



**HAL**  
open science

# Indentation instrumentée du tissu cardiaque : vers l'élaboration d'une bio-prothèse

Jean-Philippe Jehl

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Jehl. Indentation instrumentée du tissu cardiaque : vers l'élaboration d'une bio-prothèse. Mécanique des matériaux [physics.class-ph]. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0033 . tel-03335673

**HAL Id: tel-03335673**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03335673>**

Submitted on 6 Sep 2021

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

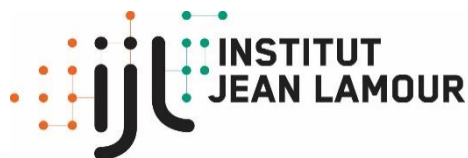
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

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

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



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



INSTITUT  
JEAN LAMOUR

Université de Lorraine  
École doctorale Chimie-Mécanique-Matériaux-Physique (ED C2MP)

Institut Jean Lamour – CNRS – UMR 7198  
Département Nanomatériaux, Électronique Et Vivant

---

# Indentation instrumentée du tissu cardiaque : vers l'élaboration d'une bio-prothèse

---

## Thèse

Présentée devant l'Université de Lorraine  
par

**Jean-Philippe JEHL**

pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine en Sciences des Matériaux**

Soutenue publiquement le 5 février 2021 devant la commission d'examen :

### Rapporteurs :

Monsieur	Thierry	FOLLIGUET	PU-PH	Université Paris-Est Créteil
Monsieur	Dominique	KNITTEL	Pr	Université de Strasbourg

### Examineurs :

Madame	Anne	RUBIN	MCF HDR	Université de Strasbourg
Monsieur	Taha	BOUKHOBZA	Pr	Université de Lorraine

### Directeurs de thèse :

Monsieur	Franck	CLEYMAND	MCF HDR	Université de Lorraine
Monsieur	Pablo	MAUREIRA	PU-PH	Université de Lorraine

### Invité :

Monsieur	Thierry	BASTOGNE	Pr	Université de Lorraine
----------	---------	----------	----	------------------------



## **Remerciements**

Les recherches liées au présent travail ont été menées à l'Institut Jean Lamour et à l'école de chirurgie de Nancy Lorraine de 2014 à 2020. Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué, par quelque moyen que ce soit, à la réalisation de cette thèse, en particulier :

Franck Cleymand et Richard Kouitat pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'être mes directeurs de thèse successifs. Ils m'ont donné l'occasion d'élargir mon champ de connaissances au domaine de la mécanique appliquée aux tissus biologiques.

Le Professeur Pablo Maureira, co-directeur de ma thèse, pour sa disponibilité et l'intérêt des discussions au cours desquelles il a partagé son point de vue et son expérience. Ses conseils, ses retours d'informations critiques ont été primordiaux dans l'orientation de mes travaux au regard de sa pratique médicale.

Les Professeurs Dominique Knittel et Thierry Folliguet, rapporteurs de ma thèse, pour l'examen approfondi de mon travail et la pertinence de leurs remarques.

Les Professeurs Taha Boukhobza et Anne Rubin en acceptant d'être mes co-examineurs et en révisant ma thèse.

Les professeurs Thierry Bastogne et Nguyen Tran pour leur grand soutien de tous les instants au cours de la réalisation de ce doctorat et la confiance qu'ils m'ont accordée à travers les responsabilités confiées dans les projets de Recherche Hôpital Virtuel de Lorraine et ASSistance CARDIAQUE dans le cadre du Traitement de l'Infarctus du Myocarde (ASCATIM).

Pascale mon épouse, Clément, Manon et Solène, mes enfants, qui m'ont soutenu inconditionnellement ces dernières années.

Ma famille pour son soutien continu.

Les jeunes doctorants, Arnaud, Gaël et les moins jeunes Anne-Sophie, Valentin pour les échanges scientifiques.

Pour terminer, je voudrais conclure ces remerciements en soulignant l'importance de bénéficier de soutiens inconditionnels dans nos moments d'incertitudes en remerciant chaleureusement : Franck Cleymand, Taha Boukhobza, Thierry Bastogne, Annie DARY, Dominique Daloz et Thierry Belmonte.



# Table des matières

INTRODUCTION GENERALE .....	9
<b>1 LA CARACTERISATION MECANIQUE DU TISSU CARDIAQUE .....</b>	<b>17</b>
1.1. INTRODUCTION .....	17
1.2. LE TISSU CARDIAQUE .....	19
1.2.1. Anatomie du muscle cardiaque.....	19
1.2.2. Le cycle périodique du muscle cardiaque.....	22
1.2.3. La vascularisation du tissu cardiaque et les propriétés du muscle cardiaque in vitro.....	23
1.2.4. Le comportement mécanique du myocarde .....	24
1.3. LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION EX VIVO DU TISSU CARDIAQUE .....	28
1.3.1. Introduction .....	28
1.3.2. Technique de l'indentation instrumentée .....	28
1.3.3. Théorie du contact.....	32
1.3.4. Analyse des courbes d'indentation instrumentée .....	35
1.4. SYNTHESE.....	41
1.4.1. Discussion.....	41
1.4.2. Conclusion .....	41
1.5. TABLE DES FIGURES .....	42
1.6. BIBLIOGRAPHIE .....	43
<b>2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'INDENTATION EN MILIEU LIQUIDE DU TISSU CARDIAQUE .....</b>	<b>51</b>
2.1 INDENTATION INSTRUMENTEE.....	51
2.1.1 Introduction : .....	51
2.1.2 Indentation instrumentée en milieu liquide .....	51
2.2 DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'ANALYSE DES COURBES EXPERIMENTALES EN MILIEU LIQUIDE.....	56
2.2.1 Analyse des courbes expérimentales en milieu liquide pour un poinçon sphérique par la relation de Hertz .....	56
2.2.2 Optimisation de la relation de Hertz pour le tissu cardiaque : modèle HERTZ-2D .....	60
2.2.3 Limitations du modèle HERTZ-2D : .....	62
2.3 INDENTATION DU TISSU CARDIAQUE.....	68
2.3.1 Préparation des échantillons du tissu cardiaque : .....	68
2.3.2 Stratégie d'une campagne d'indentation instrumentée .....	69
2.4 SYNTHESE .....	70
2.4.1 Discussion.....	70
2.4.2 Conclusion .....	70
2.5 TABLE DES FIGURES : .....	71
2.6 TABLE DES TABLEAUX : .....	72

2.7	BIBLIOGRAPHIE .....	73
<b>3</b>	<b>ESTIMATION DU MODULE D'YOUNG REDUIT DU TISSU CARDIAQUE PAR INDENTATION SPHERIQUE ...</b>	<b>79</b>
3.1	PREAMBULE .....	79
3.2	INTRODUCTION .....	79
3.3	SPHERICAL DEPTH SENSING INDENTATION IN A LIQUID ENVIRONMENT: TOWARD CARDIAC TISSUE CHARACTERIZATION. (SIPS 2018 MAMALIS INTERNATIONAL SYMPOSIUM ) .....	81
3.3.1	<i>Summary:</i> .....	81
3.3.2	<i>Introduction:</i> .....	81
3.3.3	<i>Materials and methods:</i> .....	82
3.3.4	<i>Results:</i> .....	84
3.3.5	<i>Discussion:</i> .....	88
3.3.6	<i>Conclusion</i> .....	89
3.3.7	<i>Acknowledgements</i> .....	89
3.3.8	<i>References:</i> .....	90
3.4	LIQUID ENVIRONMENT SPHERICAL DEPTH SENSING INDENTATION: TOWARD THE MECHANICAL CHARACTERIZATION OF LIVING TISSUE. (INVITED PAPER SIPS 2018 / ZEHETBAUER INTERNATIONAL SYMPOSIUM) .....	93
3.4.1	<i>Summary:</i> .....	93
3.4.2	<i>Introduction:</i> .....	94
3.4.3	<i>Materials and methods:</i> .....	94
3.4.4	<i>Results:</i> .....	96
3.4.5	<i>Discussion:</i> .....	101
3.4.6	<i>Conclusion</i> .....	102
3.4.7	<i>Acknowledgements</i> .....	103
3.4.8	<i>References:</i> .....	103
<b>4</b>	<b>VERS UN MODELE COMPORTEMENTAL D'UNE BIO-PROTHESE COMPATIBLE AVEC LE TISSU CARDIAQUE</b>	<b>109</b>
4.1	PREAMBULE.....	109
4.2	INTRODUCTION.....	109
4.3	TRANSVERSE ISOTROPIC MODELLING OF LEFT-VENTRICLE PASSIVE FILLING: MECHANICAL CHARACTERIZATION FOR EPICARDIAL BIOMATERIAL MANUFACTURING .....	111
4.3.1	<i>Abstract</i> .....	111
4.3.2	<i>Introduction</i> .....	112
4.3.3	<i>Materials and methods:</i> .....	114
4.3.4	<i>Results:</i> .....	119
4.3.5	<i>Discussion</i> .....	125
4.3.6	<i>Conclusion</i> .....	127
4.3.7	<i>Acknowledgements</i> .....	128



4.3.8	<i>Funding</i> .....	128
4.3.9	<i>References</i> :.....	128
<b>5</b>	<b>DEPLOIEMENT DE LA METHODE DE CARACTERISATION POUR UN TISSU BIOLOGIQUE COMPLEXE : L'OS CORTICAL</b> .....	<b>135</b>
5.1	PREAMBULE.....	135
5.2	INTRODUCTION.....	135
5.3	TITLE: SPHERICAL DEPTH-SENSING NANOINDENTATION OF HUMAN ANTERIOR SKULL BASE BONES: ESTABLISHMENT OF A TEST PROTOCOL .....	136
5.3.1	<i>Abstract</i> .....	136
5.3.2	<i>Introduction</i> .....	137
5.3.3	<i>Material and methods</i> .....	139
5.3.4	<i>Data analysis</i> .....	142
5.3.5	<i>Ethical considerations</i> .....	144
5.3.6	<i>Results</i> .....	144
5.3.7	<i>Discussion</i> .....	147
5.3.8	<i>Conclusion</i> .....	151
5.3.9	<i>Acknowledgments</i> .....	152
5.3.10	<i>Funding</i> .....	152
5.3.11	<i>References</i> .....	152
	<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>157</b>



# Introduction générale

La cardiopathie ischémique est une atteinte cardiaque qui peut entraîner des conséquences graves : infarctus, mort subite, insuffisance cardiaque... Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elle est responsable de 17,5 millions de morts dans le monde chaque année, soit 30% des décès<sup>1</sup>. Première cause de mortalité dans le monde, elle est la deuxième cause de mortalité en France, juste après les cancers et elle est à l'origine d'environ 140 000 morts par an<sup>2</sup> et 400 décès par jour.

Une des lésions caractéristiques de la cardiopathie ischémique est l'infarctus du myocarde. Il correspond à l'ensemble des conséquences tissulaires secondaire à l'obstruction d'une partie du lit artériel elle-même responsable d'une hypoxie cellulaire. Il en résulte un remodelage ventriculaire qui se manifeste en général par l'évolution d'une cicatrice tissulaire fibreuse ayant perdu ses propriétés contractiles. Lorsque le remodelage concerne une quantité significative du tissu cardiaque, les manifestations cliniques peuvent présenter divers tableaux cliniques conduisant à l'insuffisance cardiaque ischémique.

Malgré des progrès indéniables dans la compréhension de la fonction cardiaque et dans l'amélioration des techniques médicales et chirurgicales, l'insuffisance cardiaque ischémique représente toujours une cause majeure de mortalité dans le monde et son pronostic reste sévère dans sa forme évoluée. Dans ce contexte, de nouvelles approches thérapeutiques, telles que la médecine régénérative et le génie tissulaire sont développées pour compenser

---

<sup>1</sup> [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/fr/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/) (consulté au 1<sup>er</sup> décembre 2020)

<sup>2</sup> <https://www.fedecardio.org/La-Federation-Francaise-de-Cardiologie/Presse/journee-mondiale-du-coeur> (consulté au 1<sup>er</sup> décembre 2020)

voire se substituer aux tissus endommagés. Ces stratégies bien que prometteuses ne permettent pas une application clinique de routine. Une des tentatives de l'ingénierie tissulaire est de reproduire le plus fidèlement possible le comportement mécanique du tissu à traiter. Dans ce travail de thèse, une approche permettant de relier la caractérisation mécanique du tissu cardiaque sain avec sa microstructure a été réalisée. A cet effet et afin d'éviter la dégradation des propriétés du matériau due à son assèchement et/ou à sa dé-vascularisation, un protocole expérimental a été défini permettant d'effectuer les mesures dans un environnement proche de son milieu physiologique.

Une perspective à ces travaux de thèse est l'élaboration d'un matériau de substitution sous la forme des membranes dont les propriétés mécaniques sont proches du myocarde. Un premier prototype de membrane a été réalisé et expérimenté sur le petit animal. Ces résultats constituent une étape indispensable dans le développement d'une assistance biomécanique dans le cadre d'un projet européen FEDER ASCATIM (2018-2021).

L'élaboration d'un matériau de substitution suggère une nouvelle fois que la connaissance approfondie des caractéristiques mécaniques des tissus, qui composent les organes du corps, est d'une extrême importance pour différentes stratégies du génie tissulaire.

Avec le développement de nouvelles techniques et de nouveaux dispositifs médicaux, une connaissance plus détaillée des propriétés mécaniques des tissus mous est désormais possible. Bien que quelques recherches aient été effectuées dans ce domaine, les informations actuellement disponibles sont limitées et insuffisantes pour une bonne compréhension de la fonction biomécanique de ces tissus au niveau local. La nanoindentation instrumentée est l'un des rares outils qui permettent d'étudier très localement (~ centaines de  $\mu\text{m}$ ) les propriétés mécaniques des tissus mous et durs. Cette technique permet la caractérisation d'un échantillon à partir de l'analyse d'une courbe d'indentation instrumentée en milieu liquide par la théorie du contact (relation de Hertz). Bien que cet essai mécanique soit bien maîtrisé pour les matériaux conventionnels à l'air ambiant, sa réalisation en milieu liquide introduit des biais qu'il est nécessaire d'analyser et de traiter.

Ce manuscrit présente donc les principes de la caractérisation mécanique par indentation instrumentée en milieu liquide de tissus biologiques et plus particulièrement du ventricule

gauche, site de la majorité des infarctus. La modélisation du comportement mécanique d'une bio-prothèse de substitution ou d'adjonction au ventricule gauche est définie. Enfin une extension de la méthode de caractérisation développée est appliquée aux os corticaux dont les propriétés mécaniques sont souvent mal comprises en raison de leur géométrie complexe et de leur localisation profonde.

Dans un premier chapitre, nous orientons notre revue de la littérature vers i) une explication de la structure et du comportement mécanique du tissu cardiaque : le myocarde et ii) la présentation de la caractérisation des tissus biologiques par des essais mécaniques mettant en œuvre différents modes de sollicitations.

Le deuxième chapitre s'attache à définir les éléments essentiels lors de la mise en place d'essais d'indentations instrumentées sur des tissus biologiques. Nous présentons le protocole expérimental permettant la caractérisation mécanique locale des propriétés du myocarde à partir d'un code développé sous scilab. Ce code permet l'analyse d'une courbe d'indentation instrumentée en milieu liquide par l'implémentation de la théorie du contact (relation de Hertz)<sup>3</sup>.

Dans le troisième chapitre, nous présentons la caractérisation du myocarde à travers l'estimation des modules d'Young du tissu suivant deux directions principales par indentation sphérique confirmant ainsi la nature anisotrope du tissu cardiaque<sup>4</sup>. La recherche des durées limites d'exploitation des échantillons après prélèvement (expérimentation ex-vivo) nous a permis de définir une cinétique de rigidification des tissus<sup>5</sup> pouvant être comparée aux techniques de datation utilisées en médecine légale<sup>6</sup>.

---

<sup>3</sup> J-Ph. Jehl, R. Kouitat On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue 2016 Sustainable Industrial Processing Summit

<sup>4</sup> *J-Ph. Jehl, Pablo Maureura, Richard Kouitat Njiwa* Liquid environment spherical depth sensing indentation: toward the mechanical characterization of living tissue 2018 Sustainable Industrial Processing Summit

<sup>5</sup> *J-Ph. Jehl, Pablo Maureura, Richard Kouitat Njiwa* Spherical depth sensing indentation in a liquid environment: toward the cardiac tissue characterization. 2018 Sustainable Industrial Processing Summit

<sup>6</sup> Madea, B., Rödiger, A. Precision of estimating the time since death using different criteria of supravital muscular excitability. *Forens Sci Med Pathol* **2**, 127–133 (2006)

Les quatrième et cinquième chapitres concernent des développements spécifiques. Sur la base de la caractérisation mécanique du myocarde ex vivo, une modélisation du comportement mécanique d'une bio prothèse de tissu cardiaque est définie. Enfin, une première transposition de la méthode développée pour le tissu cardiaque est proposée pour un matériau biologique dont les caractéristiques mécaniques sont peu connues : l'os cortical. Ainsi nous présentons également une application de la méthode développée sur un autre type de matériau biologique permettant d'illustrer les capacités de cette approche<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> Favier, Valentin et al. "Spherical Depth-Sensing Nanoindentation of Human Anterior Skull Base Bones: Establishment of a Test Protocol." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 110 (2020).

# Chapitre 1

## La caractérisation mécanique du tissu cardiaque





# Table des matières

<b>1</b>	<b>LA CARACTERISATION MECANIQUE DU TISSU CARDIAQUE .....</b>	<b>17</b>
1.1.	INTRODUCTION.....	17
1.2.	LE TISSU CARDIAQUE.....	19
1.2.1.	<i>Anatomie du muscle cardiaque .....</i>	<i>19</i>
1.2.1.1.	Les fibres du muscle cardiaque .....	20
1.2.1.2.	La matrice extracellulaire .....	21
1.2.2.	<i>Le cycle périodique du muscle cardiaque .....</i>	<i>22</i>
1.2.3.	<i>La vascularisation du tissu cardiaque et les propriétés du muscle cardiaque in vitro .....</i>	<i>23</i>
1.2.4.	<i>Le comportement mécanique du myocarde.....</i>	<i>24</i>
1.2.4.1.	Le modèle de Hill.....	25
1.2.4.2.	Le modèle à microdilatation.....	26
1.3.	LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION EX VIVO DU TISSU CARDIAQUE .....	28
1.3.1.	Introduction .....	28
1.3.2.	<i>Technique de l'indentation instrumentée.....</i>	<i>28</i>
1.3.2.1.	Courbe d'indentation instrumentée.....	28
1.3.2.2.	Les différentes pointes de pénétrateur .....	30
1.3.2.3.	Les différentes marques de systèmes d'indentation instrumentée .....	31
1.3.3.	<i>Théorie du contact.....</i>	<i>32</i>
1.3.4.	<i>Analyse des courbes d'indentation instrumentée .....</i>	<i>35</i>
1.3.4.1.	Méthode de Doerner et Nix .....	35
1.3.4.2.	Méthode d'Oliver et Pharr .....	37
1.3.4.3.	Limitation de la méthode d'Oliver and Pharr .....	40
1.4.	SYNTHESE.....	41
1.4.1.	<i>Discussion .....</i>	<i>41</i>
1.4.2.	<i>Conclusion .....</i>	<i>41</i>
1.5.	TABLE DES FIGURES.....	42
1.6.	BIBLIOGRAPHIE .....	43



# La caractérisation mécanique du tissu cardiaque

## 1.1. Introduction

L'activité de recherche associée aux pathologies du muscle cardiaque couvre un champ scientifique très large s'étendant de la biologie à la modélisation mathématique. Parmi les aspects relevant de ce dernier point, on trouve l'application des principes mécaniques. Cette application spécifique a donné naissance à la biomécanique au début des années 1970 [1]. Ce domaine contribue à la compréhension du comportement mécanique des organismes vivants et à montrer que les caractéristiques mécaniques et l'organisation de la structure des matériaux biologiques sont étroitement liées à leurs fonctionnalités [1].

Le muscle cardiaque génère des forces de type passives ou actives [2]. Les forces passives sont dues à l'élasticité du tissu. Les forces actives sont dues aux mécanismes de contraction et de dilatation des fibres du tissu cardiaque. Elles contribuent à la mise en mouvement du tissu et sont gouvernées par les stimuli électriques du système nerveux. Il convient alors, d'appréhender la structure du tissu cardiaque (myocarde) en tenant compte précisément de la manière dont les fibres musculaires (cardiomyocytes) sont agrégées dans la matrice extracellulaire.

Fonctionnellement, ce sont les fibres musculaires qui permettent les contractions du myocarde et fournissent la pression nécessaire pour éjecter le sang<sup>8</sup>. Par leur relaxation, sous l'effet des oreillettes, elles assurent le remplissage des ventricules. La structure tissulaire permet aux fibres musculaires de se contracter et de se dilater dans le sens longitudinal des fibres [3]. Les techniques d'imagerie permettent aujourd'hui de visualiser l'architecture de la matrice extracellulaire [4] [5]. Malgré ces descriptions anatomiques détaillées, deux descriptions

---

<sup>8</sup> [https://www.youtube.com/watch?v=XRcuTJIQs\\_8](https://www.youtube.com/watch?v=XRcuTJIQs_8) (consulté au 1<sup>er</sup> décembre 2020)

expliquant la disposition des fibres musculaires dans le myocarde s'opposent [6]. La première s'appuie sur la « construction » des ventricules à partir d'une bande du myocarde [7].

La deuxième description définit un arrangement de 'feuilles' décrivant des réseaux laminaires constitués de quatre à six myocytes [8]. Ces deux types de représentations révèlent un arrangement complexe de cardiomyocytes au sein de la matrice extracellulaire. Ces différents concepts expliquant la morphologie hétérogène du tissu cardiaque suggèrent que le myocarde pourrait être décrit comme une organisation tridimensionnelle [4], [9]. Des études récentes, utilisant l'imagerie, ont montré que l'orientation des myocytes est non seulement cruciale pour définir les directions de la contraction mais démontrent également que le processus de contraction / relaxation est altéré par des pathologies comme l'infarctus du myocarde [10].

Dans ce contexte, de nouvelles approches thérapeutiques, comme la médecine régénératrice [11], [12] et l'ingénierie tissulaire [13], bénéficieront de plus de précisions en associant la description de l'orientation tissulaire avec la caractérisation mécanique des tissus cardiaques sains et malades. Les tissus issus de cette ingénierie tissulaire pourront alors compenser voire se substituer aux tissus endommagés en reproduisant le plus fidèlement possible leurs comportements mécaniques. Ces stratégies bien que prometteuses ne permettent pas aujourd'hui une application clinique de routine.

## 1.2. Le tissu cardiaque

Une première approche anatomique nous amène à définir les muscles comme des organes du corps humain en charge d'assurer le mouvement. Ils se divisent en deux grandes catégories les muscles lisses et les muscles striés. Les muscles lisses sont présents à l'intérieur d'organes creux tels que la vessie et les muscles striés sont en charge de la motricité du corps humain. Les muscles striés se subdivisent en deux sous catégories<sup>9</sup> :

- Les muscles squelettiques
- Le muscle cardiaque (myocarde).

### 1.2.1. Anatomie du muscle cardiaque

Le myocarde est constitué de fibres musculaires (cardiomyocytes) qui sont reliées bout à bout, permettant une activité contractile concertée et par une matrice extracellulaire qui entoure les fibres musculaires comme un mortier. Les fibres musculaires permettent les contractions du myocarde et fournissent la pression nécessaire pour éjecter le sang. Par leur relaxation, elles permettent le remplissage des ventricules. La matrice extracellulaire garantit l'intégrité de la structure tissulaire et ne permet aux fibres musculaires qu'une contraction. Holzapfel et Ogden [14] proposent une description du myocarde en tenant compte de la structure du tissu cardiaque et de l'orientation de ses fibres musculaires. Cependant, la disposition et l'orientation des fibres musculaires dans le myocarde demeurent controversées [20]. Les techniques d'imagerie nous permettent aujourd'hui de visualiser l'architecture de la matrice extracellulaire.

Ces informations morphologiques suggèrent que le myocarde est mieux décrit sur la base d'un modèle qui peut être considéré comme un maillage tridimensionnel à fibres orientées [23],[24].

Ainsi, le tissu cardiaque est organisé en paquets superposés comme le montre la figure 1.1.

---

<sup>9</sup> Ressource Unisciel (CC BY-NC-ND 3.0) par Francis Canon Université de Technologie de Compiègne (1<sup>er</sup> décembre 2020)

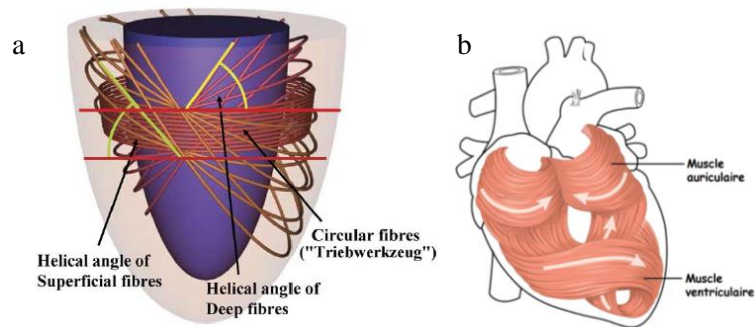


Figure 1. 1 : Organisation du myocarde a) suivant le concept de paquets de fibres juxtaposé et b) suivant l'enroulement d'une bande musculaire a) Issu de Review The anatomical arrangement of the myocardial cells making up the ventricular mass b) Issu de Unisciel (CC BY-NC-ND 3.0) par Francis Canon Université de Technologie de Compiègne

### 1.2.1.1. Les fibres du muscle cardiaque

Le muscle cardiaque est un système contractile complexe composé de nombreuses fibres musculaires (cardiomyocytes) de structures cylindriques de longueur moyenne de 100  $\mu\text{m}$  et de diamètre 5 à 10  $\mu\text{m}$  et d'une matrice extra cellulaire. L'unité mécanique est obtenue grâce à un attachement des cellules constituant les fibres musculaires par l'intermédiaire de disques intercalaires (figure 1.2).

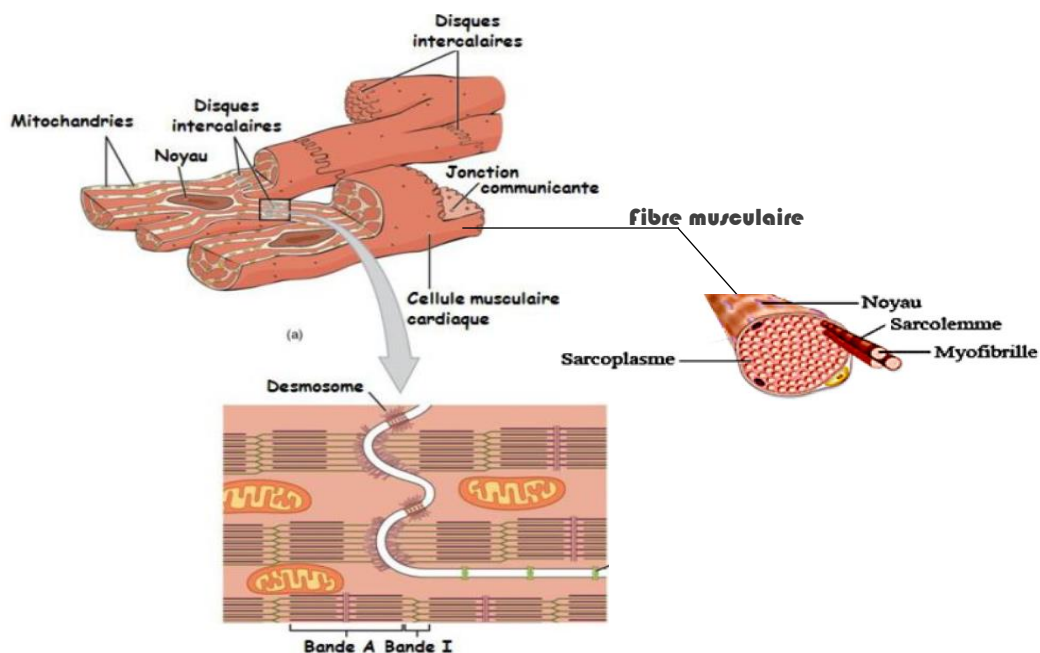


Figure 1. 2 : Schéma de l'organisation microstructurale du muscle cardiaque

Ressource Unisciel (CC BY-NC-ND 3.0) par Francis Canon Université de Technologie de Compiègne

Ces fibres musculaires sont elles-mêmes constituées de myofibrilles, structures tubulaires allongées d'un diamètre de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Ces structures constituées de myofilaments fins et épais sont disposées selon une organisation géométrique en trois dimensions (figure 1.3). La contraction des fibres musculaires correspond à un raccourcissement des sarcomères dû au glissement relatif des filaments fins (actine) et épais (myosine) : les deux disques délimitant un sarcomère se rapprochent l'un de l'autre. Ce phénomène se produisant simultanément pour tous les sarcomères de la cellule, il en résulte un raccourcissement global de la cellule musculaire, et par effet de propagation, de l'ensemble des fibres cardiaques du myocyte suivant leur axe longitudinal.

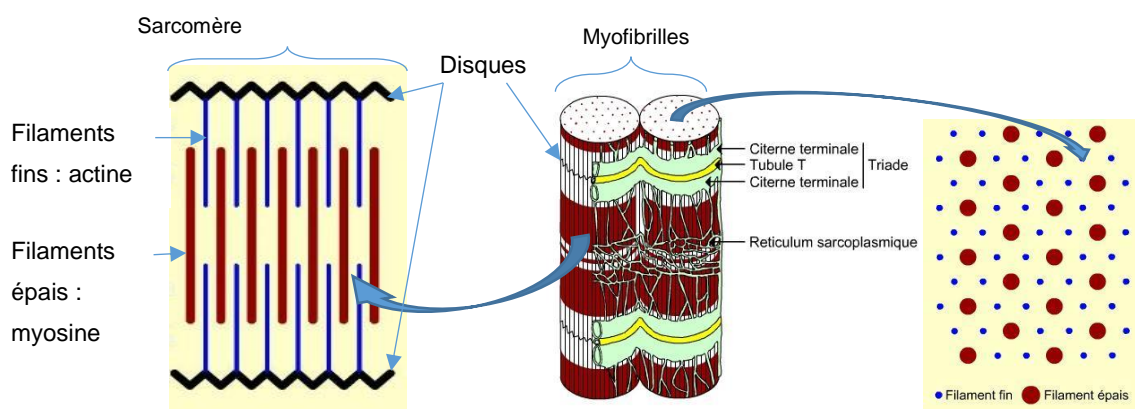


Figure 1. 3 : Représentation d'une myofibrille et des coupes transversales et longitudinales

Ressource Unisciel (CC BY-NC-ND 3.0) par Gilles Camus, Différences muscle squelettique - muscle cardiaque

### 1.2.1.2. La matrice extracellulaire

Le fonctionnement des tissus tels que le tissu cardiaque est lié à leur élasticité. Dans les tissus composant un organisme pluricellulaire, la matrice extracellulaire joue un rôle essentiel dans l'architecture tissulaire, mais aussi dans des processus aussi variés que la régulation des fonctions cellulaires, la différenciation, la prolifération. Ces réseaux complexes se construisent et se spécialisent au cours du développement, et leur composition évolue en fonction de différentes situations physiologiques (croissance ou remodelage du tissu au cours de la cicatrisation), ou pathologiques (fibroses, ostéoathrose ...). En effet, la matrice extracellulaire est en renouvellement permanent, résultat de l'équilibre entre la synthèse de ses constituants

et leur dégradation. La rupture de cet équilibre conduit à des pathologies, soit par accumulation de matrice, c'est le cas des fibroses, soit par destruction, comme l'arthérose ou l'emphysème pulmonaire. La matrice extracellulaire entoure les cellules/fibres musculaires et constitue une structure de type nid d'abeille dont l'orientation est similaire à celle des fibres musculaires (figure 1.4) [15].

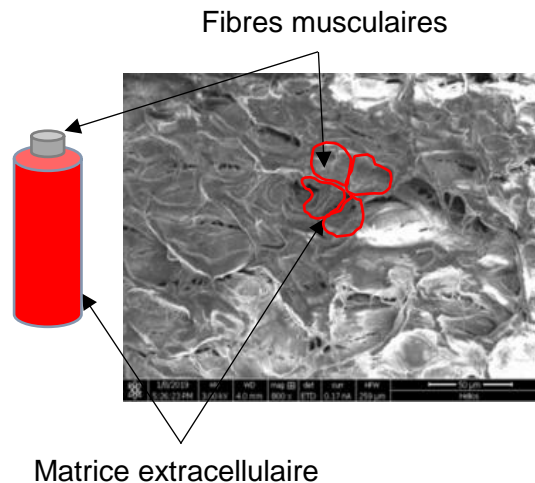


Figure 1. 4: image de microscopie électronique à balayage de l'organisation tissulaire cardiaque porcine composée de fibres musculaires et de matrice extracellulaire (IJL 2019)

### 1.2.2. Le cycle périodique du muscle cardiaque

L'étude du cycle cardiaque se limite dans ce chapitre au cycle du ventricule gauche du cœur. Ce ventricule, d'un point de vue mécanique, correspond à la partie du cœur où les pressions et les contraintes sont les plus élevées et par conséquent où les risques de lésions sont les plus importants. La figure 1.5 illustre le cycle cardiaque ventriculaire gauche (Pression-Volume) d'un cœur porcine. Nous pouvons distinguer quatre étapes bien distinctes :

- Première étape : La phase diastolique correspond au remplissage ventriculaire, qui s'étend des points 1 à 2, ce dernier correspond à la fin de la diastole du ventricule gauche (pression et volume).
- Deuxième étape : La première partie de la phase systolique (entre les points 2 et 3) est la phase de contraction iso volumique pendant laquelle la pression ventriculaire gauche augmente et le volume reste inchangé (contraction ventriculaire).



- Troisième étape : La deuxième partie de la phase systolique (entre les points 3 et 4) est la phase d'éjection de la contraction ventriculaire.

- Quatrième étape : La phase des points 4 à 1 est connue sous le nom de relaxation isovolumique, le volume du ventricule gauche est constant mais la pression ventriculaire gauche diminue.

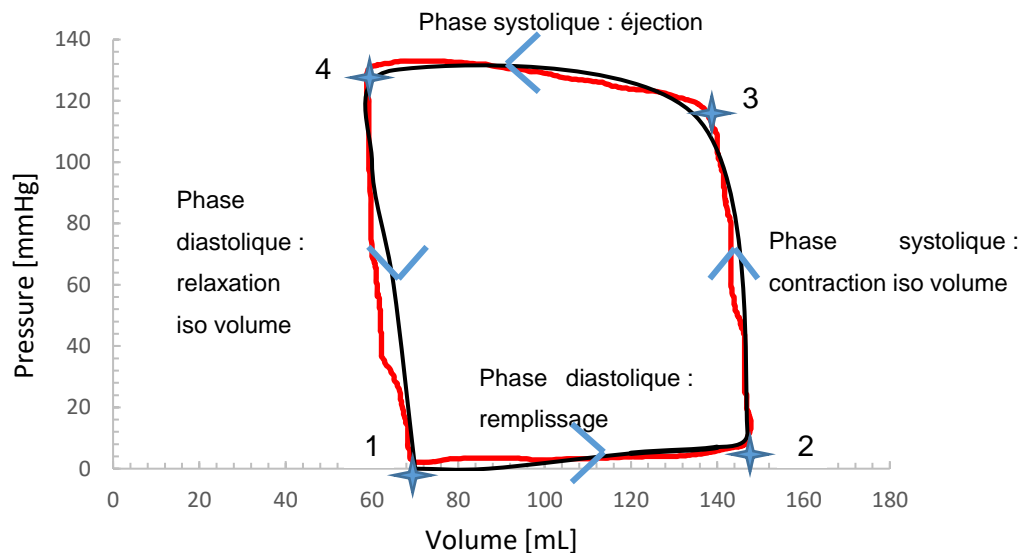


Figure 1. 5 : Cycle cardiaque ventriculaire gauche (Pression-Volume) d'un cœur porcine avec une boucle rouge représentant la boucle P-V expérimentale et la boucle noire représentant une boucle P-V théorique.

Le muscle cardiaque n'est pas téτανisable à la différence des muscles squelettiques. En effet, la téτανie se caractérise par une contraction de puissance maximum ne permettant pas au muscle de se relâcher entre deux contractions. La cellule musculaire cardiaque doit ainsi se relâcher avant d'être en mesure d'être à nouveau stimulée. Il en résulte que le muscle cardiaque doit se contracter de façon répétitive.

### 1.2.3. La vascularisation du tissu cardiaque et les propriétés du muscle cardiaque in vitro

Les vaisseaux sanguins capillaires dans le myocarde sont abondants par rapport à leur distribution clairsemée dans le muscle squelettique. Cette abondance est compatible avec le plus grand besoin du myocarde en apport d'oxygène et de nutriment.

L'espacement entre les cellules et les capillaires est faible et favorise la diffusion de l'oxygène. L'échange des substances entre le sang et les cellules du myocarde est aidé par un système longitudinal et transverse de tubules. Ces tubules permettent également la transmission rapide de l'électricité à l'intérieur des fibres, assurant ainsi l'activation quasi simultanée de toutes les myofibrilles, y compris celles situées à l'intérieur de la fibre.

L'absence de vascularisation impose une logistique adaptée dans le cadre d'une expérimentation *ex vivo* du tissu cardiaque. En effet, une fois prélevés, les échantillons doivent être placés dans une solution liquide [16]. Un spécimen de diamètre plus petit que 1 mm peut être maintenu en « vie » pendant quelques heures sans diminution de sa force de contraction. Les spécimens plus gros ne peuvent pas maintenir leur viabilité par diffusion seule (sans circulation sanguine), et ne sont donc pas utilisés dans des expériences *ex vivo*. Ainsi dans la mise en place du protocole expérimental de caractérisation mécanique, la taille des échantillons et leur mode de conservation sont primordiaux.

#### **1.2.4. Le comportement mécanique du myocarde**

Dans les tissus biologiques et particulièrement dans le myocarde, les structures internes apparaissent et coexistent à différentes échelles. La modélisation mécanique d'un tel milieu à microstructure désordonnée n'est pas une tâche simple. De nombreuses pistes sont actuellement explorées, parmi lesquelles les techniques classiques d'homogénéisation mathématique [6]-[8], les approches multi-échelles [9],[10] ainsi que la théorie des mélanges [11],[12]. Ces méthodes systématiques et puissantes donneront certainement des résultats significatifs à l'avenir. Des modèles phénoménologiques sont proposés dans la littérature. Certains d'entre eux se concentrent sur les mécanismes de la croissance et du remodelage [13]-[15].

