
Molecular and cellular concepts in atherosclerosis.  
Pharmacol Ther\_1994; **61**(1-2): 109-53.

Sauvage, M., N. Hinglais, C. Mandet, C. Badier, F. Deslandes, J. B. Michel, et al.  
Localization of elastin mRNA and TGF-beta1 in rat aorta and caudal artery as a function of age.  
Cell Tissue Res\_1998; **291**(2): 305-14.

Sauvage, M., M. P. Jacob and M. Osborne-Pellegrin  
Aortic elastin and collagen content and synthesis in two strains of rats with different susceptibilities to rupture of the internal elastic lamina.  
J Vasc Res\_1997; **34**(2): 126-36.

Schmoker, J. D., K. J. McPartland, E. K. Fellingner, J. Boyum, L. Trombley, F. P. Ittleman, et al.  
Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in atherosclerotic and nonatherosclerotic thoracic aortic aneurysms.  
J Thorac Cardiovasc Surg\_2007; **133**(1): 155-61.

Shanahan, C. M., N. R. Cary, J. R. Salisbury, D. Proudfoot, P. L. Weissberg and M. E. Edmonds  
Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification.  
Circulation\_1999; **100**(21): 2168-76.

Sary, H. C.  
Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol\_2000; **20**(5): 1177-8.

Tfayli, A., O. Piot, F. Pitre and M. Manfait  
Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy.  
Eur Biophys J\_2007 ; **36**(8): 1049-58.

- Tokunaga, O., T. Yamada, J. L. Fan and T. Watanabe  
Age-related decline in prostacyclin synthesis by human aortic endothelial cells. Qualitative and quantitative analysis.  
Am J Pathol\_1991; **138**(4): 941-9.
- Toubas, D., M. Essendoubi, I. Adt, J. M. Pinon, M. Manfait and G. D. Sockalingum  
FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*.  
Anal Bioanal Chem\_2007; **387**(5): 1729-37.
- Trask, T. M., B. C. Trask, T. M. Ritty, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and R. P. Mecham  
Interaction of tropoelastin with the amino-terminal domains of fibrillin-1 and fibrillin-2 suggests a role for the fibrillins in elastic fiber assembly.  
J Biol Chem\_2000; **275**(32): 24400-6.
- Virmani, R., A. P. Avolio, W. J. Mergner, M. Robinowitz, E. E. Herderick, J. F. Cornhill, et al.  
Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities.  
Am J Pathol\_1991; **139**(5): 1119-29.
- Vrhovski, B. and A. S. Weiss  
Biochemistry of tropoelastin.  
Eur J Biochem\_1998; **258**(1): 1-18.
- Wang, L., J. Chapman, R. A. Palmer, O. van Ramm and B. Mizaikoff  
Classification of atherosclerotic rabbit aorta samples by mid-infrared spectroscopy using multivariate data analysis.  
J Biomed Opt\_2007; **12**(2): 024006.
- Warren, A. E., M. L. Boyd, C. O'Connell and L. Dodds  
Dilatation of the ascending aorta in paediatric patients with bicuspid aortic valve: frequency, rate of progression and risk factors.  
Heart\_2006; **92**(10): 1496-500.
- Watanabe, M. and T. Sawai  
Alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta in association with dissecting aneurysm: analysis using high performance liquid chromatography.  
Tohoku J Exp Med\_1999; **187**(4): 291-303.
- Weis-Fogh, T. and S. O. Anderson  
New molecular model for the long-range elasticity of elastin.  
Nature\_1970; **227**(5259): 718-21.
- Wolinsky, H. and S. Glagov  
A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals.  
Circ Res\_1967; **20**(1): 99-111.

Wydner, K. S., J. L. Sechler, C. D. Boyd and H. C. Passmore  
Use of an intron polymorphism to localize the tropoelastin gene to mouse chromosome 5 in a region of linkage conservation with human chromosome 7.  
Genomics\_1994; **23**(1): 125-31.

Yagdi, T., Y. Atay, M. Cikirikcioglu, M. Boga, H. Posacioglu, M. Ozbaran, et al.  
Determinants of early mortality and neurological morbidity in aortic operations performed under circulatory arrest.  
J Card Surg\_2000; **15**(3): 186-93.

Zoumi, A., X. Lu, G. S. Kassab and B. J. Tromberg  
Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy.  
Biophys J\_2004; **87**(4): 2778-86.

## **Diagnostic des dilatations aortiques, approche *in-vitro* et *ex-vivo* par spectroscopies vibrationnelles optiques**

**Th. Pharm. Univ. : Reims : 2007**

### **Résumé:**

Véritable source de dilemme lors d'une intervention de chirurgie thoracique, la découverte d'une aorte ascendante modérément dilatée amène directement la question du remplacement systématique ou non de celle-ci. Le risque opératoire lié à cet acte chirurgical supplémentaire couplé à l'incertitude de l'évolution vers un futur anévrisme iraient à l'encontre d'une telle procédure; pourtant, le risque d'une réintervention quelques mois ou années plus tard reste élevé.

Dans l'optique de développer un nouvel outil de diagnostic concernant l'aorte, nous avons fait l'hypothèse que les spectroscopies vibrationnelles pourraient apporter des réponses. Nous avons donc analysé des tissus aortiques humains à l'aide des techniques de microspectroscopies vibrationnelles optiques Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et Raman. Dans un premier temps, nous avons utilisé la microspectroscopie infrarouge avec pour principal objectif la discrimination entre les tissus aortiques provenant de patients sans dilation et ceux provenant d'une aorte pathologique, possédant un diamètre supérieur à la normale. Grâce à l'emploi d'analyses statistiques multivariées sophistiquées, nous avons pu étudier de larges jeux de données spectrales. Cette analyse a mis en lumière des informations discriminantes au sein des spectres infrarouges permettant de discriminer de manière reproductible les différents échantillons. Par la suite, la microspectroscopie Raman a permis de se rapprocher des conditions réelles d'acquisition, telles qu'on peut les imaginer au bloc opératoire. Après avoir démontré la reproductibilité des résultats obtenus en spectroscopie infrarouge, l'analyse sur les fragments d'aorte *ex vivo* a permis de valider de manière solide le potentiel de la spectroscopie Raman dans le diagnostic des dilatations aortiques.

### **Mots clés :**

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Spectroscopie Raman, Anévrisme de l'aorte thoracique, Analyse statistique, Elastine, Collagène.

### **JURY**

Dr Paul Dumas - Président  
Dr Marie Paule Jacob - Rapporteur  
Pr Jean-Marie Perrier-Cornet - Rapporteur  
Dr Dominique Bertrand - Examinateur  
Dr Sylvain Rubin - Examinateur  
Dr Ganesh Sockalingum - Directeur de thèse  
Pr Michel Manfait - Co Directeur de thèse

### **Adresse de l'auteur**

M. Franck BONNIER - 6 rue des Caquetons - 02570 La Chapelle sur Chézy