Cet aspect de remodelage est sans doute d'une grande importance pour les études cliniques, en particulier lorsqu'il est associé au problème de l'infarctus du myocarde comme dans les références [15] et [16]. A l'heure actuelle, la modélisation d'un myocarde est encore en cours de développement par de nombreuses équipes de chercheurs.[14]

### 1.2.4.1. Le modèle de Hill

Pendant un moment, la communauté scientifique a pensé que le modèle à trois éléments de Hill (fig.1.6) serait suffisant pour fournir une équation constitutive pour le muscle cardiaque. Ce modèle est composé d'un élément contractile (CE), représentant le phénomène contractile des sarcomères (fig. 1.2), associé à un élément élastique en série (SE) pour la déformation des membranes et un élément élastique en parallèle (PE) pour rendre compte de la déformation issue de la tension initiale du cœur.

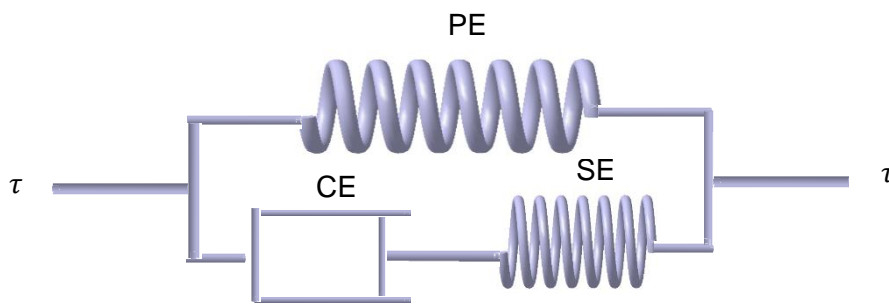


Figure 1. 6 : Modèle fonctionnel à trois éléments de HILL du muscle cardiaque

Les équations de ce modèle expriment une égalité des déplacements  $u$  (1) ainsi que deux égalités des contraintes  $\tau$  (2)

$$u_{PE} = u_{SE} + u_{CE} \quad (1)$$

$$\begin{cases} \tau_{CE} = \tau_{SE} \\ \tau_{max} = \tau_{PE} + \tau_{CE} \end{cases} \quad (2)$$

Pour rendre compte de cette tension initiale, un modèle a été développé figures 1.7-C à partir du modèle de Maxwell figure 1.7-A. Les modèles figures 1.7-B et 1.7-C sont appelés respectivement "tension de repos parallèle" et " tension au repos séries" [1].

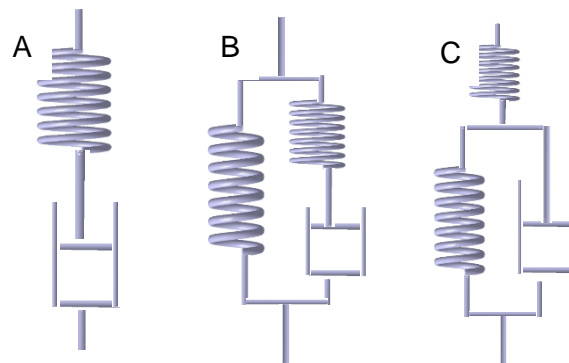


Figure 1. 7 : Modèles fonctionnels du muscle cardiaque (A) modèle de Maxwell modèle simple avec un élément contractile et un élément élastique en série, (B) modèle de Zener addition d'un élément élastique parallèle et (C) modèle de HILL addition d'un élément élastique en série.

En identifiant les résultats expérimentaux avec ces modèles, FUNG [1] a montré que ces derniers ne sont plus adaptés lorsque des expériences sont faites sur les muscles cardiaques dont la tension de repos n'est pas négligeable. Ainsi, les modèles incluant un élément parallèle n'ont pas donné satisfaction. Cela conduit à remettre en question le modèle à trois éléments de Hill et chercher une alternative à la méthode utilisée.

#### 1.2.4.2. Le modèle à microdilatation

Comme nous l'avons constaté précédemment, le muscle cardiaque est difficile à modéliser mécaniquement du fait de sa structure, de son organisation et de son fonctionnement. Des techniques classiques d'homogénéisation mathématique ou des approches multi-échelles sont actuellement développées et mèneront certainement à des résultats probants. Une autre approche phénoménologique est testée dans le cadre de la théorie des milieux à microdilatation [2] [17]. On considère ainsi qu'au regard du muscle cardiaque, l'une des propriétés les plus importantes est la capacité du point matériel à se contracter et à se dilater (phénomène contractile des sarcomères).

Il serait donc légitime de penser qu'une des modélisations pertinentes du tissu biologique et particulièrement du tissu cardiaque soit du type micromorphe<sup>10</sup>. Toutefois, afin de mettre en évidence une particularité microscopique, il est possible de ne considérer que la microdéformation et de négliger la micro-rotation (figure 1.8). Il s'en suit une simplification du modèle qui entraîne une réduction du nombre de degrés de liberté associé au point matériel, et, par conséquent, la diminution du nombre de paramètres du modèle à identifier [2], [17].

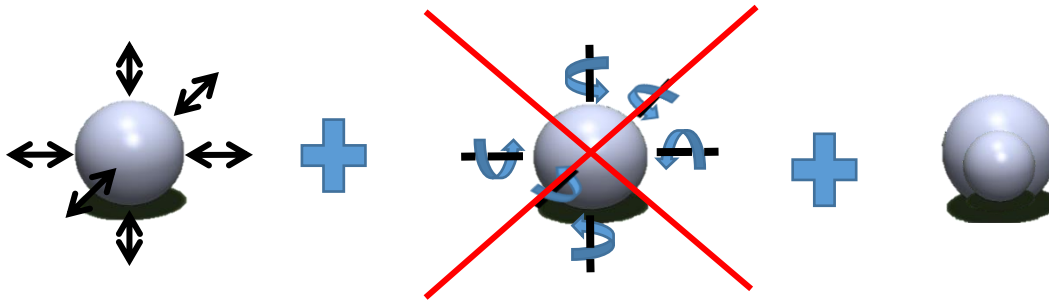


Figure 1. 8 : Modèle micromorphe sans micro-rotation : modèle à micro-dilatation

Dans ce cas les équations du comportement sont :

$$\sigma_{ij} = \lambda e_{rr} \delta_{ij} + \mu (e_{ij} + e_{ji}) + \eta \psi \delta_{ij} \quad (3)$$

Dans les relations précédentes,  $\sigma_{ij}$ ,  $e_{ij}$  représentent respectivement les tenseurs de contraintes et de déformations. La grandeur cinématique associée à la microdilatation est  $\psi$ . Les paramètres  $\lambda$  et  $\mu$  sont les coefficients de Lamé et  $\delta_{ij}$  est le symbole de Kronecker.

<sup>10</sup> L'approche micromorphe s'étend à des degrés de liberté supplémentaires non directement de nature cinématique

## **1.3. Les techniques de caractérisation ex vivo du tissu cardiaque**

### **1.3.1. Introduction**

La phase de modélisation du comportement mécanique nécessite au préalable la caractérisation des tissus biologiques par des essais mécaniques mettant en œuvre différents modes de sollicitations. Des essais de cisaillement, de traction et de compression sont utilisés pour caractériser le comportement des tissus du foie porcin par Z. Gao [18] et C. Chui [19]. Leur approche macroscopique met en œuvre une gamme de charge de 0.1 N à 10 N. Des essais d'indentations instrumentées sont également utilisés par W. Yao [20] et D. MacManus [21]. Ces derniers mettent en évidence les avantages de l'indentation par rapport aux autres essais de caractérisation en soulignant (i) la facilité relative de la préparation des échantillons et (ii) la capacité de mesurer différentes régions (approche locale à l'échelle microscopique) d'un organe afin de cartographier les propriétés hétérogènes. Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe 1.2.2.1) l'orientation des fibres cardiaques varie suivant la zone du cœur observée. Il convient d'appréhender le comportement mécanique du tissu cardiaque en tenant compte de l'organisation locale des fibres. Il est alors nécessaire de choisir un système de caractérisation mécanique adapté aux échantillons de petite taille. Le protocole de mesure devra préserver l'état des cellules vivantes du tissu cardiaque prélevées (cryogénéisation). De plus, ce système de caractérisation devra permettre la mesure des échantillons en environnement liquide pour éviter son assèchement.

### **1.3.2. Technique de l'indentation instrumentée**

#### **1.3.2.1. Courbe d'indentation instrumentée**

L'un des essais mécaniques les mieux adaptés au milieu biologique est le test d'indentation [22] pratiqué en milieu liquide. Ce test repose sur l'analyse de la résistance à l'enfoncement de deux milieux pressés l'un contre l'autre.

Une contribution majeure dans ce contexte est due à *Heinrich Rudolf Hertz* [23] qui a traité la problématique du contact élastique linéaire entre deux sphères. Depuis lors, de nombreux auteurs se sont penchés sur la question et ont considéré diverses géométries.[24]

Des progrès technologiques ont permis la construction de dispositif permettant d'enregistrer en continu la pénétration du poinçon en fonction de la charge appliquée. On parle alors d'indentation instrumentée avec une courbe d'indentation présentant une phase de chargement et une phase de déchargement (figure 1.9).

En 1986, Doerner et Nix [25] ont fourni la première analyse des données d'une indentation instrumentée en utilisant l'équation de rigidité introduite par Bulychev et al [26]. C'est une analyse qui permet de remonter à la dureté et au module d'élasticité équivalent sans mesurer la géométrie de l'empreinte. Cette dernière peut être inexistante lorsqu'aucune déformation plastique n'est présente.

Oliver et Pharr [27] ont montré que la raideur de contact de la courbe du début de déchargement correspondait mieux à une loi de puissance en comparaison à l'ajustement linéaire utilisé par Doerner et Nix (figure 1.9). Ce modèle dit de Oliver et Pharr est actuellement considéré comme le modèle standardisé pour extraire les propriétés mécaniques de l'indentation instrumentée.

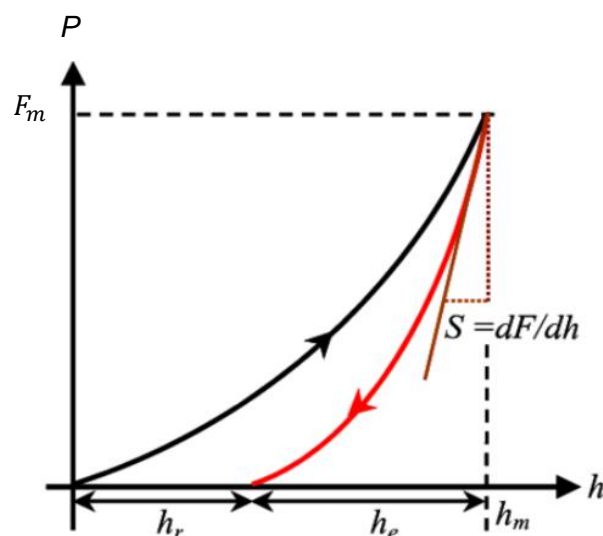


Figure 1. 9 : Définition de la raideur de contact d'Oliver & Pharr (source N. Oumarou and all International Journal of Surface Science and Engineering, vol. 4, no. 4-6, pp. 416–428, 2010)

Au-delà de l'application à des matériaux classiques, l'indentation instrumentée a déjà été utilisée pour appréhender les propriétés mécaniques de matériaux biologiques dits rigides (os, dentine) et semble un bon candidat à la caractérisation des tissus mous. En effet, l'indentation instrumentée remplit les conditions expérimentales attendues en permettant de réduire de façon significative les dimensions des zones explorées à la fois par (i) la gamme des forces appliquées, (ii) la gamme des déformations mesurées et par (iii) la géométrie des pointes utilisées. De plus elle permet l'immersion de l'échantillon pendant sa mesure.

### 1.3.2.2. Les différentes pointes de pénétrateur

Une mesure obtenue par indentation instrumentée permet de déterminer les propriétés mécaniques d'un matériau comme sa dureté, son module d'élasticité avec des pointes de formes connues.

Les machines de nanoindentation disponibles dans le commerce sont compatibles avec différentes pointes présentant des formes pyramidales, cylindriques et sphériques parmi d'autres (figure 1.10). Afin de minimiser leur influence sur les données de mesure, elles sont constituées de matériaux très rigides tels que le diamant pur ou le rubis.

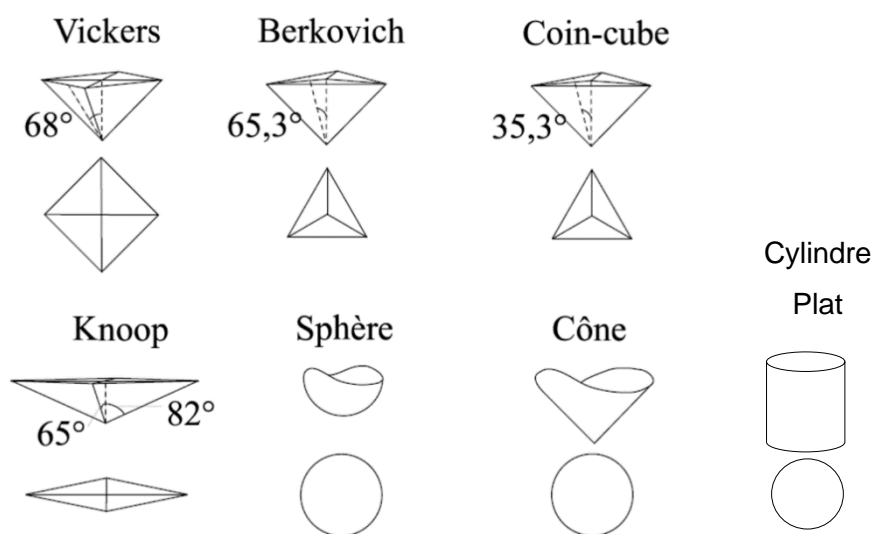


Figure 1. 10 : Représentation des différentes géométries des pénétrateurs et de leurs empreintes associées couramment utilisées en indentation



De par la nature du tissu cardiaque, matériau mou, le choix de la forme du pénétrateur se porte naturellement sur la sphère pour éviter (i) les concentrations de contraintes obtenues par les formes pyramidales et (ii) les effets de bord des formes cylindriques (poinçon plat).

Pour l'indentation instrumentée, la méthode conventionnelle d'extraction des propriétés élastiques des données d'indentation s'appuie sur la solution dérivée de Sneddon (1948, 1965) qui complète la formulation hertzienne valable pour les sphères. Sneddon a montré que la relation charge-déplacement pour des pointes de différentes géométries peut être formulée comme :

$$F = h^m \cdot K \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \quad (4)$$

Où F est la force appliquée, h la profondeur de pénétration, K une constante de la géométrie du pénétrateur, E le module d'Young du matériau,  $\nu$  le coefficient de poisson et m une constante liée à la géométrie de la pointe. Cette dernière prend notamment la valeur 1 pour le poinçon plat, 1,5 pour les sphères et 2 pour les cônes.

Pour le cas particulier des pointes sphériques d'indentation ( $m = 1/3$  et  $K = \frac{4\sqrt{R}}{3}$ ), l'expression donnée par Sneddon devient :

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{(1-\nu^2)} h^{3/2} \quad (5)$$

La relation (5) correspond à la théorie du contact hertzien dans lequel R représente le rayon de la sphère du pénétrateur, E le module d'Young et  $\nu$  le coefficient de poisson.

### **1.3.2.3. Les différentes marques de systèmes d'indentation instrumentée**

Hysitron a été l'une des premières entreprises à construire un nano-indenter permettant la caractérisation de matériaux biologiques tels que l'os, la dentine ou le cartilage. Bien que la

haute résolution de la tête de mesure Hysitron permette l'application de charges faibles et la mesure de faibles pénétrations (quelques nm), les problèmes liés à l'assèchement font de l'indentation de tissus biologiques très mous une tâche très difficile à accomplir avec une telle machine. Une telle difficulté est présente sur certains nanoindenteurs disponibles dans le commerce (Agilent, Micro Materials, IBIS).

La conception brevetée de la tête de nano-indentation Anton Paar UNHT permet l'usage des pénétrateurs longs en milieu liquide. Cette unique fonctionnalité fait de cet instrument un candidat idéal pour caractériser les matériaux mous et en particulier les tissus biologiques.

### **1.3.3. Théorie du contact**

La théorie du contact a été largement documentée dans la littérature [23]. Elle traite du contact non conforme entre deux solides au voisinage de la région de contact. Elle décrit la forme de la zone de contact, la distribution des pressions, les composantes des déformations et des contraintes dans les deux corps [23].

La théorie du contact est soumise à un certain nombre d'hypothèses :

- Les surfaces des deux solides sont continues et non conformes. C'est-à-dire que leurs rayons de courbure sont différents.
- Les déformations sont petites à la vue des dimensions des solides.
- Les solides sont considérés comme des espaces semi-infinis élastiques et isotropes.
- Le frottement est négligé.

Dans le cas de deux solides de révolution, la surface de contact formée, sous l'application d'une charge normale  $F$ , est circulaire et de rayon  $a$  (figure 1.11).

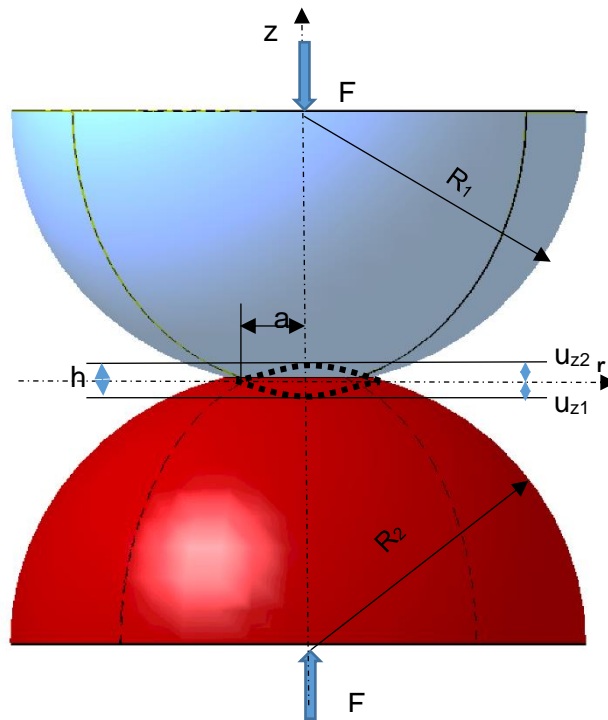


Figure 1. 11 : Représentation de la déformation de deux sphères soumises à une force F

Ainsi, en coordonnées cylindriques classiques, le déplacement normal dans cette zone de contact est tel que :

$$u_{z1} + u_{z2} = h - \frac{1}{2R}r^2 \quad (6)$$

Avec  $R$  le rayon équivalent avec  $\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$ ,  $a$  le rayon de la surface de contact et  $h$  le déplacement normal selon l'axe de symétrie  $Z$ .

Le champ de pression compatible avec ce profil de déplacement est donné par

$$P(r) = P_0 \left(1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2\right)^{1/2} \quad (7)$$

Avec  $P_0$  la pression maximale de contact

Les paramètres essentiels du problème qui sont la pression maximale, le rayon de la surface de contact et le rapprochement relatif des deux solides sont donnés par les relations :

$$P_0 = \left( \frac{6 \cdot F \cdot E^{*2}}{\pi^3 \cdot R^2} \right)^{1/3} \quad (8)$$

$$a = \left( \frac{3 \cdot F \cdot R}{4 \cdot E^*} \right)^{1/3} \quad (9)$$

$$h = \frac{a^2}{R} = \left( \frac{9 \cdot F^2}{16 \cdot R \cdot E^{*2}} \right)^{1/3} \quad (10)$$

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i} \quad (11)$$

Où  $E^*$  est le module d'Young réduit équivalent et  $E, \nu, E_i$  et  $\nu_i$  sont respectivement le module d'Young et coefficient de poisson du matériau et du pénétrateur.

On considère, au cours du déchargement, la présence d'une déformation élastique (zone de retour élastique). La pente  $S$  de la courbe du début du déchargement peut se déduire de la relation (10) :

$$S = \frac{\partial F}{\partial h} = 2 \cdot a \cdot E^* = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot E^* \cdot \sqrt{A_c} \quad (12)$$

La pente de la courbe du début de déchargement se déduisant de la courbe d'indentation, on peut calculer le module d'Young réduit équivalent (13). Connaissant les caractéristiques du pénétrateur et en postulant le coefficient de poisson du matériau indenté, le module d'Young est connu (14)

$$E^* = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{S}{\sqrt{A_c}} \quad (13)$$

$$E = (1 - \nu^2) \cdot \left[ \frac{1}{E^*} - \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \right]^{-1} \quad (14)$$

L'utilisation d'un indenteur très dur (diamant, saphir) permet de simplifier la relation précédente. En effet, en considérant que le module d'Young du pénétrateur est très grand devant celui de notre matériau, l'équation 14 se réduit à la relation suivante.

$$E = (1 - \nu^2) \cdot E^* \quad (15)$$

### 1.3.4. Analyse des courbes d'indentation instrumentée

#### 1.3.4.1. Méthode de Doerner et Nix

Lors d'un essai d'indentation pour un matériau élasto-plastique, le déplacement du pénétrateur  $h$  après contact est composé d'une déformation élastique et d'une déformation plastique. La déformation plastique, pour une charge donnée, correspond alors à la différence du déplacement total par la déformation élastique.

$$h_r = h_{max} - h_e \quad (16)$$

Avec  $h_r$  la pénétration résiduelle ou plastique,  $h_e$  la pénétration élastique et  $h_{max}$  la pénétration maximale (figure 1.9).

Doerner et Nix [28] ont observé, d'après les courbes expérimentales, que la courbe de décharge est linéaire. Ils ont donc supposé que le comportement élastique du contact entre le pénétrateur et le matériau à caractériser est similaire à celui du contact entre un indenteur de type cylindrique et un espace semi-infini pendant le déchargement (figure 1.12).

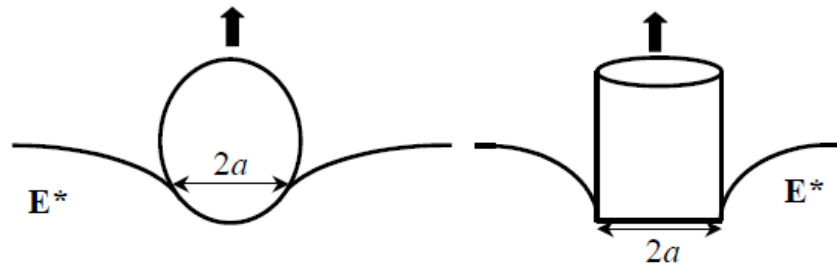


Figure 1. 12 : Assimilation d'un indenteur sphérique à un indenteur plat de même rayon de contact a par Doerner et Nix

Le fait que le pénétrateur est assimilable à un cylindre lors de la décharge permet de déterminer la profondeur de contact  $h_p$  en considérant la tangente à la courbe de décharge (figure 1.13).

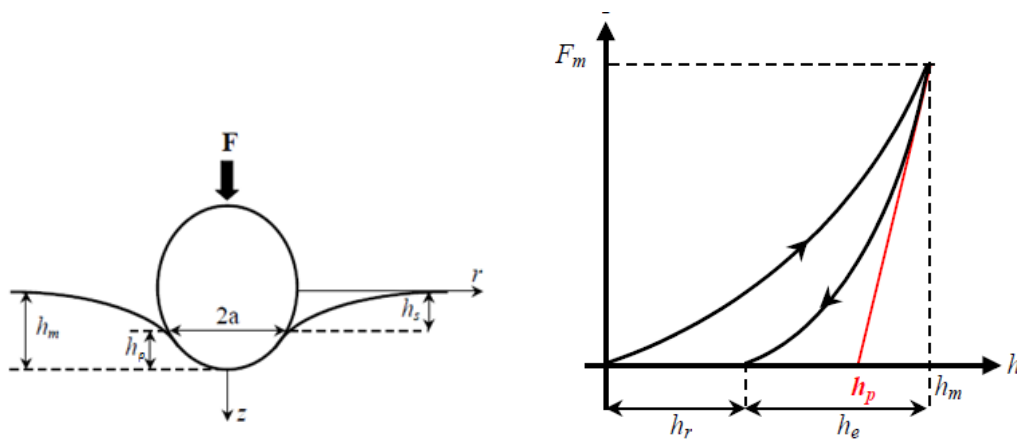


Figure 1. 13 : Représentation schématique des différentes profondeurs en fin de chargement et identification de  $h_p$  sur la courbe d'indentation

Il est alors possible de déterminer le module d'Young en tenant compte de la déflexion du matériau estimé par le calcul de la profondeur de contact  $h_p$  durant le début du déchargement de l'essai.

Parfaitement adaptée pour des matériaux soit élasto-plastiques ou purement élastiques, cette méthode montre ses limites pour les matériaux écrouissables ou visco-élasto-plastiques.

#### 1.3.4.2. Méthode d'Oliver et Pharr

La méthode d'Oliver et Pharr est la plus utilisée pour caractériser un matériau en nano-indentation. Oliver et Pharr [29] ont montré que les courbes des indentations sont rarement linéaires au début du déchargement. Pour prendre en compte l'influence de la forme du pénétrateur Olivier et Pharr ont proposé la formulation paramétrée suivante :

$$F = \alpha(h - h_r)^m \quad (17)$$

Où  $F$  est la charge instantanée,  $h$  la profondeur d'indentation,  $\alpha$  et  $m$  sont des constantes qui sont, respectivement, propres aux matériaux et à la géométrie du pénétrateur et  $h_r$  la profondeur résiduelle.

On exprime alors la raideur de contact par

$$S = \left( \frac{\partial F}{\partial h} \right)_{h=h_{max}} = \alpha \cdot m (h_{max} - h_r)^{m-1} \quad (18)$$

Tout comme Doerner et Nix, Oliver et Pharr ont supposé que le début de déchargement de la courbe d'indentation est purement élastique, ce qui leur permet d'écrire la relation suivante :

$$h_p = h_{max} - \varepsilon \cdot \frac{F_{max}}{S} \quad (19)$$

Avec

$$h_s = \varepsilon \cdot \frac{F_{max}}{S} \quad (20)$$

Ici  $\varepsilon$  est fonction de la géométrie. Pour un cône  $\varepsilon = \frac{2}{\pi} (\pi - 2)$ , pour une sphère  $\varepsilon = 0,75$  et pour un poinçon plat  $\varepsilon = 1$ . On obtient aisément les différentes équations de la surface de contact pour différentes géométries de pénétrateurs :

- $A_c = 24.5 h_p^2$  pour un indenteur Berkovich parfait (indéformable)
- $A_c = \pi a^2 = \pi(2Rh_p - h_p^2)$  pour un indenteur sphérique parfait (indéformable)

Une fois l'aire de contact définie, la caractérisation du matériau (par la détermination de son module d'Young) est obtenue par la relation (14).



La méthode d'Oliver and Pharr est résumée sous la forme d'un logigramme (figure 1.14) et reprend les éléments énoncés précédemment.

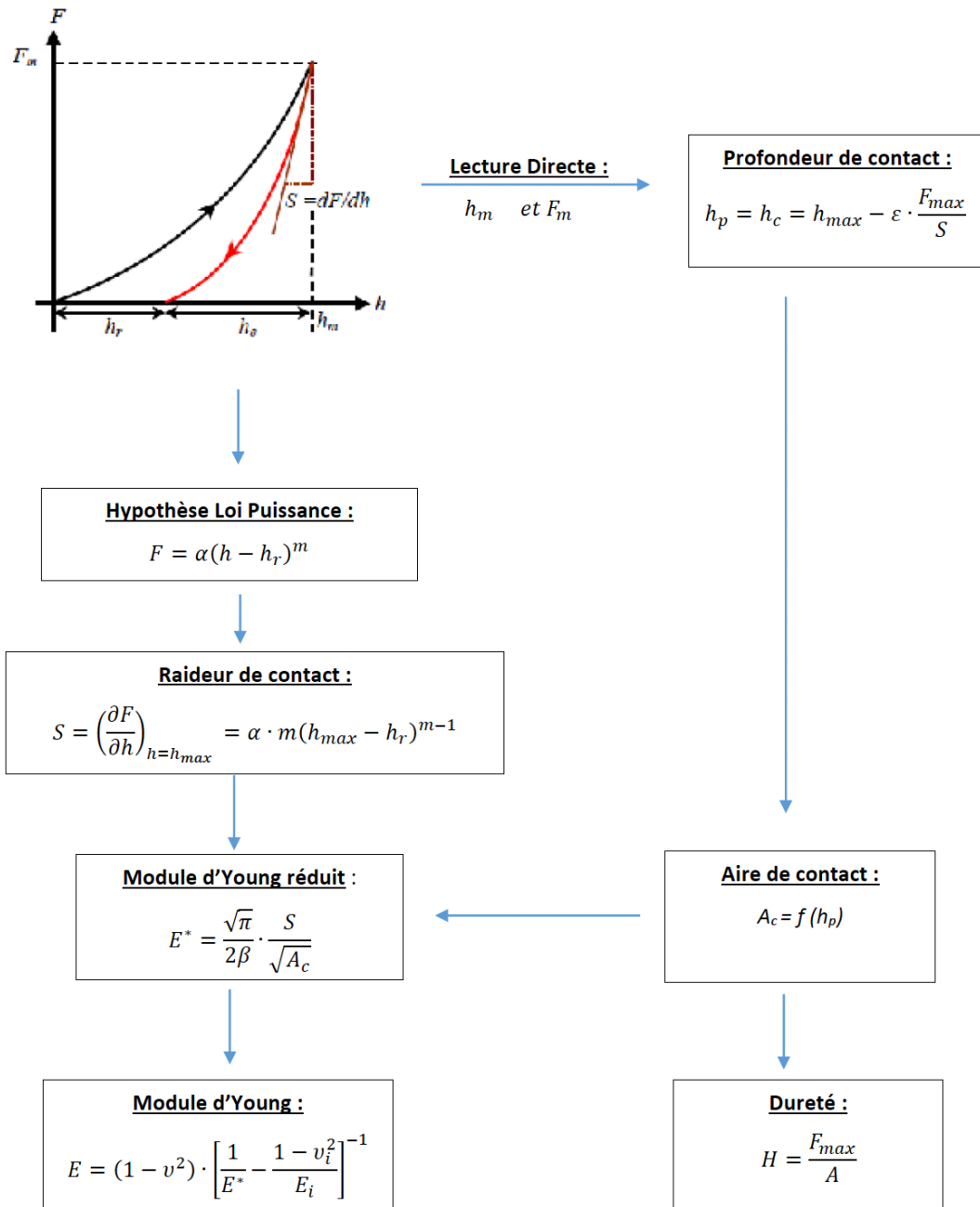


Figure 1. 14 : Description de la méthode d'Oliver & Pharr

#### **1.3.4.3. Limitation de la méthode d'Oliver and Pharr**

Le tissu s'asséchant rapidement, il est nécessaire de réaliser les essais d'indentation en milieu liquide. Pour réaliser cet essai en immersion totale, une force de pré chargement est nécessaire. Cette force est plus importante en milieu liquide qu'en milieu sec. Elle déclenche le début de la mesure de la pénétration et introduit une erreur dans la détermination du point de contact et par conséquent des erreurs dans le calcul des différentes hauteurs de pénétration nécessaires à la méthode d'Oliver and Pharr [30].

Pour mesurer le module d'Young du myocarde, des coupes cytologiques d'épaisseur de 100  $\mu\text{m}$  sont réalisées (chapitre 2). Pour appréhender les caractéristiques mécaniques des échantillons à faible épaisseurs il est nécessaire d'adapter la force d'indentation afin d'éviter une pénétration trop importante aboutissant à la prise en compte du substrat (plaque de verre).

Ainsi, pour la détermination du module d'élasticité, nous avons développé une méthode issue de la théorie de Hertz (chapitre 2) qui s'appuie sur l'analyse du début de la courbe d'indentation. Cette méthode d'analyse, à faible charge, évite les possibles effets du substrat et est insensible à l'approximation du point de contact.

## **1.4. Synthèse**

### **1.4.1. Discussion**

L'utilisation de la nanoindentation pour la caractérisation des tissus biologiques a été principalement limitée aux matériaux relativement rigides tels que la dentine Cuy et al. [31] ; Finke et al. [32] [33] ; Habelitz et al. [34], des os Bembey et al. [35] ; Haque [36] ; Rho et al. [37] ; Roy et al. [38] ou du cartilage Ebenstein et al. [39] ; Franke et al. [40] ; Li et al. [41]. Ces limitations étaient dues aux limites des machines liées aux plages de force et de profondeur mesurables. Les évolutions technologiques ont permis l'étude des tissus biologiques mous Constantinides et al. [42] ; Ebenstein et al. [43] à partir de pénétrateurs sphériques. La théorie du contact utilisée pour analyser une courbe d'indentation instrumentée permet d'appréhender les caractéristiques mécaniques d'un matériau (relations développées par Hertz). Dans ce chapitre, nous avons analysé la stratégie de caractérisation mécanique à partir de la phase de déchargement de la courbe d'indentation instrumentée : la méthode d'Oliver et Pharr. Au-delà de l'application à des matériaux classiques, la méthodologie d'Oliver et Pharr a déjà été utilisée pour appréhender les propriétés mécaniques de matériaux biologiques relativement rigides tels que la dentine [44] les os [36]–[38], [45] ou le cartilage [39]. Au regard des limitations constatées de cette méthode pour des matériaux mous, de petites épaisseurs et sensibles à la déshydratation, il est pertinent de s'intéresser à la courbe de chargement [16] pour mesurer les caractéristiques mécaniques du tissu cardiaque.

### **1.4.2. Conclusion**

Les dispositifs de test d'indentation instrumentée montrent un potentiel prometteur pour la caractérisation mécanique de matériaux mous compte tenu de leur structure. Les machines classiques de micro / macro-indentation (Barnes et al. [46] ; Kendall et al. [47]) ont démontré des capacités fiables afin d'acquérir des données expérimentales significatives pour de tels matériaux. La microstructure fibreuse du muscle strié et particulièrement du muscle cardiaque oriente le choix du système de caractérisation des propriétés mécaniques vers la nanoindentation instrumentée à pointe sphérique.

## 1.5. Table des figures

<u>FIGURE 1. 1 : ORGANISATION DU MYOCARDE A) SUIVANT LE CONCEPT DE PAQUETS DE FIBRES JUXTAPOSE ET B) SUIVANT L'ENROULEMENT D'UNE BANDE MUSCULAIRE A) ISSU DE REVIEW THE ANATOMICAL ARRANGEMENT OF THE MYOCARDIAL CELLS MAKING UP THE VENTRICULAR MASS B) ISSU DE UNISCIEL (CC BY-NC-ND 3.0) PAR FRANCIS CANON UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE</u> .....	20
<u>FIGURE 1. 2 : SCHEMA DE L'ORGANISATION MICROSTRUCTURALE DU MUSCLE CARDIAQUE</u> .....	20
<u>FIGURE 1. 3 : REPRESENTATION D'UNE MYOFIBRILLE ET DES COUPES TRANSVERSALES ET LONGITUDINALES</u> .....	21
<u>FIGURE 1. 4 : IMAGE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE L'ORGANISATION TISSULAIRE CARDIAQUE PORCIN COMPOSEE DE FIBRES MUSCULAIRES ET DE MATRICE EXTRACELLULAIRE (IJL 2019)</u> .....	22
<u>FIGURE 1. 5 : CYCLE CARDIAQUE VENTRICULAIRE GAUCHE (PRESSION-VOLUME) D'UN CŒUR PORCIN AVEC UNE BOUCLE ROUGE REPRESENTANT LA BOUCLE P-V EXPERIMENTALE ET LA BOUCLE NOIRE REPRESENTANT UNE BOUCLE P-V THEORIQUE</u> .....	23
<u>FIGURE 1. 6 : MODELE FONCTIONNEL A TROIS ELEMENTS DE HILL DU MUSCLE CARDIAQUE</u> .....	25
<u>FIGURE 1. 7 : MODELES FONCTIONNELS DE HILL DU MUSCLE CARDIAQUE (A) MODELE SIMPLE AVEC UN ELEMENT CONTRACTILE ET UN ELEMENT ELASTIQUE EN SERIE, (B) ADDITION D'UN ELEMENT ELASTIQUE PARALLELE ET (C) ADDITION D'UN ELEMENT ELASTIQUE EN SERIE</u> .....	26
<u>FIGURE 1. 8 : MODELE MICROMORPHE SANS MICRO-ROTATION : MODELE A MICRO-DILATION</u> .....	27
<u>FIGURE 1. 9 : DEFINITION DE LA RAIDEUR DE CONTACT D'OLIVER &amp; PHARR</u> .....	29
<u>FIGURE 1. 10 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES GEOMETRIES DES PENETRATEURS ET DE LEURS EMPREINTES ASSOCIEES COURAMMENT UTILISEES EN INDENTATION</u> .....	30
<u>FIGURE 1. 11 : REPRESENTATION DE LA DEFORMATION DE DEUX SPHERES SOUMISES A UNE FORCE F</u> .....	33
<u>FIGURE 1. 12 : ASSIMILATION D'UN INDENTEUR SPHERIQUE A UN INDENTEUR PLAT DE MEME RAYON DE CONTACT A PAR DOERNER ET NIX</u> .....	36
<u>FIGURE 1. 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES PROFONDEURS EN FIN DE CHARGEMENT ET IDENTIFICATION DE HP SUR LA COURBE D'INDENTATION</u> .....	36
<u>FIGURE 1. 14 : DESCRIPTION DE LA METHODE D'OLIVER &amp; PHARR</u> .....	39

## 1.6. Bibliographie

- [1] Y. Fung, *Biomechanics [Texte imprimé]: mechanical properties of living tissues*. New York : Springer-Verlag. 1993., 1993.
- [2] J.-P. Jehl et R. K. Njiwa, « A (Constrained) Microstretch Approach in Living Tissue Modeling: a Numerical Investigation Using the Local Point Interpolation - Boundary Element Method », *CMES-Comput. Model. Eng. Sci.*, vol. 102, n° 5, SI, p. 345-358, déc. 2014.
- [3] K. T. Weber, Y. Sun, S. C. Tyagi, et J. P. M. Cleutjens, « Collagen Network of the Myocardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 26, n° 3, p. 279-292, mars 1994, doi: 10.1006/jmcc.1994.1036.
- [4] R. H. Anderson, S. Y. Ho, K. Redmann, D. Sanchez-Quintana, et P. P. Lunkenheimer, « The anatomical arrangement of the myocardial cells making up the ventricular mass », *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 28, n° 4, p. 517-525, oct. 2005, doi: 10.1016/j.ejcts.2005.06.043.
- [5] L. Espira et M. P. Czubyrt, « Emerging concepts in cardiac matrix biology », *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 87, n° 12, p. 996-1008, déc. 2009.
- [6] P. P. Lunkenheimer *et al.*, « The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: a critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass », *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 29, n° Supplement\_1, p. S41-S49, avr. 2006, doi: 10.1016/j.ejcts.2006.02.062.
- [7] F. Torrent-Guasp *et al.*, « Towards new understanding of the heart structure and function », *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 27, n° 2, p. 191-201, févr. 2005, doi: 10.1016/j.ejcts.2004.11.026.
- [8] I. J. LeGrice, P. J. Hunter, et B. H. Smaill, « Laminar structure of the heart: a mathematical model », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 272, n° 5, p. H2466-H2476, mai 1997, doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2466.
- [9] P. P. Lunkenheimer *et al.*, « Three-dimensional architecture of the left ventricular myocardium », *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, vol. 288A, n° 6, p. 565-578, 2006, doi: 10.1002/ar.a.20326.
- [10] S. Nielles-Vallespin *et al.*, « Assessment of Myocardial Microstructural Dynamics by In Vivo Diffusion Tensor Cardiac Magnetic Resonance », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 69, n° 6, p. 661-676, févr. 2017, doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.051.
- [11] N. Tran *et al.*, « Short-Term Heart Retention and Distribution of Intramyocardial Delivered Mesenchymal Cells within Necrotic or Intact Myocardium », *Cell Transplant.*, vol. 15, n° 4, p. 351-358, avr. 2006, doi: 10.3727/000000006783981918.
- [12] P. Maureira *et al.*, « Residual viability is a predictor of the perfusion enhancement obtained with the cell therapy of chronic myocardial infarction: a pilot multimodal imaging study », *Clin. Nucl. Med.*, vol. 37, n° 8, p. 738-742, août 2012, doi: 10.1097/RLU.0b013e318251e38a.

- [13] P. Maureira *et al.*, « Repairing chronic myocardial infarction with autologous mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling », *J. Biomed. Sci.*, vol. 19, n° 1, p. 93, 2012, doi: 10.1186/1423-0127-19-93.
- [14] G. A. Holzapfel et R. W. Ogden, « Constitutive modelling of passive myocardium: a structurally based framework for material characterization », *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 367, n° 1902, p. 3445-3475, sept. 2009, doi: 10.1098/rsta.2009.0091.
- [15] A. F. G. Godier-Furnémont *et al.*, « Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 19, p. 7974-7979, mai 2011, doi: 10.1073/pnas.1104619108.
- [16] J. J. Lemasters et R. G. Thurman, « Rinse solution for organs and tissues », 5145771, sept. 08, 1992.
- [17] N. Thurieau, J.-P. Jehl, R. K. Njiwa, N. Tran, et P. Maureira, « Modeling heart tissue as a micromorphic medium: a numerical investigation », *J. Mech. Med. Biol.*, vol. 17, n° 05, p. 1750078, juill. 2017, doi: 10.1142/S0219519417500786.
- [18] Z. Gao, K. Lister, et J. P. Desai, « Constitutive Modeling of Liver Tissue: Experiment and Theory », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, n° 2, p. 505, févr. 2010, doi: 10.1007/s10439-009-9812-0.
- [19] C. Chui, E. Kobayashi, X. Chen, T. Hisada, et I. Sakuma, « Combined compression and elongation experiments and non-linear modelling of liver tissue for surgical simulation », *MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING AND COMPUTING*, n° 6, p. 787, 2004.
- [20] W. Yao *et al.*, « Measuring the compressive viscoelastic mechanical properties of human cervical tissue using indentation », *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 34, p. 18-26, juin 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.016.
- [21] D. B. MacManus, M. D. Gilchrist, et J. G. Murphy, « An empirical measure of nonlinear strain for soft tissue indentation », *R. Soc. OPEN Sci.*, vol. 4, n° 11, nov. 2017, doi: 10.1098/rsos.170894.
- [22] M. Oyen et D. Taylor, « Special issue on nanoindentation of biological materials », *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 2, n° 4, p. 311, août 2009, doi: 10.1016/j.jmbbm.2009.04.001.
- [23] H. HERTZ, « Über die Berührung fester elastischer Körper (Sur le contact entre corps élastiques) », *J. für reine und angewandte Mathematik*, vol. 92, 1881, p. 156-171.
- [24] I. N. Sneddon, « The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile », *Int. J. Eng. Sci.*, vol. 3, n° 3, p. 47, 19650101.
- [25] M. f. Doerner et W. d. Nix, « A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments », *J. Mater. Res.*, vol. 1, n° 4, p. 601, 08/01/1986 1986.
- [26] S. I. Bulychev, V. P. Alekhin, M. K. Shorshorov, A. P. Ternovskij, et G. D. Shnyrev, « Determination of Young modulus by the hardness indentation diagram », *Zavod. Lab.*, vol. 41, n° 9, p. 1137-1140, 1975.

- [27] W. Oliver et G. Pharr, « An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments », *J. Mater. Res.*, vol. 7, n° 6, p. 1564-1583, juin 1992.
- [28] M. F. Doerner et W. D. Nix, « A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments », *J. Mater. Res.*, vol. 1, n° 4, p. 601-609, août 1986, doi: 10.1557/JMR.1986.0601.
- [29] G. M. Pharr, W. C. Oliver, et F. R. Brotzen, « On the generality of the relationship among contact stiffness, contact area, and elastic modulus during indentation », *J. Mater. Res.*, vol. 7, n° 3, p. 613-617, mars 1992, doi: 10.1557/JMR.1992.0613.
- [30] A. Samani, J. Bishop, C. Luginbuhl, et D. B. Plewes, « Measuring the elastic modulus of ex vivo small tissue samples », *Phys. Med. Biol.*, vol. 48, n° 14, p. 2183–2198, juill. 2003, doi: 10.1088/0031-9155/48/14/310.
- [31] J. L. Cuy, A. B. Mann, K. J. Livi, M. F. Teaford, et T. P. Weihs, « Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel », *ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY*, n° 4, p. 281, 2002.
- [32] M. Finke, J. A. Hughes, D. M. Parker, et K. D. Jandt, « Mechanical properties of in situ demineralised human enamel measured by AFM nanoindentation », *SURFACE SCIENCE -AMSTERDAM-*, n° 3, p. 456, 2001.
- [33] J. Ge, F. Z. Cui, X. M. Wang, et H. L. Feng, « Property variations in the prism and the organic sheath within enamel by nanoindentation », *Biomaterials*, vol. 26, n° 16, p. 3333-3339, juin 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.059.
- [34] S. Habelitz, G. W. Marshall Jr, M. Balooch, et S. J. Marshall, « Nanoindentation and storage of teeth », *JOURNAL OF BIOMECHANICS*, n° 7, p. 995, 2002.
- [35] A. K. Bembey, M. L. Oyen, A. J. Bushby, et A. Boyde, « Viscoelastic properties of bone as a function of hydration state determined by nanoindentation », *Philos. Mag.*, vol. 86, n° 33-35, p. 5691-5703, nov. 2006, doi: 10.1080/14786430600660864.
- [36] F. Haque, « Application of Nanoindentation Development of Biomedical to Materials », *Surf. Eng.*, vol. 19, n° 4, p. 255-268, août 2003, doi: 10.1179/026708403322499173.
- [37] J.-Y. Rho, T. Y. Tsui, et G. M. Pharr, « Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation », *Biomaterials*, vol. 18, n° 20, p. 1325-1330, oct. 1997, doi: 10.1016/S0142-9612(97)00073-2.
- [38] M. E. Roy, J.-Y. Rho, T. Y. Tsui, N. D. Evans, et G. M. Pharr, « Mechanical and morphological variation of the human lumbar vertebral cortical and trabecular bone », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 44, n° 2, p. 191-197, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199902)44:2<191::AID-JBM9>3.0.CO;2-G.
- [39] D. M. Ebenstein, A. Kuo, J. J. Rodrigo, A. H. Reddi, M. Ries, et L. Pruitt, « A nanoindentation technique for functional evaluation of cartilage repair tissue », *J. Mater. Res.*, vol. 19, n° 1, p. 273-281, janv. 2004, doi: 10.1557/jmr.2004.19.1.273.
- [40] O. Franke, M. Göken, M. A. Meyers, K. Durst, et A. M. Hodge, « Dynamic nanoindentation of articular porcine cartilage », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, n° 4, p. 789-795, mai 2011, doi: 10.1016/j.msec.2010.12.005.

- [41] C. Li, L. A. Pruitt, et K. B. King, « Nanoindentation differentiates tissue-scale functional properties of native articular cartilage », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 78A, n° 4, p. 729-738, 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30751.
- [42] G. Constantinides, Z. I. Kalcioğlu, M. McFarland, J. F. Smith, et K. J. Van Vliet, « Probing mechanical properties of fully hydrated gels and biological tissues », *J. Biomech.*, vol. 41, n° 15, p. 3285-3289, nov. 2008, doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.08.015.
- [43] D. M. Ebenstein et L. A. Pruitt, « Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 69A, n° 2, p. 222-232, 2004, doi: 10.1002/jbm.a.20096.
- [44] J. L. Cuy, A. B. Mann, K. J. Livi, M. F. Teaford, et T. P. Weihs, « Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel », *Arch. Oral Biol.*, vol. 47, n° 4, p. 281-291, avr. 2002, doi: 10.1016/S0003-9969(02)00006-7.
- [45] J.-Y. Rho, M. E. Roy, T. Y. Tsui, et G. M. Pharr, « Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, n° 1, p. 48-54, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199904)45:1<48::AID-JBM7>3.0.CO;2-5.
- [46] S. I. Barnes, A. Lyshchik, M. k. Washington, J. c. Gore, et M. i. Miga, « Development of a mechanical testing assay for fibrotic murine liver », *MEDICAL PHYSICS - LANCASTER PA-*, n° 11, p. 4439, 2007.
- [47] M. A. Kendall, Y. F. Chong, et A. Cock, « The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery », *BIOMATERIALS - GUILDFORD-*, n° 33, p. 4968, 2007.



## Chapitre 2

### Protocole expérimental d'indentation en milieu liquide du tissu cardiaque



# Table des matières

<b>2</b>	<b>PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'INDENTATION EN MILIEU LIQUIDE DU TISSU CARDIAQUE .....</b>	<b>51</b>
2.1	INDENTATION INSTRUMENTEE .....	51
2.1.1	<i>Introduction</i> :.....	51
2.1.2	<i>Indentation instrumentée en milieu liquide</i> .....	51
2.1.2.1	Adaptation du système d'indentation au milieu liquide .....	51
2.1.2.2	Forces induites au milieu liquide .....	52
2.1.2.3	Analyse des courbes expérimentales en milieu liquide par la méthode d'Oliver and Pharr .....	54
2.2	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'ANALYSE DES COURBES EXPERIMENTALES EN MILIEU LIQUIDE .....	56
2.2.1	<i>Analyse des courbes expérimentales en milieu liquide pour un poinçon sphérique par la relation de Hertz</i> 56	
2.2.2	<i>Optimisation de la relation de Hertz pour le tissu cardiaque : modèle HERTZ-2D</i> .....	60
2.2.3	<i>Limitations du modèle HERTZ-2D</i> :.....	62
2.2.3.1	Etude de la saturation des courbes d'indentations du tissu cardiaque :.....	62
2.2.3.2	Etude de l'état de surface des échantillons indentés (coupe cytologique) : .....	66
2.3	INDENTATION DU TISSU CARDIAQUE.....	68
2.3.1	<i>Préparation des échantillons du tissu cardiaque</i> :.....	68
2.3.2	<i>Stratégie d'une campagne d'indentation instrumentée</i> .....	69
2.4	SYNTHESE.....	70
2.4.1	<i>Discussion</i> .....	70
2.4.2	<i>Conclusion</i> .....	70
2.5	TABLE DES FIGURES : .....	71
2.6	TABLE DES TABLEAUX : .....	72
2.7	BIBLIOGRAPHIE.....	73



# Protocole expérimental d'indentation en milieu liquide du tissu cardiaque

## **2.1 Indentation instrumentée**

### **2.1.1 Introduction :**

Les systèmes de type nanoindentation permettent de réduire de façon significative les dimensions des zones explorées à la fois par (i) la gamme des forces appliquées, (ii) la gamme des déformations mesurées et par (iii) la géométrie des pointes utilisées. Ils permettent ainsi une mesure locale des propriétés du tissu [1], [2].

Cependant, interpréter la relation force-pénétration du matériau testé à partir des données expérimentales n'est pas aussi simple que pour les tests uni-axiaux traditionnels en raison du champ de déformation non homogène induit par la pénétration du poinçon. Pour notre travail, un poinçon sphérique a été choisi pour diminuer les concentrations de contraintes pouvant provoquer des déformations non élastiques des matériaux mous (déchirures). L'analyse de la phase de chargement des courbes d'indentations instrumentées a été réalisée à partir de la théorie de Hertz [3]. Un environnement liquide a été mis en place pour éviter l'assèchement du tissu biologique [4].

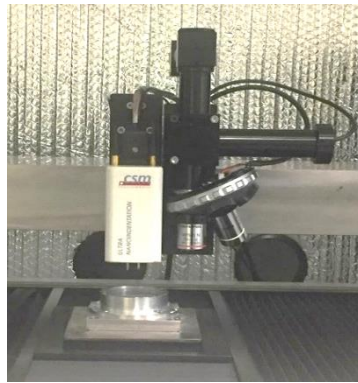
### **2.1.2 Indentation instrumentée en milieu liquide**

#### ***2.1.2.1 Adaptation du système d'indentation au milieu liquide***

Le matériel utilisé est un ultra nanoindenteur de la société ANTON-PAAR (anciennement CSM-Instrument) localisée à Peseux en Suisse (figure 2.1). Ce système permet de travailler dans une gamme de profondeur de pénétration variant de quelques nanomètres à 100  $\mu\text{m}$  et

dans une gamme de charge de 10  $\mu\text{N}$  à 100 mN. La résolution en profondeur est de 0.01 nm et celle en force est de 0.01  $\mu\text{N}$ .

Des adaptations ont été apportées au dispositif pour permettre la réalisation d'essais sur des tissus biologiques en milieu liquide. Il s'agit de l'utilisation de pénétrateurs et de références longs et de la réalisation d'un porte échantillon adapté aux lames supports des coupes histologiques immergés (figure 2.1).



*Figure 2. 1: ultra-nano indenteur Anton Paar équipé d'un indenteur long, de sa référence et d'un réservoir pour fixer et immerger les coupes histologiques*

### **2.1.2.2 Forces induites au milieu liquide**

L'échantillon ex-vivo de tissu cardiaque nécessite d'être immergé pour éviter un assèchement et une détérioration de ses caractéristiques mécaniques. Il est ainsi nécessaire de définir l'influence de ce milieu sur la mesure.

En effet, il est connu que la traversée d'un milieu liquide modifie de façon significative la courbe d'indentation (figure 2.2) [5].

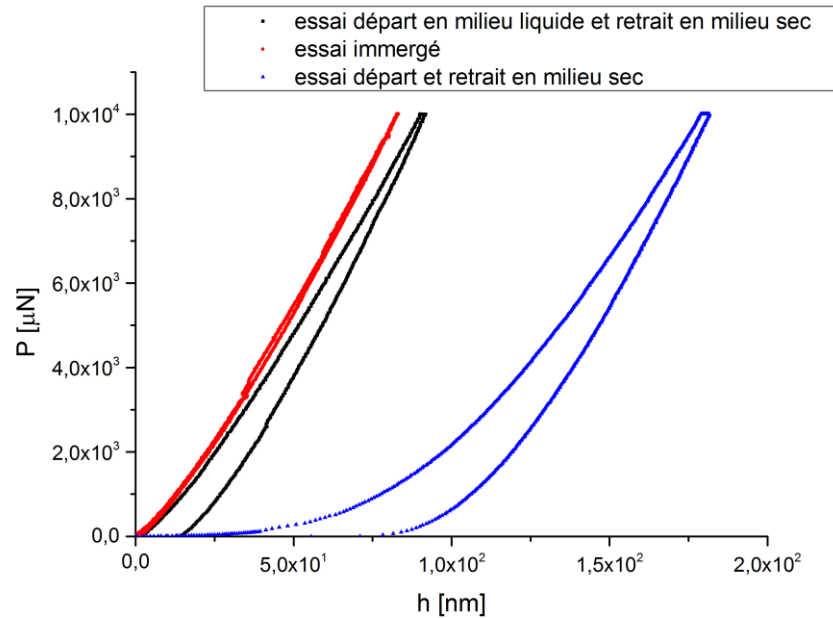


Figure 2. 2 : Courbes d'indentations instrumentées d'un échantillon de Si (verre de silice) indenté en immersion totale (en rouge), avec une fin d'essai en milieu sec (en noir) et avec un début et une fin d'essai en milieu sec (en bleu)

L'échantillon de verre de silice, à ce niveau de chargement, ne se déforme qu'élastiquement. Seule la configuration de l'essai immergé du début à la fin donne une courbe conforme à ce type de déformation (courbe rouge de la figure 2.2). Ainsi, pour réaliser des essais d'indentations instrumentées en milieu liquide, il est nécessaire d'effectuer les expérimentations en immersion complète pour éviter la prise en compte des forces de tension superficielle au chargement et au déchargement qui sont non négligeables dans notre cas.

### 2.1.2.3 Analyse des courbes expérimentales en milieu liquide par la méthode d'Oliver and Pharr

Le développement de la méthode d'analyse des essais d'indentations en milieu liquide est réalisé à l'aide d'un échantillon de référence de la société Anton Paar en verre de silice dont les caractéristiques mécaniques sont connues (module d'Young de 75 GPa et coefficient de poisson de 0,16). Cet échantillon a été indenté successivement en milieu sec et en milieu liquide. L'analyse graphique des courbes d'indentations et plus particulièrement des phases de chargement montre une différence dans la détection du point de contact (figure 2.3).

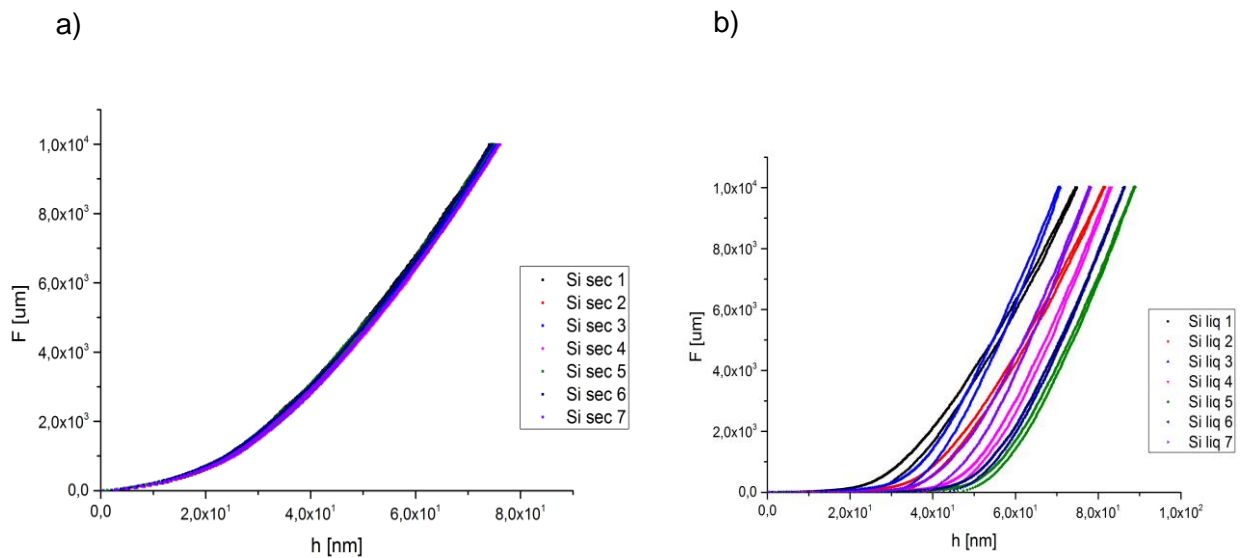


Figure 2. 3 : Courbes d'indentations instrumentées d'un échantillon de référence (Si) réalisées a) en milieu sec et b) en milieu liquide

Spécifiquement, le point de contact détermine le début de l'essai d'indentation et contribue à la détermination des hauteurs de pénétration  $h_{\text{max}}$  et  $h_r$  nécessaires pour la caractérisation des échantillons par la méthode d'Oliver & Pharr (chapitre 1) [6].



La réalisation de l'essai d'indentation en milieu liquide revient à ajouter un troisième corps dans l'expérimentation indenteur/échantillon vs indenteur/eau/échantillon. Ce troisième corps induit des variations de détection du point de contact. Ces variations rendent non fiable la caractérisation des échantillons en milieu liquide par la méthode classique d'Oliver & Pharr (tableau 2.1).

<i>Caractérisation</i>	Milieu sec	Milieu liquide (eau distillée à température ambiante)
Hauteur maximum (h max)	130 nm	140 nm
Déviat ion standard h max	2,4 nm	9,1 nm
Module d'Young réduit E*	78 GPa	75 GPa
Déviat ion standard E*	1,5 GPa	4,6 GPa

*Tableau 2. 1 : Caractérisation d'étalon de verre de silice en milieu sec et liquide*

Bien que performante pour les matériaux métalliques et cristallins (matériaux élasto-plastiques) en milieu sec, la méthode d'Oliver and Pharr montre des limites en terme de reproductibilité en milieu liquide. Il convient alors de développer une méthode insensible à la détection du point de contact pour analyser les courbes d'indentations en milieu liquide.

## 2.2 Développement de la méthode d'analyse des courbes expérimentales en milieu liquide

### 2.2.1 Analyse des courbes expérimentales en milieu liquide pour un poinçon sphérique par la relation de Hertz

L'analyse graphique des courbes d'indentations en milieu sec et liquide de la phase de chargement démontre une différence dans la détection du point de contact (figure 2.3).

Une solution consiste à développer une nouvelle méthodologie basée sur la relation connue sous la dénomination « relation de Hertz » [3], présentée chapitre 1.3.3, traduisant le contact élastique entre deux corps de révolution (figure 2.4).

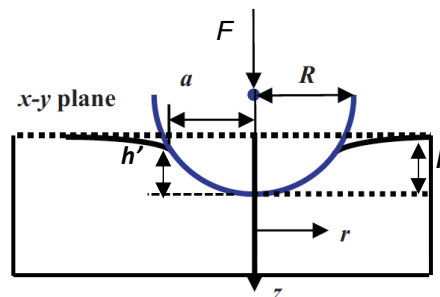


Figure 2.4 : Représentation schématique du contact entre la pointe sphérique et un échantillon

L'objectif de ce développement est de mettre au point une méthode permettant de calculer les caractéristiques mécaniques d'un échantillon en milieu liquide. La stratégie adoptée consiste à déterminer la partie (domaine de caractérisation) la plus grande possible de la courbe de chargement pour laquelle la relation de Hertz (1) ci-dessous est valable.

$$h^3 = \left( \frac{9.F^2}{16.R.E^{*2}} \right) \quad (1)$$

Pour rappel, cette relation,  $F$  désigne la force appliquée,  $h$  le rapprochement relatif des deux corps,  $R$  le rayon de courbure du poinçon et  $E^*$  le module de Young réduit de l'échantillon. En

prenant le logarithme des deux membres de la relation (1), on obtient la relation (2) ci-après qui établit une relation affine entre le logarithme de F et celui de h. Le module d'élasticité réduit est contenu dans l'ordonnée à l'origine de la relation (2) qu'une régression linéaire appliquée aux données expérimentales permet d'évaluer. Notons ici que le coefficient directeur de cette relation affine est constant égal à 3/2.

$$\ln(F) = \frac{3 \cdot \ln(h)}{2} + \frac{1}{2} \ln\left(\frac{16 \cdot R \cdot E^{*2}}{9}\right) \quad (2)$$

Les courbes sur la figure 2.5 montrent des exemples de régression linéaire effectués en milieu sec et humide.

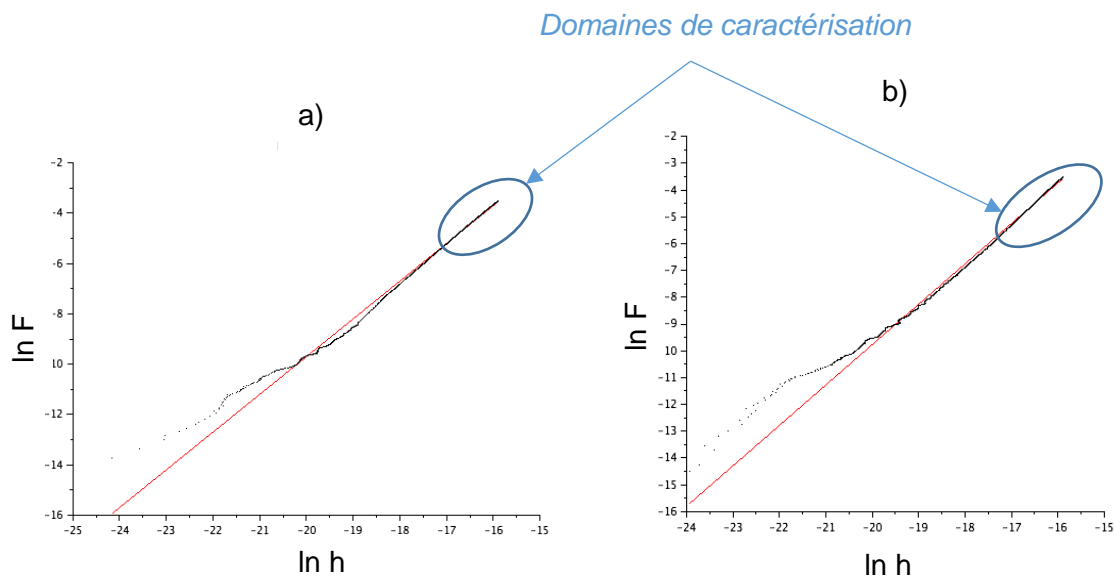


Figure 2. 5 : Régression linéaire de la formulation logarithmique de la relation de hertz appliquée aux indentations de l'échantillon de référence de verre de silice a) en milieu liquide et b) en milieu sec

Si on note b la pente à l'origine, le module de Young réduit est donné par la relation (3) :

$$E^* = \frac{3 \cdot e^b}{4 \cdot R^{0.5}} \quad (3)$$

La stratégie appliquée en milieu liquide et en milieu sec a conduit aux grandeurs consignées dans le tableau 2.2.

<b>Caractérisation</b>	<b>Hertz Milieu sec</b>	<b>Hertz Milieu liquide</b>
Coefficient directeur	1,494	1,499
Pente à l'origine	-0,40	-0,33
Module d'Young réduit E*	76,1 GPa	75,5 GPa
Déviatation standard E*	1,23 GPa	1,14 GPa

*Tableau 2. 2 : Résultats de la caractérisation par la relation de Hertz de l'échantillon de référence de verre de silice à partir du chargement de la courbe d'indentation en milieux sec et liquide.*

Ces premiers résultats élargissent l'applicabilité de la nanoindentation [7] à un environnement liquide [1], [8]. La méthode développée issue de la théorie de Hertz est présentée sous la forme d'un logigramme (figure 2.6).

La méthode d'analyse des courbes expérimentales en milieu liquide est résumée sous la forme d'un logigramme (figure 2.6) et reprend les éléments énoncés précédemment.

Protocole d'analyse des courbes expérimentales en milieu

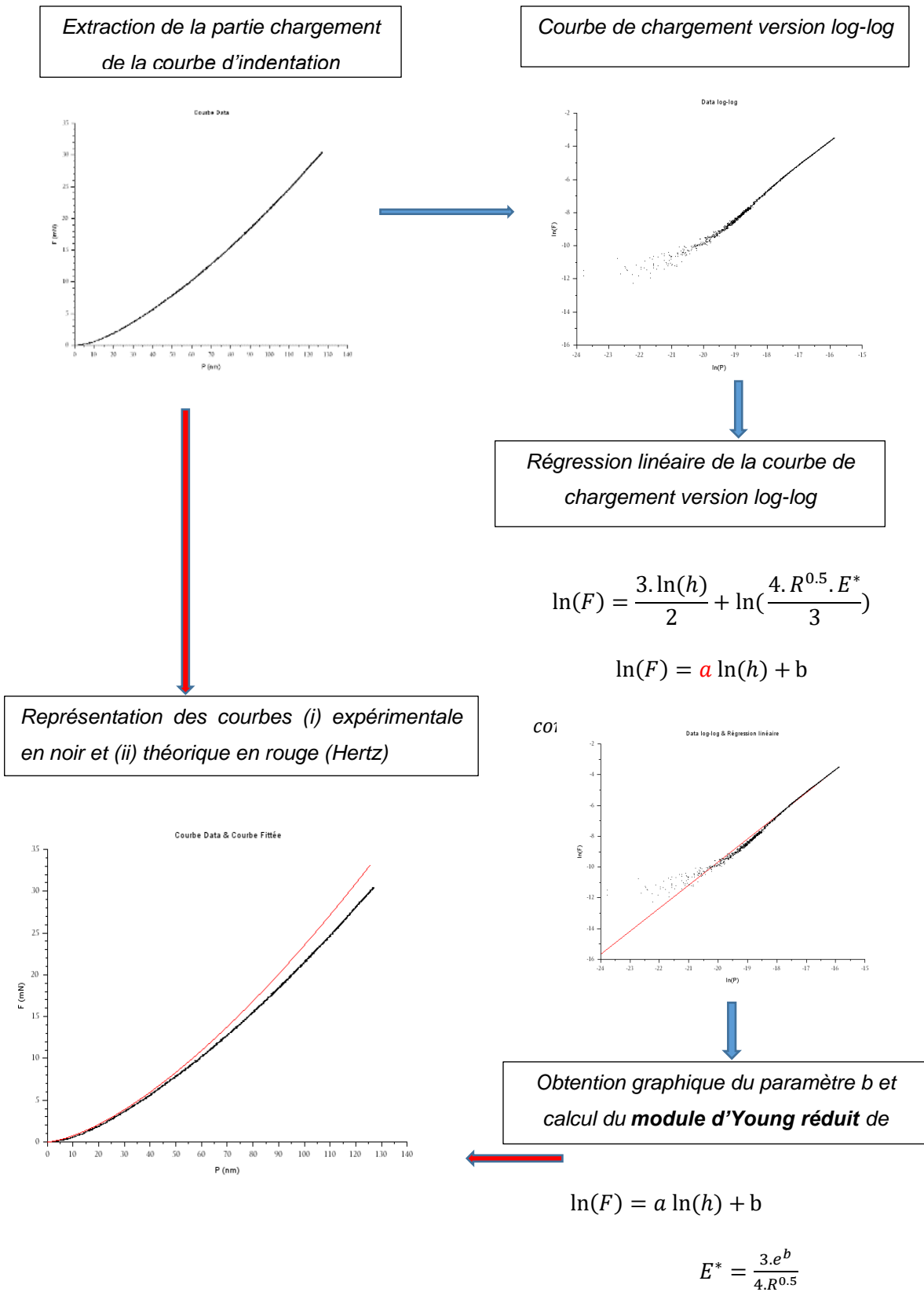


Figure 2. 6 : Description de la méthode issue de la théorie de Hertz à partir d'une indentation d'un échantillon étalon de verre de silice

## 2.2.2 Optimisation de la relation de Hertz pour le tissu cardiaque : modèle HERTZ-2D

Rappelons que lorsqu'une charge  $F$  est appliquée à un indenteur sphérique, son déplacement  $h$  dans le demi-espace du tissu cardiaque produit un cercle de contact à la surface de rayon  $r$ , comme indiqué sur la figure 2.4. Les études habituelles utilisant la relation de Hertz tirent parti de l'approximation au premier ordre du développement de Taylor de la fonction sphérique (4).

$$f(r) = (R - \sqrt{R^2 - r^2}) \quad (4)$$

Une telle approximation entraîne un écart à partir d'une profondeur indentée des tissus cardiaques équivalente à  $h/R > 5\%$ . La limite du domaine de validité de la relation de Hertz se limite à  $5 \mu\text{m}$ . Ce domaine, où les données expérimentales et la relation de Hertz se superposent, peut être visualisé figure 2.7.

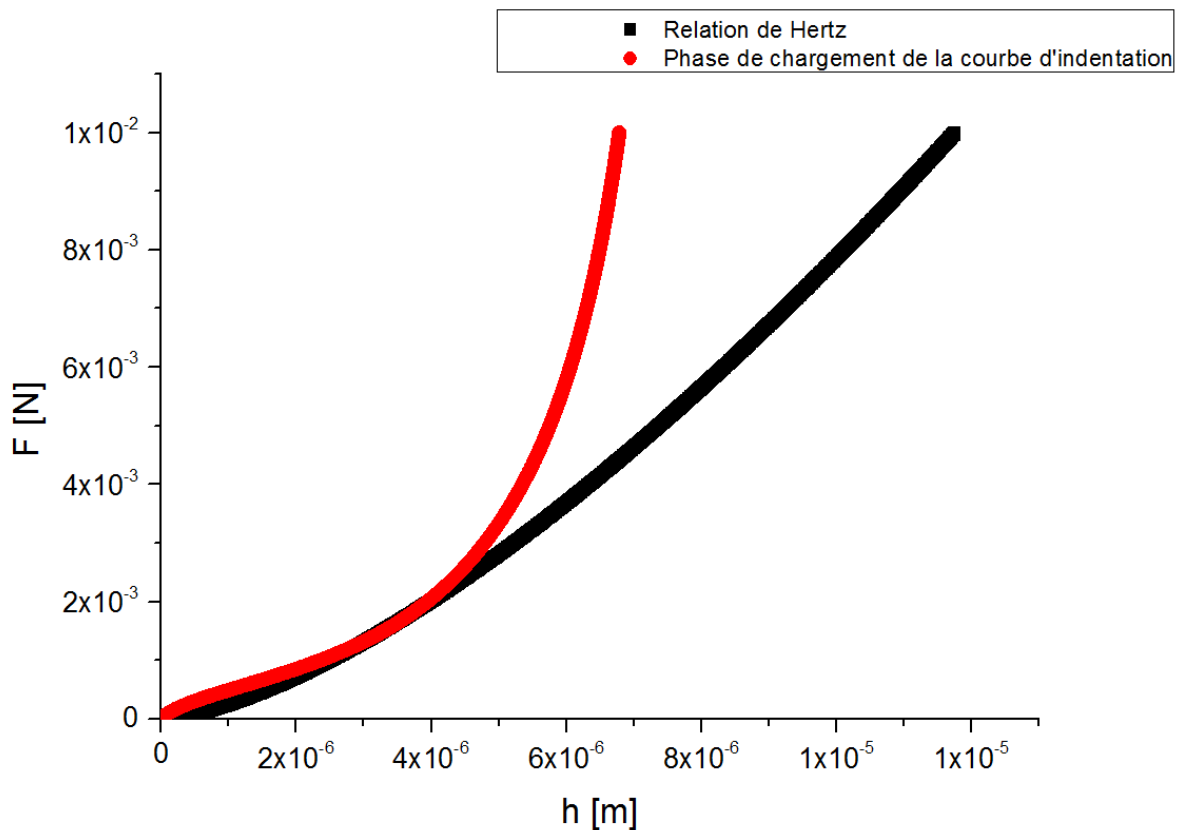


Figure 2. 7 : Courbe brute d'indentation et courbe théorique du modèle de HERTZ

Pour mieux prédire l'indentation d'un matériau mou, D.X. LIU [12], à partir des travaux de Sneddon [14], propose d'approximer la fonction radiale (4) par son développement limité d'ordre 2. En considérant que le rapport  $h/R$  reste toujours très petit, on peut ainsi approcher la fonction  $f(r)$  (4) par son développement limité et ne retenir que les deux premiers termes. Ce développement devient alors :

$$f(r) = \frac{r^2}{2R} + \frac{r^4}{8R^3} \quad (5)$$

En remplaçant la fonction radiale par son développement limité dans les expressions de la théorie du contact proposé par Sneddon (6) et (7)

$$h = \int_0^1 \frac{f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (6)$$

$$F = \frac{4\mu a}{1-\nu} \int_0^1 \frac{x^2 f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (7)$$

Où  $x=r/a$  est la variable adimensionnelle avec  $a$  le rayon de la surface de contact projeté. On obtient alors la profondeur et la force corrigées notées respectivement  $h_e$  et  $F_e$  définies comme :

$$h_e = \frac{a^2}{R} + \frac{a^4}{3R^3} \quad (8)$$

$$F_e = \frac{4}{3} E^* a^3 \left( \frac{1}{R} + \frac{2a^2}{5R^3} \right) \quad (9)$$

La courbe reconstruite à partir des expressions (8) et (9) que nous appelons modèle de Hertz-2D suit la courbe expérimentale au début de chargement pour des profondeurs d'indentations inférieures à 30% de la profondeur maximale correspondant à une déformation [19]  $\varepsilon = \frac{a}{R} < 20\%$  (Figure 2-9).

Cette valeur définit la limite du domaine de l'analyse des courbes d'indentations à partir du modèle HERTZ-2D compte tenu de la faible épaisseur des échantillons (maximum de 100um) pour qu'il soit viable ex-vivo et élaboré sous la forme de coupes cytologiques avec une bonne planéité et une faible rugosité. Au-delà de cette déformation on peut noter la présence d'une saturation de la profondeur de pénétration  $h$  (figure 2.7) représentant une limitation à la caractérisation du myocarde.

## 2.2.3 Limitations du modèle HERTZ-2D :

### 2.2.3.1 Etude de la saturation des courbes d'indentations du tissu cardiaque :

Intuitivement, compte-tenu de la nature et de la géométrie (faible épaisseur) de l'échantillon du myocarde, on conçoit aisément que le substrat sur lequel repose l'échantillon influence l'analyse des courbes d'indentations. La courbe expérimentale d'indentation, Figure 2.8 a et la courbe générée par l'application de (8) et (9) Figure 2.8 b divergent pour une profondeur  $h$  de  $8 \mu\text{m}$ .

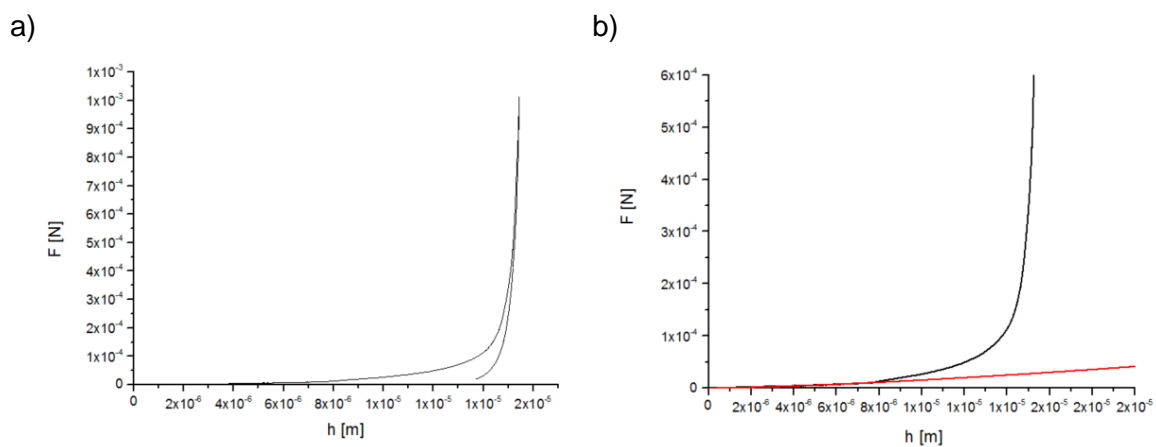


Figure 2. 8 : Représentation a) une courbe d'indentation d'un échantillon de tissu cardiaque b) une courbe expérimentale et une courbe théorique (issue de la relation de Hertz 2D)

Afin d'expliquer cette divergence, une expérience numérique reproduisant un essai d'indentation a été réalisée Figure 2.9 avec un indenteur sphérique de  $100 \mu\text{m}$  de rayon sur un échantillon de  $100 \mu\text{m}$  d'épaisseur.

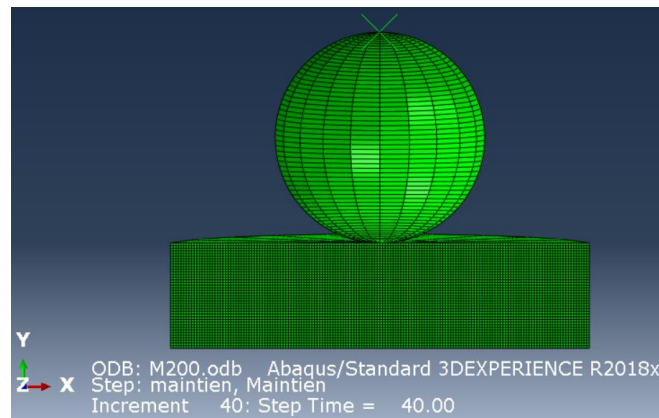


Figure 2. 9 : Expérience numérique d'indentation avec un indenteur sphérique de  $100 \mu\text{m}$  de rayon (Abaqus R 2018)



Cette expérience numérique permet la simulation d'une indentation d'un matériau isotrope et homogène de module d'Young.

En appliquant le résultat de la caractérisation de l'indentation de la courbe d'indentation Figure 2.8-a ( $E=200$  MPa) et un coefficient de poisson, issu de la littérature de 0.49. La simulation de l'indentation instrumentée montre qu'à partir du 13<sup>ème</sup> incrément la contrainte équivalente de Von Mises s'applique sur une profondeur équivalente à l'épaisseur de l'échantillon (Figure 2-10 a) et correspond à une profondeur indentée de 8  $\mu\text{m}$  (Figure 2-10 b). Cette profondeur d'indentation correspond au point de début de divergence de la courbe expérimentale et de la courbe théorique (Figure 2.8 b)

Au-delà de cette profondeur, la contrainte de Von Mises s'applique également au substrat en verre de silice (Figure 2-12 c). Ce résultat explique l'augmentation de la rigidité du couple échantillon substrat provoquant la saturation de la courbe expérimentale par rapport à la courbe théorique (Figure 2.8 b)

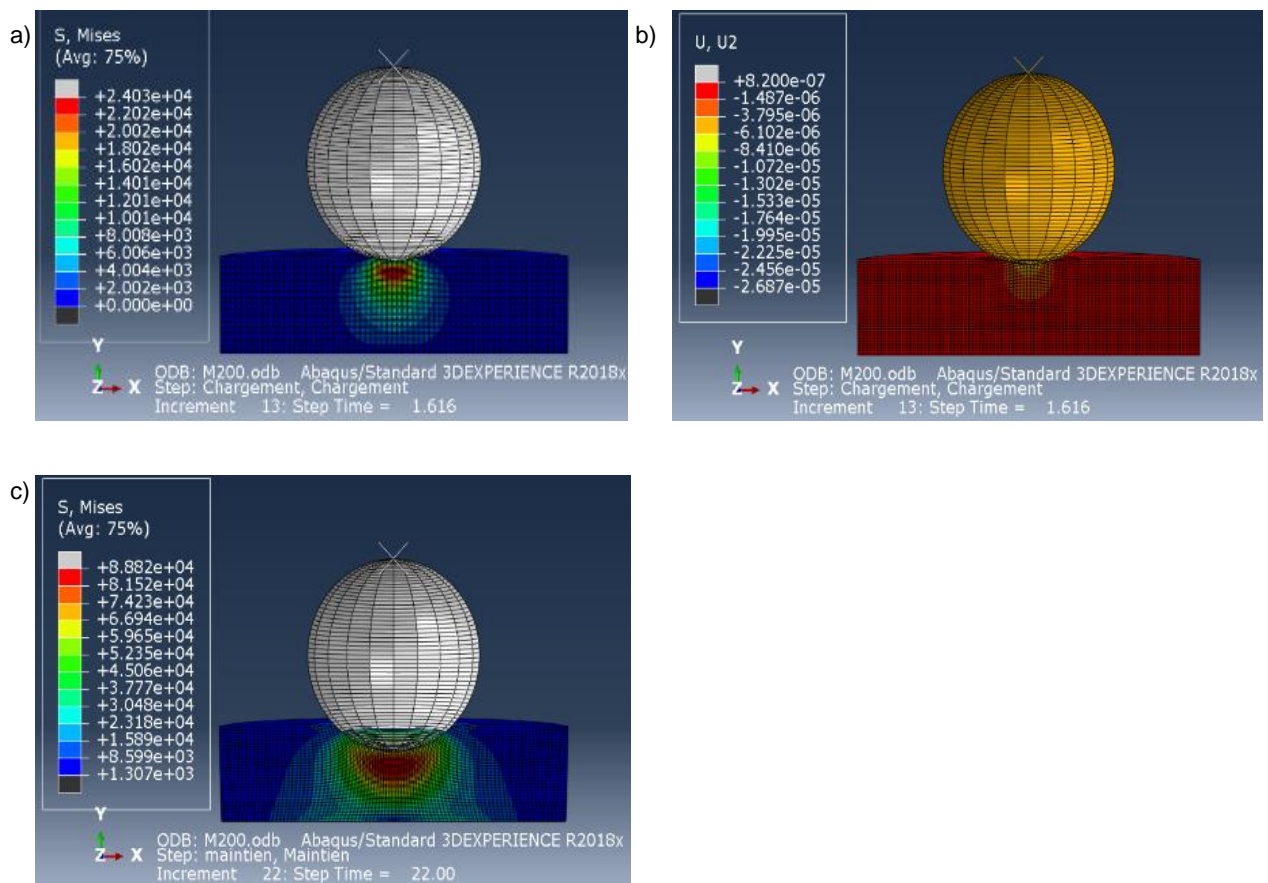


Figure 2. 10 : Expérience numérique d'indentation avec un indenteur sphérique de 100  $\mu\text{m}$  de rayon sur un échantillon de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de module d'Young 200 kPa et de coefficient de poisson de 0,49 a) Limite d'indentation pour des contraintes appliquées uniquement au tissu b) Déplacement maximal du pénétrateur correspondant à la limite d'indentation du tissu seul c) Contrainte en fin d'essai de 1 mN avec influence du substrat occasionnant un effet de saturation de l'indentation

Compte-tenu de ce résultat, il est alors possible de déterminer les contraintes limites et les déformations limites des indentations instrumentées pour lesquelles la caractérisation à partir des relations de Hertz sont valables.

Il est admis que la contrainte  $\sigma$  et la déformation  $\varepsilon$  sont obtenues à partir des relations suivantes [19] :

$$\sigma = F/\pi a^2 \quad (10)$$

$$\varepsilon = \frac{a}{R} \quad (11)$$

La relation (9) et la relation (10) permettent d'aboutir à l'expression de  $\sigma$  fonction de  $E^*$ ,  $a$  et  $R$ .

$$\sigma = F/\pi a^2 = \frac{4}{3\pi} E^* a \left( \frac{1}{R} + \frac{2a^2}{5R^3} \right) \quad (12)$$

Les profondeurs maximales des 26 indentations ainsi que les déformations limites avant influence du substrat (plaque de verre) sont présentées Figure 2. 11.

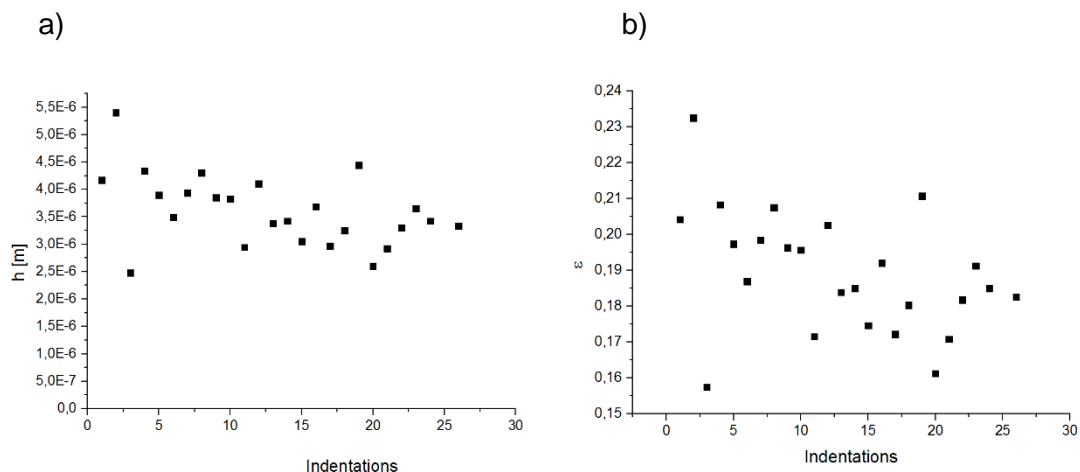


Figure 2. 11 : a) Pénétrations maximales et b) déformations maximales du domaine de Hertz 2D obtenues à partir de 26 indentations d'un échantillon du tissu cardiaque porcin

La déformation maximale est régulièrement observée pour une valeur moyenne de 19 % pour les 26 essais d'indentations réalisés avant l'influence du substrat pour une épaisseur d'échantillon du tissu cardiaque de 100 $\mu$ m.

En respectant cette limite, on obtient des modules d'Young réduits par la relation classique de Hertz et la méthode Hertz 2D sensiblement identiques avec cependant des variations de valeurs Figure 2.12 et Tableau 2. 3.

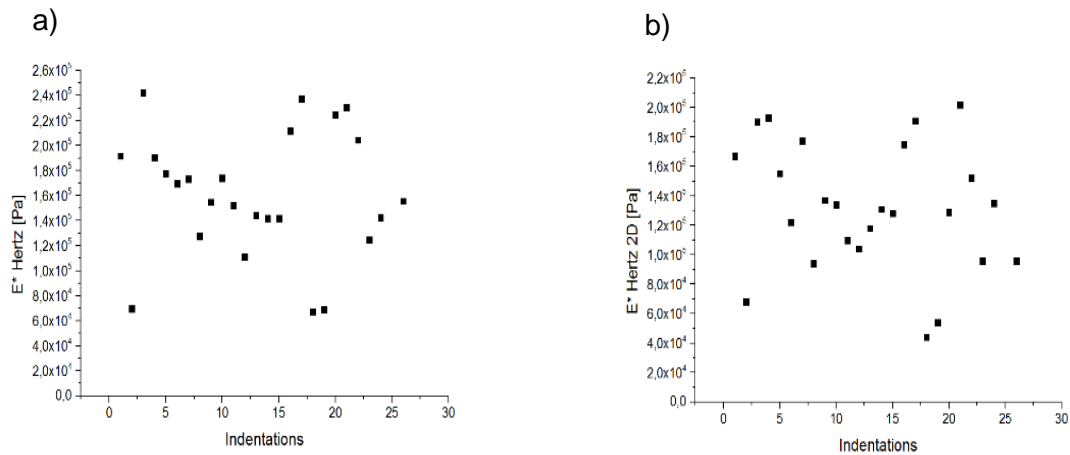


Figure 2. 12 : a) modules d'Young réduits obtenus par la relation de Hertz b) modules d'Young réduits obtenus à partir du modèle Hertz 2D obtenus à partir de 26 indentations d'un échantillon du tissu cardiaque porcin

<b>Caractérisation</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecartype</b>
Module d'Young réduit E* modèle de Hertz [Pa]	1.61E+05	5.01E+04
Module d'Young réduit E* modèle de Hertz 2D [Pa]	1.32E+05	4.33E+04

Tableau 2. 3 : Résultats de la caractérisation à partir de la relation de Hertz et du modèle Hertz 2D d'un échantillon de tissu cardiaque porcin (26 indentations)

On peut noter que les modules d'Young réduits obtenus sont similaires pour les deux modèles de Hertz (tableau 2.3). Pour expliquer les importantes variations entre les modules d'Young réduits, il convient d'étudier la nature des échantillons. Deux causes peuvent expliquer ces variations : i) la variation de la structure des tissus sous-jacents, ii) des défauts de surface des échantillons [9].

### 2.2.3.2 Etude de l'état de surface des échantillons indentés (coupe cytologique) :

La théorie du contact est basée sur un contact plein entre deux solides. Une rugosité non négligeable a pour résultat de diminuer cette surface de contact, de minimiser les caractéristiques mécaniques obtenues et d'augmenter la variation des mesures pour des matériaux minces [10]. Une solution communément utilisée consiste à polir les échantillons. La fragilité et la finesse du tissu cardiaque empêchent tout polissage.

Pour minimiser l'impact de la rugosité sur la mesure du tissu cardiaque, des coupes cytologiques sont réalisées sur des échantillons congelés. Cette méthodologie ne permet pas technologiquement de réaliser des coupes supérieures à 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Il est alors nécessaire de vérifier que la rugosité de l'échantillon du tissu cardiaque, dont la structure fibreuse est présentée Figure 2.13, permet l'usage de la nanoindentation.

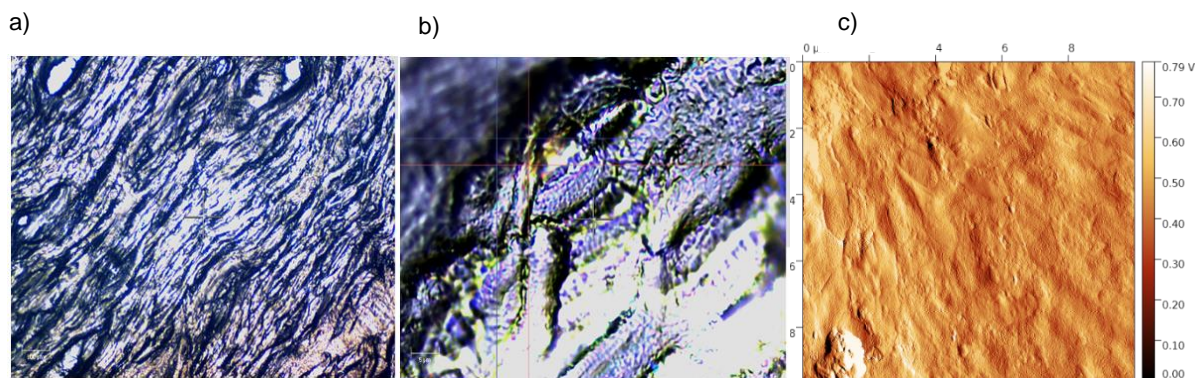


Figure 2. 13 : Micrographies du tissu cardiaque dans le sens des fibres (orientation pour une indentation radiale) a) surface de 1 mm<sup>2</sup> b) surface de 5 000  $\mu\text{m}^2$  (microscope de l'ultra nano indenteur Anton Paar) c) Image de phase de 100  $\mu\text{m}^2$

La rugosité est évaluée à l'aide d'un Microscope à Force Atomique (AFM) Figure 2.14 sur des surfaces mesurées de 10 000  $\mu\text{m}^2$  (quadrillage de lignes de 100  $\mu\text{m}$ ).

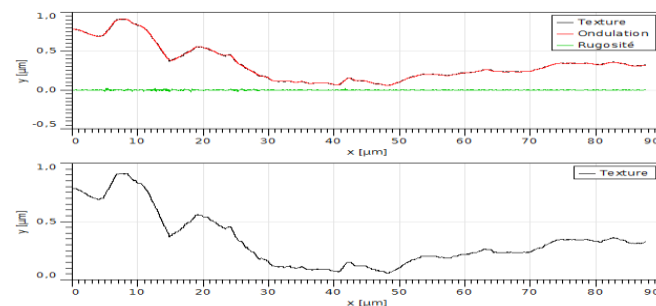


Figure 2. 14 : Courbe brute d'ondulation et courbe de rugosité d'une ligne mesurée

La rugosité maximale ( $R_t$ ) mesurée est de  $0,04 \mu\text{m}$  pour les 5 échantillons porcins testés (26 indentations par échantillons) avec un écartype de  $0.005 \mu\text{m}$ . Ce paramètre de rugosité représente une amplitude maximale d'un défaut local mesuré sur une ligne.

La profondeur utile (domaine de caractérisation) des indentations est de l'ordre de  $8 \mu\text{m}$ , selon les échantillons. Il est communément admis que la rugosité de surface ne doit pas dépasser 5 % de la profondeur maximale d'indentation. Ce ratio est largement respecté dans le cas de la préparation des coupes cytologiques [10].

## 2.3 Indentation du tissu cardiaque

### 2.3.1 Préparation des échantillons du tissu cardiaque :

Les échantillons biologiques préparés à l'Ecole de Chirurgie de Nancy Lorraine (lamelle de tissu cardiaques d'épaisseur 100  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ ) sont issus de 5 cœurs de porcs. Ils ont été prélevés dans le ventricule gauche et plus particulièrement dans « la zone latérale ». Des coupes cytologiques ont été réalisées suivant les trois directions de sollicitations *i.e.* longitudinale, radiale et transversale du ventricule gauche figure 2.15.

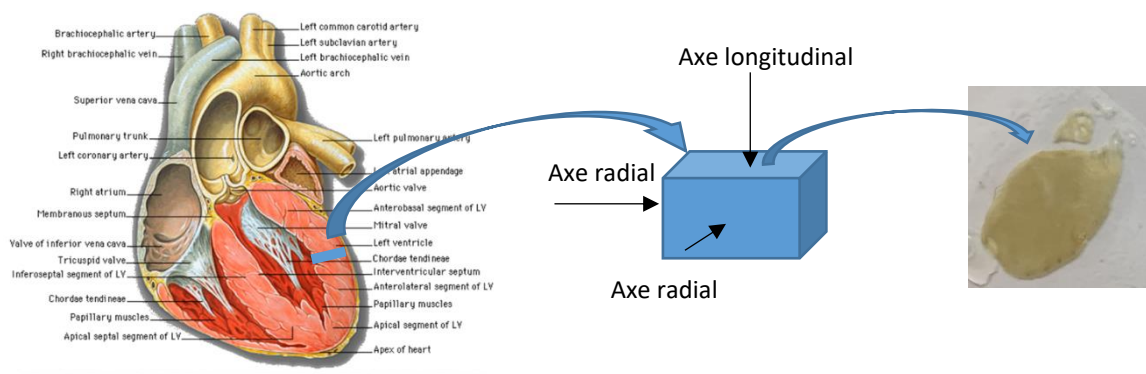


Figure 2. 15 : Orientations des coupes systoliques suivant les trois axes principaux

Ces échantillons sont susceptibles de s'assécher rapidement et ont une durée de vie limitée. Ainsi, pour garantir leur intégrité, une méthodologie stricte a été suivie : (i) plonger le cœur dans un milieu protecteur (OCT), (ii) réaliser une congélation rapide à  $-80^{\circ}\text{C}$ , (iii) réaliser les coupes cytologiques de 100  $\mu\text{m}$  et de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (iv) maintenir à l'état de congélation (cryogénie).

Pour la réalisation des essais, l'échantillon est décongelé par immersion pendant 15 minutes dans un milieu liquide à température ambiante.

### 2.3.2 Stratégie d'une campagne d'indentation instrumentée

Le muscle cardiaque fait partie des matériaux « mous » nécessitant un réglage spécifique de l'ultra nanoindenteur. Pour cela, une approche expérimentale (plan d'expérience de Taguchi) a été réalisée pour définir les niveaux de réglage des facteurs contribuant à la caractérisation mécanique du tissu (minimisation de l'erreur de répétabilité). La méthode des plans d'expériences de Taguchi a permis de tester les différentes combinaisons possibles entre ces facteurs pour évaluer leurs effets et leurs interactions potentielles. Les facteurs testés sont (i) la vitesse de chargement, (ii) la force maximale d'indentation et (iii) la force de contact. Cette méthode a minimisé les variations autour de la valeur cible (module d'Young) et a ainsi permis d'adapter (i) les vitesses de sollicitation, (ii) le niveau de chargement (tableau 2.4).

Paramètres	Niveau de réglage retenu
fréquence d'acquisition	10 Hz
Force de contact	100 $\mu$ N
Force maximale	1 mN
Vitesse de chargement	0,5 mN/min

*Tableau 2. 4 : Détermination des principaux paramètres techniques de l'ultra nano indenteur pour le tissu cardiaque en milieu liquide*

## **2.4 Synthèse**

### **2.4.1 Discussion**

Le protocole développé semble avoir pallié aux limitations technologiques d'incertitudes de mesure à faible charge et d'influence du liquide d'hydratation [11]. Ces premiers résultats ont élargi l'applicabilité de la nanoindentation à un environnement liquide pour des tissus biologiques mous et plus particulièrement pour du tissu cardiaque.

Le tissu cardiaque présentant un comportement élastique, il paraît pertinent d'appliquer la relation de Hertz. Dans sa formulation classique, cette relation permet une représentation de l'essai d'indentation limitée à un domaine réduit à des déformations inférieures à 20%. Au-delà, l'influence du substrat rend impossible la caractérisation de l'échantillon.

Les variations des mesures observées avec ces deux méthodes (tableau 2.3) semblent provenir de l'hétérogénéité du tissu cardiaque. Ces résultats laissent présumer la possibilité de réaliser une caractérisation mécanique du tissu cardiaque en lien avec sa description anatomique et plus particulièrement avec l'orientation de ses fibres [12], [13].

### **2.4.2 Conclusion**

Dans notre approche, nous supposons l'élasticité du tissu cardiaque ex-vivo compatible avec une réversibilité des déformations présentes en situation in-vivo pendant le processus de chargement à faible vitesse d'indentation [10], [11]. La méthode issue de la relation de Hertz et la méthode Hertz 2D appliquées au chargement d'un essai d'indentation permettent une estimation raisonnable du module d'Young. Cette approche pourrait être considérée comme un point de départ pour le développement de modèles plus complexes, qui pourront inclure l'inhomogénéité et l'anisotropie du tissu cardiaque.



## 2.5 Table des figures :

<u>FIGURE 2. 1: ULTRA-NANO INDENTEUR ANTON PAAR EQUIPE D'UN INDENTEUR LONG, DE SA REFERENCE ET D'UN RESERVOIR POUR FIXER ET IMMARGER LES COUPES HISTOLOGIQUES</u> .....	52
<u>FIGURE 2. 2 : COURBES D'INDENTATIONS INSTRUMENTEES D'UN ECHANTILLON DE Si (VERRE DE SILICE) INDENTE EN IMMERSION TOTALE (EN ROUGE), AVEC UNE FIN D'ESSAI EN MILIEU SEC (EN NOIR) ET AVEC UN DEBUT ET UNE FIN D'ESSAI EN MILIEU SEC (EN BLEU)</u>	53
<u>FIGURE 2. 3 : COURBES D'INDENTATIONS INSTRUMENTEES D'UN ECHANTILLON DE REFERENCE (Si) REALISEES A) EN MILIEU SEC ET B) EN MILIEU LIQUIDE</u> .....	54
<u>FIGURE 2.4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CONTACT ENTRE LA POINTE SPHERIQUE ET UN ECHANTILLON</u> .....	56
<u>FIGURE 2. 5 : REGRESSION LINEAIRE DE LA FORMULATION LOGARITHMIQUE DE LA RELATION DE HERTZ APPLIQUEE AUX INDENTATIONS DE L'ECHANTILLON DE REFERENCE DE VERRE DE SILICE A) EN MILIEU LIQUIDE ET B) EN MILIEU SEC</u> .....	57
<u>FIGURE 2. 6 : DESCRIPTION DE LA METHODE ISSUE DE LA THEORIE DE HERTZ A PARTIR D'UNE INDENTATION D'UN ECHANTILLON ETALON DE VERRE DE SILICE</u> .....	59
<u>FIGURE 2. 7 : COURBE BRUTE D'INDENTATION ET COURBE THEORIQUE DU MODELE DE HERTZ</u> .....	60
<u>FIGURE 2. 8 : REPRESENTATION A) UNE COURBE D'INDENTATION D'UN ECHANTILLON DE TISSU CARDIAQUE B) UNE COURBE EXPERIMENTALE ET UNE COURBE THEORIQUE (ISSUE DE LA RELATION DE HERTZ 2D)</u> .....	62
<u>FIGURE 2. 9 : EXPERIENCE NUMERIQUE D'INDENTATION AVEC UN INDENTEUR SPHERIQUE DE 100 <math>\mu\text{M}</math> DE RAYON (ABAQUS R 2018)</u>	62
<u>FIGURE 2. 10 : EXPERIENCE NUMERIQUE D'INDENTATION AVEC UN INDENTEUR SPHERIQUE DE 100 <math>\mu\text{M}</math> DE RAYON SUR UN ECHANTILLON DE 100 <math>\mu\text{M}</math> D'EPaisseur DE MODULE D'YOUNG 200 KPA ET DE COEFFICIENT DE POISSON DE 0,49 A) LIMITE D'INDENTATION POUR DES CONTRAINTES APPLIQUEES UNIQUEMENT AU TISSU B) DEPLACEMENT MAXIMAL DU PENETRATEUR CORRESPONDANT A LA LIMITE D'INDENTATION DU TISSU SEUL C) CONTRAINTE EN FIN D'ESSAI DE 1 mN AVEC INFLUENCE DU SUBSTRAT OCCASIONNANT UN EFFET DE SATURATION DE L'INDENTATION</u> .....	63
<u>FIGURE 2. 11 : A) PENETRATIONS MAXIMALES ET B) DEFORMATIONS MAXIMALES DU DOMAINE DE HERTZ 2D OBTENUS A PARTIR DE 26 INDENTATIONS D'UN ECHANTILLON DU TISSU CARDIAQUE PORCIN</u> .....	64
<u>FIGURE 2. 12 : A) MODULES D'YOUNG REDUITS OBTENUS PAR LA RELATION DE HERTZ B) MODULES D'YOUNG REDUITS OBTENUS A PARTIR DU MODELE HERTZ 2D OBTENUS A PARTIR DE 26 INDENTATIONS D'UN ECHANTILLON DU TISSU CARDIAQUE PORCIN</u> ..	65
<u>FIGURE 2. 13 : MICROGRAPHIES DU TISSU CARDIAQUE DANS LE SENS DES FIBRES (ORIENTATION POUR UNE INDENTATION RADIALE) A) SURFACE DE 1 <math>\text{MM}^2</math> B) SURFACE DE 5 000 <math>\mu\text{M}^2</math> (MICROSCOPE DE L'ULTRA NANO INDENTEUR ANTON PAAR) C) IMAGE DE PHASE DE 100 <math>\mu\text{M}^2</math></u> .....	66
<u>FIGURE 2. 14 : COURBE BRUTE D'ONDULATION ET COURBE DE RUGOSITE D'UNE LIGNE MESUREE</u> .....	66
<u>FIGURE 2. 15 : ORIENTATIONS DES COUPES SYSTOLIQUES SUIVANT LES TROIS AXES PRINCIPAUX</u> .....	68

## 2.6 Table des tableaux :

<u>TABLEAU 2. 1 : CARACTERISATION D'ETALON DE VERRE DE SILICE EN MILIEU SEC ET LIQUIDE.....</u>	55
<u>TABLEAU 2. 2 : RESULTATS DE LA CARACTERISATION PAR LA RELATION DE HERTZ DE L'ECHANTILLON DE REFERENCE DE VERRE DE SILICE A PARTIR DU CHARGEMENT DE LA COURBE D'INDENTATION EN MILIEUX SEC ET LIQUIDE.....</u>	58
<u>TABLEAU 2. 3 : RESULTATS DE LA CARACTERISATION A PARTIR DE LA RELATION DE HERTZ ET DU MODELE HERTZ 2D D'UN ECHANTILLON DE TISSU CARDIAQUE PORCIN (26 INDENTATIONS).....</u>	65
<u>TABLEAU 2. 4 : DETERMINATION DES PRINCIPAUX PARAMETRES TECHNIQUES DE L'ULTRA NANO INDENTEUR POUR LE TISSU CARDIAQUE EN MILIEU LIQUIDE.....</u>	69

## 2.7 Bibliographie

- [1] W. Yao *et al.*, « Measuring the compressive viscoelastic mechanical properties of human cervical tissue using indentation », *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 34, p. 18-26, juin 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.016.
- [2] MacManus D. B., Gilchrist M. D., et Murphy J. G., « An empirical measure of nonlinear strain for soft tissue indentation », *R. Soc. Open Sci.*, vol. 4, n° 11, p. 170894, nov. 2017, doi: 10.1098/rsos.170894.
- [3] H. HERTZ, « Über die Berührung fester elastischer Körper (Sur le contact entre corps élastiques) », *J. für reine und angewandte Mathematik*, vol. 92, 1881, p. 156-171.
- [4] Z. Gao, K. Lister, et J. P. Desai, « Constitutive Modeling of Liver Tissue: Experiment and Theory », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, n° 2, p. 505, févr. 2010, doi: 10.1007/s10439-009-9812-0.
- [5] G. Constantinides, Z. I. Kalcioğlu, M. McFarland, J. F. Smith, et K. J. Van Vliet, « Probing mechanical properties of fully hydrated gels and biological tissues », *J. Biomech.*, vol. 41, n° 15, p. 3285-3289, nov. 2008, doi: 10.1016/j.jbiomech.2008.08.015.
- [6] G. M. Pharr, W. C. Oliver, et F. R. Brotzen, « On the generality of the relationship among contact stiffness, contact area, and elastic modulus during indentation », *J. Mater. Res.*, vol. 7, n° 3, p. 613-617, mars 1992, doi: 10.1557/JMR.1992.0613.
- [7] W. Oliver et G. Pharr, « An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments », *J. Mater. Res.*, vol. 7, n° 6, p. 1564-1583, juin 1992.
- [8] J.-P. Jehl, G. Pierson, A. Voignier, et R. Kouitat Njiwa, « On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue », oct. 2016, vol. 2, p. 94-95, Consulté le: févr. 07, 2019. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.flogen.org/sips2016/paper-2-489.html>.
- [9] R. C. Paietta, S. E. Campbell, et V. L. Ferguson, « Influences of spherical tip radius, contact depth, and contact area on nanoindentation properties of bone », *J. Biomech.*, vol. 44, n° 2, p. 285-290, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.008.
- [10] P. Berke, F. El Houdaigui, et T. J. Massart, « Coupled friction and roughness surface effects in shallow spherical nanoindentation », *Wear*, vol. 268, n° 1, p. 223-232, janv. 2010, doi: 10.1016/j.wear.2009.07.015.
- [11] D. M. Ebenstein et L. A. Pruitt, « Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 69A, n° 2, p. 222-232, 2004, doi: 10.1002/jbm.a.20096.
- [12] H. Lombaert *et al.*, « Human Atlas of the Cardiac Fiber Architecture: Study on a Healthy Population », *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 31, n° 7, p. 1436-1447, juill. 2012, doi: 10.1109/TMI.2012.2192743.
- [13] B. Baillargeon, N. Rebelo, D. D. Fox, R. L. Taylor, et E. Kuhl, « The Living Heart Project: A robust and integrative simulator for human heart function », *Eur. J. Mech. - ASolids*, vol. 48, p. 38-47, nov. 2014, doi: 10.1016/j.euromechsol.2014.04.001.

- [14] Y. Fung, *Biomechanics [Texte imprimé] : mechanical properties of living tissues*. New York : Springer-Verlag. 1993., 1993.
- [15] J.-P. Jehl, J. P. Maureira, et R. Kouitat Njiwa, « LIQUID ENVIRONMENT SPHERICAL DEPTH SENSING INDENTATION: TOWARD THE MECHANICAL CHARACTERIZATION OF LIVING TISSUE », RIO, Brazil, nov. 2018, Consulté le: févr. 07, 2019. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01937178>.

## Chapitre 3

Estimation du module d'Young réduit du tissu  
cardiaque par indentation sphérique



# Table des matières

<b>3</b>	<b>ESTIMATION DU MODULE D'YOUNG REDUIT DU TISSU CARDIAQUE PAR INDENTATION SPHERIQUE ...</b>	<b>79</b>
3.1	PREAMBULE.....	79
3.2	INTRODUCTION.....	79
3.3	SPHERICAL DEPTH SENSING INDENTATION IN A LIQUID ENVIRONMENT: TOWARD CARDIAC TISSUE CHARACTERIZATION. (SIPS 2018 MAMALIS INTERNATIONAL SYMPOSIUM ).....	81
3.3.1	<i>Summary:</i> .....	81
3.3.2	<i>Introduction:</i> .....	81
3.3.3	<i>Materials and methods:</i> .....	82
3.3.3.1	Cardiac tissue samples: .....	82
3.3.3.2	Indentation tests .....	83
3.3.4	<i>Results:</i> .....	84
3.3.5	<i>Discussion:</i> .....	88
3.3.6	<i>Conclusion</i> .....	89
3.3.7	<i>Acknowledgements</i> .....	89
3.3.8	<i>References:</i> .....	90
3.4	LIQUID ENVIRONMENT SPHERICAL DEPTH SENSING INDENTATION: TOWARD THE MECHANICAL CHARACTERIZATION OF LIVING TISSUE. (INVITED PAPER SIPS 2018 / ZEHETBAUER INTERNATIONAL SYMPOSIUM).....	93
3.4.1	<i>Summary:</i> .....	93
3.4.2	<i>Introduction:</i> .....	94
3.4.3	<i>Materials and methods:</i> .....	94
3.4.4	<i>Results:</i> .....	96
3.4.4.1	Analysis of an LVLA sample: .....	96
3.4.4.2	Analysis of the impact of devascularizing cardiac tissue in vitro on its mechanical property variations: .....	97
3.4.4.3	Comparisons of in vitro properties of left ventricular heart tissue following two different orthogonal manipulation directions .....	99
3.4.5	<i>Discussion:</i> .....	101
3.4.6	<i>Conclusion</i> .....	102
3.4.7	<i>Acknowledgements</i> .....	103
3.4.8	<i>References:</i> .....	103





# Estimation du module d'Young réduit du tissu cardiaque par indentation sphérique

## **3.1 Préambule**

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse. Des publications ont jalonné ces quatre années sous la forme d'articles de conférences internationales à comité de lecture et d'articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture. Le choix de présenter ces publications est volontaire et démontre la démarche de valider chaque avancée en la confrontant à la communauté scientifique.

## **3.2 Introduction**

Une connaissance approfondie des caractéristiques mécaniques des tissus qui composent les organes du corps est d'une extrême importance dans des domaines tels que la simulation chirurgicale, le génie tissulaire, et l'imagerie médicale pour la distinction des zones saines et pathologiques. L'évaluation des propriétés mécaniques du tissu cardiaque doit se faire dans un environnement liquide. C'est une condition nécessaire pour éviter la dégradation des propriétés du matériau due à son assèchement. Le développement d'une approche expérimentale appropriée est présenté au chapitre 2. Cette approche permet la caractérisation d'un échantillon à partir de l'analyse d'une courbe d'indentation instrumentée en milieu liquide par la théorie de Hertz et un modèle amélioré : le modèle Hertz 2D. Bien que l'indentation instrumentée soit bien maîtrisée pour les matériaux conventionnels dans l'air ambiant, l'introduction en milieu liquide introduit des biais qu'il est nécessaire d'analyser. Ainsi, dans un premier temps, à partir de matériaux métalliques et cristallins, une étude approfondie a été menée pour permettre une caractérisation des matériaux dans de telles conditions.

Ces travaux, dont l'intitulé « On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue », ont fait l'objet d'une présentation au congrès SIPS2016 – FLOGEN. Le protocole mis au point semble surmonter les limites technologiques associées à la mesure à l'aide de charges légères et à l'influence du liquide d'hydratation.

Le tissu cardiaque ex-vivo présente un comportement élastique sous l'effet d'une indentation sphérique. Dans ces conditions, la théorie de Hertz semble applicable. Dans sa formulation classique, cette théorie assure une représentation précise de l'essai d'indentation, mais se limite à des faibles déformations. Cette restriction est surmontée en utilisant la méthode Hertz 2D. Les variations des modules d'Young réduits obtenus sont apparemment causées par l'hétérogénéité du tissu cardiaque. Ces résultats suggèrent qu'il serait possible d'analyser les caractéristiques mécaniques du tissu cardiaque au regard de sa structure anatomique. Ces résultats sont présentés au paragraphe 3.3 et ont été exposés au congrès SIPS2018 – FLOGEN / Mamalis International Symposium.

La comparaison des caractéristiques mécaniques obtenues à partir d'essais d'indentations d'échantillons du ventricule gauche prélevés le long de deux axes (axe longitudinal et axe radial) confirme la nature anisotrope du tissu cardiaque. Cette anisotropie s'explique par la composition et la structure particulière du tissu cardiaque. Afin de vérifier que ces variations ne provenaient pas de la dégradation des caractéristiques mécaniques du tissu ex vivo, une analyse de l'impact de l'absence de vascularisation a été menée. Les résultats obtenus ont permis d'estimer la durée de « vie » maximale pour un maintien des caractéristiques mécaniques à 2 heures. De plus, une corrélation a été établie entre la rigidité apparente du tissu et sa durée de vie ex vivo. Cette méthode de caractérisation pourrait être comparée aux techniques de datation utilisées en médecine légale. Ces résultats sont présentés au paragraphe 3.4 et ont été exposés au congrès SIPS2018 – FLOGEN (Invited Paper) / Zehetbauer International Symposium.

### **3.3 Spherical depth sensing indentation in a liquid environment: toward cardiac tissue characterization. (SIPS 2018 MAMALIS INTERNATIONAL SYMPOSIUM )**

Jean-Philippe JEHL<sup>1</sup>; PABLO MAUREIRA<sup>2,3</sup>; RICHARD KOUITAT NJIWA<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Université de Lorraine, Institut Jean Lamour - Dpt N2EV - UMR 7198, Nancy, France;

<sup>2</sup>CHRU, Department of Cardio-Vascular Surgery, Nancy, France;

<sup>3</sup>Université de Lorraine, INSERM, U961, Université de Lorraine, Nancy, France;

#### **3.3.1 Summary:**

A deep understanding of the mechanical properties of the tissues making up the body's organs is of extreme importance in fields such as surgical procedure simulation [1, 2], tissue engineering [3], and potentially even medical imaging (distinguishing between healthy and pathological zones) [4]. Learning about these mechanical processes requires experimental studies. Focusing on soft biological tissues, known for their tendency to quickly dry out and inherent experimental constraints in fixing samples, we opted for instrumented indentation adapted for a liquid environment. We herein present our study method for analysing cardiac tissue.

Key words: mechanical properties, characterization, instrumented indentation, cardiac tissue.

#### **3.3.2 Introduction:**

Over the last few years, modeling biological tissue properties has become a significant goal of a great number of researchers around the world.

A number of clinical disciplines could potentially benefit from descriptions of organ tissue properties: (i) pre-operative diagnostics using medical imaging, (ii) per-surgery techniques using integrated virtual reality, and (iii) simulations for training physicians and particularly surgeons. In order to characterize biological tissues, mechanical testing simulates different modes of contact.

In their study on porcine liver tissue properties, for example, Z. Gao [5] and C. Chui [7] conducted pure shear and uniaxial deformation tests. W. Yao [8] and D. MacManus [9], on the other hand, revealed the advantages of indentation compared to uniaxial tests, highlighting the former (i) offers easier sample preparation and (ii) enables the measurement of different regions of an organ in order to map heterogenic properties. Nanoindentation systems enable researchers to simultaneously explore significantly smaller zones thanks to (i) the range of loads they offer, (ii) the range of displacements they can measure, and (iii) the geometry of points used, enabling localized measurements of tissue properties. Nevertheless, interpreting the force-penetration ratio of tested materials using experimental data is not as simple using this approach as with traditional uniaxial tests, as the deformation field is rendered nonhomogeneous by the indenter penetrating the tissue. For this study, we used a spherical indenter and analyzed the curves generated by instrumented indentation using the simplified Hertzian theory [11], followed by the theory of non-conforming contact to imposed displacement.

### **3.3.3 Materials and methods:**

#### ***3.3.3.1 Cardiac tissue samples:***

In this study, we used samples from three pig hearts and two rat hearts. These samples are prone to dry out quickly and have limited usability. In order to guarantee tissue integrity, we thus followed a strict methodology: (i) immerse the heart in a protective medium, (ii) rapidly freeze at  $-80^{\circ}\text{C}$ , (iii) perform cytological slices of  $100\ \mu\text{m}$  thickness, and (iv) keep frozen.

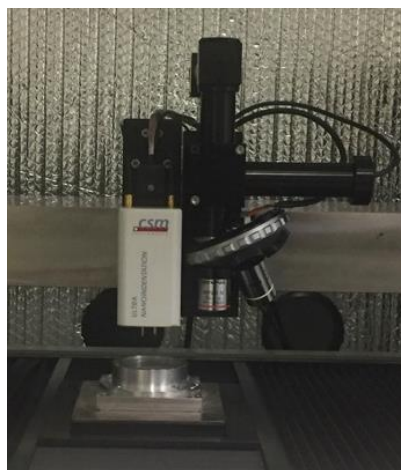
For each test, the sample was defrosted by 15-minute immersion in a room-temperature liquid medium. Figure 1 presents a cytological sample slice.



*Figure 1: 100 µm thick cytological slice of a rat heart*

### **3.3.3.2 Indentation tests**

We used an ultra nanoindenter from CSM-Instrument, currently ANTON-PAAR, Peseux, Switzerland (cf. Figure 2). This system enables testing at penetration depths varying from just a few nanometers to 100 µm, using loads of 10 µN to 100 mN. Depth resolution is 0.001 nm and load resolution is 0.01µN. The tool was adapted to enable testing on biological materials in liquid medium, for example creating a sample-holder adapted to biological tissue slices.



*Figure 2: Anton Paar ultra nanoindenter comprising (i) a long indenter, (ii) the reference, and (iii) a reservoir for fixing and immersing cytological slices*

### 3.3.4 Results:

Although soft in texture, biological tissue does exhibit some elasticity. It is thus possible that, at very shallow indenter penetration depths, the surface of contact between the sample and indenter is similar to a disc. Given these properties, we can apply an analysis of elastic contact between two solids in revolution, known as the Hertz theory. There are a number of challenges with this method, however, primarily regarding the uncertainty linked to measuring with light loads and, in this particular case, the influence of hydration liquid [6]. We thus designed a strategy enabling us to define the range of values on commencing the load for which the Hertz theory can be applied. As a brief reminder, this theory establishes the relationship between the force applied ( $F$ ), the relative approach distance of the two elements ( $h$ ), and the radius of the disc contact area ( $a$ ) (formulae (1) and (2)).

These formulae implicate also the radius of the indenter's curve ( $R$ ) and the mechanical characteristics of the sample and indenter, *i.e.* their Young's moduli and Poisson's ratios, using the reduced elasticity modulus, defined by formula (3).

$$h^3 = \left( \frac{9.F^2}{16.R.E^{*2}} \right) \quad (1)$$

$$h = \frac{a^2}{R} \quad (2)$$

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_p^2}{E_p} \quad (3)$$

In formula (3),  $E_p$  and  $\nu_p$  represent, respectively, the Young's modulus and Poisson's ratio of the indenter. When the rigidity modulus of the tested material is very weak compared to that of the indenter, it is calculated as

$$E^* = E/(1 - \nu^2) \quad (4)$$

During the indentation testing, we continually recorded the penetration depth according to the applied load. After each test, we generated a series of data couples  $(F, h)$ , from which we would be able to identify the characteristics of the material tested using formula (1). In log-log plotting, this formula becomes:

$$\ln(F) = \frac{3 \cdot \ln(h)}{2} + \frac{1}{2} \ln\left(\frac{9}{16 \cdot R \cdot E^{*2}}\right) \quad (5)$$

The aim is thus to identify the parameters of a linear function.

The contact between the sample and indenter is represented in Figure 4 and the spherical function describing this contact is provided by equation 6. Given the liquid medium used and the uncertainties associated with measuring using very light loads, this formula is only valid for a relatively small range of values, which must also be identified. To do this, we created a strategy for exploring the initial moments of indentation, enabling us to define the range of validity of formula (5) and simultaneously determine the reduced modulus  $E^*$ .

The robustness of this approach was tested for a large number of samples. An example  $F - h$  curve generated by applying formula (1) was compared with the corresponding experimental curve in Figure 3.

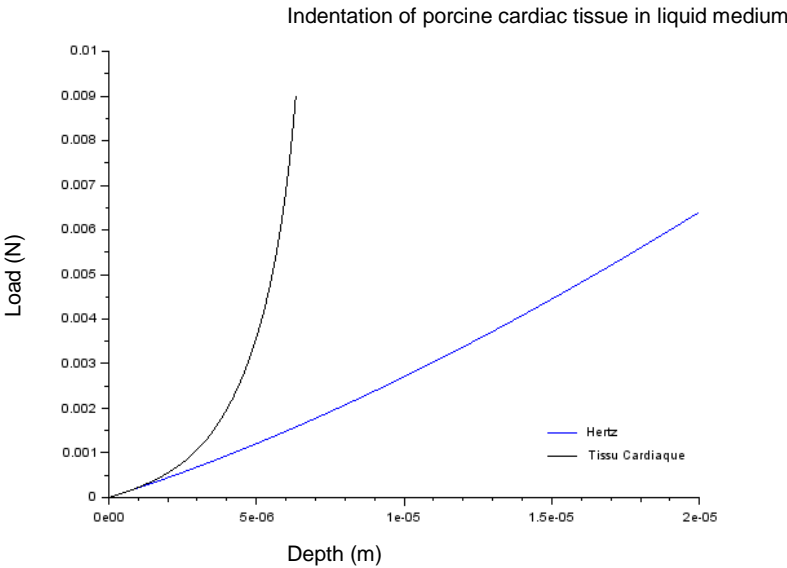


Figure 3: Raw data from indentation and HERTZ model

These figures reveal a strong correlation between the two curves for the first moments of loading. This strategy is thus able to determine a modulus of elasticity for weak loads. The question is, would this modulus remain valid for higher loads? The experimental curve reveals a saturation of the penetration depth as the load increases. Intuitively, given the sample's characteristics, it is obvious that it would be prone to mould to the shape of the indenter, causing the contact disc approximation to drop. The geometry of the sample-indenter contact with higher loads is presented in Figure 4.

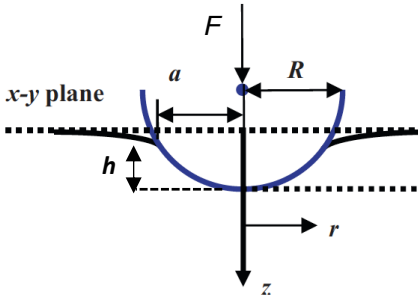


Figure 4: Schematic representation of spherical indentation

The radial profile of the indenter in contact is given as:

$$f(r) = (R - \sqrt{R^2 - r^2}) \tag{6}$$

Considering that the  $r/R$  ratio always remains very small, we can approach the previous ratio via its limited development and just retain the first two terms [13]. This thus creates:

$$f(r) = \frac{r^2}{2R} + \frac{r^4}{8R^3} \tag{7}$$



The expressions of load and penetration depth thus become [12]:

$$h = \int_0^1 \frac{f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (8)$$

$$F = \frac{4\mu a}{1-\nu} \int_0^1 \frac{x^2 f'(x)}{\sqrt{1-x^2}} dx \quad (9)$$

Where  $x = r/a$ ;  $a$  being the radius of the projected area of the contact.

Once all calculations are made, we obtain:

$$h = \frac{a^2}{R} + \frac{a^4}{3R^3} \quad (10)$$

$$F = \frac{4}{3} E^* a^3 \left( \frac{1}{R} + \frac{2a^2}{5R^3} \right) \quad (11)$$

The elasticity moduli obtained using formulae (10) and (11) are very similar to those obtained previously. There is a maximum difference of 6%, and the dispersions obtained from over 100 indentations on each model are of the same magnitude, as shown in Figure 5.

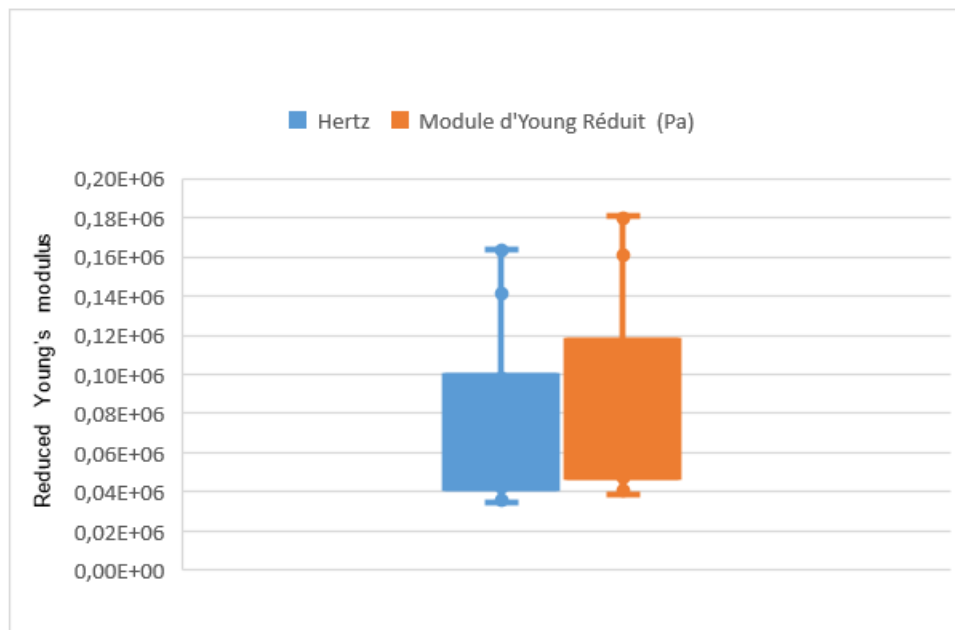
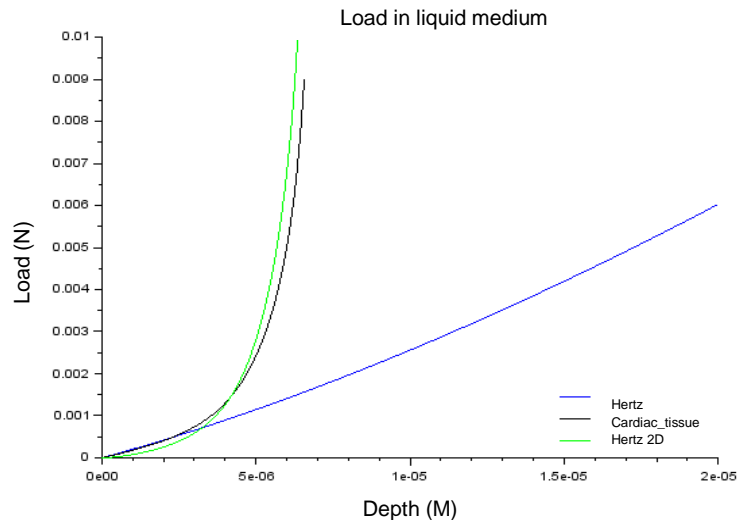


Figure 5: Mean values and dispersions of the reduced Young's modulus obtained using Hertz and Hertz\_DL2 models

In contrast, the curve reconstructed based on formulae (8) and (9), which we call the Hertz-DL2 model, almost exactly mirrors the experimental curve of Figure 6. We can thus justifiably apply this strategy to analyze indentation on soft samples.



*Figure 6: Representations of the Hertz and Hertz 2D models and experimental cardiac tissue data*

### 3.3.5 Discussion:

The protocol we developed appears to overcome the technological limitations of uncertainty associated with measuring using light loads and the influence of hydration liquid [10]. These first results prove that nanoindentation can be used on soft biological tissues in liquid medium.

Cardiac tissue exhibits a degree of elasticity when penetrated to very shallow depths by an indenter at low load speeds. In these conditions, the Hertz theory appears applicable. In its classic formulation, this theory ensures an accurate representation of the indentation test, yet is limited to a small zone and loads of under 500  $\mu\text{N}$ . This restriction is overcome by using the Hertz\_DL2 method, which proves able to closely correlate with experimental curves.

These two methods based on the Hertz theory generate near-identical reduced Young's moduli of cardiac tissue (Figure 6). The observed dispersions of measures are similar when comparing these methods (Figure 5), seemingly caused by the heterogeneity of cardiac tissue.

These results suggest that it could be possible to create a map of the mechanical characteristics of cardiac tissue associated with its anatomical description provided by Y. C. Fung [14].

### **3.3.6 Conclusion**

In our approach, we base our hypothesis on the assumed elasticity of cardiac tissue, enabling reversible deformations, and thus non-existent energy dissipation during the process of low-speed indentation load. Though biological tissue possesses a viscoelastic property [5] and cannot be considered purely elastic, the Hertz theory adapted to soft tissue enables reasonable estimation of its mechanical properties. This approach could be considered a starting point for developing more complex models, which could take into account the non-homogenous and anisotropic nature of cardiac tissue.

### **3.3.7 Acknowledgements**

The authors wish to thank the School of Surgery of Nancy, France (*Ecole De Chirurgie de Nancy*) for preparing the samples, and the virtual FEDER hospital project of Lorraine, France (*FEDER-Etat-Région Hôpital Virtuel de Lorraine*) for their generous support.

### 3.3.8 References:

- [1] Misra S, Ramesh KT, Okamura AM. Modeling of tool-tissue interactions for computer-based surgical simulation: a literature review. *Presence-Teleop Virt* 2008; 17: 463–491.
- [2] Perrenot C, Perez M, Tran N, Jehl J-Ph, Felblinger J, Bresler L, Hubert J. The virtual reality simulator dV-Trainer® is a valid assessment tool for robotic surgical skills. *Surgical Endoscopy* September 2012, Volume 26, Issue 9, pp 2587-2593
- [3] Fung YC. Stress, strain, growth, and remodeling of living organisms. In: Casey J, Crochet MJ, editors. *Theoretical, experimental, and numerical contributions to the mechanics of fluids and solids*. Basel/Switzerland: Birkh.user Verlag 1995: 469–482.
- [4] J-Ph. Jehl and R. Kouitat Njiwa. A (Constrained) Microstretch Approach in Living Tissue Modeling: a Numerical Investigation Using the Local Point Interpolation – Boundary Element Method. *Computer Modeling in Engineering & Sciences*, Vol.102, No.5, 2014
- [5] Gao Z, Lister K, Desai J. Constitutive modeling of liver tissue: experiment and theory. *Ann Biomed Eng* 2010; 38: 505–516.
- [6] J-Ph. Jehl, A.Voignier, R. Kouitat. On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue. 2016 Sustainable Industrial Processing Summit
- [7] Chui C, Kobayashi E, Chen X, Hisada T, Sakuma I. Combined compression and elongation experiments and non-linear modelling of liver tissue for surgical simulation. *Med Biol Eng Comput* 2004; 42: 787–798.
- [8] Wang Yao, Kyoko Yoshida, Michael Fernandez, Joy Vink, Ronald J. Wapner, Cande V. Ananth, Michelle L. Oyen, Kristin M. Myers. Measuring the compressive viscoelastic mechanical properties of human cervical tissue using indentation *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* Volume 34, June 2014, Pages 18-26
- [9] MacManus D, Gilchrist M, Murphy J. An empirical measure of nonlinear strain for soft tissue indentation. *Royal Society Open Science* [serial online]. n.d.;4(11) Available from: Science Citation Index, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.
- [10] D.M. Ebenstein, L.A. Pruitt. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues 2004 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 69A: 222–232, 2004
- [11] H. Hertz, "Über die Berührung fester elastischer Körper," 1882.

[12] I. N. Sneddon, "The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile," *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, pp. 47-57, 1965.

[13] Liu, D., Zhang, Z., & Sun, L. (2010). Nonlinear elastic load–displacement relation for spherical indentation on rubberlike materials. *Journal of Materials Research*, 25(11), 2197-2202. doi:10.1557/jmr.2010.0285

[14] Y. C. Fung, *Biomechanics Mechanical Properties of Living Tissues*, Springer Science Business Media, LLC.



### **3.4 Liquid environment spherical depth sensing indentation: toward the mechanical characterization of living tissue. (Invited Paper SIPS 2018 / ZEHETBAUER INTERNATIONAL SYMPOSIUM)**

Jean-Philippe JEHL<sup>1</sup>; PABLO MAUREIRA<sup>2,3</sup>; RICHARD KOUITAT NJIWA<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Université de Lorraine, Institut Jean Lamour - Dpt N2EV -UMR 7198, Nancy, France;

<sup>2</sup>CHRU, Department of Cardio-Vascular Surgery, Nancy, France;

<sup>3</sup>Université de Lorraine, INSERM, U961, Université de Lorraine, Nancy, France;

#### **3.4.1 Summary:**

The mechanical properties of biological tissues are well-known as playing a crucial role in our study of healthy and pathological organs. Understanding these properties is necessary for many different applications. Take, for example, the improvement of bench-top models used in simulated surgical procedures [1, 2], specialized neo-tissue engineering [3] or imaging-based differentiation between healthy and pathological tissues based on their response to external stimuli [4]. In this study, we focus on cardiac tissue, presenting the results of an instrumented indentation experiment in a liquid environment [5]. We demonstrate it is possible to reveal the variations in elasticity according to how the contact is directed on the sample.

Key words: mechanical properties, characterization, instrumented indentation, cardiac tissue.

### **3.4.2 Introduction:**

Over the last few years, modeling the properties of biological tissues has become a major goal for a great number of researchers around the world. Some models do not take into account the tissue's microstructure and assume the material is homogenous. Specifically concerning cardiac tissue, a new schematization was proposed by Fung [6], which clearly demonstrated the tissue's fibrous property, while Hervé Lombaert has presented an exhaustive mapping of how cardiac tissue fibers are oriented [7].

Due to its inherent anisotropy, this type of tissue requires a rethinking of its potential mechanical properties, using an adapted experimental method. In order to understand the effects of these fiber orientations, nanoindentation can be used, enabling the simultaneous analysis of significantly smaller zones thanks to the (i) large range of loads they can apply, (ii) variety of displacements they can measure, and (iii) the geometry of points they use. This type of test was notably used by D. MacManus [8] in order to measure different regions of the aorta. In this study, we focus on characterizing the properties of porcine heart tissue, proposing (i) a pre-study on the impact of devascularizing cardiac tissue *in vitro* on the variations in its mechanical properties, and (ii) an analysis of measurements taken *in vitro* of the lateral region of the left ventricle following two directions of contact. Our analyses of the generated curves apply the non-conforming contact theory [9].

### **3.4.3 Materials and methods:**

The samples used in this study were extracted from three pig hearts. This type of sample is prone to dry out quickly and has a limited lifespan. In order to guarantee integrity, we thus followed this strict methodology: (i) immerse the heart in a protective medium, (ii) rapidly freeze at -80°C, (iii) perform cytological slices of 100 µm thickness, and (iv) keep frozen.



The samples were extracted from the left ventricle, specifically the lateral region, along two primary angle axes (long axis and short axis), as shown on the schematic illustration in Figure 1. We will henceforth use the terminology of LVLA (left ventricular long axis) and LVSA (left ventricular short axis) samples.

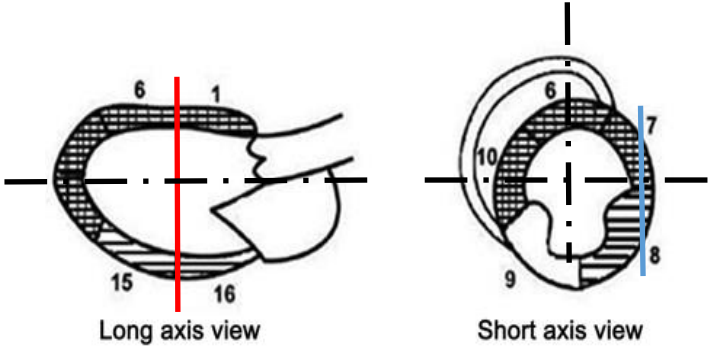


Figure 1: Mapping of different heart zones with sample slice sections along the short axis in red and long axis in blue

A series of 25 indentations were systematically performed on all samples. Each indented site was labelled and microscopically analyzed, as shown in Figure 2. The contact surface disc generated by indentations did not exceed a radius of 30  $\mu\text{m}$ . The load and unload speeds were intentionally kept low, enabling us to generate cardiac tissue elasticity as well as reversible deformations, avoiding any interference from neighboring indentations. The distance between each indentation was 100  $\mu\text{m}$ .

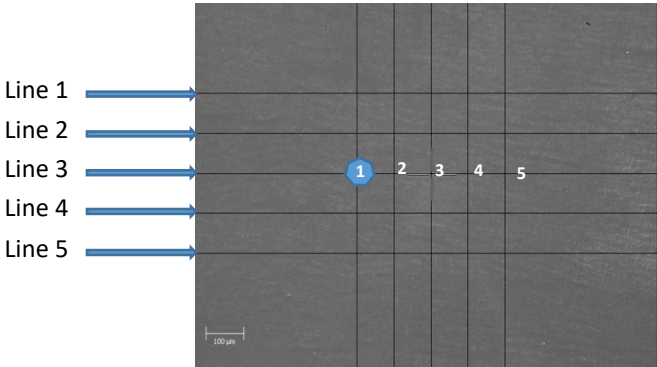


Figure 2: representation and identification of indented sites on micrograph following 25 indentations

### 3.4.4 Results:

#### 3.4.4.1 Analysis of an LVLA sample:

A minimum of 25 indentations were performed using the same load on each sample analyzed. The analysis method described above was employed for each indentation curve. The moduli produced by this analysis are presented in Table 1.

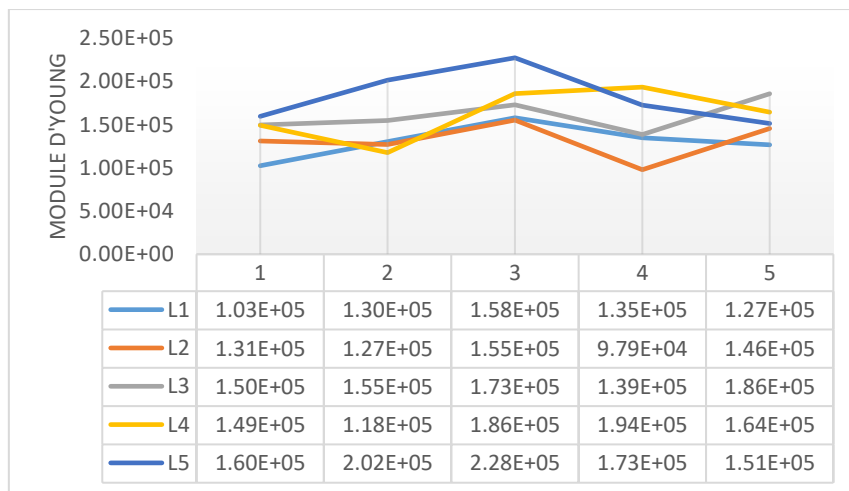
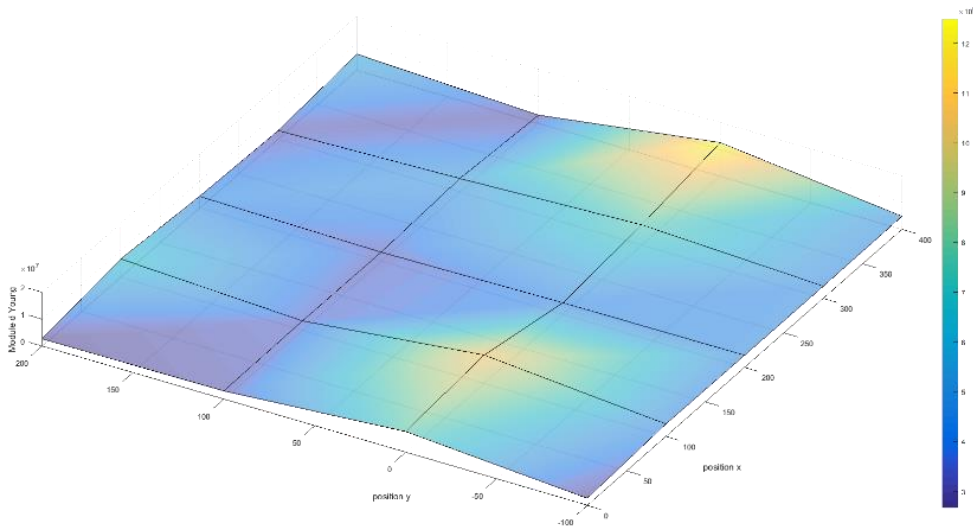


Table 1: Reduced Young's moduli from 25 indentation curves on a cardiac tissue sample

The mean modulus of the porcine heart samples cut from the lateral left ventricular region along the long axis was 0.15 MPa, with a dispersion of 0.06 Mpa (Fig. 6-a). In order to explain these dispersions, we generated a graphical representation of the reduced Young's moduli according to where the indentation was performed. This revealed that the same areas repeatedly and frequently generated a response (Fig. 6-b).

These periodic repetitions indicate the presence of a network-type structure compatible with the fibrous structure of cardiac tissue.



*Figure 6: topography of reduced Young's moduli of 25 indentations performed on a sample of pig heart extracted from the lateral region of the left ventricle along the long axis and indented along the short axis*

#### **3.4.4.2 Analysis of the impact of devascularizing cardiac tissue *in vitro* on its mechanical property variations:**

In this type of study, one known drawback is biological tissues tendency to deteriorate in terms of mechanical properties following total or partial devascularization. It is therefore crucial we recorded how long our samples retained their properties *in vivo*. Three samples were measured over a 10-hour period following the method described above.

Figure 7 illustrates the increase in reduced Young’s modulus observed in the cardiac tissue after 4 hours of experimentation in a liquid environment.

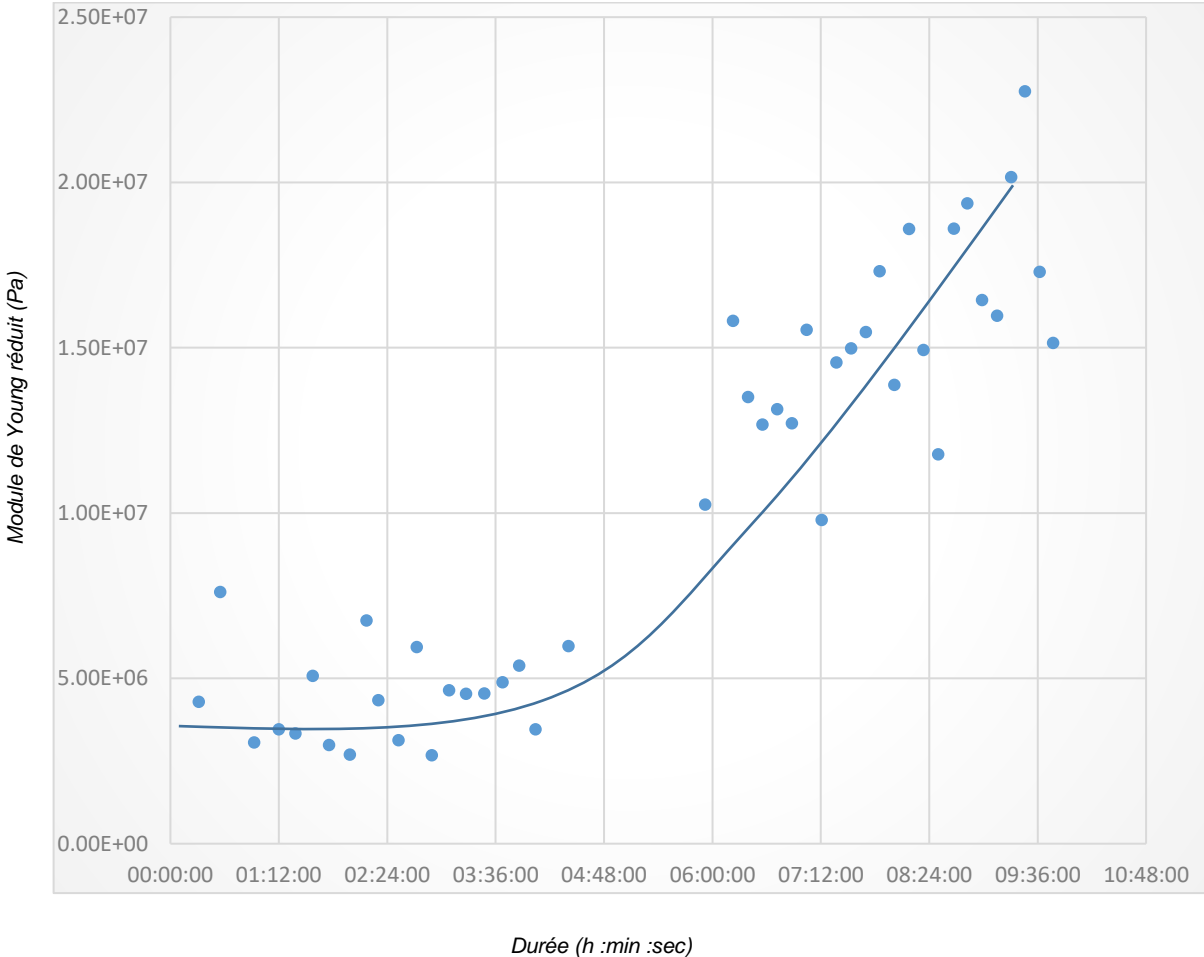


Figure 7: Evolution of reduced Young’s moduli after 50 indentations measured over a 10-hour period

The moduli increased until 10 hours into the experiment, when the values stabilized. The reduced Young’s modulus increased from an initial mean value of 4.84 MPa to 87 MPa after 10 hours.

In addition to this observed increase in rigidity, we also found that the dispersion increased by 6 MPa (Fig. 8).

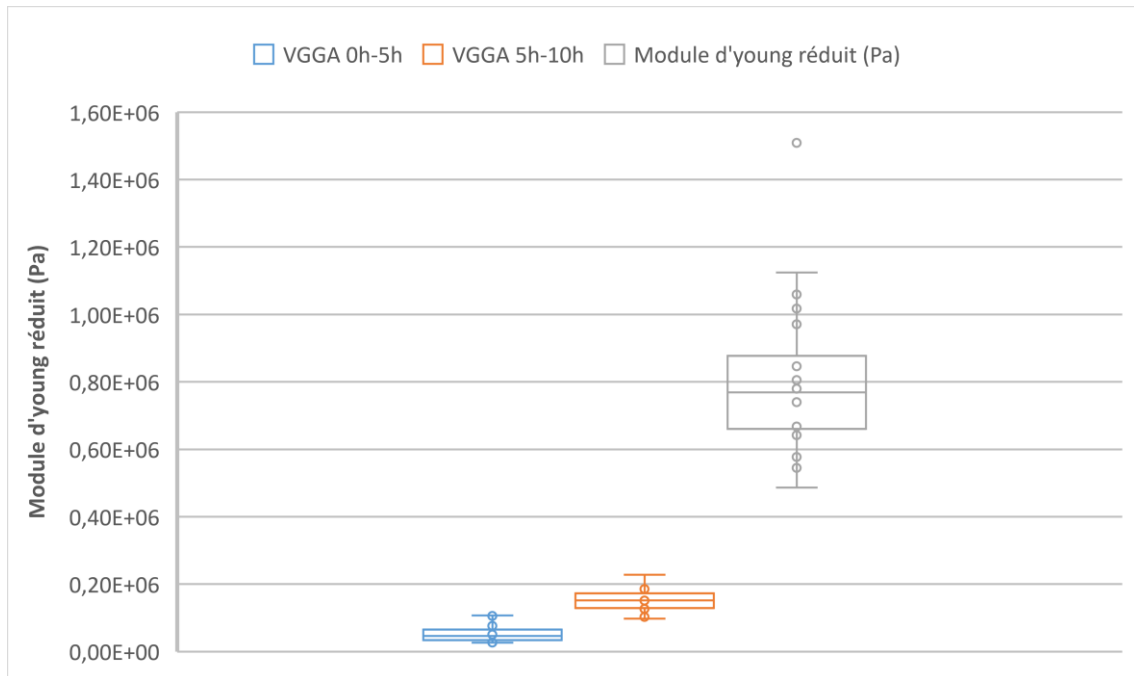


Figure 8: Means and dispersions of Young's moduli for three series of 25 indentations measured over 15 hours

### 3.4.4.3 Comparisons of in vitro properties of left ventricular heart tissue following two different orthogonal manipulation directions

Cardiac tissue is known for its fibrous nature, and this particular series of measurements was designed to quantify the influence of these fibers' orientation on the tissue's properties. The measurements were taken from the samples cut from the LVLA and LVSA. Comparisons were made between samples from the same heart to avoid bias associated with inter-individual differences. The tests on each sample lasted less than 2 hours, thus respecting the maximum useful sample duration we defined previously, halved for safety reasons.

The results produced clearly revealed there were two distinct groups of measurements (Fig.8). The mean reduced Young's modulus of the LVSA samples (0.38 MPa) was double that of the LVLA samples (0.13 MPa).

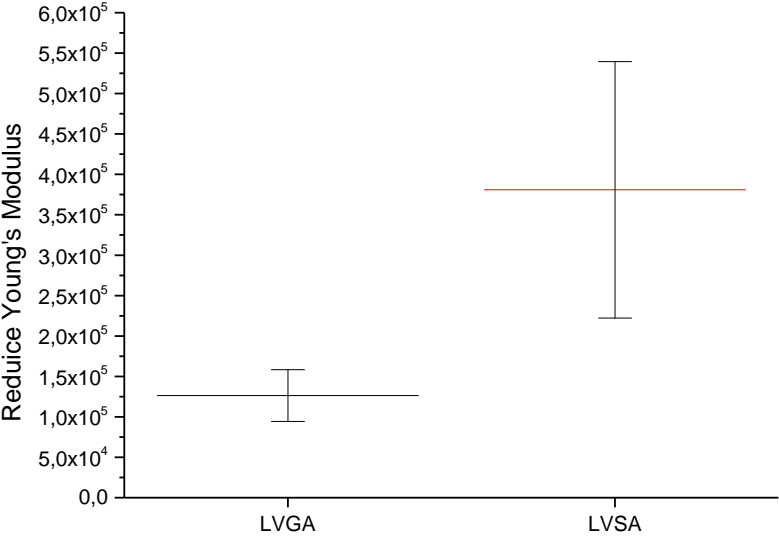


Figure 8: Means and dispersions of Young's moduli of porcine heart tissue sampled from the lateral region of the left ventricle along two different perpendicular directions

In order to estimate the orientation of fibers in the indented samples, we performed microscopic analyses (Fig. 9 a - b). This enabled us to demonstrate the different tissue structures according to the two different slice angles.

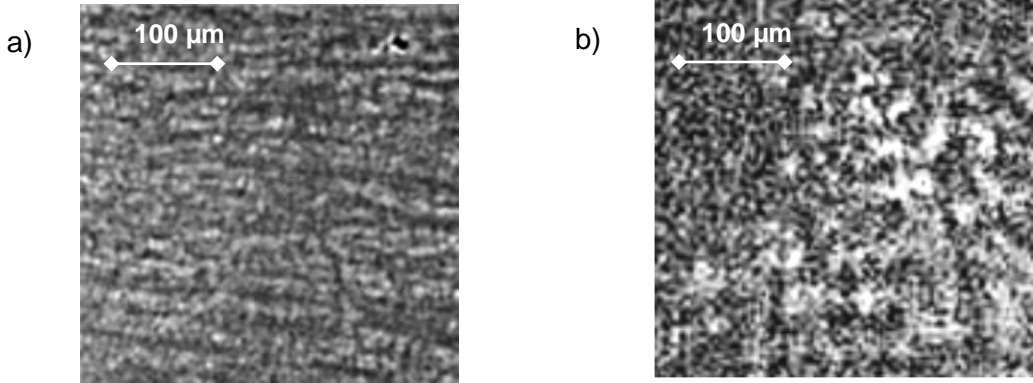


Figure 10: Microscopic analyses of porcine heart samples taken from the lateral region of the left ventricle, along the a) long axis (LVLA) and b) short axis (LVSA)

Reference optical microscopic analyses from cytological slices are presented in Figure 11. Figure 11-a enables the fibrous muscle tissue of the heart to be clearly distinguished in longitudinal axis view, showing short, multiple branches and central stubby nuclei. In Figure 11-b, the cardiac muscle cells are sliced along the transversal axis, in circular cross-sections with central nuclei. The cardiac muscle fibers are cylindrical yet branch out in short extensions enabling anastomosis to neighboring fibers. Each fiber is short, measuring between 100 and 150  $\mu\text{m}$  with a diameter of 15-20  $\mu\text{m}$ .

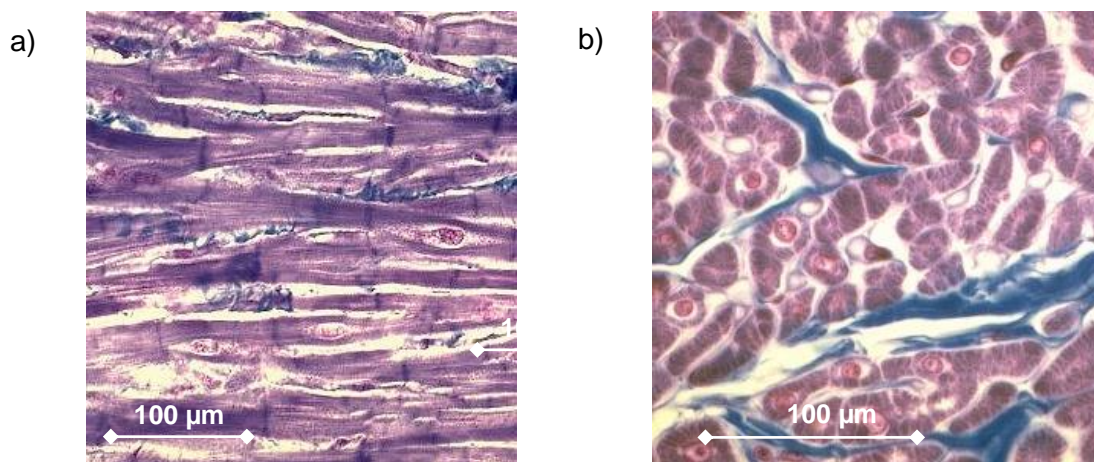


Figure 11: Microscopic imaging of reference for cardiac tissue sliced a) longitudinally (long axis) and b) transversally (short axis)

By comparing the reference microscopic imaging in Figures 11-a and 11-b with those of indented samples, we were able to estimate that the LVLA sample would comprise longitudinally-oriented fibers and the LVSA transversally-oriented fibers. These observations are notably in line with the fiber orientation mapping performed by Hervé Lombaert [7].

### 3.4.5 Discussion:

Cardiac tissue exhibits a certain elasticity when indented at very shallow depths with low load speeds. Given these characteristics, it seems justified to apply the theory of non-conforming contact. This classic formula (Hertz theory) enables an accurate representation of the indentation test, yet is limited to a small area and loads under 500  $\mu\text{N}$ . This constraint can be overcome by applying the non-conforming contact theory developed in this study, which provides strong correlation with experimental curves (Fig. 5).

The results we obtained from our analysis of how devascularizing cardiac tissue *in vitro* impacts on the variations in its mechanical properties enabled us to estimate the maximal time span during which samples can be used (between 2 and 4 hours). We were also consequently able to draw correlations between the apparent rigidity of tissue and its devascularization duration. This characterization method could thus be compared to dating techniques used in forensic medicine.

Our comparison of measurements taken from the left ventricle along two major differing axes (long and short axis) revealed different mechanical properties. These results confirm the anisotropic nature of cardiac tissue in the lateral region of the left ventricle. This anisotropy, when combined with cardiac tissue's particular structure, and especially considering the orientation of its fibers, could account for the different measurements we obtained in two different samples. In order to confirm this finding, more samples were taken following a localized reference point linked to the fiber orientation in different regions of the heart.

### **3.4.6 Conclusion**

Despite biological tissues possessing viscoelastic properties [6] yet not being described as purely elastic, our study demonstrated that the contact theory adapted to soft tissue enables a reasonably accurate estimation of mechanical properties. This study enabled us to measure and compare different samples of porcine heart tissue sliced from the lateral region of the left ventricle along either the large or short axis. These preliminary findings confirm the anisotropic nature of cardiac tissue. The complexity of its fibrous structure forced us to first perform microscopic analyses before commencing indentation tests in order to determine the orientation of the tissue fibers. The analysis of the indentation curves combined with observations of the sample's fiber orientation thus aided us in characterizing the cardiac tissue following a localized reference point. Different areas of the heart should now be measured to improve our knowledge of healthy, and consequently pathological, cardiac tissue.



### 3.4.7 Acknowledgements

The authors wish to thank the School of Surgery of Nancy, France (*Ecole De Chirurgie de Nancy*) for preparing the samples, as well as the virtual FEDER hospital project of Lorraine, France (*FEDER-Etat-Région Hôpital Virtuel de Lorraine*) for their valuable participation and support.

### 3.4.8 References:

- [1] Misra S, Ramesh KT, Okamura AM. Modeling of tool-tissue interactions for computer-based surgical simulation: a literature review. *Presence-Teleop Virt* 2008; 17: 463–491.
- [2] Perrenot C, Perez M, Tran N, Jehl J-Ph, Felblinger J, Bresler L, Hubert J. The virtual reality simulator dV-Trainer® is a valid assessment tool for robotic surgical skills. *Surgical Endoscopy* September 2012, Volume 26, Issue 9, pp 2587-2593
- [3] Fung YC. Stress, strain, growth, and remodeling of living organisms. In: Casey J, Crochet MJ, editors. *Theoretical, experimental, and numerical contributions to the mechanics of fluids and solids*. Basel/Switzerland: Birkh.user Verlag 1995: 469–482.
- [4] J-Ph. Jehl and R. Kouitat Njiwa. A (Constrained) Microstretch Approach in Living Tissue Modeling: a Numerical Investigation Using the Local Point Interpolation – Boundary Element Method. *Computer Modeling in Engineering & Sciences*, Vol.102, No.5, 2014
- [5] J-Ph. Jehl, A.Voignier, R. Kouitat. On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue. 2016 Sustainable Industrial Processing Summit
- [6] Y. C. Fung, *Biomechanics Mechanical Properties of Living Tissues*, Springer Science Business Media, LLC.
- [7] Herve Lombaert, Jean-Marc Peyrat, Pierre Croisille, Stanislas Rapacchi, Laurent Fanton, Farida Cheriet, Patrick Clarysse, Isabelle Magnin, Hervé Delingette, and Nicholas Ayache. Human Atlas of the Cardiac Fiber Architecture: Study on a Healthy Population. *IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING*, VOL. 31, NO. 7, JULY 2012
- [8] MacManus D, Gilchrist M, Murphy J. An empirical measure of nonlinear strain for soft tissue indentation. *Royal Society Open Science* [serial online]. n.d.;4(11) Available from: Science Citation Index, Ipswich, MA. Accessed May 17, 2018.

- [9] H. Hertz, "Über die Berührung fester elastischer Körper," 1882.
- [10] Liu, D., Zhang, Z., & Sun, L. (2010). Nonlinear elastic load–displacement relation for spherical indentation on rubberlike materials. *Journal of Materials Research*, 25(11), 2197-2202. doi:10.1557/jmr.2010.0285
- [11] I. N. Sneddon, "The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile," *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, pp. 47-57, 1965.
- [12] R Kouitat-Njiwa, Jürgen Von Stebut. Boundary element numerical analysis of elastic indentation of a sphere into a bi-layer material. *International Journal of Mechanical Sciences* Volume 45, Issue 2, February 2003, Pages 317-324

## Chapitre 4

Vers un modèle comportemental d'une bio-prothèse compatible avec le tissu cardiaque



# Table des matières

<b>4</b>	<b>VERS UN MODELE COMPORTEMENTAL D'UNE BIO-PROTHESE COMPATIBLE AVEC LE TISSU CARDIAQUE</b>	<b>109</b>
4.1	PREAMBULE.....	109
4.2	INTRODUCTION.....	109
4.3	TRANSVERSE ISOTROPIC MODELLING OF LEFT-VENTRICLE PASSIVE FILLING: MECHANICAL CHARACTERIZATION FOR EPICARDIAL BIOMATERIAL MANUFACTURING .....	111
4.3.1	<i>Abstract</i> .....	111
4.3.2	<i>Introduction</i> .....	112
4.3.3	<i>Materials and methods:</i> .....	114
4.3.3.1	Pig cardiac tissue sample preparation: .....	114
4.3.3.2	Microscopic observation of muscle fiber orientation:.....	116
4.3.3.3	Indentation evaluation at different levels of the left ventricle: .....	116
4.3.3.4	Measurement of Young's modulus and sample fiber orientation:.....	116
4.3.3.5	Finite Element Analysis of left ventricle model .....	118
4.3.3.6	Mechanical evaluation of a transverse isotrope model by FEM.....	119
4.3.4	<i>Results:</i> .....	119
4.3.4.1	Young's modulus and fiber orientation of left-ventricle lateral region: .....	119
4.3.4.2	Construction of whole left-ventricle model using Finite Element Method .....	121
4.3.4.3	Mechanical evaluation of the numerical model of the left ventricle .....	123
4.3.5	<i>Discussion</i> .....	125
4.3.6	<i>Conclusion</i> .....	127
4.3.7	<i>Acknowledgements</i> .....	128
4.3.8	<i>Funding</i> .....	128
4.3.9	<i>References:</i> .....	128
<b>5</b>	<b>DEPLOIEMENT DE LA METHODE DE CARACTERISATION POUR UN TISSU BIOLOGIQUE COMPLEXE : L'OS CORTICAL .....</b>	<b>135</b>
5.1	PREAMBULE.....	135
5.2	INTRODUCTION.....	135
5.3	TITLE: SPHERICAL DEPTH-SENSING NANOINDENTATION OF HUMAN ANTERIOR SKULL BASE BONES: ESTABLISHMENT OF A TEST PROTOCOL .....	136
5.3.1	<i>Abstract</i> .....	136
5.3.2	<i>Introduction</i> .....	137
5.3.3	<i>Material and methods</i> .....	139
5.3.3.1	ASB samples .....	139

5.3.3.2	Micro-CT imaging .....	139
5.3.3.3	Spherical depth-sensing nanoindentation.....	140
5.3.4	<i>Data analysis</i> .....	142
5.3.5	<i>Ethical considerations</i> .....	144
5.3.6	<i>Results</i> .....	144
5.3.7	<i>Discussion</i> .....	147
5.3.8	<i>Conclusion</i> .....	151
5.3.9	<i>Acknowledgments</i> .....	152
5.3.10	<i>Funding</i> .....	152
5.3.11	<i>References</i> .....	152
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....		<b>157</b>

# Vers un modèle comportemental d'une bio-prothèse compatible avec le tissu cardiaque

## **4.1 Préambule**

Ce chapitre présente une application des travaux de caractérisation du tissu cardiaque. Au cours des dernières années, on a constaté une augmentation progressive de la précision de modèles de comportement mécanique et de la détermination de propriétés mécaniques du muscle cardiaque. Cependant, une bonne étude de modélisation comparative tend à inclure de nouvelles données expérimentales basées sur des changements particuliers des propriétés mécaniques et de l'orientation du muscle dans diverses régions spécifiques du cœur, à savoir la base, le milieu et l'apex du ventricule gauche (VG). Nous avons fait le choix de présenter ces travaux, intitulés « Transverse isotropic modelling of left-ventricle passive filling: mechanical characterization for epicardial biomaterial manufacturing » publiés dans le *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.

## **4.2 Introduction**

Malgré des progrès indéniables dans la compréhension de la fonction cardiaque et dans l'amélioration des techniques médicales et chirurgicales, l'insuffisance cardiaque ischémique représente toujours en 2020 une cause majeure de mortalité dans le monde et son pronostic reste difficile à établir. Dans ce contexte, de nouvelles approches thérapeutiques, telles que la médecine régénérative et le génie tissulaire sont développées pour compenser les dommages causés par cette maladie. Cependant, le génie tissulaire n'en est encore qu'aux balbutiements. La médecine régénérative et le génie tissulaire associés à la caractérisation mécanique des tissus cardiaques sain et malade devraient aider à améliorer leur efficacité.





## **4.3 Transverse isotropic modelling of left-ventricle passive filling: mechanical characterization for epicardial biomaterial manufacturing**

Jean-Philippe Jehl<sup>1</sup>; Pan Dan<sup>1,3</sup>; Arnaud Voignier<sup>1</sup>; Nguyen Tran<sup>4</sup>; Thierry Bastogne<sup>2,5</sup>; Pablo Maureira<sup>3,4</sup>; Franck Cleymand<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, IJL, F- 54000 Nancy;

<sup>2</sup>Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F- 54500 Vandœuvre-lès-Nancy;

<sup>3</sup>CHRU de Nancy, Department of Cardio-Vascular Surgery, F- 54000 Nancy;

<sup>4</sup>Université de Lorraine, INSERM, U961, F- 54000 Nancy;

<sup>5</sup>INRIA BIGS, F- 54000 Nancy.

### **4.3.1 Abstract**

Biomaterials applied to the epicardium have been studied intensively in recent years for different therapeutic purposes. Their mechanical influence on the heart, however, has not been clearly identified. Most biomaterials for epicardial applications are manufactured as membranes or cardiac patches that have isotropic geometry, which is not well suited to myocardial wall motion. Myocardial wall motion during systole and diastole produces a complex force in different directions. Membrane or cardiac patches that cannot adapt to these specific directions will exert an inappropriate force on the heart, at the risk of overly restricting or dilating it. Accurately characterizing the mechanical properties of the myocardial wall is thus essential, through analysis of muscle orientation and elasticity. In this study, we investigated the Hertz contact theory for characterizing cardiac tissue, using nanoindentation measurements to distinguish different patterns in the local myocardium. We then evaluated the predictive accuracy of this model using Finite Element Analysis (FEA) to mimic the diastolic phase of the heart. Our results, extracted from instrumented nanoindentation experiments in a liquid environment using five pig hearts, revealed variations in elasticity according to the local orientation of the myocardial tissue. In addition, applying the Finite Element Method (FEM) in our model based on transverse isotropy and local tissue orientation proved able to accurately simulate the passive filling of a left ventricle (LV) in a representative 3D geometry. Our model

enables improved understanding of the underlying mechanical properties of the LV wall and can serve as a guide for designing and manufacturing biomedical material better adapted to the local epicardial tissue.

**Keywords:** cardiac tissue, muscular fibers, transverse isotropic behavior, biomechanical modeling, finite element method.

### 4.3.2 Introduction

Biomedical materials for epicardial application have been extensively investigated over the past decades, with several different types of these materials having become clinically available (Gaetani et al., 2015; Pattar et al., 2019). Epicardial biomedical materials are usually designed as thin membranes containing diverse biological or mechanical properties and applied directly onto the target epicardial region. In general, these epicardial biomaterials can be used as hemostatic patches, creating an interface to prevent severe tissue adhesion following cardiac surgery, or as cardiac patches delivering cell therapy following myocardial infarction. However, research in this field has focused primarily on the biological or therapeutic behavior of these biomaterials, largely ignoring analysis of how they interact mechanically with the heart.

Once the biomedical material is adhered to the epicardium, however, it sustains the same cyclic strain and shear stress caused by the heart beating as the epicardium. The muscle fiber structure also differs from one area to another, thus exerting mechanical force in different directions during heart circulation, as well as at different locations (Bayer et al., 2012; Lombaert et al., 2012). However, only a few biomaterials are designed considering the myofiber orientation and structural specificity of cardiac tissue (Cui et al., 2020). Most epicardial biomaterials are manufactured as isotropic membranes, which cannot adapt to the specific muscle fiber structure of the heart, thus potentially applying inappropriate force to the epicardium, which could eventually cause a restriction or dilation effect on the heart.

Characterizing the mechanical properties of the heart wall, and particularly of the left ventricle, is thus of major importance for epicardial biomaterial design (Weinberger et al., 2017). The fibrous nature of the heart has long been known, and the spatial variation within the heart's fibers has already been described, with computational models established accordingly. It is also well known that the muscle fascicles of the myocardium are arranged in three main directions, forming three muscle layers within the ventricular wall from the epicardium to the endocardium (Sánchez-Quintana et al., 1994). The combined effect of these differently-

oriented fibers on the ventricular wall can generate an average direction, and this direction varies from the apex to the aortic root (Freeman et al., 1985).

An ideal epicardial biomaterial should, instead, expand in the same way as the local epicardium. Due to the complex wall motion in play here, epicardial biomaterials should closely match the target zone of the heart, which means offering a similar elasticity and fiber structure. Thus, understanding the mechanical performance of the diastolic ventricle can guide advances in the design and manufacturing of epicardial biomaterials. For this purpose, a heart model with mechanical characterization during diastole could serve as an invaluable tool.

Furthermore, heart simulation models are also of great importance in medical research and training. Given the complex composition of the heart on both macroscopic and microscopic scales, it is hard to establish a model that can perfectly simulate all aspects of the heart, including the mechanical movement, electric activity, and pump function. Studies from the literature have so far focused on only one aspect of the heart, primarily contributing to advances in cardiology (Niederer et al., 2019).

Woods was a pioneer in using models to understand cardiac physiology and mechanics. In his study, the stress in the heart wall was considered as a thin-walled spherical shell (Woods, 1892). Modelling has since progressed to simulate in detail the anatomical and physiological complexities of the heart, and geometric models have been developed containing multiscale information of the heart (Chabiniok et al., 2016).

It is now well known that cardiac muscle fibers run in parallel and form a 3D network enabling the heart wall's complex motion during the cardiac cycle. Thus, for a better understanding of heart function, the anatomical architecture of these cardiac fibers should first be described. Three-dimensional models of myocardial architecture have been built up from detailed histological studies in the 1990s (Guccione et al., 1995; LeGrice et al., 1995). Since then, the development of invasive and non-invasive imaging techniques, such as CT and magnetic resonance imaging, has made it possible to construct patient-specific models of the beating heart to simulate its dynamics (Gilbert et al., 2012; Plank et al., 2009). However, the lack of detailed tissue structure information in significant amounts of image data still constitutes a significant failing in computational models and could influence model results.

Various numerical frameworks of heart architecture have been described in previous studies, based on different modeling methods (Chabiniok et al., 2016; Niederer et al., 2019). Benefitting from 3-dimensional cardiac imaging techniques, many authors have been able to build 3D models of the heart illustrating detailed fiber structures (Wang et al., 2021). Furthermore, powerful numerical tools now enable the construction and evaluation of models based on collected data. These numerical models are widely used in clinical and educational settings.

For example, Finite Element Analysis (FEA) is a popular method for building and evaluating heart models with more detailed mechanical characterization (Martonová et al., 2021; Morgan et al., 2016). However, no study has yet presented the physical results of such simulations, such as overall local elasticity of the spatial arrangement of cardiac fibers. In this study, we evaluated the average fiber orientation and elasticity of the lateral part of the left ventricular wall in healthy pig hearts. We then built a numerical 3D model based on the obtained results, providing a simplified illustration of the complex fiber arrangement. We evaluated the method's accuracy by simulating the diastole phase of a left ventricle.

### **4.3.3 Materials and methods:**

#### **4.3.3.1 *Pig cardiac tissue sample preparation:***

The samples used in this study were extracted from five healthy pig hearts provided by the School of Surgery of the University of Lorraine. Ethical approval for the study was obtained from our university's ethics committee (committee number: 201922016556026) and then further validated by the French Ministry of Higher Education. The hearts were explanted during diastole for this study. One pig's heart was fully filled with 0.9% sodium chloride and sealed to mimic the end of passive filling during diastole. We then performed computed tomography (CT) and 3D reconstruction of the heart. To prevent the cardiac tissue from drying out, the samples were rapidly immersed in a protective medium (optimal cutting temperature compounds) and frozen at -80°C. For each heart, the lateral region of the left ventricular wall was selected for obtaining reproductive data (Figure 1A) and a 0.5-cm wide slice was extracted from the long axis (Figure 1B). The extracted tissue was then cut into 16 cytological slices, horizontally from the base to the apex of the heart, in two different thicknesses (100 µm and 10 µm, eight slices each) using a cryomicrotome, and stored frozen. The thicker slices were used later for mechanical characterization while the thinner ones served for muscle fiber structure observation.

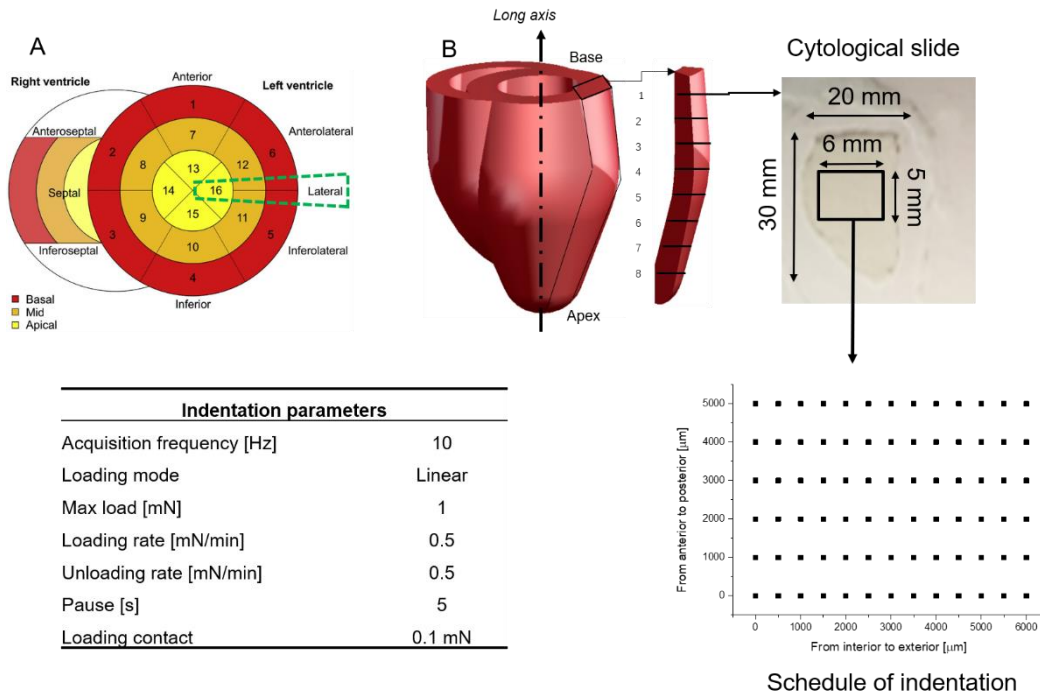


Figure 1: A. A 0.5-cm wide slice was extracted from the lateral region of the left ventricle of each heart (green dash). B. Eight 100- $\mu\text{m}$  and eight 10- $\mu\text{m}$  slices were obtained from the longitudinal axis of the left ventricle, from the base to the apex. Slices of 100- $\mu\text{m}$  thickness were used for indentation testing, 13x6 points were detected on each sample following the above planning and indentation parameters

#### **4.3.3.2 Microscopic observation of muscle fiber orientation:**

Heart samples cut to 10- $\mu\text{m}$  thickness were stained with DAPI (D9542, Sigma-Aldrich), for the nuclei, and Phalloidin (P5282, Sigma-Aldrich), for the actin, as per manufacturer's instructions. Imaging was performed using fluorescent microscopy (Moticam 3000, Motic).

#### **4.3.3.3 Indentation evaluation at different levels of the left ventricle:**

The mechanical properties of the specimen were determined using a depth sensing indentation test. An ultra nanoindenter was used (ANTON-PAAR, Peseux, Switzerland), affording a penetration range of a few nanometers to 100  $\mu\text{m}$ , using loads of 10  $\mu\text{N}$  to 100 mN. The depth and load resolution were 0.003 nm and 0.01  $\mu\text{N}$ , respectively. This tool is well suited to testing on biological materials in liquid medium, incorporating a sample holder adapted for biological tissue slices. This technique involves indenting the tissue using a spherical indenter of 100- $\mu\text{m}$  radius ( $R$ ). Just before we commenced mechanical tests to determine the properties of the cardiac tissues, the specimens were thawed then soaked in physiological serum to avoid any dryness or premature destruction. To ensure that the tissue remained properly hydrated, the sample was kept in physiological serum during the entire depth-sensing procedure. The experiments were carried out at room temperature (21°C). A 13x6 matrix of indentations was systematically performed on each specimen (78 measures). Each indented site was identified and microscopically analyzed. The contact surface disc generated by indentations did not exceed a radius of 30  $\mu\text{m}$ . The load and unload speeds were intentionally kept low so as to guarantee the elasticity behavior of the cardiac tissue. Our previous experimental protocol showed that indentation speed inferior or equal to 0.5mN/min allow a measurement of elasticity behavior other than viscoelasticity behavior. Furthermore, a 500- $\mu\text{m}$  distance was maintained between each indentation to avoid any interference from neighboring indentations (Figure 1B).

#### **4.3.3.4 Measurement of Young's modulus and sample fiber orientation:**

For the heart samples cut to 100- $\mu\text{m}$  thickness, Young's modulus was calculated based on the Hertz theory formula outlined below. We designed a strategy enabling us to define the range of values on commencing the load for which the Hertz theory can be applied. As a brief reminder, this theory establishes the relationship between the force applied ( $F$ ), the relative approach distance of the two elements ( $h$ ), and the radius of the disc contact area ( $a$ ) (1).

These formulae also involve the radius of the indenter's curve ( $R_c$ ) and the mechanical characteristics of the sample and indenter, *i.e.* their Young's moduli and Poisson ratios, using the reduced elasticity modulus, defined by Formula (3).

$$h = \left( \frac{9 \cdot F^2}{16 \cdot R_c \cdot E^{*2}} \right)^{1/3} \quad (1)$$

with the bend radius  $R_c$  defined as:  $\frac{1}{R_c} = \frac{1}{R_i} + \frac{1}{R_s}$  (2)

and the reduced Young's modulus  $E^*$  given by:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i} \quad (3)$$

In these equations,  $E, \nu, R_s, E_i, \nu_i$ , and  $R_i$  are the Young's moduli, the Poisson ratios, and the bend radius of the sample and the indenter, respectively.

Given that all samples had a defined thickness, the variation in Young's modulus was caused by variations in the fiber orientation. According to the mechanism of cardiac muscle contraction, the Young's modulus is minimal when the fibers are orientated vertically and maximal when horizontally. Thus, the fiber orientation is calculated according to the measured Young's modulus.

With a spherical indenter radius  $R_i \ll R_s$  (plane sample), the equation (2) became  $R_c = R_i$ . Moreover, the diamond indenter's Young's modulus was higher than the sample one ( $E_i \gg E$ ). Thus, equation (3) became  $E^* = E / (1 - \nu^2)$ .

Given the liquid medium used and the uncertainties associated with measurement using very low loads, we developed a strategy for exploring the initial moments of indentation. It enabled us to define the range of validity of (4) (contact point and end point of the applied Hertz Theory) while simultaneously determining the reduced Young's modulus  $E^*$ . For each test, data pairs  $(F, h)$  were first generated then equation (4) was used to identify the material's characteristics. This equation is a Hertz logarithmic formulation that enables identification of the parameters of a linear function (Figure 2).

$$\ln(F) = \frac{3}{2} \ln(h) + \frac{1}{2} \ln \left( \frac{9}{16 \cdot R \cdot E^{*2}} \right). \quad (4)$$

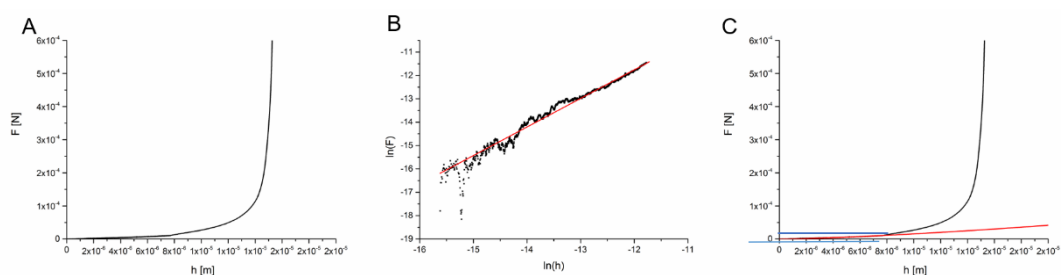


Figure 2. Example of optimization of indentation on one detected point. (A) Charging indentation curve obtained from detection. (B) Transformation of the experimental data of (A) into logarithmic curve (black), with a linear regression (red) obtained by applying Formula (4). (C) Reversal of the logarithmic curve issued from (B, red) into classical curved and crossmatch with experimental curve (black) to determine the optimized parameters

The indenter output a continuous value of elasticity within the indentation depth, the initial point was determined once an elasticity behavior was detected. As too deep detection was influenced by the underlying glass support ( $F$  increased sharply while  $H$  was beyond  $15\mu\text{m}$ ), the indentation had to be optimized. In order to obtain the optimal detection parameter, the experimental indentation curve of every point of detection was crossmatched with the theoretical curve (applying Hertz theory) to determine the individual  $h_{\text{max}}$  ( $8\mu\text{m}$  as indicated by the cross point, in the case of Figure 2). A regular limit of the deformation  $(h/R)^{1/2}$  under 30% was observed.

#### 4.3.3.5 Finite Element Analysis of left ventricle model

The 3D-reconstructed image of the heart from CT was transferred to Abacus software. Based on the measured Young's modulus and average fiber orientation, FEA was applied to obtain the left ventricle (LV) model for the diastole simulation (LV passive phase). A tetrahedral quadratic mesh with 122170 nodes, of global size 4, and 83949 linear elements, was applied.

In order to test the feasibility of this numerical model's mechanical evaluation, a simplified model was also constructed according to the CT measurement: the left ventricle was represented by a hollow cylinder with internal and external radii equal to 20 mm and 40 mm, respectively. The tubular height was 110 mm. A tetrahedral quadratic mesh with 94433 nodes, of global size 4, and 66492 linear elements, was applied.



#### 4.3.3.6 Mechanical evaluation of a transverse isotrope model by FEM

The volume in the left ventricle increases during diastole phase and is correlated with the internal pressure. This heart cycle is known as the pressure-volume loop. Using the two numerical left-ventricle models, we progressively increased the internal pressure until a level equivalent to the end of passive diastole filling in order to evaluate the change in volume. The diastolic movement of the left-ventricle wall was also recorded.

### 4.3.4 Results:

#### 4.3.4.1 Young's modulus and fiber orientation of left-ventricle lateral region:

The Young's modulus detected in the samples revealed the minimum value was  $1 \times 10^4$  Pa, and maximum value  $2.5 \times 10^5$  Pa. The fiber orientation was thus defined as vertical ( $90^\circ$ ) at the point of  $1 \times 10^4$  Pa and horizontal ( $0^\circ$ ) at the point of  $2.5 \times 10^5$  Pa.

Fiber variations caused variation in Young's modulus between  $E_I$ ,  $E_T$  and  $E_i$  ( $E_I$  stands for longitudinal Young's modulus where fibers orientate parallelly to indenter,  $E_T$  stands for transversal Young's modulus where fibers orientate perpendicularly to indenter and  $E_i$  is the measured Young's modulus which is related to the fibers orientation angle to be calculated). Where an ellipse can be considered representative of this evolution, Relation (5) can be determined and the local fiber orientation,  $\theta_i$ , estimated as follows:

$$\tan \theta_i = \frac{E_I}{\sqrt{(E_i^2 - E_T^2)}} \cdot \frac{\sqrt{(E_T^2 - E_i^2)}}{E_T} \quad (5)$$

The Young's modulus in the same sample was dependent of the location (Figure 3a). These variations were the result of mixed muscle fiber orientation and were calculated according to the measurement of the local Young's modulus and based on the equation (5) (Figure 3b, c).

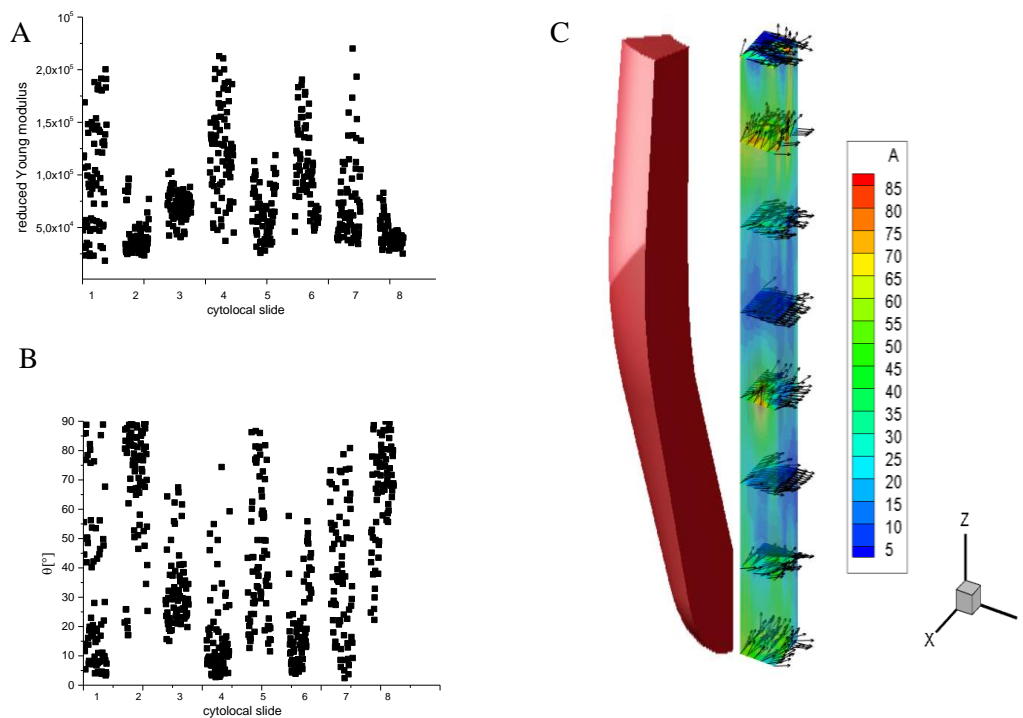


Figure 3. (A) Young's modulus detected on eight heart samples cut into  $100 \mu\text{m}$ ; the value varied at different detection points. (B) Variation in fiber orientation between samples, according to Young's modulus. (C) Representative figure of fiber orientation on different levels of left-ventricle lateral region, result issued from one pig heart out of five, the color-scale represent the fibers orientation angle.

To confirm the accuracy of the calculated fiber orientation, fluorescent microscopic images were taken of the same level. At the basal level of the heart, the general value of Young's modulus was lower than the apex one. Accordingly, the calculated fiber orientation was more vertical at the basal (Figure 4A) than that found at the apex (Figure 4B). This calculated orientation was in accordance with the microscopic fluorescent observation. From the two-dimensional microscopic image, at the basal level, cell arrangement was predominantly in the "Y" direction, which was vertical to the indenter (Figure 4C). At the apex level, cell arrangement was in the "Z" direction, which was parallel to the indenter (Figure 4D).

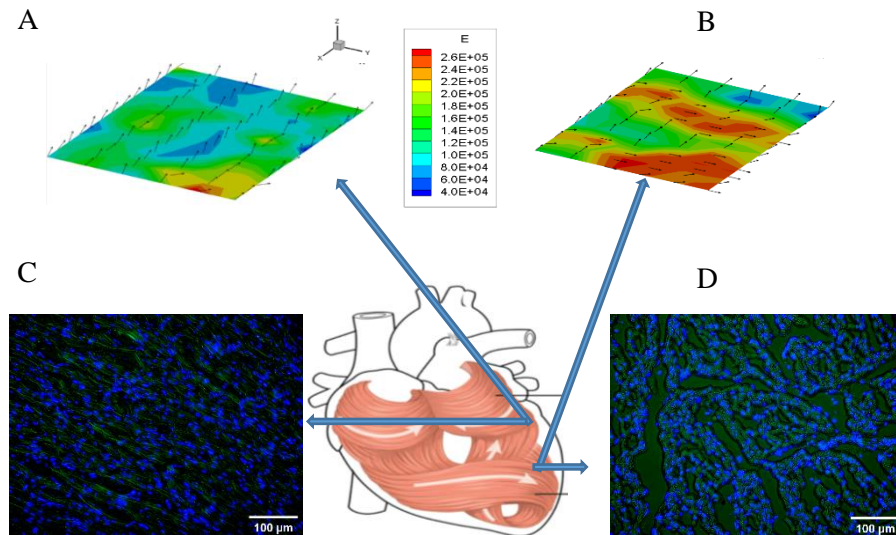


Figure 4. Confirmation of calculated fiber orientation by microscopic fluorescent observation. Representative image of Young's modulus and individual fiber orientation at the basal (A) and apex (B) levels of the heart. Fluorescent microscopic images taken of the basal (C) and apex (D) levels demonstrated a vertical (C) and horizontal (D) arrangement of muscle fiber arrangement. Muscle cells were stained with DAPI for nuclei and with Phalloidin for actin visualization. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

#### 4.3.4.2 Construction of whole left-ventricle model using Finite Element Method

In order to construct the whole left-ventricle model, we assumed that the entire ventricular wall expanded in the same manner as the lateral region. Consequently, the transverse isotropic matrix (5) and average fiber orientation detected (Figure 5A) on eight different levels were introduced as parameters into an FEA. Thus, we constructed a simplified cylindrical model (Figure 5B) and a CT-based mode (Figure 5C).

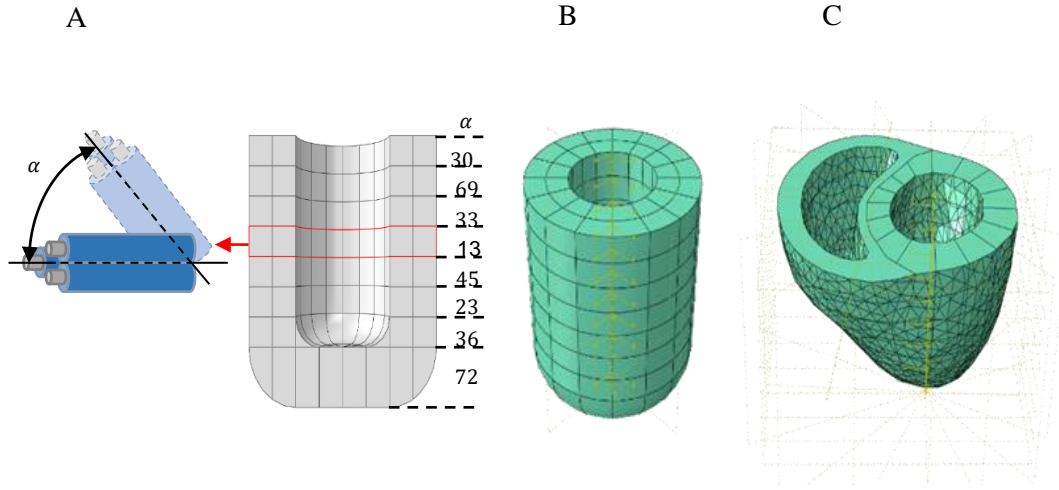


Figure 5. Construction of 3D transverse isotropic model of left ventricle. (A) Average fiber orientation calculated from eight different levels of detected cardiac tissue. (B) Simplified cylindrical model based on average fiber orientation and tissue elasticity. (C) CT-based model constructed with average fiber orientation, tissue elasticity, and 3D abaqus data transferred from CT imaging of the same heart

We defined the transversely isotropic matrix using five independent coefficients: the longitudinal and transverse Young's moduli, noted  $E_L$  and  $E_T$ , respectively; the Poisson ratio in the isotropic plane,  $\nu_{TT}$ , and transverse plane,  $\nu_{LT}$ ; a longitudinal-transverse shear modulus,  $G_{LT}$  (6).

$$C^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{1}{E_T} & -\frac{\nu_{TT}}{E_T} & -\frac{\nu_{LT}}{E_L} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\nu_{TT}}{E_T} & \frac{1}{E_T} & -\frac{\nu_{LT}}{E_L} & 0 & 0 & 0 \\ -\frac{\nu_{TL}}{E_T} & -\frac{\nu_{TL}}{E_T} & \frac{1}{E_L} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{2(1+\nu_{LT})}{E_L} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & G_{LT} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & G_{LT} \end{pmatrix} \quad (6)$$

The symmetry of the stress tensors of the medium implies:

$$-\frac{\nu_{LT}}{E_L} = -\frac{\nu_{TL}}{E_T} \quad (7)$$

The transverse strain could not be measured using nanoindentation. In this work, we assume  $\nu_{LT} = \nu_{TT} \approx 0.49$  to the deformability of the fibers. The shear modulus,  $G_{LT}$ , is determined by the following empirical expression, taken from Lekhnitskii (1981):

$$G_{LT} = \frac{E_L E_T}{E_L(1+2\nu_{LT})+E_T} \quad (8)$$

This formula was established for transversely isotropic rocks, also developed by Van Loocke for skeletal muscles (Van Loocke *et al.*, 2006), and is applied here as a first approximation. All things considered equal, the elasticity matrix of the LV wall was defined as follows in Table 1:

	$C_{1111}$	$C_{1122}$	$C_{2222}$	$C_{1133}$	$C_{2233}$	$C_{3333}$	$C_{1212}$	$C_{1313}$	$C_{2323}$
value	0.35	0.176	0.35	0.00137	0.00137	0.00138	0.0874	0.00226	0.00226

Table 1: transversely isotropic stiffness tensor

#### 4.3.4.3 Mechanical evaluation of the numerical model of the left ventricle

To evaluate the diastole phase of the numerical model, progressively increasing pressure was applied to the ventricular cavity. The simulated ventricular pressure was increased from 5.5 mmHg to 11 mmHg, while the ventricular volume was accordingly increased to 112 mL in the CT-based model and 113 mL in the cylindrical model. This pressure-volume change was compared to a known Pressure-Volume loop issued from a healthy pig heart (Raake *et al.*, 2019). The simulation demonstrated a linear change regression between pressure and volume, which was compatible with the detected P-V loop (Figure 7). This result indicated that the numerical model was capable of simulating the passive filling process of the left ventricle.

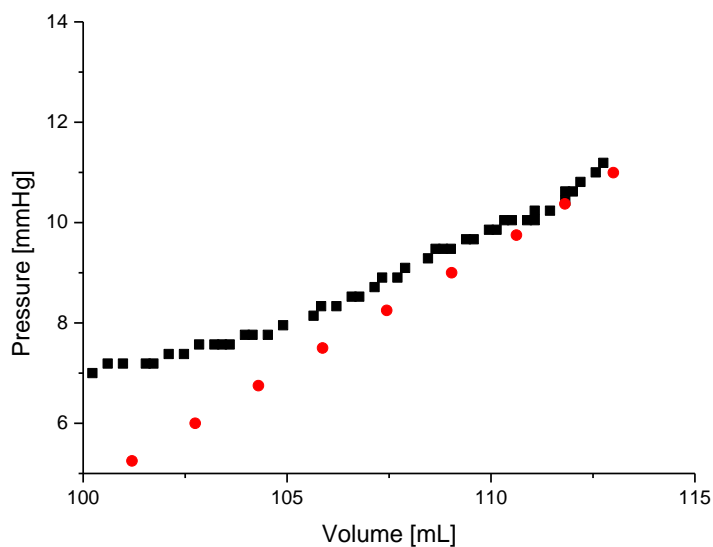


Figure 6: In a detected Pressure-Volume loop (black curve), the left-ventricle volume increased progressively with the ventricular pressure caused by passive filling of blood from the left atrium. The simulated curve (red dot) demonstrated a similar Pressure-Volume relationship, which was a linear trend

During the increase in ventricular pressure, the wall motion was also recorded. In the cylindrical model, displacement was most significant in the basal and apex regions of the heart (3.5 mm). In the CT-based model, the most significant displacement was observed in the apex (4.9 mm), lateral free wall (5.11 mm), and septum (3.5 mm) of the heart. Due to the differently-arranged fibers from the base to the apex, the heart rotation could also be observed during the passive-filling phase, mimicking a real heart (Figure 8 and online video).

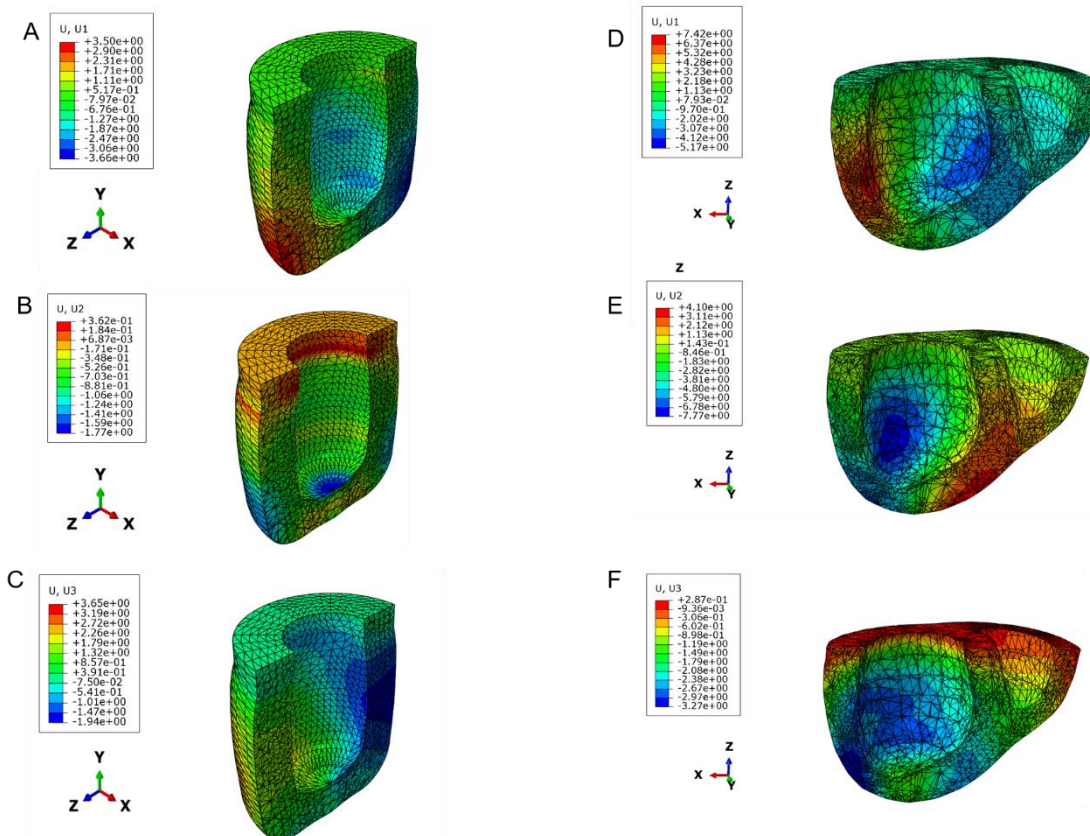


Figure 7. Left-ventricle wall motion during diastole simulation. Wall motion of cylindrical model (A) and CT-based model (B) during diastole revealed differing wall displacement. U1 represents wall motion in the X axis, U2 for the Y axis, and U3 for the Z axis



Figure 8. Ventricular rotation during passive filling phase. A, at the beginning of simulation. B, at the end of simulation. Ventricular rotation can be observed with ventricular cavity filling. Color-scale represent fiber displacement, unite in millimeter. Online video is available for this rotation process.

### 4.3.5 Discussion

In the study presented herein, we characterized the elasticity and fiber orientation of the lateral region of a healthy pig left ventricle. Based on this data and the scanning image of this heart, we constructed a model using FEM.

Cardiac muscle contraction was induced by sarcomeres, adapted according to this anatomic structure, with the indentation test demonstrating that the tissue was less stiff when the indentation tip was parallel to the fibers, meaning the muscle fiber was oriented vertically, at 90°. Since the cardiac muscle fibers are oriented differently from endocardium to epicardium, as well as from the base to the apex of the heart, it is difficult to obtain a complete map of the heart. Our results on eight different levels revealed the change in overall fiber orientation. They were aligned more toward the LV longitudinal axis at the base and apex of the heart than in the middle. This fiber arrangement was further confirmed by microscopy, and corresponded to findings in other studies (Holzapfel and Ogden, 2009; Lombaert et al., 2012; Sánchez-Quintana et al., 1994). As a result, the formula that we proposed can adequately explain the relationship between fiber elasticity and overall fiber orientation. To the best of our knowledge, this is the first study to describe the relationship between fiber orientation and resulting elasticity.

While the fiber elasticity and orientation varies depending on measurement location, the wall motion direction is the result of average fiber orientation and the fibers' elasticity response to ventricular pressure (Wong and Kuhl, 2014). Our results revealed similar average fiber

orientation to that shown by Lombaert et al. (Lombaert et al., 2012). By using an average fiber orientation value, we were able to simplify the data input for the model construction and functional simulation. In this study, the measurements were taken on eight slices. Despite these measurements not containing all layers of cardiac tissue, the continuous fiber orientation change they revealed enabled our prediction of mechanical properties on locations between those histological cuts. Nevertheless, more slices would be needed if one sought to enrich the mechanical information in the model.

Our mechanical simulation based on measured fiber elasticity and orientation confirmed the accuracy of the model. By simulating the P-V loop, our results showed that the numerical model demonstrated a progressive increase in volume caused by internal pressure, which was compatible with a measured P-V loop (Raake et al., 2019). Furthermore, changes in fiber angle distribution are known to alter fiber stress–strain distribution on the LV wall (Palit et al., 2015), and the simulation approach containing fiber angle distribution also revealed a rotation process, which is an important dynamic characteristic of the beating heart (Nakatani, 2011).

All these results together demonstrated that our computational model based on mechanical measurement and imaging data can represent the passive filling course of the left ventricle during diastole. By simulating the change in volume and wall displacement, it also enables detailed information about LV motion to be acquired. This detailed information is especially useful for the manufacturing of biomedical materials for epicardial applications.

The principal novelty of this study is that we found a simple method describing representative fiber orientation calculated within detected Young's modulus. In fact, the existing computational models describing fiber orientation are based on imaging observation (CT, RMI or histology), while the mechanical behavior detection was apart. These two major characteristics were thus lack of relation. Furthermore, the structural characteristics of myocardium, such as the local orientation of the myo- and collagen fibers, are spatially heterogeneous and vary with position throughout the tissue from base to apex and from endocardium to epicardium. Therefore, the myocardium does not actually possess structural uniformity, which is essential to define a representative tissue element for an inhomogeneous specimen (Avazmohammadi et al., 2019). Applying the overall fiber elasticity and calculated mean fiber orientation on different location of the specimen, we are thus able to construct a computation model that contain both the geometric and mechanical properties of myocardium, which were inherently related.

#### Study Limitations

First, the data used for this study was acquired from explanted hearts that were arrested during diastole. Thus, the model described solely the inactive diastole status. Though the systolic



phase was not investigated in this study, systolic wall motion is not the key factor influencing the mechanical performance of epicardial biomaterial.

Secondly, the cardiac tissue used in this study was from the lateral region of the LV, and mechanical testing was effectuated in eight slices from different levels. Even though numerous points were detected on each sample, any information from between slices was thus missed. More histological cuts are therefore needed to better represent the smooth variation of fiber orientation. Furthermore, we built the whole LV using the mechanical information obtained from the lateral region of the LV, and the authors are aware that the different regions of the LV vary in how they expand. Given this, every part of the LV should be measured individually to establish a complete numerical model.

Thirdly, an elasticity matrix was defined by instrumented indentation tests using a spherical tip, yet the Poisson ratio was obtained from the literature. In order to obtain it, other tests are needed. In this study, we consider a linear elastic model. Moreover, the fibers of the heart tissue have directional sensitivity and symmetry. We can thus consider them to be a material with transverse isotropic behavior.

In this study, the orientation of the fibers was defined as constant and an elasticity matrix was established for each layer of the left ventricle. The first simulation showed that this configuration seems to be a good candidate for simulating ventricular diastole. This paves the way for a second study consisting in taking into account the variation in fiber density, viscoelastic behavior, and large deformations.

#### **4.3.6 Conclusion**

The mechanical performance of cardiac tissue is related to local fiber structure. The formula that we propose outlines, for the first time, a way to describe the elasticity of cardiac tissue and underlying fiber orientation. Building off CT imaging, we created a computational model that can accurately simulate the diastole phase of the LV. By modelling LV wall motion during passive diastole filling, our understanding of volume changes and the local deformation of the epicardium will be vastly improved, which will guide advances in the manufacturing of biomaterials for epicardial applications.

### 4.3.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the Nancy Lorraine School of Surgery, France, for their valuable collaboration.

### 4.3.8 Funding

This work was supported by the CARE & ASCATIM FEDER PROJECTS (University of Lorraine).

### 4.3.9 References:

- Bayer, J.D., Blake, R.C., Plank, G., Trayanova, N.A., 2012. A novel rule-based algorithm for assigning myocardial fiber orientation to computational heart models. *Ann Biomed Eng* 40, 2243–2254. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0593-5>
- Chabiniok, R., Wang, V.Y., Hadjicharalambous, M., Asner, L., Lee, J., Sermesant, M., Kuhl, E., Young, A.A., Moireau, P., Nash, M.P., Chapelle, D., Nordsletten, D.A., 2016. Multiphysics and multiscale modelling, data-model fusion and integration of organ physiology in the clinic: ventricular cardiac mechanics. *Interface Focus* 6, 20150083. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2015.0083>
- Cui, H., Liu, C., Esworthy, T., Huang, Y., Yu, Z., Zhou, X., San, H., Lee, S., Hann, S.Y., Boehm, M., Mohiuddin, M., Fisher, J.P., Zhang, L.G., 2020. 4D physiologically adaptable cardiac patch: A 4-month in vivo study for the treatment of myocardial infarction. *Science Advances* 6, eabb5067. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5067>
- Freeman, G.L., LeWinter, M.M., Engler, R.L., Covell, J.W., 1985. Relationship between myocardial fiber direction and segment shortening in the midwall of the canine left ventricle. *Circ Res* 56, 31–39. <https://doi.org/10.1161/01.res.56.1.31>
- Gaetani, R., Feyen, D.A.M., Verhage, V., Slaats, R., Messina, E., Christman, K.L., Giacomello, A., Doevendans, P.A.F.M., Sluijter, J.P.G., 2015. Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials* 61, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.005>
- Holzapfel, G.A., Ogden, R.W., 2009. Constitutive modelling of passive myocardium: a structurally based framework for material characterization. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 367, 3445–3475. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0091>

- Lombaert, H., Peyrat, J.-M., Croisille, P., Rapacchi, S., Fanton, L., Cheriet, F., Clarysse, P., Magnin, I., Delingette, H., Ayache, N., 2012. Human atlas of the cardiac fiber architecture: study on a healthy population. *IEEE Trans Med Imaging* 31, 1436–1447. <https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2192743>
- Martonová, D., Holz, D., Duong, M.T., Leyendecker, S., 2021. Towards the simulation of active cardiac mechanics using a smoothed finite element method. *J Biomech* 115, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.110153>
- Morgan, A.E., Pantoja, J.L., Weinsaft, J., Grossi, E., Guccione, J.M., Ge, L., Ratcliffe, M., 2016. Finite Element Modeling of Mitral Valve Repair. *J Biomech Eng* 138, 021009. <https://doi.org/10.1115/1.4032125>
- Nakatani, S., 2011. Left Ventricular Rotation and Twist: Why Should We Learn? *J Cardiovasc Ultrasound* 19, 1–6. <https://doi.org/10.4250/jcu.2011.19.1.1>
- Niederer, S.A., Lumens, J., Trayanova, N.A., 2019. Computational models in cardiology. *Nat Rev Cardiol* 16, 100–111. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0104-y>
- Palit, A., Bhudia, S.K., Arvanitis, T.N., Turley, G.A., Williams, M.A., 2015. Computational modelling of left-ventricular diastolic mechanics: Effect of fibre orientation and right-ventricle topology. *Journal of Biomechanics* 48, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.12.054>
- Pattar, S.S., Fatehi Hassanabad, A., Fedak, P.W.M., 2019. Application of Bioengineered Materials in the Surgical Management of Heart Failure. *Front Cardiovasc Med* 6, 123. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00123>
- Raake, P.W.J., Barthelmes, J., Krautz, B., Buss, S., Huditz, R., Schlegel, P., Weber, C., Stangassinger, M., Haberkorn, U., Katus, H.A., Most, P., Pleger, S.T., 2019. Comprehensive cardiac phenotyping in large animals: comparison of pressure-volume analysis and cardiac magnetic resonance imaging in pig post-myocardial infarction systolic heart failure. *Int J Cardiovasc Imaging* 35, 1691–1699. <https://doi.org/10.1007/s10554-019-01610-z>
- Sánchez-Quintana, D., Climent, V., Garcia-Martinez, V., Rojo, M., Hurlé, J.M., 1994. Spatial arrangement of the heart muscle fascicles and intramyocardial connective tissue in the Spanish fighting bull (*Bos taurus*). *J Anat* 184, 273–283.
- Van Loocke, M., Lyons, C.G., Simms, C.K., 2006. A validated model of passive muscle in compression. *Journal of Biomechanics* 39, 2999–3009. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.10.016>
- Wang, D.D., Qian, Z., Vukicevic, M., Engelhardt, S., Kheradvar, A., Zhang, C., Little, S.H., Verjans, J., Comaniciu, D., O'Neill, W.W., Vannan, M.A., 2021. 3D Printing, Computational Modeling, and Artificial Intelligence for Structural Heart Disease. *JACC Cardiovasc Imaging* 14, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.12.022>
- Weinberger, F., Mannhardt, I., Eschenhagen, T., 2017. Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circ Res* 120, 1487–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310738>
- Wong, J., Kuhl, E., 2014. Generating fiber orientation maps in human heart models using Poisson interpolation. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 17, 1217–1226. <https://doi.org/10.1080/10255842.2012.739167>



## Chapitre 5

Déploiement de la méthode de caractérisation  
pour un tissu biologique complexe : l'os cortical



# Table des matières

<b>5</b>	<b>DEPLOIEMENT DE LA METHODE DE CARACTERISATION POUR UN TISSU BIOLOGIQUE COMPLEXE : L'OS CORTICAL</b>	<b>135</b>
5.1	PREAMBULE	135
5.2	INTRODUCTION	135
5.3	TITLE: SPHERICAL DEPTH-SENSING NANOINDENTATION OF HUMAN ANTERIOR SKULL BASE BONES: ESTABLISHMENT OF A TEST PROTOCOL	136
5.3.1	<i>Abstract</i>	136
5.3.2	<i>Introduction</i>	137
5.3.3	<i>Material and methods</i>	139
5.3.3.1	ASB samples	139
5.3.3.2	Micro-CT imaging	139
5.3.3.3	Spherical depth-sensing nanoindentation	140
5.3.4	<i>Data analysis</i>	142
5.3.5	<i>Ethical considerations</i>	144
5.3.6	<i>Results</i>	144
5.3.7	<i>Discussion</i>	147
5.3.8	<i>Conclusion</i>	151
5.3.9	<i>Acknowledgments</i>	152
5.3.10	<i>Funding</i>	152
5.3.11	<i>References</i>	152





# Déploiement de la méthode de caractérisation pour un tissu biologique complexe : l'os cortical

## **5.1 Préambule**

Dans ce chapitre, les protocoles et méthodes développés au cours de cette thèse sont appliqués aux os de la base antérieure du crâne ASB (anterior skull base). En effet, les propriétés mécaniques de ces os sont souvent mal comprises en raison de leur géométrie complexe (macro et micro structures) et de leur localisation profonde. Nous avons fait le choix de présenter ces travaux, intitulés « Spherical depth-sensing nanoindentation of human anterior skull base bones: establishment of a test protocol » publiés dans le *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.

## **5.2 Introduction**

Il est particulièrement intéressant pour les chirurgiens de la base du crâne d'évaluer la gamme de forces qu'ils peuvent appliquer pendant les procédures opératoires et de savoir quel type de retour haptique un dispositif de simulation doit produire afin d'être réaliste. Le but de cette étude est d'établir un protocole de mesure afin de fixer les conditions expérimentales pour caractériser des os de la base du crâne antérieur. Un plan d'expérience a été utilisé pour tester les différentes combinaisons possibles de ces facteurs. Deux échantillons d'os ASB provenant de la tête de deux donneurs du corps humain (deux spécimens) ont été sélectionnés en fonction de leur microstructure telle qu'évaluée par micro-CT (microtomographie) : faible porosité (16,87%, os sphénoïde) et forte porosité (79,85%, os ethmoïde). Des séries de 36 nanoindentations (n=288) ont été effectuées sur le spécimen 1 pour étudier l'effet de la température (deux niveaux : 20 ou 37°C), l'état d'hydratation (sec ou immergé dans du chlorure de sodium physiologique salin) et l'analyse de la courbe de chargement selon la théorie du contact (traitement en début ou en fin de courbe).

Les valeurs moyennes du module de Young ( $E^*$ ) réduit varient de manière significative en fonction de l'état d'hydratation et de la microstructure osseuse. Le protocole, après avoir été testé sur un os du fémur dont les caractéristiques mécaniques sont connues, a été appliqué au second spécimen pour confirmation. Cette étude conseille, pour obtenir les propriétés physiologiques des os ASB, de réaliser des tests en immersion, à température ambiante avec une analyse en fin de courbe de chargement. C'est la première fois qu'une étude est menée sur les os ASB en définissant les paramètres expérimentaux liés aux conditions physiologiques.

### **5.3 Title: Spherical depth-sensing nanoindentation of human anterior skull base bones: establishment of a test protocol**

#### **5.3.1 Abstract**

The mechanical properties of anterior skull base (ASB) bones are not well understood due to their complex geometry and deep location. However, it is of particular interest for skull base surgeons to appraise the force range they can apply during procedures and know what kind of haptic feedback a simulation device should produce in order to be realistic for trainees. The aim of this study was to establish a measurement protocol to set the level of hydration state, temperature, curve analysis method for spherical depth sensing nanoindentation of ASB bones. A definitive screening design method was used to test the different possible combinations of these factors. Two samples of ASB bones from the heads of two human body donors (two specimens) were selected according to their microstructure as assessed by micro-CT (microtomography): low-porosity (16.87%, sphenoid bone) and high-porosity (79.85%, ethmoid bone). Depth measurement series of 36 nanoindentations ( $n=288$ ) were performed on specimen 1 according to the L8 Taguchi orthogonal array to study the effect of temperature (two levels: 20 or 37°C), hydration state (dry or immersed in physiological saline sodium chloride), and loading curve analysis according to the Hertzian contact theory (fitting at the start or at the end). The mean values of reduced Young's ( $E^*$ ) modulus varied significantly depending on the hydration status and bone microstructure. In order to obtain the physiological properties of ASB bones, we thus propose performing immersion tests.

To simplify the experimentation protocol, future experiments must include a room temperature level and a fit of the curve at the end of the load. A validation series was performed on the second specimen to assess the set of parameters. The  $E^*$  in dry bone gave mean values of 994.68 MPa, versus 409.79 MPa in immersed bones ( $p < 0.00001$ ). This is the first time a study has been carried out on ASB bones, defining the experimental parameters related to physiological conditions.

**Keywords:** Anterior skull base, bone, spherical depth sensing nanoindentation, temperature, hydration, experimental design, mechanical properties

### 5.3.2 Introduction

Anterior skull base (ASB) bones, comprising the frontal, ethmoid, and sphenoid bones, must be partially broken and resected in many endoscopic endonasal skull-base operations to access tumor or inflammatory lesions. These bone structures are close to vital anatomical structures, such as the internal carotid arteries, brain, and optic nerves (Hosemann and Draf, 2013). Therefore, an understanding of their mechanical properties may help surgeons analyze and prevent surgical complications, such as uneventful perforation of the ethmoid roof (White *et al.*, 2004). It could also be useful to understand what type of haptic feedback a simulation device should give to be realistic for trainees (Favier *et al.*, 2019).

Most biomechanical studies on skull bones report on the behavior of the calvaria, which protects the brain from external injuries, to understand the mechanisms of skull fractures in forensics (Raul *et al.*, 2008) and traumatology (Alexandre *et al.*, 2019). In this perspective, authors have studied the whole bone without distinguishing between cortical and trabecular bone to better understand the mechanisms of skull fractures. The ASB bones, located at the interface between the brain and paranasal sinuses, are of particular interest because of their unusual anatomy, which has no equivalent anywhere in the body. They comprise sections featuring thin bone walls (approximately 100 micrometers' thick) that encompass the paranasal sinuses and are mainly cortical in nature, with no or little trabecular bone (Berger *et al.*, 2013). Due to this unique, complex, and variable anatomy (see geometry, Figure 1), it is impossible to collect standardized specimens to perform common material tests. Therefore, to test the mechanical properties of ASB bones one must consider the microstructure rather than the macroscopic geometry of bone samples.

Spherical depth-sensing nanoindentation is a localized test that studies mechanical properties at the tissue level, related to a microscopic structure. It has never before been used to characterize ASB bones. According to a study by Rodriguez-Florez (Rodriguez-Florez *et al.*, 2013), the tissue-level mechanical properties of bone measured by nanoindentation depends on the hydration state and data analysis method, among other factors.

Thus, the optimal parameters for studying ASB bones using nanoindentation are unknown. According to our previous experiment in sampling thin walls of ASB bones (Favier *et al.*, 2017), the consistency of ASB bones seems to be affected by the hydration state: the more exposed to ambient air the samples were, the more brittle they became. Other parameters may interfere with the results of experiments. For example, samples are usually at room temperature (20°C) during tests, while the body temperature is 37°C. Different analysis methods on loading curves may also influence the final value of the reduced Young's modulus ( $E^*$ ) (Fischer-Cripps, 2001). This modulus is a characteristic that can define the localized mechanical behavior of a material. Subsequently, using this  $E^*$  is a way to compare different structures of bones.

An experimental design was carried out i) to evaluate and define the level of experimental parameters (temperature, hydration, curve analysis) influencing the nanoindentation tests of ASB bones and ii) to analyze the interactions or dependencies between these variables (factors).

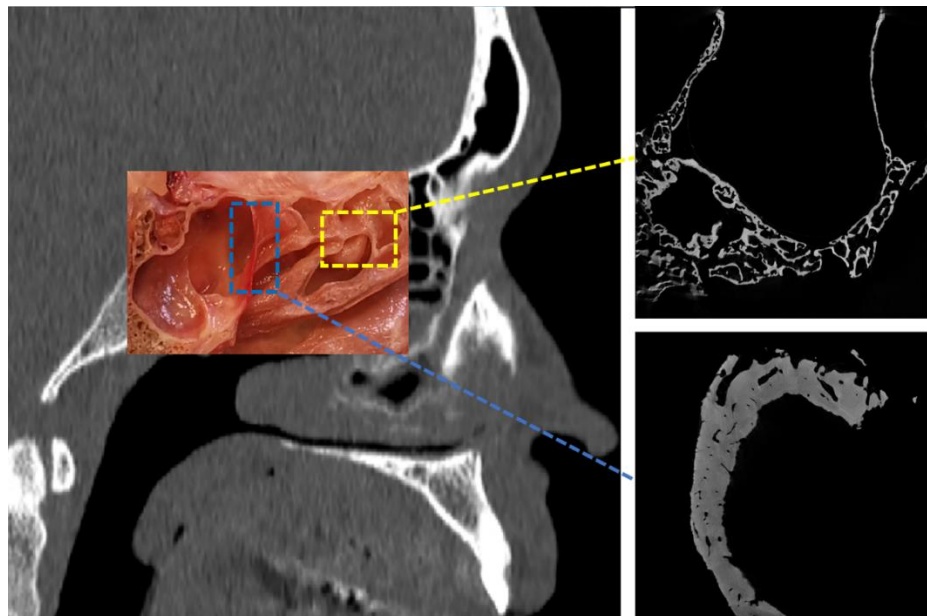


Figure 1: Sample extract sites and micro-CT imaging (Specimen 1). Yellow: ethmoid bone (high-porosity shown in micro-CT), acquisition with 5  $\mu\text{m}$  voxel size; blue: sphenoid bone (low-porosity in micro-CT), acquisition with 3.75  $\mu\text{m}$  voxel size

### **5.3.3 Material and methods**

#### **5.3.3.1 ASB samples**

The samples were extracted from two human heads (two men, 81 and 84 years-old, without known disease related to their skeleton), each from bodies donated to the anatomy laboratory of Nancy, France.

Each head was preserved frozen at -18°C, without any chemical fixation. The samples were not stored in saline, but frozen without medium, just after extraction from the heads. All samples were stored in airtight boxes. For the sampling, the head underwent parasagittal hemisection, and two samples were meticulously extracted from the left side: one from the ethmoid cell walls and one from the anterior wall of the sphenoid sinus (Figure 1). Each bone sample was separated from its surrounding mucosa and periosteum.

In order to avoid the samples deteriorating, they were immediately refrozen following a common procedure (Bakhach et al., 2009, Dall'Ara *et al.*, 2012) for bone sample conservation..

The indent area of 1 mm<sup>2</sup> is selected without visible porosity using the microscope integrated in the system (Rho *et al.*, 1997). A roughness test (Taylor-Hobson, Leicester, United Kingdom) is then performed on this surface. The surface was eligible for nanoindentation when the local roughness defect (Rt) was less than or equal to 0.02 µm for a sampling length of 250 µm (Lc). Before the test, the sample is placed on a sample holder (Petri dish), and fixed with cyanoacrylate and sand grains allowing the adjustment of the horizontality of the surface to be indented (by microscopy integrated in the system). This made it possible to obtain a perpendicularity between the tested surface and the axis of the indenter.

#### **5.3.3.2 Micro-CT imaging**

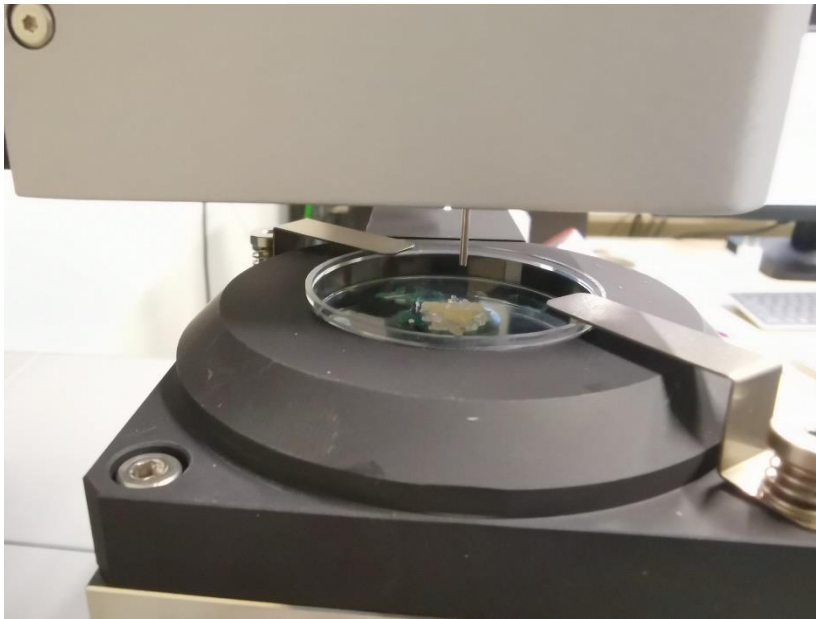
Each sample was scanned using X-ray micro-CT (microtomography) (Figure 1) with the Nanotom S Phoenix x-ray (Baker Hughes GE, Boston, Massachusetts, USA, 180 kV - 150 µA, 25 W) at maximum accuracy according to the size of the sample. Before starting experiments, a blank of detector noise was recorded, then subtracted of radiography data set. Samples were placed frozen in the micro-CT to be thawed in ambient air atmosphere (constant temperature during micro-CT acquisition, approximately 20°C) and put on a polyethylene rod holder with a polystyrene home-made holder stuck on it to avoid samples movement during the acquisition

process. Scanning in air affords the highest contrast between the specimen and surrounding medium (Bouxsein *et al.*, 2010). Total scan time was 144 minutes per sample (0.25° step, 1440 images, 6 second exposure, 80 KVp, 6.5W, microfocus beam 2 µm). The distance between the detector and the source was set to 200 mm and distance sample-source was set to 20 mm, with a constant magnification factor of 13.3. No dilatation was observed during experiments. Voxel size was 3.75 µm in each dimension (isometric) for “low-porosity” bone (LPB) and 5 µm for “high-porosity” bone (HPB). For 3d-imaging reconstruction, the cone-beam algorithm of Feldkamp was applied using Phoenix datos|x software (GE, Boston, Massachusetts, USA). The 3D qualitative representation of the porosity (LPB or HPB, see Figure 1) was obtained by importing the “.raw” file (16 bits) in the 3D software (VGStudio Max 3.3 materials package, Volume graphics, Heidelberg, Germany). To accurately distinguish voids from bone material, some filters were applied (adaptive gauss and opacity mapping filters) on each volume. Finally, the porosity was calculated as the total pore volume divided by the total sample volume (Boughton *et al.*, 2019), using the porosity analysis VGDefX algorithm of VGStudio Max. Porosity rate (obtained from bone volume fraction, BV/TV) and wall thickness were calculated directly from the numerical model of the specimen (Bouxsein *et al.*, 2010).

### **5.3.3.3 Spherical depth-sensing nanoindentation**

An ultra nanoindenter (UNHT<sup>3</sup> Bio) from ANTON-PAAR, Peseux, Switzerland (Figure 2) was used. This system enables testing at penetration depths varying from just a few nanometers to 100 µm, using loads of up to 20 mN. The depth resolution was 0.006 nm and the load resolution 0.001 µN. The radius of the spherical indenter (diamond tip) was 100µm. The contact surface disc generated by indentations did not exceed a radius of 30 µm. The load and unload speeds were intentionally kept low (40 mN/min), enabling us to generate bone elasticity as well as reversible deformations, avoiding any interference from neighboring indentations.

The tool was adapted to enable testing on biological materials in liquid medium.. Raw data curves were obtained using OriginPro 9 software (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).



*Figure 2: Bone samples placed in the Anton Paar ultra nanoindenter (dense bone, dry environment)*

#### 2.4 Experimental design

Due to the nature of ASB bones (different microstructures and organizations), how the environmental factors of the test and their inter-factor interactions influenced the results should be assessed in order to define the optimal test configuration. The following parameters were studied: temperature (two levels: 20°C; 37°C) and hydration (two levels: testing in liquid environment with physiological saline sodium chloride after 1 hour of immersion; in ambient air). To ensure this protocol would be usable for all bone structures, we introduced two “extreme” bone microstructures: one LPB, the other HPB (Figure 1). Furthermore, we studied two analysis methods for characterizing bone structures: one where the loading curve was fitted at the start, the other applying it at the end, to separate any influence of potential residual soft tissues (periosteum) or surface irregularities.

One way of addressing this issue of fixed parameters is to conduct an experimental approach testing the different possible combinations of these factors. We used the “definitive screening design” method according to the following principles (Lundstedt *et al.*, 1998).

Consider an experiment of which the outcome depends on  $p$  parameters. Assume that the range of variations of each parameter can be subdivided into  $n$  levels. The basic experimental design requires  $p^n$  experiments. This is evidently not a feasible approach for problems that depend on a high number of parameters, however, such as those encountered in living organisms. In order to overcome this obstacle, one should use the fractional factorial designs introduced by Genichi Taguchi (Taguchi, 1990)]. Then, one can perform a simplified analysis of interactions and evaluate the impact of each parameter.

Each sample was defrosted at room temperature (20°C) for the micro-CT acquisition and fixed to a support with glue before being tested with the nanoindenter. A series of 36 indentations was performed for each step of the experimental design, using the same load on each sample analyzed. According to an L8 Taguchi orthogonal array (Taguchi, 1990), a total of eight series were performed to analyze all the parameters mentioned above (*i.e.*, 288 indentations, Table 1).

### 5.3.4 Data analysis

Bone tissue has a viscoelastic behavior. It is thus possible that, at very shallow indenter penetration depths, the surface of contact between the sample and indenter takes a similar form to a disc. Given these properties, one can apply an analysis of elastic contact (Jehl *et al.*, 2016). Thus, a strategy enabling to define the range of values on commencing the load was designed, for which the Hertzian contact relation (Hertz, 1882) can be applied. As a brief reminder, this formula establishes the relationship between the force applied ( $F$ ), the relative approach distance between the two elements ( $h$ ), and the radius of the disc contact area ( $a$ ) (formulae (1) and (2)). These formulae implicate also the radius of the indenter's curve ( $R$ ) and the mechanical characteristics of the sample and indenter, *i.e.* their Young's moduli and Poisson's ratios, using the reduced elasticity modulus, defined by formula (3).

$$h^3 = \left( \frac{9.F^2}{16 \times R \times E^{*2}} \right) \quad (1)$$

$$a = (R \cdot h)^{1/2} \quad (2)$$

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_p^2}{E_p} \quad (3)$$



In formula (3),  $E_p$  and  $\nu_p$  represent, respectively, the Young's modulus and Poisson's ratio of the indenter. When the rigidity modulus of the tested material is very weak compared to that of the indenter, it is calculated as  $E^* = E/(1 - \nu^2)$ .

During the indentation testing, the penetration depth was continually recorded according to the applied load. After each test, a series of data pairs  $(F, h)$  was generated, from which one would be able to identify the characteristics of the material tested using formula (1). In log-log plotting, this formula becomes:

$$\ln(F) = \frac{3 \cdot \ln(h)}{2} + \frac{1}{2} \ln\left(\frac{9}{16 \cdot R \cdot E^{*2}}\right) \quad (4)$$

The aim was thus to identify the parameters of a linear function.

Figure 3 presents a test sample. The reduced Young's modulus ( $E^*$ ) was calculated both at the start and end of the loading curve to evaluate the influence of data analysis on measurement. The fittings produced similar scores ( $E^*$ ). Thus, there was no significant difference between the two fittings, but the "end" part of the curve provided a better fit of the slope for the reduced Young's modulus calculation ( $R=1$  for all tests), since surface irregularities were not taken into account.

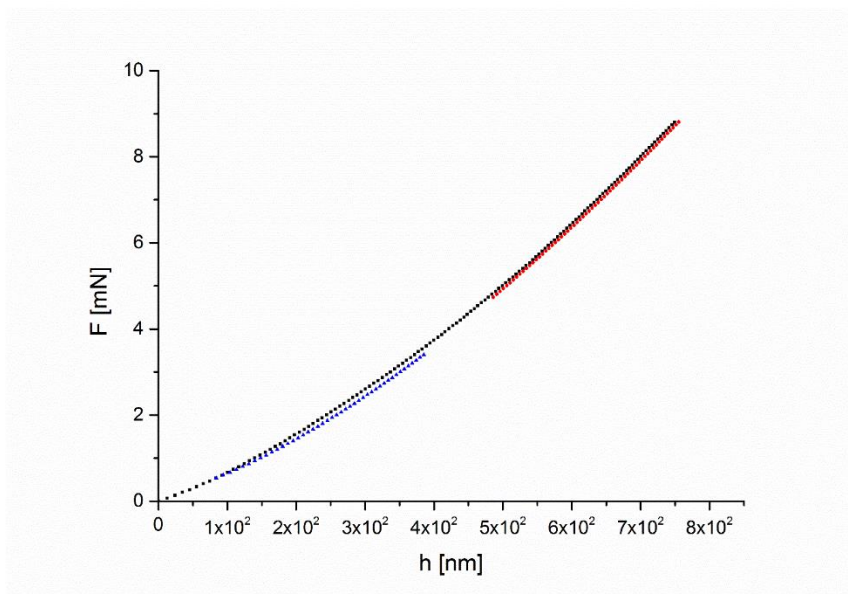


Figure 3: A: B: Comparison of curve analysis on a calibration sample. Black dots: loading curve; blue dots: fit at the start of the curve; red dots: fit at the end of the curve

Test s	Bone microstructure	Hydration status	Temperatur e	Analysi s
# 1	Low-porosity	Dry	20°C	Start
# 2	Low-porosity	Dry	37°C	End
# 3	Low-porosity	Hydrated	20°C	End
# 4	Low-porosity	Hydrated	37°C	Start
# 5	High-porosity	Dry	20°C	End
# 6	High-porosity	Dry	37°C	Start
# 7	High-porosity	Hydrated	20°C	Start
# 8	High-porosity	Hydrated	37°C	End

Table 1: L8 Taguchi orthogonal array for indentation tests configuration

### 5.3.5 Ethical considerations

This study is in accordance with the Helsinki Convention (1964), the French legislation governing the donation of bodies and the relevant guidelines and regulations from the laboratory of anatomy of Nancy, France. Neither donor was from a vulnerable population, and written informed consent was obtained for all anatomical and surgical studies.

### 5.3.6 Results

Bone volume fraction was 20.15 % (porosity of 79.85 %) on HPB and 83.13% % (porosity of 16.87%) on LPB. The minimum thickness of the indented zone was 48  $\mu\text{m}$  for HPB and 105  $\mu\text{m}$  for LPB.

The main results are summarized in Table 1 and categorized by the four parameters of analysis: density of bones, hydration of the environment, temperature of samples, curve analysis. Figure 4 presents a box-plot graph illustrating the mean values and dispersion of  $E^*$  according to the different parameters.

<b>Characterization</b>	<b>Reduced Young's Modulus E* (mean)</b>	<b>Reduced Young's Modulus E* (median)</b>	<b>Standard deviation E*</b>	<b>Range</b>	<b>P-value (test)</b>
<i>LPB</i>	519.66 MPa	491.23 MPa	182.82 MPa	157.61 to 934.08 MPa	< 0.00001 (Welch's t-test)
<i>HPB</i>	350.68 MPa	351.68 MPa	104.65 MPa	147.42 to 545.33 MPa	
<i>Environment: dry</i>	697.13 MPa	665.56 MPa	221.32 MPa	545.33 to 934.08 MPa	< 0.00001 (Wilcoxon)
<i>Environment: liquid</i>	173.21 MPa	177.34 MPa	66.16 MPa	147.42 to 230.2 MPa	
<i>Temperature: 20°C</i>	419.92 MPa	422.2 MPa	109.88 MPa	147.42 to 756.74 MPa	0.0836249 (Welch's t-test)
<i>Temperature: 37°C</i>	450.42 MPa	420.7 MPa	177.60 MPa	157.59 to 934.08 MPa	
<i>Curve analysis: start</i>	403.54 MPa	401.09 MPa	141.48 MPa	147.42 to 756.74 MPa	0.000285377 (Welch's t-test)
<i>Curve analysis: end</i>	466.80 MPa	441.81 MPa	145.99 MPa	157.59 to 934.08 MPa	

*Table 2: Main results of characterization according to studied parameters (Specimen 1)*

A statistical comparison was performed using Welch's t-test for normal distribution variables (density, temperature, and curve analysis) due to the unequal variances in the series. The distribution of values in the "temperature: 20°C" record was not normal, so a Wilcoxon test was performed to compare the effect of porosity on measured mechanical properties. There was no statistical difference between the temperature parameters, yet the bone porosity and environment factors were found to effect significant changes in the measured mechanical properties. A comparison of the loading curve fitting parameters revealed a statistical difference, although the absolute difference was 63 MPa. On the other hand, hydration seemed to have a huge impact on measured properties, varying by up to 400%. Finally, spherical depth-sensing indentation was proven able to distinguish between different porosity levels, leading to different mechanical properties.

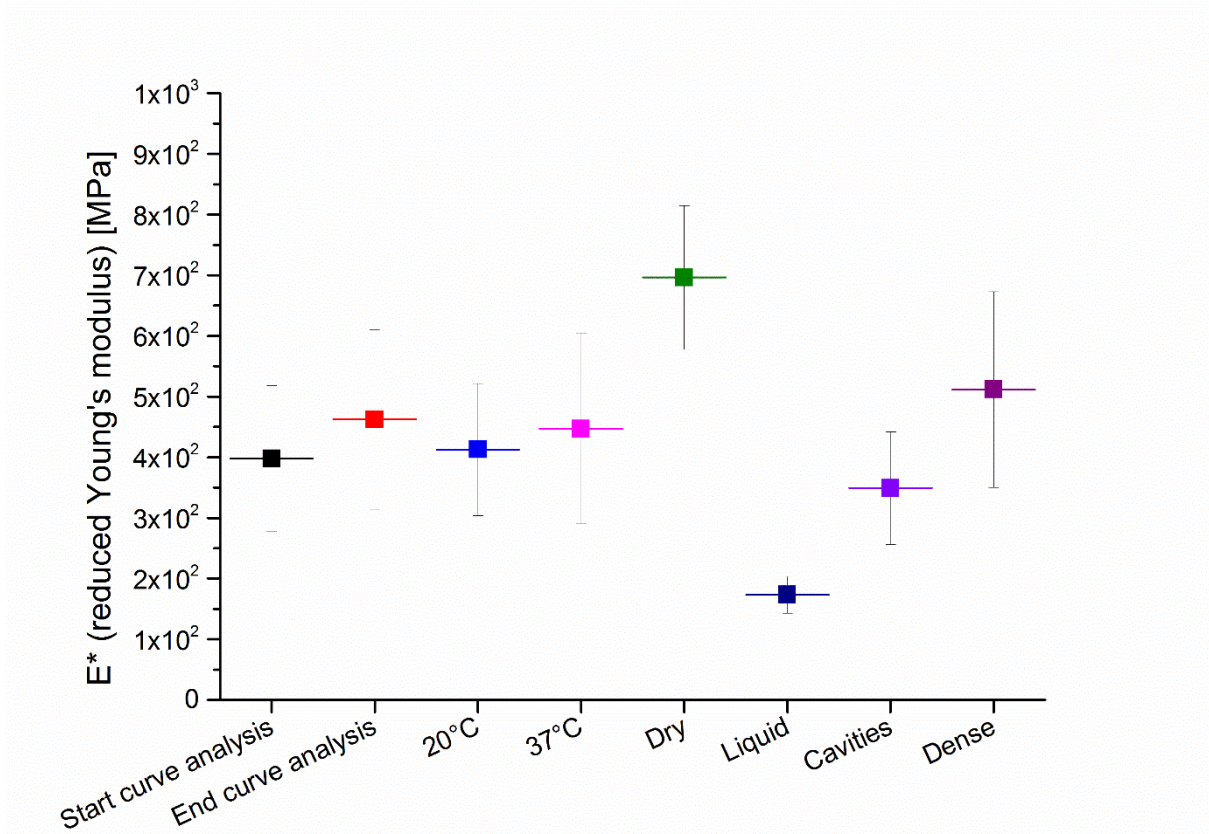


Figure 4: Comparison of *in vitro* properties of anterior skull base bone following different testing parameters (see L8 Taguchi orthogonal array, table 1). Means and dispersions of reduced Young's moduli ( $E^*$ ) for a series of 36 indentations per sample (288 indentations)

To complete the analysis of the impact of individual factors, the presence or absence of interactions between these factors should be verified. Three plots (Figure 5) allow this verification. They are “x–y line plots of cell (level combination) means on the response variable for each level of one factor over all the levels of a second factor” (Lovie, 2005). The title of each plot provide information on the interaction tested.  $E^*$  is represented on the y-axis. On the x-axis, the 2 levels of a studied parameter are represented (discrete variable). Thus, if the lines or profiles corresponding to the separate factor levels are parallel, that is, no differential effect over different combinations of the levels of the factors is revealed, then there is no interaction. If they are not parallel, then an interaction is present.

Figure 5A shows a decreasing trend in  $E^*$  for both bone microstructures (red and blue curves) when the environment changes (dry then liquid). An interaction between bone microstructure and hydration status led to a difference in elasticity between the two bones: greater in a dry environment (approx. 300 MPa) than in a liquid medium (approx. 50 MPa), i.e., a difference of 250 MPa. The slopes of Figures 5.B and 5.C are similar, and the differences are lower than 50 MPa, thus inducing only slight interactions that are negligible.

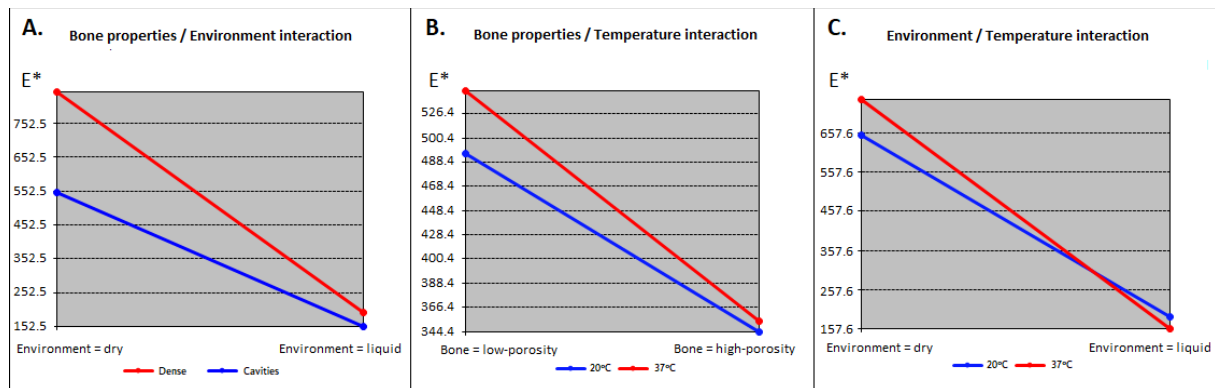


Figure 5: Interaction plot: representation of interactions according to the experimental design method (Lovie, 2005).

### 5.3.7 Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study on the mechanical characterization of the thin bone walls of the ASB. Biological tissues are known for their viscoelasticity behavior (Oyen *et al.*, 2012). The Hertzian load-displacement relation (Hertz, 1882) focuses on the elastic behavior (quasi-static loading at low load). It was used to define the measurement environment of spherical depth sensing nanoindentation.

Waridel *et al.* studied the stress resistance of ethmoid and sphenoid bones using dynamometer measurement (Waridel *et al.*, 1997) to understand the pressure required to cause bone breakage at 11 anatomical sites (bones conserved in 40% ethanol). They identified that highly fragile sites correlated with the location of surgical complications relating to endonasal endoscopic sinus surgery, although did not include characterization of mechanical properties. This finding is of particular interest for Ear Nose and Throat surgeons and neurosurgeons who usually perform endoscopic endonasal surgical procedures. Surgeons need to safely break and remove these walls to access the boundaries of the nasal fossae and sinuses in order to treat infectious diseases or tumors of the ASB.

Thus, understanding the mechanical properties of these bones is essential for surgeons at different levels. First of all, it is important for a better design of surgical simulators. Indeed, surgical simulators (i.e. virtual simulator with haptic feedback and/or physical simulators) have to replicate the complex anatomy and mechanical properties. Indeed, surgical simulators (i.e. virtual simulator with haptic feedback and/or physical simulators) have to replicate the complex anatomy and mechanical properties of ASB bones. This is of course important for improving the visual and haptic realism of simulation, but also mandatory for safety reasons. Ethmoid and sphenoid bones are surrounded by vital structures such as the forebrain, orbits, optic nerves and internal carotid arteries. By practicing with a simulator with inadequate feedback, trainees could learn to apply aberrant and potentially dangerous forces in the operating room (Yamauchi *et al.*, 2002). Furthermore, it could induce negative training transfer (Våpenstad *et al.*, 2017). Second, these data are required for the objective assessment of these simulators. Currently, the “mechanical fidelity” of simulators is only assessed by subjective rating provided by users, as there are no data on the mechanical behavior of these bones. Through biomechanical characterization, simulators may be more “realistic”, by selecting appropriate materials (Favier *et al.*, 2017) or improving haptic feedback (Favier *et al.*, 2019). Third, biomechanical data may help design surgical robots by appraising the range of forces that an automated device may apply on these structures. Finally, knowing mechanical properties is helpful to better understand the mechanisms of ASB bone fracture.

The reason this haptic feedback is still poorly understood may be explained by the complex geometry presented by ASB bones (Figure 1), which are highly resistant to the use of conventional mechanical tests (bending, strain or torsion tests). Such tests require standardized geometrical or polished samples of the material, impossible in this case due to these bones’ anatomical properties. Furthermore, conventional tests do not take into account the variable microstructure that could be related to different mechanical behaviors.

Spherical depth-sensing indentation is an engineering technique involving pressing a hard-tipped material into another material with a known force, which has already been used to characterize the mechanical properties of human femoral cortical bone (Boughton *et al.*, 2018). The elastic modulus of a material is calculated from the loading (Hertz relation (Hertz, 1882)) or unloading curve (Oliver and Pharr theory (Oliver and Pharr, 2004)). The advantage of spherical- rather than sharp-tip indentation is that, at small loads and displacements, the deformation is almost entirely elastic using the former (Oliver and Pharr, 2004). Biological materials are known for their viscoelastic behavior, which can generate unloading curves that are difficult to interpret using the Oliver and Pharr method (Malgat *et al.*, 2016).

In addition, the indentation in a liquid medium makes it difficult to detect the point of contact. This difficulty affects the results from the Oliver and Pharr method, but has no influence on the Hertz relationship (Jehl et al., 2016). To illustrate the impact of the analysis method, an experiment on a well-studied bone (femur cortical bone) is presented in supplementary material (Supplementary material S1). A finite element simulation confirms the validity of the developed method (Supplementary material S2). Arnold and colleagues (Arnold *et al.*, 2017) conducted a systematic review on micro-indentation used to measure cortical bone stiffness. They concluded that “due to the porous nature of cortical bone at the millimeter scale, the apparent elastic modulus at the millimeter scale will be less than the modulus at a smaller material scale, where pores will not affect its stiffness” and recommended combining indentation with high-resolution imaging. In the study presented herein, a nanoindenter associated with micro-CT imaging were therefore used.

The reduced Young's moduli reported in this study are lower than data reported on other cortical bones. The method described here was not intended to provide explanations of such low moduli. However, several hypotheses can be drawn. First, in ASB cortical bones, the orientation of osteons/lamellae is poorly studied but seems to be randomly distributed (Dempster, 1967) (supplementary material S3) and may lead to different mechanical properties (Smit et al., 2002). It is radically different from long bones, where osteons are oriented along the loading force axis in long bone and vertebrae (Roy *et al.*, 1998). Second, the bone mineral density may be different in ASB bones, and will be study in further works. Finally, ASB bones have an embryological origin different from long bones. The former develop from the neural crest, the latter from the mesoderm (McBratney-Owen *et al.*, 2008). A flaw in the measurement method could also have been discussed, but this method was validated on a femur cortical bone (supplementary material S1) and found similar results than previous study using indentation tests (Boughton *et al.*, 2018). Nevertheless, it will be interesting to evaluate the impact of the liquid medium (saline solution) on the nanoindentation results, compared to other liquid medium (Hank's balanced saline solution, HBSS) (Habelitz et al., 2002).

To establish a measurement protocol, environmental parameters must be set to characterize the bone's behavior in a physiological way. Dehydration (Rodriguez-Florez *et al.*, 2013) and temperature are known to increase the stiffness and strength of cortical bone (Nyman *et al.*, 2006). An experimental design was thus created according to the L8 Taguchi orthogonal array (Taguchi, 1990) fixing four parameters: **i**) temperature, **ii**) hydration, **iii**) loading curve fitting method, and **iv**) bone microstructure. **i**) Our results demonstrate that the two temperature levels studied (20 and 37°C) had no impact on the mechanical properties of ASB bones (Figure 4).

Furthermore, temperature had only a weak influence on the environment (Figure 5.C.). Similarly, while there was slight difference in mechanical behavior when comparing the bone structures according to temperature, the effect of this interaction is related to measurement dispersions, and is not significant (Figure 5.B). Thus, to simplify the experimental protocol, we chose to perform future tests at ambient temperature (20°C).

**ii)** In contrast, the hydration status was found to be important, since the results demonstrate a reduced Young's modulus ( $E^*$ ) four times higher in the dry samples (Figure 4). In the human body, water resides within the bone canals and also within the extracellular mineralized matrix (Nyman *et al.*, 2006). We therefore chose to set a liquid environment to replicate the human bone physiology. Furthermore, interaction between bone and hydration status (Figure 5.A) revealed greater difference in the dry environment. We hypothesize that drying improves the difference between low and high-porosity bones in a non-physiological manner (denaturation).

**iii)** The Hertzian contact theory (Hertz, 1882) enabled us to study part (or all) of the loading curve of the nanoindentation tests (Figure 3). The mechanical characterization obtained by curve indentation fitting requires one to hand-select the contact point (beginning of the test) in order to overcome the bone roughness and complex geometric surfaces. This is why we chose to compare tests with the curve indentation fitting at the start (10% to 50% of the load) as well as at the end (50% to 98%) of the load, the latter not requiring human selection. Our results reveal a significant difference of 63 MPa for  $E^*$  (Table 1). This can be explained by the residual soft tissues at the bone surface (periosteum). Curve indentation fitting at the end of the learning curve would appear to be the optimal solution to avoid interpretation bias.

**iv)** The results show the different mechanical properties presented by LPB compared to HPB (Figure 4). HPB cause reduced stiffness consistent with the literature (Cooper *et al.*, 2016). Thus, nanoindentation would appear a suitable technique for studying the mechanical behavior of these bones according to the variation of internal microstructure.

To confirm the protocol based on these parameters, two new bone samples were scanned and tested. The results are summarized in Table 2. This protocol enables the differentiation of bone microstructures, using an environment close to physiological conditions. A thorough analysis and quantification of microstructure via micro-CT will be performed in future experiments, which could explain the standard deviation values (Boruah *et al.*, 2017).



<b>Characterization of specimen 2</b>	<b>Reduced Young's Modulus E* (mean)</b>	<b>Reduced Young's Modulus E* (median)</b>	<b>Standard deviation E*</b>	<b>Range</b>	<b>P-value (test)</b>
<i>Low-porosity bone (10.8%)</i>	994.68 MPa	991.94 MPa	342.52 MPa	434 to 1745.2 MPa	< 0.0001 (Welch's t-test)
<i>High-porosity bone (60%)</i>	409.79 MPa	379.07 MPa	175.14 MPa	206.09 to 755.56 MPa	

*Table 3: Main results of characterization in protocol validation (specimen 2)*

### 5.3.8 Conclusion

The aim of the study was to define the environment for ASB bones measurements. The choice of comparison from E\*, associated with suitable measurement conditions (low load, low loading speed), represents a first step in the characterization of these bones.

Nanoindentation associated with micro-CT imaging would appear to be the optimal technique to characterize the mechanical properties of thin ASB bone walls, capable of differentiating between samples according to microstructure. Furthermore, to obtain the physiological properties of ASB, the tests must be performed involving immersion. Temperature during testing does not interfere with the mechanical properties, and future experiments should ideally be performed in 20°C temperature and a liquid (physiological saline sodium chloride) environment to measure ASB mechanical properties. Finally, it is recommended to perform curve fitting at the end of the load.

Future experiments will use the integrated Sinus Mode, which enables to perform Dynamic Mechanical Analysis for depth profiling of mechanical properties (HIT, EIT vs. depth) and measurement of viscoelastic properties (E', E'': storage and loss moduli, tan δ) on samples ranging. Viscoelastic indentation responses will be examined based on an approach using elastic-viscoelastic correspondence. These experiments will be coupled with a precise analysis of microstructure (bone mineral density, orientation of the osteons) using micro-CT. Furthermore, other mechanical tests will be performed (uniaxial and biaxial traction) to study the anisotropy of ASB bones.

### **5.3.9 Acknowledgments**

The authors wish to acknowledge the laboratory of anatomy of Nancy, France, for their valuable collaboration, Mrs Kathryn Atkins for the English editing, and the ASCATIM FEDER PROJECT (University of Lorraine) and CarMoSim startup company for their valuable participation and support.

### **5.3.10 Funding**

This work was partially funded by the “Collège Français d’ORL et chirurgie cervico-faciale” (no grant number available).

### **5.3.11 References**

Alexander SL, Rafaels K, Gunnarsson CA, Weerasooriya T. Structural analysis of the frontal and parietal bones of the human skull. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 1 févr 2019;90:689-701.

Arnold M, Zhao S, Ma S, Giuliani F, Hansen U, Cobb JP, et al. Microindentation - a tool for measuring cortical bone stiffness? A systematic review. *Bone Joint Res*. 2017 Sep;6(9):542–9.

Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. *Organogenesis*. 2009;5(3):119–26.

Berger G, Eviatar E, Kogan T, Landsberg R. The normal uncinatè process: histology and clinical relevance. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. mars 2013;270(3):959-64.

Boruah S, Subit DL, Paskoff GR, Shender BS, Crandall JR, Salzar RS. Influence of bone microstructure on the mechanical properties of skull cortical bone - A combined experimental and computational approach. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;65:688–704.

Boughton OR, Ma S, Zhao S, Arnold M, Lewis A, Hansen U, et al. Measuring bone stiffness using spherical indentation. *PLOS ONE*. 2018 Jul 12;13(7):e0200475.

Boughton OR, Ma S, Cai X, Yan L, Peralta L, Laugier P, et al. Computed tomography porosity and spherical indentation for determining cortical bone millimetre-scale mechanical properties. *Scientific Reports*. 2019 May 15;9(1):1–15.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(7):1468–86.

Cooper DML, Kawalilak CE, Harrison K, Johnston BD, Johnston JD. Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(5):187–98.

Dall'Ara E, Schmidt R, Zysset P. Microindentation can discriminate between damaged and intact human bone tissue. *Bone*. 2012 Apr;50(4):925–9.

Dempster WT. Correlation of types of cortical grain structure with architectural features of the human skull. *American Journal of Anatomy*. 1967;120(1):7–31.

Favier V, Zemiti N, Caravaca Mora O, Subsol G, Captier G, Lebrun R, et al. Geometric and mechanical evaluation of 3D-printing materials for skull base anatomical education and endoscopic surgery simulation - A first step to create reliable customized simulators. *PLoS ONE*. 2017;12(12):e0189486.

Favier V, Gallet P, Subsol G, Captier G. Understanding the Biomechanical Properties of Skull Base Tissues Is Essential for the Future of Virtual Reality Endoscopic Sinus and Skull Base Surgery Simulators. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2019;12(2):231-2.

Fischer-Cripps AC. Study of analysis methods of depth-sensing indentation test data for spherical indenters. *Journal of Materials Research*. juin 2001;16(6):1579-84.

Habelitz S, Marshall GW, Balooch M, Marshall SJ. Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech*. 2002 Jul;35(7):995–8.

Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*. 1882;92:156–71.

Hosemann W, Draf C. Danger points, complications and medico-legal aspects in endoscopic sinus surgery. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Dec 13;12:Doc06.

Jehl J, Pierson G, Voignier A, Kouitat Njiwa R. On the depth sensing indentation on liquid environment for application to biological tissue. In: Kongoli F, Kobe S, Calin M, Dong C, editors. *Sustainable Industrial Processing Summit SIPS 2016 Volume 2: Dubois Intl. Symp. / Complex Metallic Systems. Volume 2*. Montreal(Canada): FLOGEN Star Outreach. 2016. p. 94-95.

Lovie, P. Interaction Plot. In *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science* (eds B.S. Everitt and D.C. Howell). 2005. doi:10.1002/0470013192.bsa307

Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, et al. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 24 août 1998;42(1):3-40.

Malgat R, Faure F, Boudaoud A. A Mechanical Model to Interpret Cell-Scale Indentation Experiments on Plant Tissues in Terms of Cell Wall Elasticity and Turgor Pressure. *Front Plant Sci.* 2016;7:1351.

McBratney-Owen B, Iseki S, Bamforth SD, Olsen BR, Morriss-Kay GM. Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Dev Biol.* 2008 Oct 1;322(1):121–32.

Nyman JS, Roy A, Shen X, Acuna RL, Tyler JH, Wang X. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *J Biomech.* 2006;39(5):931–8.

Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of Materials Research.* 2004 Jan;19(1):3–20.

Oyen ML, Shean TAV, Strange DGT, Galli M. Size effects in indentation of hydrated biological tissues. *Journal of Materials Research.* 2012 Jan;27(1):245–55.

Raul J-S, Deck C, Willinger R, Ludes B. Finite-element models of the human head and their applications in forensic practice. *Int J Legal Med.* sept 2008;122(5):359-66.

Rho J-Y, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials.* 1997 Oct 1;18(20):1325–30.

Rodriguez-Florez N, Oyen ML, Shefelbine SJ. Insight into differences in nanoindentation properties of bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2013 Feb 1;18:90–9.

Roy ME, Rho JY, Tsui TY, Evans ND, Pharr GM. Mechanical and morphological variation of the human lumbar vertebral cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res.* 1999 Feb;44(2):191–7.

Smit TH, Huyghe JM, Cowin SC. Estimation of the poroelastic parameters of cortical bone. *Journal of Biomechanics.* 2002 Jun 1;35(6):829–35.

Taguchi G. *Introduction to Quality Engineering*, Asian Productivity Organization, Tokyo, 1990.

Våpenstad C, Hofstad EF, Bø LE, Kuhry E, Johnsen G, Mårvik R, et al. Lack of transfer of skills after virtual reality simulator training with haptic feedback. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2017 Dec;26(6):346–54.

Waridel F, Monnier P, Agrifoglio A. Evaluation of the bone resistance of the sphenoid and ethmoid sinuses. *Laryngoscope.* 1997 Dec;107(12 Pt 1):1667–70.

White PS, Nassif R, Saleh H, Drew T. Pilot study of a device for measuring instrument forces during endoscopic sinus surgery. *Acta Otolaryngol.* 2004 Mar;124(2):176–8.

Yamauchi Y, Yamashita J, Morikawa O, Hashimoto R, Mochimaru M, Fukui Y, et al. Surgical Skill Evaluation by Force Data for Endoscopic Sinus Surgery Training System. In: Dohi T, Kikinis R, editors. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention — MICCAI 2002*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2002. p. 44–51. (Lecture Notes in Computer Science).



# Conclusion Générale

Lors de ce travail, la caractérisation mécanique du myocarde a été menée à partir du dispositif d'indentation instrumentée. Ces essais ont apporté des résultats reproductifs et une description mécanique originale concordant avec les observations histologiques. La méthode associant les essais d'indentations instrumentées aux observations histologiques constitue donc un moyen d'analyse pertinent des microstructures biologiques complexes dans des conditions *ex vivo* bien définis. Plus précisément, la nanoindentation instrumentée à pointe sphérique s'est avérée être un essai mécanique adapté au regard de la fragilité globale du muscle cardiaque.

Dans cette approche, nous avons basé notre hypothèse sur l'élasticité supposée du tissu cardiaque à l'état basal, permettant des déformations réversibles conformes à l'observation clinique. Bien que le tissu biologique possède une propriété viscoélastique et ne puisse être considéré comme purement élastique, la théorie du contact adaptée aux tissus mous a permis une estimation raisonnable de ses propriétés mécaniques. La relation de Hertz a été appliquée dans sa formulation classique, elle assure une représentation précise de l'essai d'indentation, mais se limite à de faibles pénétrations. Une évolution de la relation de Hertz issue des relations de SNEDDON a été réalisée et permet d'augmenter le domaine de la courbe d'indentation utile à la caractérisation de l'échantillon.

Afin d'étudier la stabilité des caractéristiques mécaniques du *tissu ex-vivo* en absence de vascularisation, des essais d'indentations ont été réalisés sur des échantillons pendant 24 heures. Les résultats obtenus ont permis d'estimer la durée de maintien des caractéristiques mécaniques des échantillons à 4 heures (évolutions très faibles et non significatives). Les conditions d'essais doivent être rigoureuses et limitées aux premières heures pour garantir une bonne robustesse des essais. La rigidité du tissu augmente progressivement dès l'extraction du milieu naturel par déshydratation et réorganisation moléculaire proportionnellement à la durée post prélèvement.

Par ailleurs, il nous semble pertinent d'étendre ces mesures à différentes situations qui influencent la rigidification du tissu cardiaque comme par exemple différents états pathologiques ou encore des caractérisations de rigidification tardive telles qu'elles peuvent être appliquées en médecine légale.

La morphologie du cœur est complexe. Son architecture aussi bien à l'échelle macroscopique et histologique est encore aujourd'hui débattue. Ainsi notre travail s'est concentré sur la mesure et la comparaison de différents échantillons de tissus cardiaques porcins découpés dans la région latérale du ventricule gauche le long du grand ou du petit axe. Ces premiers résultats ont confirmé la nature anisotrope du tissu cardiaque. Afin de relier cette anisotropie à la nature fibreuse du tissu, des échantillons de tissu cardiaque porcine ont été prélevés de la base vers l'apex du ventricule gauche. Les caractéristiques mécaniques obtenues ont montré des résultats qui évoluent suivant un « régime sinusoïdal ». Les informations morphologiques du tissu cardiaque, issues de l'imagerie, montrent également une évolution de l'orientation des fibres du myocarde qui constitue probablement le déterminant principal de la variation des valeurs obtenues. Une caractérisation mécanique à partir d'indentations instrumentées menées systématiquement sur l'ensemble du ventricule gauche devrait apporter une réponse à la question encore d'actualité, sur la constitution du myocarde en un muscle pouvant se dérouler en une seule bande ou en une juxtaposition de « paquets de fibres ». Plus globalement, une caractérisation mécanique à partir d'indentations instrumentées menées systématiquement sur l'ensemble du cœur devrait contribuer à différencier les parois du cœur. Par exemple, s'il est bien entendu i) que le ventricule gauche est plus puissant que le ventricule droit : la pression est plus élevée à l'entrée de l'aorte qu'à l'entrée de l'artère pulmonaire et ii) que le muscle qui compose le ventricule gauche est également nettement plus épais, des questions demeurent sur la comparaison des microstructures de chaque ventricule.

Les informations obtenues à partir des résultats des essais d'indentations instrumentées menés sur le myocarde, ont permis de définir une matrice d'élasticité d'une bio-prothèse du tissu cardiaque porcine. La simulation de la phase diastolique à partir des caractéristiques de cette bio-prothèse a montré une déformation compatible avec celle du ventricule gauche in vivo. De nombreux points restent cependant à traiter pour caractériser une telle prothèse même si les premiers essais menés sur un modèle murin (rats) de notre membrane s'avèrent déjà prometteurs. Par ailleurs, de nombreuses pathologies impliquent de sortir du cadre de la théorie des petites déformations. La transition vers un modèle à grandes déformations sera alors indispensable.



Parallèlement aux travaux menés sur le tissu cardiaque, nous avons mené une étude sur les os ASB (anterior skull base) afin de généraliser le protocole de mesure à différents matériaux biologiques. La nanoindentation associée à l'imagerie par micro-CT semble être la technique optimale pour caractériser les propriétés mécaniques des parois osseuses minces de l'ASB en fonction de leur microstructure.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et peuvent s'appliquer dans les domaines de la caractérisation mécanique, de la compréhension des tissus biologiques et même de manière ambitieuse dans le domaine de la thérapeutique.

Par exemple, une première perspective de ce travail de thèse est l'élaboration d'un matériau de substitution ou d'addition passif sous forme de membranes dont les propriétés mécaniques sont proches de celles du myocarde. Des premiers prototypes ont été réalisés et implantés sur le petit animal. Cette membrane développée dans le cadre du projet européen ASCATIM, permettra d'assurer le rôle d'interface avec un exosquelette dont le rôle est de maintenir la fonction contractile du ventricule gauche dans le cadre du traitement des infarctus du myocarde sévères et contribuera au développement de nouvelles thérapies à partir de composants actifs tels que des cellules souches encapsulées au sein de la membrane. Une deuxième perspective serait l'étude de la morphogénèse du cœur. En effet l'acquisition de sa forme et la création d'un tissu contractile sont fortement dépendantes des interactions mécaniques dans l'environnement direct des cellules en développement (mécano transduction, rôle de l'apesanteur etc.).

Ainsi les perspectives de cet axe de recherche sont ambitieuses et au-delà de contribuer à la description des matériaux biologiques et des biomatériaux, elles peuvent s'étendre à la conception de dispositifs reproduisant fidèlement les caractéristiques physiques du vivant.

## **Résumé**

### ***Title : Indentation instrumentée du tissu cardiaque : vers l'élaboration d'une bio-prothèse***

Malgré des progrès indéniables dans la compréhension de la fonction cardiaque et dans l'amélioration des techniques médicales et chirurgicales, l'insuffisance cardiaque ischémique représente toujours une cause majeure de mortalité dans le monde. De nouvelles approches thérapeutiques, telles que la médecine régénérative et le génie tissulaire, sont développées pour compenser voire se substituer aux tissus endommagés. Une des tentatives de l'ingénierie tissulaire est de reproduire le plus fidèlement possible le comportement mécanique du tissu à traiter. Dans ce travail de thèse, une approche liant la caractérisation mécanique du tissu cardiaque sain avec sa microstructure a été réalisée. A cet effet et afin d'éviter la dégradation des propriétés du matériau due à son assèchement et/ou à sa dé-vascularisation, un protocole expérimental a été défini permettant d'effectuer les mesures dans un environnement proche de son milieu physiologique. Le tissu cardiaque a été ainsi caractérisé à travers l'estimation des modules d'Young suivant deux directions principales par indentations sphériques. Ces résultats ont confirmé ainsi la nature anisotrope du tissu cardiaque. La recherche des durées limites d'exploitation des échantillons après prélèvement (expérimentation ex-vivo) nous a permis de définir une cinétique de rigidification des tissus pouvant être comparée aux techniques de datation utilisées en médecine légale. Une perspective à ces travaux de thèse est l'élaboration d'un matériau de substitution passif dans le but d'obtenir des membranes dont les propriétés mécaniques sont proches du tissu cardiaque. Sur la base de la caractérisation mécanique du myocarde, une modélisation du comportement mécanique d'une bio-prothèse a été définie. Un premier prototype de membrane a été réalisé et expérimenté sur le petit animal. Ces résultats ont constitué une étape indispensable dans le développement d'une assistance biomécanique dans le cadre d'un projet européen FEDER ASCATIM (2018-2021). Enfin, une première transposition de la méthode développée pour le tissu cardiaque a été proposée pour un matériau biologique dont les caractéristiques mécaniques sont peu connues : l'os cortical.

### ***Title : Instrumented indentation of cardiac tissue: towards the development of a bio-prosthesis***

Despite undeniable progress of the heart function understanding and in the improvement of medical and surgical techniques, ischaemic heart failure is still a major cause of death worldwide. New therapeutic approaches, such as regenerative medicine and tissue engineering are being developed to compensate or even replace damaged tissues. One of the attempts of tissue engineering is to reproduce as closely as possible the mechanical behavior of the tissue to be treated. In this thesis work, an approach linking the mechanical characterisation of healthy heart tissue with its microstructure was carried out. To this end and in order to avoid the degradation of the material properties due to its drying out and/or de-vascularisation, an experimental protocol was defined to perform the measurements in a context close to its physiological environment. The cardiac tissue was thus characterised through the estimation of Young's modulus in two main directions by spherical indentation. These results thus confirmed the anisotropic nature of the cardiac tissue. The search for the time limits for using the samples after collection (ex-vivo experimentation) enabled us to define a tissue rigidification kinetics which can be compared to the dating techniques used in forensic medicine. One perspective to this thesis work is the development of a passive substitute material in order to obtain membranes whose mechanical properties are close to those of cardiac tissue. On the basis of the mechanical characterization of the myocardium, a model of the mechanical behavior of a bio-prosthesis has been defined. A first membrane prototype has been produced and tested on small animals. These results were an essential step in the development of biomechanical assistance within the framework of a European ERDF ASCATIM project (2018-2021). Finally, a first transposition of the method developed for cardiac tissue was proposed for a biological material whose mechanical characteristics are unknown: cortical bone.